

만성 B형 간질환에서 간염 B virus 표식자 발현에 따른 DNA의 검출

영남대학교 의과대학 내과학 교신

이동준 · 최진수 · 김준환 · 이헌주

서 론

B형 간염 바이러스(hepatitis B virus; HBV) 감염은 세계적으로 널리 분포되어 있으며 우리나라에서도 인구의 약 8%가 HBV의 보유자로(김정룡, 1988) HBV는 만성 간질환 및 간세포암 발생의 가장 중요한 원인으로 밝혀져 있다.

HBV에 의한 간손상의 자세한 기전에 대해서는 아직도 명확하게 밝혀지지는 않았으나 HBV의 지속적인 증식과 체내 면역학적 체계의 상호작용에 의한 것으로 인정되어 있고(Eddleston과 Mondelli, 1986; Ferrari 등, 1986) HBV 보유자에서 HBV의 감염력과 간질환의 활성도 평가에 있어서 HBV의 증식여부를 파악하는 것이 가장 중요하다고 보고되고 있다(Chu 등, 1985). 혈청내 HBV의 증식여부와 감염력을 알기 위하여 일반적으로 B형 바이러스의 e항원 및 항체(HBeAg, anti-HBe) 검사가 이용되고 있다(Okada 등, 1976; Alberti 등, 1978). 바이러스 증식이 활발하고 간의 염증이 진행되는 상태에서는 HBeAg이 지속되거나 anti-HBe로 전환이 되면 바이러스 증식이 멈춰지고 간의 염증도 관해 상태에 이른다고 알려졌으나(Alberti 등, 1978; Realdi 등, 1980) 최근의 여러 보고들은 HBeAg/anti-HBe 검사 체계만으로는 HBV의 동태를 정확히 파악할 수 없다고 한다(Raimondo 등,

1982; Brecque 등, 1986).

혈청내 HBV DNA의 존재는 바이러스 입자의 증식을 뜻하므로 HBV의 증식을 반영하는 가장 확실한 증거는 HBV의 DNA를 확인하는 검사이며, 혈중 HBV DNA의 검출이 만성 B형 간질환의 활성도 및 감염력의 평가에 있어서 바이러스의 동태를 가장 잘 나타내는 지표로 인정되고 있다(Hadziyannis 등, 1983; Lok 등, 1984). 최근 혈청 HBeAg 및 anti-HBe 표식자 검사와 혈중 HBV DNA를 직접 검출할 수 있는 dot blot법을 비교 연구한 결과 HBeAg 및 anti-HBe 표식자 검사와 DNA 발현 양상과는 일치하지 않는 것으로 밝혀졌다(Bonino 등, 1981; Waller 등, 1982).

현재까지 혈중 HBV DNA를 직접 검출할 수 있는 여러 방법들이 개발되어 있는데 기존의 DNA 검출법중 가장 먼저 개발된 것은 dot blot(또는 spot blot)법이며 이 검사는 최소 검체당 1 ~ 2pg의 DNA가 있어야 양성으로 나타나며(Scotto 등, 1983) HBV 보유자의 경우 혈중 바이러스 농도가 이보다 낮은 경우가 상당수 있으므로 HBV에 감염된 모든 환자에 있어서 HBV의 동태를 정확하게 파악할 수가 없었다(Lieberman 등, 1983; Matsuyama 등, 1985; Waller 등, 1987). 1985년 Saiki 등(1985)이 처음으로 시행한 DNA 증합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction; PCR)은 특

정 부위의 DNA서열을 수시간내에 백만배 이상 증폭할 수 있는 방법으로 극미량의 DNA만 검체 내에 있어도 이를 검출해 낼 수 있어 DNA 연구 분야에서 활발히 응용되고 있다(Saiki 등, 1988; Eisentein, 1990). 최근 PCR이 HBV의 연구에도 이용되고 있으며 HBV와 관련된 만성 간질환에서 혈중 HBV의 증식상태를 파악하는데 가장 정확한 표식자로 알려진 HBV DNA를 PCR을 이용하여 검출하면 기존의 방법들보다 훨씬 낮은 농도의 HBV DNA도 검출할 수 있다고 보고되고 있다 (Kaneko 등, 1989).

이에 본 연구에서는 dot blot법과 PCR에 의한 각각의 HBV DNA의 양성율을 비교하고 HBV에 감염된 여러 상태의 간질환 환자에서 기존의 HBeAg 및 anti-HBe 표식자 검사체계 결과와 DNA 검출 결과를 비교 분석하여 HBV와 관련된 각종 간질환 환자에서의 임상적 평가에 미치는 의미를 더욱 정확히 평가하고자 한다.

대상 및 방법

1994년 8월부터 1995년 12월까지 영남대학교 의과대학 부속병원 내과에 내원한 혈청 HBsAg 양성인 환자들을 대상으로 6개월 이상 추적관찰시 자각증상, 이학적 소견 및 생화학적 검사상 정상 소견을 보인 무증상 HBsAg 보유자 17예, 이학적 소견, 생화학적 검사소견 및 간침생검에 의하여 진단된 만성 간염 환자 91예, 생화학적인 염증 소견이 경미하고 임상적으로 비장중대, 반복되는 복수 등 대상불능(dccompensation)의 소견을 주로 하는 간경변증 환자 57예, 간경변증의 합병 유무에 관계없이 확진된 원발성 간세포암 환자 27예, 총 192예를 대상으로 하였으며 이들의 질환별, 성별, 연령별 분포는 표 1과 같다. 대상 환자들에 대한 체혈은 외래 및 입원실에서 무균적으로 시행하여 원심분리 후 혈청만을 취하여 -20°C에 보관하였다가 사용하였다.

