

Serotyping in Patients with Chronic Hepatitis C

Soon-Mo Chang[†]

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

To determine the clinical usefulness of Immuno Blot test, 160 samples from the patients with chronic HCV infection were analyzed. And serotyping and line probe assay were performed to evaluate the distribution of hepatitis C virus genotypes in Korean isolates. In this group, as a result of genotyping type 1b and 2a, the serotype I and II were the most common source of HCV infection. There were no significant difference in response to the alpha-interferon HCV infection treatment with the subtype 1b or 2a. And the serotypes of NS4 peptides were compared with the genotypes to evaluate their clinical usefulness. Among 49 cases studied for genotypes and serotype, genotype 1b, 1b/2b, 2a, 2a/2c and 2b were 51.0%, 2.0%, 34.6%, 8.1% and 4.0%, respectively. The serotypes I and II were 57.1% and 42.8%, respectively; they were matched with genotypes in 85.7% and seemed to be easy to perform. To monitor their performing progress or treatment response, serotype test was made before the genotype test. The Result showed that there was no significant difference in response to the alpha-interferon HCV infection treatment with the subtype 1b or 2a in Korea.

Key Words: Hepatitis C virus (HCV), HCV serotype and genotype

서 론

C형 간염 바이러스 (hepatitis C virus, HCV)는 크기가 80 nm 이하의 작은 바이러스로서 1989년 Choo 등에 의해 그 genome의 구조가 밝혀졌는데 약 10,000개의 nucleotide와 약 3,000개의 아미노산을 가진 single stranded RNA 바이러스이다. HCV 감염의 진단은 혈청 항체를 검출하는 방법과 PCR을 이용하여 바이러스의 RNA를 직접 검출하는 방법이 있다. 그리고 간접적으로 ALT의 활성을 보거나 직접적으로 간생검이 이용될 수 있으나 양자 모두 선별 검사에는 적합한 방법이 될 수 없다. 또한 항체 검사는 항체 형성기간 동안에는 진단이 어려우며, 환자가 감염 후 회복되었는지 현재 바이러스혈증이 있는지를 구분하기가 어렵다¹⁷⁾. 반면에 역전사 중합효소연쇄반응 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)에 의한 바이러스 RNA의 검출은 감염 후 수일 후부터 가능하다. HCV는 유전적 이질성에 따라 여러 가지 아형이 있고, HCV 아형간에 지역 분포, 질병 유발 정도¹²⁾ 및 치료에 대한 반응 정도가 다른 것으로 보고되고 있다¹¹⁾. 한국에서도 PCR법을 이용한 HCV의 유전자 아형 (genotype)이

알려져 있으며, 흔히 관찰되는 아형이나 간질환별 분포는 일본과 유사하다고 보고되고 있다^{18,19)}. HCV의 유전자 아형간에 c100-3 단백질에 대한 제 1세대 anti-HCV ELISA 및 제 2세대 재조합 면역블롯법 (recombinant immunoblot assay, RIBA)에 대한 반응이 차이가 있음이 밝혀졌고¹³⁾, c-33 및 c-22 단백질에 대해 양성도가 다른 것이 알려짐에 따라¹⁾ 최근에 혈청학적 아형 (혈청형, serotype) 검사법이 고안되었는데 이것은 아형 특이 아미노산에 대한 항체를 효소 면역법으로 검출하는 검사법이다. 한국의 HCV 혈청형 분포는 김 등에 의하면 대부분이 1형과 2형으로 보고되어 있으며, 일본의 경우 혈청형 I형이 가장 흔히 관찰되고 (74%, 74/100), II형이 22% (22/100), 그리고 혼합형이 2% (2/100)에서 각각 관찰되었다는 보고가 있다¹⁴⁾. 현재 HCV의 유전자 배열에 따라 적어도 6개의 HCV 유전자형과 11개 아형이 세계 각지에서 동정되었다¹⁵⁾.

C형 간염 (HCV)의 자연 경과를 보면 임상 증상이 가벼운 경우가 대부분이다. 그러나 간조직 검사상 반수 가량에서 만성 활동성 간염이 발견되고 적어도 20% 이상에서 20년 내에 간경변증으로 진행하며, 간암 발생율이 년 1~4%인 것으로 알려져 있어 C형 간염은 적절히 치료되어야 한다²⁻⁴⁾. IFN- α 로 치료하는 것이 C형 간염의 기본 치료이지만 장기적인 치료 효과는 만족스럽지 못하다. IFN- α 치료받은 반수 이하에서 생화학적 및 바이러스 제거 등의 개선이 나타나고 대부분은 완전한 치료를 끝낸 후 6개월 이내에 재발한다. 국내에서는 IFN 치료와 유전자형에 대한 연구는 일부에 불과할 뿐이며 특히 PCR 법에 의한 유전자형 검사는 채혈 후 즉시 분

*논문 접수: 2003년 12월 1일

수정재접수: 2003년 12월 15일

[†]별책 요청 저자: 장순모, (우) 660-757 경남 진주시 상봉서동 1142, 진주보건대학 임상병리과

Tel: 055-740-1849, Fax: 055-740-1846

e-mail: smchang@chc.ac.kr

리하여 얻은 검체나 -70℃에 보관하여야 하는 검체에 대한 엄격한 요건이 요구되어 유전자형 검출 성적이 낮아 보다 검출성적이 높은 유전자 특이성 항체를 검출하는 방법인 HCV 혈청형과 치료 효과와의 관련성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

1999년 9월부터 2001년 4월까지 부산 지역 종합병원 내과에서 HCV 감염으로 의심되어 면역 블롯검사 결과 양성인 검체 150예 및 음성인 검체 10예 총 160예를 사용하였다. 양성인 검체 133예 중 혈청형 (serotype)과 유전자형 (genotype)이 모두 검출될 수 있었던 49예를 대상으로 양자의 아형을 비교하였으며 이 49예에 대한 IFN 치료 효과를 검증하였다. IFN (Intermax alpha, 제일제당) 치료는 3,000,000 units씩 일주일 동안 격일로 세번 투여하여 6개월 동안 실시하였다.

2. 연구방법

1) 면역블롯법

면역블롯은 시약회사 지침 (HCV blot 3.0, Genelabs, Singapore)에 따라 실시하였다. HCV genome의 capsid, NS3, NS4, NS5 영역으로 나오는 core, NS3-1, NS3-2, NS4, NS5의 5개의 제조항 펩티드가 있는 nitrocellulose strip을 희석된 혈청과 대조액으로 반응시킨 후, 비결합된 물질을 제거하기 위해 세척하고 affinity purified anti-human IgG with alkaline phosphatase를 넣어 반응시켰다. 비결합 conjugate를 세척에 의해 제거하고 가시적인 blot로 하기 위해 BCIP/NBT와 반응시켜 판독하였다. 판독 기준은 시약 회사 지침에 따라 실시하였다.

2) HCV serotyping 1-6 assay

Murex HCV Serotyping 1-6 Assay kit (Murex Diagnostics, UK)를 이용하여 제조회사의 설명서에 지시된 방법대로 BRIO 자동 EIA측정기 (BRIO, Italy)를 사용하여 검사하였다. 검체 결과 판정은 H well의 흡광도가 G well의 흡광도보다 0.1 이상 크고 또한 가장 높은 흡광도를 나타낸 well의 흡광도가 H

well의 흡광도의 0.4배가 넘을 때만 신뢰성이 있는 결과로 판정하였다.

3) Line probe에 의한 HCV 유전자 아형 결정

Random primer로 HCV cDNA를 합성하였고, PCR은 Gene-Amp PCR system 9600 thermal cycler에서 outer primer로 94℃, 30초간 denaturation, 55℃, 30초간 annealing, 72℃, 30초간 extension하는 조건을 30회 시행하였다. PCR 산물 중 1/10을 취하여 inner primer로 같은 조건 하에서 nested PCR을 시행하였다. Nested PCR 산물 10 μl를 type specific probe가 코팅된 strip과 반응시켜 유전자형을 결정하였는데 INNO-LiPA HCV kit (INNOGENETICS N.V., Belgium)에서 제시하는 방법대로 시행하였다.