Table 1. Patient characteristics

Diagnosis	No. of patient			Mean age ± SD (years)	Serum HBeAg/anti-HBe status	
	Male	Female	Total		+/ -	- / +
Carrier	11	6	17	37.1 ± 10.1	9	8
CH	69	22	91	35.9 ± 9.3	50	41
LC	33	24	57	49.5 ± 9.1	21	36
HCC	21	6	27	52.3 ± 8.3	10	17
Total	134	58	192	42.8 ± 9.2	90	102

* All patients were positive for serum HBsAg.

Carrier: asymptomatic HBsAg carriers, CH: chronic hepatitis, LC: liver cirrhosis, HCC: hepatocellular carcinoma with or without cirrhosis.

Table 2. Synthetic oligonucleotide sequences for HBV PCR

	oligonucleotide sequences	Nucleotide position
outer sense	5' - GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAA - 3'	1691 - 1710
outer antisense	5' - CTGACTACTAATTCCTGGATGCTGGGTCT - 3'	1810 - 1829
inner sense	5' - GGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATT - 3'	2007 - 1986
inner antisense	5' - ACTAATTCCTGGATGCTGGGTCTTCCAAA - 3'	2253 - 2235

HBsAg은 Ausria® (Abbot, USA)를 이용하여 방사면역측정법으로, HBeAg과 이에 대한 항체인 anti-HBe는 Abbot-HBe® (Abbot, USA)를 사용하여 방사면역측정법으로 검출하였다. dot blot법을 위하여 Hepatitis B Viral DNA kit(Abbott, USA)를 사용하였다. PCR은 환자의 혈청 200 µl에 proteinase K 반응 용액(20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 0.7% SDS, 200 µg/ml proteinase K) 800 µl를 가하고 50°C에서 2시간 방치한 후 96°C에서 10분간 가열하여 proteinase K의 활성을 파괴하였다. 그 후 phenol/chloroform 600 µl를 가하여 원심 분리하여 DNA를 분리하였으며, 그 상층액을 100% 에탄올로 DNA를 침전시킨 후 이에 70% 냉에탄올 800 µl를 가하여 세척 후 실온에서 20분간 DNA 침사를 건조시켰다. 건조된 침사에 10 µl의 증류수를 가하여 검사 때까지 -70°C에 냉동 보관하였다. Primer는 HBV 유전자 중 상동성이 높은 core 영역의 primer를 선택하였다(표 2). PCR을 위한 반응액은 각각의 최종 농도가 Tris/HCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 소혈청 알부민 500 µg/ml, dNTP 200 µM이 되게 하여 전체 10 µl로 반응을 시행하였으며 각각의 primer(outersense, outer antisense) 10 pmol을 첨가하였다. 유리모세관(Idaho, USA)에 주입한 후 DNA증폭기(FTC-2000, 대한메디칼시스템, 한국)를 이용하여 94°C에서 5분간 열 변성 후, 62°C에서 20초, 72°C에서 20초, 94°C에서 20초의 반응을 30회 반복시행 후 72°C에서 3분간 1회로서 반응을 완료하였다. PCR산물은 ethidium bromide가 첨가

된 2.5% agarose gel에서 전기영동한 후 자외선 상에서 각각의 밴드를 관찰하였다.

각군간의 성적차이의 유의성 검증은 Student's t-test, 각군의 구성성분의 비교에는 Fisher exact test를 사용하여 실시하였다.

성 적

Dot blot법에 의한 DNA검출율의 경우 HBeAg 양성인 환자 90명 중 53명(58.9%), anti-HBe 양성인 환자 102명 중 35명(34.3%)에서 HBV DNA가 양성이었다. PCR법에 의한 DNA 검출율의 경우 상기군에서 각각 65명(72.2%), 55(53.9%)에서 양성이었다(표 3, 그림 1, 2). 17명의 무증상 HBsAg 보유자중 dot blot법의 경우 7명(41.2%)의 혈청에서, PCR법의 경우 9명(52.9%)의 혈청에서 HBV DNA가 검출되었다. HBeAg 양성인 9명 중 6예(66.7%)에서 dot blot법으로 검출되었고, 7명(77.8%)에서 PCR법으로 검출되었다. HBeAg 음성인 8명 중 1명(12.5%)에서 dot blot법으로 검출되었고, 2예(25.0%)에서 PCR법으로 검출되었다(표 4). 91명의 만성 간염 환자 중 dot blot법의 경우 48명(52.7%)의 혈청에서, PCR법의 경우 62명(68.1%)의 혈청에서 HBV DNA가 검출되었다. HBeAg 양성인 50예 중 31예(62.0%)에서 dot blot법으로 검출되었고, 37예(74.0%)에서 PCR법으로 검출되었다. HBeAg 음성인 41명 중 17명(41.5%)에서 dot blot

Table 3. Detection rate of serum HBV DNA in patients with different sets of serological profile using dot blotting and polymerase chain reaction

Viral Marker Profile	Dot blot(%)	PCR(%)
HBeAg (+), anti-HBe (-)	53/90 (58.9%)	65/90 (72.2%)
HBeAg (-), anti-HBe (+)	35/102 (34.3%)	55/102 (53.9%)
Total	88/192 (41.2%)	120/192 (62.5%)

법으로 검출되었고, 25명(61.0%)에서 PCR법으로 검출되었다(표 5). 57명의 간경변증 환자 중 dot blot법의 경우 22명(38.6%)의 혈청에서, PCR법의 경우 35명(59.6%)에서 HBV DNA가 검출되었다. HBeAg 양성인 21명 중 11명(52.4%)에서 dot blot법으로 검출되었고, 15명(71.4%)에서 PCR법으로 검출되었다. HBeAg 음성인 36예 중 11명(30.6%)에서 dot blot법으로 검출되었고, 19명(52.8%)에서 PCR법으로 검출되었다(표 6). 27명의 원발성 간세포암 환자 중 dot blot법의 경우 11명(40.7%)의 혈청에서, PCR법의 경우 15명(55.6%)에서 HBV

DNA가 검출되었다. HBeAg 양성인 10명 중 5명(50.0%)에서 dot blot법으로 검출되었고, 6명(60.0%)에서 PCR법으로 검출되었다. HBeAg 음성인 17명 중 6명(35.3%)에서 dot blot으로 검출되었고, 9명(52.9%)에서 PCR법으로 검출되었다(표 7). 무증상 HBsAg 보유자에서 HBeAg 양성인 군과 음성인 군간의 HBV DNA 검출률은 각각 77.8%, 25.0%로 유의한 차이가 있었으나(표 4, 그림 3, $P < 0.05$), 나머지군에서는 HBeAg 양성인 군과 음성인 군간의 HBV DNA 검출률의 유의한 차이는 없었다(표 5, 6, 7, 그림 3).

Table 4. HBV DNA detection rate in asymptomatic HBsAg carriers

Viral Marker Profile	N	No. with HBV DNA in sera detected by	
		Dot blot (%)	PCR (%)
HBeAg (+)	9	6 (66.7%)	7 (77.8%)*
HBeAg (-)	8	1 (12.5%)	2 (25.0%)
Total	17	7 (41.2%)	9 (52.9%)

* Vs. HBeAg(-) asymptomatic carrier, $p < 0.05$.

Table 5. HBV DNA detection rate in patients with chronic hepatitis

Viral Marker Profile	N	No. with HBV DNA in sera detected by	
		Dot blot (%)	PCR (%)
HBeAg (+)	50	31 (62.0%)	37 (74.0%)
HBeAg (-)	41	17 (41.5%)	25 (61.0%)
Total	91	48 (52.7%)	62 (68.1%)

Table 6. HBV DNA detection rate in patients with liver cirrhosis

Viral Marker Profile	N	No. with HBV DNA in sera detected by	
		Dot blot (%)	PCR (%)
HBeAg (+)	21	11 (52.4%)	15 (71.4%)
HBeAg (-)	36	11 (30.6%)	19 (52.8%)
Total	57	22 (38.6%)	9 (59.6%)

Table 7. HBV DNA detection rate in patients with hepatocellular carcinoma

Viral Marker Profile	N	No. with HBV DNA in sera detected by	
		Dot blot (%)	PCR (%)
HBeAg (+)	10	5 (50.0%)	6 (60.0%)
HBeAg (-)	17	6 (35.3%)	9 (52.9%)
Total	27	11 (40.7%)	15 (55.6%)

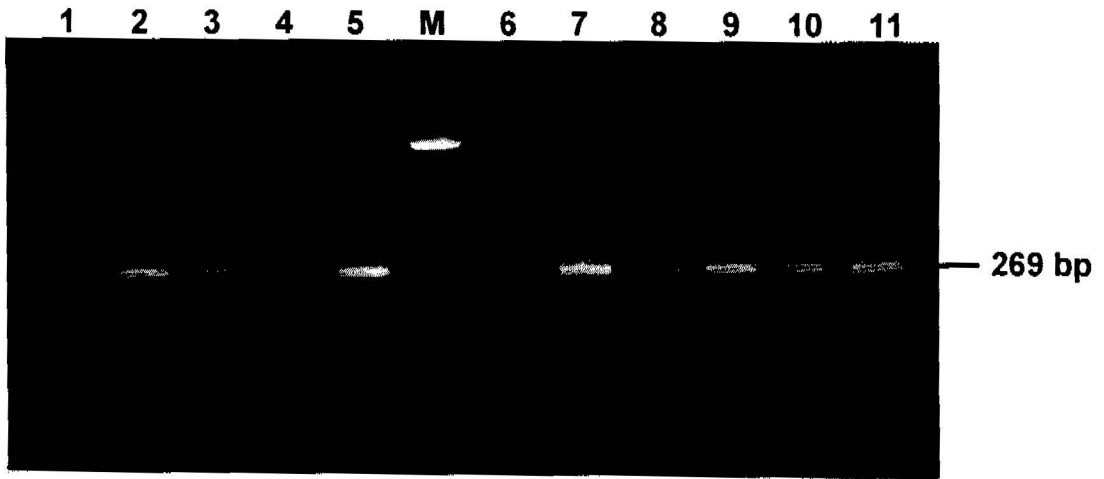


Fig. 1. Detection of serum HBV DNA by PCR in patients with chronic hepatitis B liver disease (1~11). The 269 bp product is revealed by U.V. fluorescence after ethidium bromide staining. M: molecular weight marker (100 ladder).