4) IFN 치료 효과의 판정 기준

Hino 등의 제안에 기준하여 IFN 치료 종료 후 정상화된 혈청 ALT치의 지속과 함께 계속적으로 음전화된 HCV RNA가 존재하였을 때를 완전 관해로 하였고 혈청 ALT치는 계속 정상치를 지속하나 계속해서 HCV RNA가 양성으로 나타날 때를 불완전 관해로 평가하였으며 완전 관해와 불완전 관해에 해당되지 않는 예를 무반응으로 분류하였다 (Table 1).

결 과

1. HCV immunoblot

HCV 양성인 검체 150예와 대조군으로 음성인 검체 10예 등 총 160예를 대상으로 면역 블롯 검사를 실시한 결과 면역 블롯법의 진양성율은 88.6%를 나타내었으며 면역블롯법이 스크리닝 검사에서 유용한 것으로 나타났다.

2. HCV serotype과 genotype

HCV 면역블롯법에서 양성을 나타낸 133예에 대하여 혈청형과 유전자형 검사를 실시하여 양자가 모두 검출되는 49예를 서로 비교한 표는 Table 2와 같다. 이 표에서 보면 혈청형

Table 1. Guideline for IFN efficacy for the patients with HCV

Complete Response:	
Continuous normal ALT Level after IFN therapy	
Continuation of changed HCV RNA (-) after therapy	
Incomplete Response :	
Continuous normal ALT Level after IFN therapy	
But Continuation of HCV RNA (+) after IFN therapy	
Non-Response:	
Case that exclude complete and incomplete response	

Table 2. Comparison between HCV genotyping and serotyping

Genotypes	Serotyp (No. of cases)					
	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5	Type 6
Total						
1b	23	2				25
1b/2b	1					1
2a	2	15				17
2a/2c	1	3				4
2b	1	1				2
Total	28	21				49