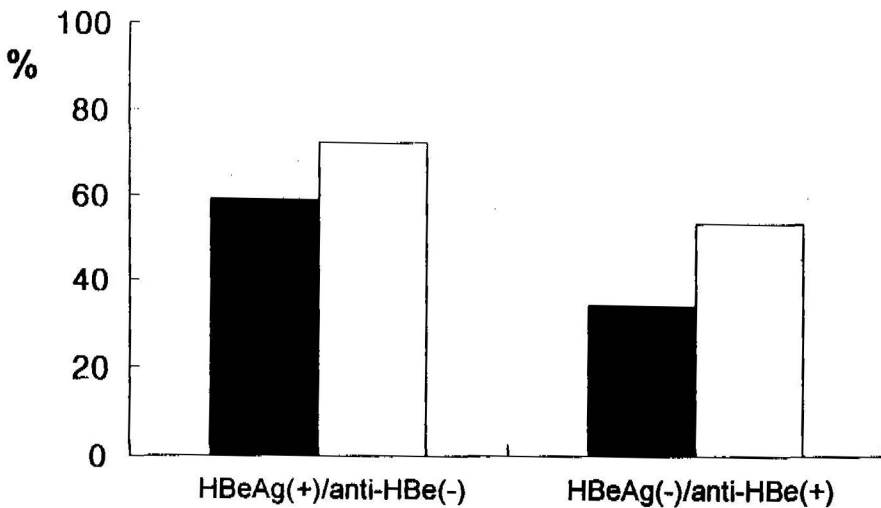


Fig. 2. Detection rate of serum HBV DNA in patients with different sets of serological profile using dot blotting (■) and polymerase chain reaction (□).

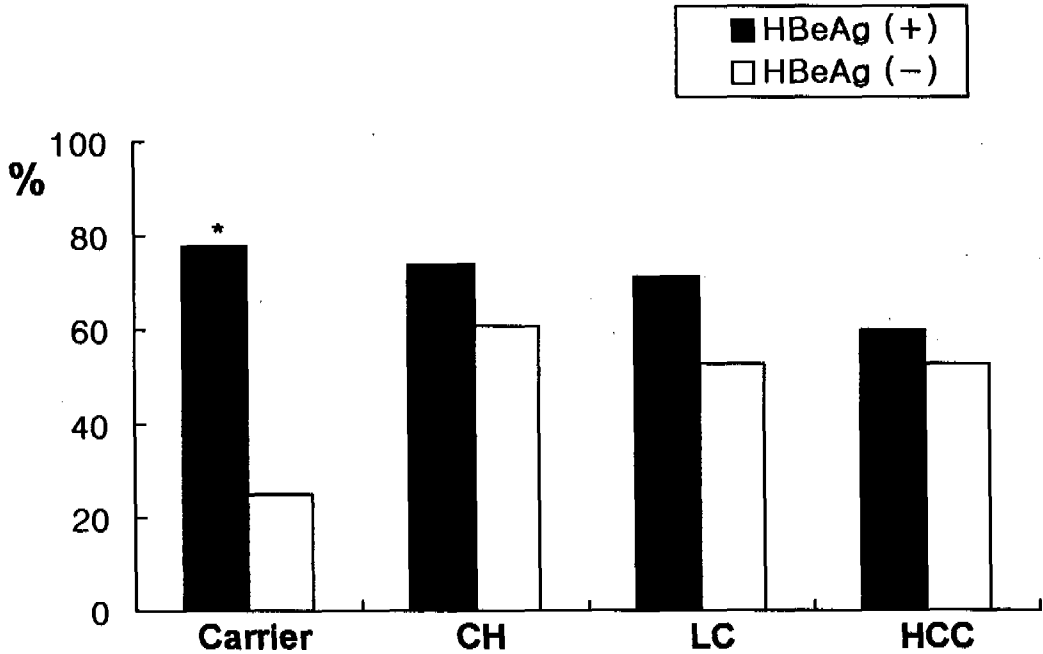


Fig. 3. Detection rate of serum HBV DNA in patients with chronic HBsAg-positive liver disease using polymerase chain reaction. Carrier: asymptomatic HBsAg carriers, CH: chronic hepatitis, LC: liver cirrhosis, HCC: hepatocellular carcinoma. * $P < 0.05$ compared with asymptomatic HBsAg(-) carriers.

고 찰

HBeAg은 HBV core내의 저분자량의 polypeptide 성분으로 혈중에서 용해성이 있으며 혈중 HBeAg의 존재는 HBV core 단백질 체내에서 합성되고 있다는 간접적인 표현이며 측정방법이 간편하므로 바이러스 증식 및 감염력의 지표로 널리 쓰이고 있다(Alberti 등, 1978; Realdi 등, 1980). 그러나 HBV의 증식 및 감염력의 지표를 가장 예민하게 나타내는 표식자는 HBV DNA이며 이를 검출하는 방법으로 기존에는 dot blot법이 주로 사용되어 왔으나 최근 PCR법이 개발되어 임상적으로 널리 이용되고 있다. PCR법은 HBV DNA의 측정에 매우 민감한 방법으로 PCR법을 이용하면 검체에 10^2 pg의 DNA(3000 HBV입자)만 있으면 이를 검출해 낼 수가 있으며 Southern blot을

함께 이용한다면 민감도는 더욱 높아져 검체당 10^3 pg의 DNA만 있어도 되는데 이는 3개의 HBV 입자에 해당되는 것으로 바이러스의 동태에 대한 인식을 새롭게 하기에 충분한 민감도라 하겠다(Kaneko 등, 1989). PCR의 현실적인 문제점으로는 검사의 민감도가 너무 높아 위양성이 나올가능성이 많다는 것인데 이론적으로는 바이러스 입자가 하나만 오염되어도 위양성이 가능해서 DNA의 추출과정에서부터 PCR과정에 이르기까지 세심한 주의가 필요하다(Eisenstein, 1990).

Baker 등(Baker 등, 1991)은 다양한 시기의 B형 만성 간염에서 dot blot법과 PCR법으로 HBV DNA를 측정할 결과 PCR법은 dot blot법에 비해 더욱 예민하게 DNA를 검출하였으며 ALT치와도 연관이 있음을 보고하였다. 국내의 경우 송 등(송재일 등, 1991)은 33명의 HBsAg 양성인 만성 간

질환 환자를 대상으로 dot blot법 및 PCR법을 이용한 HBV DNA 검출검사에서 HBeAg 양성인 경우 dot blot법으로는 84.4%, PCR법으로는 93.0%에서 검출하였으며 anti-HBe 양성인 경우 dot blot법으로는 42.4%, PCR법으로는 63.6%에서 검출하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 HBeAg 양성인 경우 각각 58.9%, 72.2%에서 검출되었으며 anti-HBe 양성인 경우 각각 34.3%, 53.9%에서 검출하여 다른 보고들과 마찬가지로 dot blot법에 비해 PCR법이 훨씬 예민하게 HBV DNA를 검출함을 보여주었다.

무증상 HBsAg 보유자에서 HBV DNA는 감염 기간과 HBeAg과 anti-HBe의 상태에 따라 다양한 농도를 보일 수 있는 것으로 알려져 있다(Kam 등, 1982). 본 연구의 결과에서 HBeAg 양성인 군의 77.8%에서 PCR법으로 HBV DNA를 관찰할 수 있었고 HBeAg음성인 군에서는 PCR법으로도 25.0%에서만 관찰되어($p < 0.05$) 정 등(1995)의 100%, 18.2%와 유사 하였으며 무증상 HBsAg 보유자에서 다양한 HBV의 증식이 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 건강 HBsAg 보유자 일부에서 PCR법으로도 HBV DNA가 검출되지 않으므로 PCR법이 무증상 HBsAg 보유자의 예후를 알수 있는 지표로서 유용하게 이용 될 가능성을 암시한다. 현재 PCR법이 임상적으로 이용될 수 있는 경우는 HBsAg과 anti-HBe가 양성이지만 감염이 있고 dot blot에서 HBV가 관찰되지 않는 경우와 HBsAg이 음성인 간질환에서 HBV의 역할규명, 그리고 간이식후 HBV 감염의 추적관찰 등이라 할 수 있다(Brcchot, 1993).

일반적으로 HBeAg 양성인 만성 간질환 환자의 약 90%에서 dot blot으로 HBV DNA가 관찰되고 10%에서는 관찰되지 않는다(Krogsgaard, 1988). HBeAg 양성인 상태에서 HBV DNA가 관찰되지 않는 것은 일시적인 현상으로 시간이 경과하면

HBeAg이 소실되고 anti-HBe가 출현한다(Chu 등, 1980). 그러나 드물게는 HBeAg이 양성으로 유지되면서 HBV DNA가 계속적으로 관찰되지 않을 수도 있다. 본 연구에서는 HBeAg 양성 만성 간염 환자의 62%에서 dot blot 방법으로 HBV DNA를 관찰하여 김 등(1987)의 75%, 박 등(1987)의 61%, 송 등(1991)의 85%와 비슷한 결과를 얻었다, HBV의 농도는 연령이 증가하거나 간손상이 심할수록 감소하므로 대상환자의 차이(Chu 등, 1985) 또는 검사방법의 예민도에 따라 다소의 차이가 있을 것으로 생각되었다. HBV 감염이 드물고 주로 성인에서 감염되는 북부유럽지역에서는 anti-HBe 양성인 환자의 10% 내지 20%에서 혈액에 HBV가 관찰되고 반면에 HBV 감염이 흔하고 모자감염 또는 어린시절에 감염되는 아시아 지역에서는 환자의 40%까지 HBV가 관찰된다고 한다(Krogsgaard, 1988). 본 연구의 경우 HBeAg 음성인 만성 B형 간염 환자의 61.0%에서 HBV DNA를 관찰하여 정 등(1988)의 결과와 유사하였으며, 간경변증 환자에서는 52.8%에서, 원발성 간세포암 환자에서는 52.9%에서 HBV DNA를 검출할 수 있었다. 이러한 결과로 우리나라에서는 anti-HBe가 존재하더라도 많은 환자에서는 HBV의 증식이 있음을 알수 있었다. 즉, HBeAg에서 anti-HBe로의 혈청학적 전환이 일어났다고 해도 대부분의 환자에서는 바이러스의 증식이 멈추지 않고 지속됨을 뜻한다고 할 수 있을 것이다. anti-HBe 양성 환자중 PCR법으로도 DNA를 검출할 수 없었던 경우에 대해 Kaneko 등(1989)은 2가지 기전으로 설명을 하고 있는데 그 하나는 바이러스 증식이 간 조직에서 일어나긴 하지만 혈청내 바이러스 농도가 너무 낮아 검출 한계를 벗어났기 때문이라는 것이고, 다른 설명으로는 숙주의 간세포 유전자에 integration된 HBV의 유전자에 의해 HBsAg만 발현되어 양성으로 나타날 뿐 실제로는 바이러스 중