*Concordance rate: 84.4%

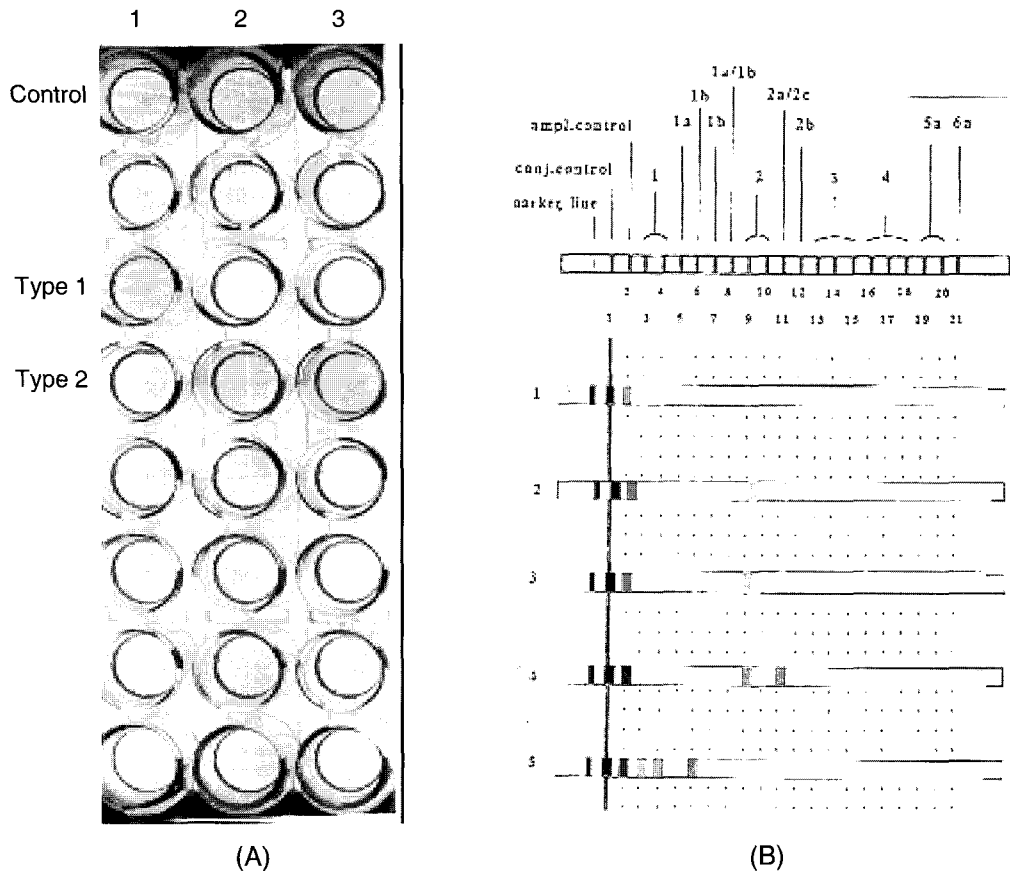


Fig. 1. The results of HCV serotyping (A) and genotyping (B). In serotyping cases lane 1 and lane 2~3 are type 1 and type 2. In genotyping, cases 1, 2, 3, 4, 5 are type 1b, 2a/2c, 2a/2c, 2b and 1b, respectively.

검사에서 총 49예 중 28예 (57.1%)가 I형, 21예 (42.8%)가 II형을 나타내었으며 유전자형 검사에서 1b형이 25예 (51.0%), 1b/2b를 나타낸 예가 1예 (2.0%), 2a형이 17예 (34.6%), 2a/2c를 나타낸 예가 4예 (8.1%) 그리고 2b형이 2예 (4.0%)를 나타내어 대부분이 1b와 2a형을 나타내었으며 1a형은 한 예도 없었다. 혈청형 검사 및 유전자형 검사 시에 반드시 대조군으로는 HCV 음성인 예를 매 lot 마다 동시에 시행하였다. HCV 간질환 환자 133예 중 41예에서 혈청형을 결정할 수 없었으며 혈청형이 밝혀진 92예 중 43예가 유전자형이 결정되지 않았다. 이에 혈청형과 유전자형의 동시 검출이 가능했던 49예를 서로 비교하였다. 이 표에서 보면 양자 검사에서 일치율은 85.7%를 나타내었으며 mixed형은 불일치로 판정하였다 (Table 2). Fig. 1은 혈청형과 유전자형의 결과를 나타낸 것이다.

3. Response to alpha-interferon

IFN 치료를 받았던 49예의 환자에 대한 치료 효과를 나타낸 것은 Table 3과 같다. 이 표에서 보면 49환자 중 20예가 (40.8%) 완전 관해를 나타내었으며 5예 (10.2%)가 불완전 관

해를, 그리고 24예 (48.9%)가 치료에 무반응을 나타내었다. 불완전 관해를 포함한 관해율은 1b형이 52.0%, 2a형이 47.0%를 나타내었다. 그들의 연령 분포는 25세~56세이었고 평균 연령은 37세이었다. 불완전 관해는 5예 (10.2%)로서 처음에는 혈청 ALT치는 정상 수치로 내려갔으나 HCV RNA가 음전화하지 않은 예이었다. 무반응 24예 중 12예 (50.0%)가 1b형을 나타내었으며 9예 (37.5%)가 2a형이었다 (Table 3, 4).

고찰

C형 간염 바이러스 (hepatitis C virus; HCV) 감염은 수혈 받은 사람의 7~10%에서 발생하는 수혈의 비교적 흔한 합병증으로서 HCV 감염자 중 50% 이상은 만성 간질환으로 이행되는 데 이중 20% 정도는 만성활동성간염, 간경화 등에 걸리게 되고 간암 발생의 위험을 증가시키게 된다. HCV 검출용 진단시약이 제 1세대에서 제 3세대로 바뀌면서 예민도와 특이도가 개선되었지만, 6,851개의 anti-HCV 반복 양성 검체 중 국산 면역블롯법으로 39%만 진양성 (reactive)을 보이고 불확정 (indeterminate) 및 음성 (non-reactive)이 각각 9%

Table 3. Response to α -interferon treatment in 49 patients chronically infected with HCV by HCV genotype

HCV subtype	No of patients	No (%) of patients with given responses		
		Complete response	Incomplete response	Non-response
1b	25	10	3	12
1b/2b	1		1	
2a	4	2		2
2a/2c	17	7	1	9
2b	2	1		1
Total	49	20	5	24

1b type vs. non 1b type; $p>0.05$

Table 4. Response to α -interferon treatment in 49 patients chronically infected with HCV by HCV serotype

HCV subtype	No of patients	No (%) of patients with given responses		
		Complete response	Incomplete response	Non-response
Type 1	28	9	5	14
Type 2*	21	11		10
Total	49	20	5	24

* $p>0.05$

와 52%로서 위양성이 여전히 문제가 되므로 EIA만으로 anti-HCV 검사 결과를 통보하는 것은 임상적으로 문제시 된다고 지적하고 있다. 그리고 헌혈자 혈액을 대상으로 하였을 때 제 1세대 EIA 양성 중 확인 검사에서는 대략 30% 가량에서만 진양성이었으며, 제 2세대 EIA 양성 중 대략 40%에서, 그리고 제 3세대 EIA 양성 중 대략 54%에서 진양성을 보인다고 한다²²⁾. 일반적인 항체 검사법 만으로는 위양성이 높아 환자로 하여금 불필요한 PCR 검사, 초음파 검사 등을 시행하는 오류를 범할 위험이 높다. 검사자간에 진양성율의 결과가 차이가 나는 원인은 아마 anti-HCV EIA 시약의 차이, 면역블롯 구성 펩티드의 차이 및 반복 양성 검체의 사용 등으로 추정되나 앞으로 더 연구하여야 할 사항으로 생각된다. HCV는 70%의 homology를 나타내는 바이러스의 heterogeneous group으로 존재하게 된다. Okamoto 등은 HCV 감염 환자에서 8.2년의 경과 중에 3시점을 잡아 각 시점의 혈청에서 8~10 클론의 HCV주를 분리하여 HVR (hypervariable region)의 염기배열 및 아미노산을 비교한 결과, 급성기에서는 10 클론 전부가 동일한 아미노산을 가졌지만 보균자가 된 4년 이후에는 HVR의 25 아미노산 염기 중 6~8 아미노산이 치환되어 2~3종류의 클론으로 변하고 그 4년 후에 완전히 새로운 수 종류의 클론으로 변하였다고 보고하였다⁹⁾. 그리하여 그들은 이 사실이 HVR의 변이가 HCV 유전자 전체의 변이의 약 10배에 해당된다고 하면서 HCV의 지속 감염 상태에

서는 시간이 경과함에 따라 새로운 변이주의 축적을 시사한다고 하였다. 그러므로 genome 배열이 보존된 영역 내에서 조그마한 유전자 변이의 차이를 이용한 혼합 primer를 이용하여 유전자형에 의한 HCV 분류가 가능하게 되었다. 이들 유전자형의 분류는 core 혹은 NS5 부위의 변이를 기준으로 type I, II, III 및 IV의 4가지형으로 분류한 Okamoto 등 분류와 E1 혹은 NS5 부위의 변이를 기준으로 type 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 5a 및 6a 등으로 나눈 Simmonds 등의 분류를 비롯하여 여러 학자마다 서로 다른 기준과 이름으로 분류되고 있어서 유전자형 비교연구에 어려움을 초래하여 왔으나, 현재에는 Simmonds 등에 의한 분류가 국제적으로 인정되고 있다.

본 연구에서 133예의 HCV 간질환자를 대상으로 NS4 펩티드를 이용한 혈청형 검출법을 실시한 결과 92예에서만 혈청형을 결정할 수 있었으며, 나머지 41예에서는 결정할 수가 없었다. 혈청형이 결정된 92예 중 43예에서 유전자형이 결정되지 않았다. 133예에 대하여 혈청형과 유전자형 검사를 실시하여 양자가 모두 검출되는 49예 중 혈청형 검사에서는 28예 (57.1%)가 1형을, 21예 (42.8%)가 2형을 나타내었다. 국내의 보고에서 김 등은 HCV 감염자 중 1형은 57.4%, 2형은 42.6%라고 보고하여 본 연구의 성적과 유사하였다. HCV 혈청형의 분류 방법이 상이하여 직접 비교는 할 수 없으나 일본의 보고도 이 연구 성적과 유사하였다. McOmish 등에 의