식이 일어나지 않는다는 것이다. 이러한 환자들은 HBV를 전염시킬 수 있고(Monjardino 등, 1991) 일부환자에서는 precore변이형 HBV에 감염되었을 가능성이 있다(조성원 등, 1992). HBeAg 음성 만성 B형 간염은 HBeAg 양성 간염과 임상적으로 차이가 있다고 한다. 간염의 호전과 악화가 빈번하고, 자연 치유가 드물고, 불량한 예후를 보이며, 인터페론 치료에도 반응이 좋지 않다고 한다. 그리고 전격성 간염을 유발시킬 수 있다고 의심되고 있다(Omata 등, 1991; Liang 등, 1991; Carman 등, 1991).

HBV의 precore 부위가 HBeAg의 합성과 배출에 관여하며(Ou 등, 1986), precore 부위에 변이가 발생되더라도 바이러스 생성에는 영향을 미치지 않는다는 사실이 보고된 후(Schlicht 등, 1987) precore 부위에 변이가 형성된 HBV가 HBeAg 음성 만성 간염을 유발시킬 수 있을 것이라는 가정 하에 precore 부위의 염기서열 분석이 시도되었다. 분석의 결과 precore 원위부의 1896번 guanine이 adenine으로 변이되어 stop codon이 형성되어 HBeAg을 생산하지 못하는 변이형 HBV가 확인되었다(Carman 등, 1991). 바이러스 증식이 장기간 지속되면 바이러스 유전자에 변이가 흔하게 발생된다. HBV의 변이는 reverse transcriptase의 proof-reading repair-enzyme 활성도의 저하로 인하여 초래된다. precore 부위 이외에도 pre-S 부위(Okamoto 등, 1987; Carman 등, 1990), X 부위(Feitelson 등, 1991), core 부위(Chung 등, 1993) 등 HBV DNA 전반에 걸쳐 변이형이 보고되고 있다.

본 연구의 결과에서 무증상 HBsAg 보유자보다 만성간염, 간경변증 및 간세포암 환자군에서 특히 HBeAg 음성일때의 DNA 양성율이 높아진 것은 간질환이 진행성인 환자에서는 HBeAg이 음성이어도 그중 상당수에서 HBV의 증식이 진행되고 있음을 의미한다고 생각된다. 따라서 HBV에 의한

간질환의 진행성 및 활동성을 판단할 때 혈청 HBeAg 검사체계보다 HBV DNA를 확인하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는, HBV의 증식 및 감염력을 파악하는데 가장 중요한 표지자로 알려진 HBV DNA를 최근 임상에서 많이 이용되고 있는 PCR법을 사용해 검출함으로써 기존의 dot blot법과 PCR법을 비교하고, 만성 간질환 환자에서 HBV의 e항원, 항체 체계에 따른 HBV DNA의 검출율을 PCR법을 이용하여 알아봄으로써 HBV의 증식 및-감염력을 파악하고자 무증상 HBsAg 보유자 17명(HBeAg 양성 9명, anti-HBe 양성 8명), 만성 B형 간염 환자 91명(HBeAg 양성 50명, anti-HBe 양성 41명), 간경변증 환자 57명(HBeAg 양성 21명, anti-HBe 양성 36명), 원발성 간세포암 환자 27명(HBeAg 양성 10명, anti-HBe 양성 17명)을 대상으로 HBV DNA의 검출빈도를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Dot blot법의 경우 HBeAg 양성인 환자군, anti-HBe 양성인 환자군에서의 HBV DNA의 검출율은 각각 58.9%, 34.3% 이었고, PCR법에 의한 검출율은 상기군에서 각각 72.2%, 53.9%였다. HBeAg 음성인군에서의 PCR법에 의한 HBV DNA 검출율은 무증상 HBsAg 보유자의 경우 25.0%, 만성 B형 간염 환자군의 경우 61.0%, 간경변증 환자군의 경우 52.8%, 원발성 간세포암 환자군의 경우 52.9%였다. 무증상 HBsAg 보유자에서 HBeAg 양성인 군과 음성인 군간의 HBV DNA 검출율은 각각 77.8%, 25.0%로 유의한 차이가 있었으나, 나머지 군에서는 HBeAg 양성인 군과 음성인 군간의 HBV DNA 검출율의 유의한 차이는 없었다.