하면 일본과 대만에서는 1형과 2형이 주로 나타나는데 비하여 홍콩, 마카오 등에서는 1, 2형 및 6형이 특징적으로 나타난다고 보고하고 있다. Yoshioka 등이 만성 C형 간염 환자 102명을 대상으로 Okamoto 등의 분류에 따라 보고한 유전자형의 빈도는 II형 57%, III형 27%, IV형 3%, 혼합형 2%, 그리고 unknown 11% 등이었다. 이것들을 Simmonds 등의 분류로써 해석하면 본 연구의 성적과 유사하였다. Nishizono 등은 유전자형 검출 보고에서 I형은 57 bp, II형은 144 bp, III형은 174 bp, 그리고 IV형은 123 bp에서 증폭상을 확인할 수 있었다고 하였다. 그 결과 그들은 I형이 0.9%, II형이 72.8%, III형이 13.6%, IV형이 8.7% 그리고 혼합형이 3.9%로써 II형이 대다수를 점하며 II형은 III형에 비해 인터페론 치료 효과 반응이 나쁘다고 하였다. 즉 각각의 유전자형에 대한 인터페론의 치료에 의한 치료효율 (RNA음성화율)은 II형이 46.7% (34.7%)이고 III형은 78.6% (64.3%)로서 유전자형에 따라 인터페론의 효과의 차이가 있다고 하였다. 한편 IFN은 세가지 단백질로 구성되어 있다. 즉 바이러스의 활성을 저해 하는 능력을 가진 α , β , γ 이다. α 와 β 는 주로 항중식성과 항바이러스성의 성격을 가진 반면에 γ 는 주로 면역조절기능을 가지고 있으므로 장기간 IFN으로 치료하면 간경화를 가진 C형 간염 환자 간암의 발생을 막을 수 있다고 한다^{3,8,10,16}. IFN- α 치료의 다양한 효과는 지금까지의 HCV 치료 중 가장 효과적인 것으로 알려졌다. 치료에 대한 효과 발현은 이전에는 ALT수치의 정상화로 규정했지만 HCV RNA의 소멸이 진정한 marker이며 완전 관해의 확인이 병행되어야 한다. 만성 HCV 환자의 IFN 치료를 받은 49예를 대상으로 분석한 결과 49환자 중 20예 (40.8%)가 완전 관해를 나타내었으며 5예 (10.2%)가 불완전 관해를, 그리고 24예 (48.9%)가 치료에 무반응을 나타내었다. 불완전 관해를 포함한 관해율은 1b형이 52.0%, 2a형이 47.0%를 나타내었다. 그들의 연령 분포는 25세~56세이었고 평균 연령은 49세이었다. 불완전 관해는 5예 (10.2%)로서 처음에는 혈청 ALT치는 정상 수치로 내려갔으나 HCV RNA가 음전화하지 않은 예이었다. 무반응 24예 중 12예 (50.0%)가 1b형을 나타내었으며 9예 (37.5%)가 2a형이었다. 본 연구에서도 낮은 연령층과 HCV 감염의 기간이 짧은 그룹에서 좋은 예후를 나타내어 타 보고와 유사한 결과를 나타내었다^{12~15}. 특히 HCV의 유일한 치료제인 인터페론의 치료 효과 판정은 환자의 경제적 부담을 절감할 수 있고, 질병의 정확한 효율적 관리를 위해서는 현재 기본요소로 이용되는 인자들인 연령, 감염 기간 및 간경화증의 존재 등보다 HCV RNA의 정량과 유전자형의 결정이 중요하다고 하겠다.

감사의 글

이 논문은 진주보건대학 학술연구논문 연구비에 의해 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Alonso C, Lamelin JP, Sanjose S, Vitvitski L and Berby F (1994): Serological responses to different genotypes of hepatitis C virus in France. *J Clin Microbiol*, **32**: 211-212.
- 2) Alter H (1991): Descartes before the horse: I clone, Therefore I am : The hepatitis C virus in current perspective. *Annals of Internal Medicine*, **115**: 644-649.
- 3) Andreone P, Gramenzi A, Cursaro C, Sbolli G, Fiorino S, Giammarino LD, Miniero R, D'Errico A, Gasbarrini G and Bernardi M (1999): Interferon- α course: results of a randomized multicenter trial. *Journal of Hepatology*, **30**: 788-793.
- 4) Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdayn CS, Wain M, Kleiner DE, Mahaney K and Hootnagle JH (1995): Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, Double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*, **15**: 694-699.
- 5) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW and Houghton M (1989): Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**: 359-362.
- 6) Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G and Houghton M (1990): The major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *British Medical Bulletin*, **46**: 423-441.
- 7) Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC, Perrillo RP, Carey W, Jaconson IM, Payne J, Dienstag JL, Van Thiel DH, Tamburro C, Lefkowitz J, Albrecht J, Mesc-hievitz C, Ortego TJ and Gibas A (1989): Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferone alpha. A multicenter randomized, controlled trial. *N Eng J Med*, **321**: 1501-1506.
- 8) Davis GL (1992): Genomic variation of hepatitis C virus: Clues to clinical variation? *Gastroenterology*, **103**: 345-349.
- 9) Hino K, Kaku K and Niwa A (1999): IFN therapy for chronic active HCV. *J Medical Technology*, **37**: 1111-1116.
- 10) McOmish F, Chan SW, Dow BC, Gillon J, Frame WD, Crawford RJ, Yap PL, Follett EAC and Simmonds P (1993): Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: investigation of type specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion*, **33**: 7-13.
- 11) Nishizono A (1994): Summary and evaluation of genome and antibody diagnosis in hepatitis C virus infection. *Rinsho Byori*, **42**: 1240-1247.

- 12) Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F and Miyakawa Y (1992): Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol*, **73**: 673-679.
- 13) Omata M, Ito Y, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Takano S, Hosoda K, Tada M, Ohto M, Ito K and Okuda K (1991): Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of eight-week course of recombinant α -interferon for chronic non-A, non-B hepatitis. *Dig Dis Sci*, **36**: 1217-1222.
- 14) Peignoux MM, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N and Poliquin M (1995): Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol*, **22**: 1050-1056.
- 15) Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J and Urdea MS (1993): Classification of hepatitis C virus into six major genotype and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*, **74**: 2391-2399.
- 16) Tanaka K, Ikematsu H, Hirohata T and Kashuwa S (1996): Hepatitis C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma among Japanese: possible role of type 1b infection. *J Natl Cancer Inst*, **88**: 742-746.
- 17) Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, Yaqui T, Koida I, Saitoh S, Hashimoto M, Iwasaki S, Kobayashi M and Hiromitsu K (1994): Factors predictive of response to interferon- α therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, **19**: 1088-1094.
- 18) Yoshioka K and Kakumu S (1994): Predicting factors for the response to Interferon therapy against hepatitis C virus infection: HCV Genotyping. *J Clin Pathol*, **42**: 1010-1014.
- 19) Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, Higashi Y, Shibata M and Morishima T (1996): Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationship to genotype of hepatitis C virus. *Hepatology*, **43**: 101-104.
- 20) Zaaijer H, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G and Lelie PN (1993): Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet*, **341**: 722-724.
- 21) 김영아, 김현숙, 한광협 (1998): C형 간염 바이러스의 혈청형과 HCV RNA 정량적 분석. *대한임상병리학회지*, **18**: 259-264.
- 22) 오홍범, 황유성, 조연정, 김두성, 김상인 (1997): 국내 헌혈자에서의 항-HCV 항체 면역블롯검사 경험. *대한수혈학회지*, **8(1)**: 1-7.
- 23) 은상진, 서장수, 김종규, 이원길, 김재식, 송달효, 김인수 (1994): 한국인 헌혈자에서 EIA 확인검사 및 RT-PCR을 이용한 C형 간염 양성률 비교. *대한수혈학회지*, **5**: 9-15.
- 24) 이정녀, 황은주, 조종래, 함건주, 이은엽, 손한철, 김순호 (1991): 건강공혈자와 B형 및 비A 비 B형 급성간염 및 만성 간질환 환자에 있어서 혈청 간염 C 바이러스 항체에 관한 연구. *대한임상병리학회지*, **11**: 207-214.
- 25) 이진경, 홍석일, 황유성, 이선호, 민원기, 성영철, 이동순 (1996): 한국의 C형 간염 바이러스 RNA 양성인 간질환자 및 건강공혈자에서의 C형 간염 바이러스 유전자형의 분포 양상. *대한임상병리학회지*, **16**: 528-539.