이상의 결과로 PCR을 이용할 경우 기존의 dot blot보다 훨씬 예민하게 HBV DNA를 검출할 수 있고, HBsAg 양성인 만성 간질환 환자의 대부분에서는 HBeAg 및 anti-HBe 표식자 체계와는 무관하게 바이러스의 증식이 지속되고 있음을 알 수 있었으며, PCR법이 무증상 HBsAg 보유자의 예후를 알 수 있는 지표로서 유용성에 대한 가능성을 의미하나 확실한 의의를 알기 위하여 전향적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고 문헌

김경희, 강진경, 김용범, 문영명, 최홍재, 오상환, 서정선: 만성 간질환에 있어서 molecular hybridization 검사에 의한 혈청 HBV DNA 검출에 관한 연구. 대한내과학회지 32: 1-12, 1987.

김정룡: 간염 B바이러스의 급만성 간질환의 원인적 역할과 감염예방대책, 서울대학교병원 법인화 십주년 기념 학술대회 논문집. 서울대학교 출판부, 서울, 1988, 쪽 57-77.

박영태, 유혜경, 이창홍, 문해란, 김경호, 최규완: B형 간염 바이러스에 의한 간질환에서 혈청 B형 간염 바이러스 DNA의 검출 양상. 대한내과학회지 33: 315-326, 1987.

송재일, 유권, 이효석, 김정룡: HBsAg이 양성인 만성 간질환 환자에서 중합효소연쇄반응을 이용한 HBV DNA의 검출의의. 대한내과학회지 40: 299-307, 1991.

정일권, 주재학, 차상우, 봉형근, 김진오, 반찬욱, 이준성 등: 만성 HBsAg보유자에서 중합효소연쇄반응법에 의한 혈청 HBV DNA의 검출. 대한소화기학회지 27: 651-658, 1995.

조성원, 이문성, 김진홍, 심찬섭, 문인걸, 한인권: Anti-HBe 양성 B형 만성 간염 환자에서 pre-

core 유전자의 돌연변이형 간염 바이러스의 관찰. 대한소화기학회지 24: 293-299, 1992.

Alberti A, Diana S, Scullard GH, Eddlestone ALWF, Williams R: Full and empty Dane particles in chronic hepatitis B virus infection: Relation to hepatitis B e antigen and presence of liver damage. Gastroenterology 75: 869-874, 1978.

Baker BL, Di Bisceglie AM, Kaneko S, Miller R, Feinstone SM, Waggoner JC, Hoofnagle JH: Determination of hepatitis B virus DNA in serum using the polymerase chain reaction: Clinical significance and correlation with serological and biochemical markers 13: 632-636, 1991.

Bonino F, Hoyer B, Nelson J, Engle R, Verme G, Gerin JL: Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: A marker of active hepatitis B virus replication in the liver. Hepatology 1: 386-391, 1981.

Bonino F, Rosina F, Rizzetto M, Rizzi R, Chiaberge E, Trdanico R, Callea F, et al.: Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV DNA and anti-HBe. Gastroenterology 90: 1268, 1986.

Brechot C: Application of molecular biology to diagnosis. In Zuckerman AJ, Thomas HC: Viral Hepatitis. Edinberg, Churchill Livingstone, 1993, pp 411-426.

Brunetto MR, Oliveri F, Rocca G, Criscuolo D, Chaberge E, Capalbo M, David E, et al.: Natural course and response to interferon of chronic type B hepatitis accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. Hepatology 10: 198, 1989.

Carman WF, Fagan EA, Hadziyannis S,

- Karayiannis P, Tassopoulos NC, Williams R, Thomas HC: Association of a precore genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis. *Hepatology* 14: 219, 1991.
- Carman WF, Jacyna MR, Hadzyannis S, Karayiannis P, Mcgarver MJ, Makris A, Thomas H: Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 2: 588, 1989.
- Carman WF, Zanetti AR, Karayianis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, et al.: Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 3: 325, 1990.
- Centers for Disease Control: Postexposure prophylaxis of hepatitis B: Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee. *Ann Intern Med* 101: 351-354, 1984.
- Chu CM, Karayiannis P, Flower MJF, Monjardino J, Liaw YF, Thomas HC: Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: Studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 5: 431-434, 1980.
- Chu CM, Liaw YF, Sheen IS, Chen TJ: Correlation of age with the status of hepatitis B virus replication and histological changes in chronic type B hepatitis. *Liver* 5: 117-122, 1985.
- Chung WL, Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Ito Y, Imazeki F, Lu SN, et al.: Precore mutations and core clustering mutations in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 104: 263, 1993.
- Eddleston ALWF, Mondelli M: Immunopathological mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 3(Suppl. 2): S17-S23, 1986.
- Eisenstein BI: The polymerase Chain Reactions. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 322: 178-183, 1990.
- Feitelson M, Duan LX, Noriike N, Clayton M: Hepatitis B X open reading frame deletion mutants isolated from atypical hepatitis B virus infections. *J Hepatology* 13(Suppl 4): S58, 1991.
- Ferrari C, Penna A, Delgiantioni A, Fiaccadori F: Cellular immune response to hepatitis B virus antigens. An overview. *J Hepatol* 21(7): 52-60, 1988.
- Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA: Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 3: 656-662, 1983.
- Kam W, Rall LB, Smucker EA, Schmid R, Rutter WJ: hepatitis B virus DNA in liver and serum of asymptomatic carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7522-7526, 1982.
- Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, Salerno JA, Reimer KA: Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 312-316, 1989.
- Krogsgaard K: Hepatitis B virus DNA in serum. Applied molecular biology in the evaluation of hepatitis B infection. *Liver* 8: 257-280, 1988.
- La Brecque DR, Muhs JM, Lutwick LI, Woolson RF, Heirholzer WR: The risk of hepatitis B transmission from health care workers to patients in a hospital setting-A prospective study. *Hepatology* 6: 205-208, 1986.

- Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Benporath E: A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 324: 1705, 1991.
- Lieberman HM, LaBrecque DR, Kew MC, Hadziyannis SJ, Shafritz DA: Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test: Comparison with results for other viral markers. *Hepatology* 3: 279, 1983.
- Lok ASF, Hadziyannis SJ, Weller IVD, Karvountzis MG, Monjardino J, Karayiannis P, Montano L, et al.: Contribution of low level HBV replication to continuing inflammatory activity in patients with anti-HBe positive chronic hepatitis B virus infection. *Gut* 25: 1283-1287, 1984.
- Matsuyama Y, Omata M, Yokosuka O, Imazeki F, Ito Y, Okuda K: Discordance of hepatitis B e antigen/antibody and hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in serum. *Gastroenterology* 89: 1104, 1985.
- Monjardino J, Velosa J, Thomas HC, Carnero de Moura M: Serum HBV DNA detected by PCR in dot blot negative HBV carriers with active liver disease. *J Hepatol* 13: 44-48, 1991.
- Okada K, Kamiyama I, Inomata M, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M: e antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N Engl J Med* 294: 746-749, 1976.
- Okamoto H, Imai M, Tsud F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M: Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adr or adwr. *J Virol* 61: 3030, 1987.
- Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M: Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med* 324: 1699, 1991.
- Ou JH, Laub O, Rutter WJ: Hepatitis B virus gene function: The precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1578, 1986.
- Raimondo G, Recchia S, Lavarini C, Crivelli O, Rizzetto M: Dane particle-associated hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B virus infection and hepatitis B e antibody. *Hepatology* 2: 449-454, 1982.
- Realdi G, Alberti A, Rugge M, Bortolotti F, Rigoli AM, Tremolada F, Ruol A: Seroconversion from Hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 79: 195-199, 1980.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Corr PJ, Brown AM: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354, 1985.
- Schlicht JH, Salfeld J, Schaller H: The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal

- sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation. *J Virol* 61: 3701, 1987.
- Scotto J, Hadchouel M, Hery C, Yvart J, Tiollais P, Brechot C: Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: Comparison with results for other viral markers. *Hepatology* 3: 279-284, 1983.
- Walter E, Blum HE, Offensperger WB, Zeschnigk C, Offensperger S, Gerok W: Spot-blot hybridization assay for the detection of hepatitis B virus DNA in serum: Factors determining its sensitivity and specificity. *Hepatology* 7: 557, 1987.
- Weller IVD, Fowler MJF, Monjardino J, Thomas HC: The detection of HBV DNA in serum by molecular hybridization: a more sensitive method for the detection of complete HBV particles. *J Med Virol* 9: 273-280, 1982.

- Abstract -

Detection of Serum Hepatitis B Virus DNA According to HBV Markers in Chronic Hepatitis B Liver Disease

Dong Jun Lee, Jin Su Choi, Joon Hwan Kim, Heon Ju Lee

Department of Internal Medicine

College of Medicine, Yeungnam University

Taegu, Korea

The identification of serum HBV DNA is very important for the assessment of the disease activity in persistent infection, for the evaluation of the infectivity of an individual's blood.

The dot blot, however, has limited sensitivity and sometimes inconsistent with other serological markers and clinical settings. Using the most important recent advance in molecular biology, the polymerase chain reaction(PCR), specific DNA sequences can be amplified more than a million-fold in a few hours and with this technique the detection of the extreme low level of DNA is possible.

This study was to determine sensitivity of the PCR for the detection of serum HBV DNA in comparison with dot blot analysis and to investigate the serum HBV DNA status and clinical significance of PCR in patients with chronic HBsAg positive liver disease.

The subjects of this study were 17 patients with asymptomatic HBsAg carriers(9 HBeAg positive patients, 8 anti-HBe positive patients), 91 chronic hepatitis B(50 HBeAg positive patients, 41 anti-HBe positive patients), 57 liver cirrhosis(21 HBeAg positive patients, 36 anti-HBe positive patients), 27 hepatocellular carcinoma(10 HBeAg positive patients, 17 anti-HBe positive patients).

The results were summarized as following;

The detection rates of HBV DNA by dot blot, PCR were 58.9%, 72.2% in HBeAg positive patients, 34.3%, 53.9% in anti-HBe positive patients. The detection rates of HBV DNA by PCR in HBeAg negative patients were 25.0% in asymptomatic HBsAg carriers, 61.0% in chronic hepatitis B, 52.8% in liver cirrhosis, 52.9% in hepatocellular carcinoma. The positive rate for HBV DNA is a significant difference between HBeAg positive and negative asymptomatic HBsAg carriers, but not significantly difference in other groups.

In conclusions, this study confirmed that the PCR is much more sensitive than the dot blot analysis in detecting the HBV DNA in the sera of patients with chronic liver disease. The presence of HBV DNA in the serum was detected by PCR with higher sensitivity and it suggested that active viral replication is still going on in most patients with chronic HBsAg positive liver disease irrespective of HBeAg/anti-HBe status, and PCR may be used as a prognostic factor in asymptomatic HBsAg carriers.

Key Words: Liver, PCR