

가족집적성을 보이는 B형간염 바이러스 만성보유자에서 바이러스 유전자의 돌연변이와 주요조직접합체 양상 - 질병발현 형태와의 관련성을 중심으로 -

정승필, 이호석¹⁾, 김정룡¹⁾, 안윤옥²⁾

영남대학교 의과대학 가정의학교실, 서울대학교 의과대학 내과학교실¹⁾, 예방의학교실²⁾

Hepatitis B Virus DNA Mutation, Pattern of Major Histocompatibility Class-I among Familial Clustered HBV Carriers in Relation to Disease Progression

Seung-Pil Jung, Hyo-Suk Lee¹⁾, Chung-Yong Kim¹⁾, Yoon-Ok Ahn²⁾

Department of Family Medicine, Yeungnam University Hospital;
Department of Internal Medicine¹⁾ and Preventive Medicine²⁾, Seoul National University College of Medicine

Objectives : Chronic HBsAg carriers are the principal source of infection for other susceptible people, and are themselves at high risk of developing serious liver diseases. In Korea, it has been estimated that 65-75% of the HBsAg positives remained as persistent carriers. Additionally, familial clustering of HBV infection has frequently been observed among carriers. Some would become progressive, chronic hepatitis patients, and others would not. The aim of this study was to evaluate the association between various factors, such as the duration of infection, type of virus, mutation of precore/core region in HBV, major histocompatibility class-I, and developing chronic liver diseases among familial HBV carriers.

Methods : Chronic carrier status was identified by repeated serological tests for HBsAg at intervals of six months or more. A familial chronic carrier was defined when the disease was observed in a family member over two generations. Two families were recruited, among which a total of 20 chronic HBsAg carriers(11 carriers in No.1, and 9 in No.2 family) were identified. Data on the general characteristics and liver disease status were collected. Identification of the HBV-DNA was successful only for 13 subjects among the 20 carriers. Analysis of viral

DNA in terms of subtype, pre-core and core region mutations was carried out. The type of major histocompatibility class-I for the 13 subjects was also analysed.

Results & Conclusions : Seven of 10 chronic HBV carriers of the 1st generation and one of 10 of the 2nd generation were clinical patients with chronic hepatitis, the others, three of the 1st and nine of the 2nd generation, were asymptomatic carriers. This data indicates that the duration of HBV carriage is one of the major factors for disease severity. The subtype of HBsAg analysed using HBV-DNA identified in 13 carriers were adr, and the pattern of precore nonsense mutation in HBV-DNA was identical among family members, which means that the same virus strains were transmitted between the family members. The association between the precore or core mutations in HBV-DNA and the disease severity was not observed. While it was suggested that a specific type of MHC class-I may be related to disease progression.

Korean J Prev Med 2000;33(3):323-333

Key Words: HBV, Chronic carrier, Chronic hepatitis, Core mutation, Pre-core mutation, MHC class-I

서론

우리 나라 만성간질환에서 B형간염이 차지하는 비중은 85%이상으로 추정된다(김정룡 등, 1994). 만성간질환 환자에서 HBsAg 양성자율을 보면 만성활동성간염 61.4%, 간경변 73.1%, 그리고 간세포암

환자에서는 약 69%이다. 또한 만성간염에서 간경변으로, 간경변에서 간암으로 진행되는 이행률(progression rate)은 15년 동안에 각각 36%, 42%로 보고하고 있는데, HBsAg 양성환자의 이행률이 음성환자에서 보다 통계적으로 유의하게 높다(김정룡 등, 1994). B형간염 유병률

은 통상 표면항원(HBsAg) 양성자율로 표시된다. 우리 나라 HBsAg 양성률은 1980년대 남자 8.0%, 여자 6.1%로 추정되었는데(Ahn et al., 1992), 1990년대에는 각각 7.4%, 3.6%로 추정된다(Ahn, 1999). B형간염에서 임상적 또는 공중보건학적으로 가장 문제가 되는 것은 HBsAg 만성보유자이다(Ahn, 1996). 이들은 B형간염 감염의 주된 감염원이 될 뿐 아니라 본인 스스로도 만성간염, 간경

변, 간세포암 등으로 발병할 위험도가 매우 높기 때문이다. 우리 나라의 경우 HBsAg 양성자중 만성보유자(chronic carrier)는 65-75%로 추정된다(Park, 1989; Ahn, 1999). B형간염 바이러스(HBV)에 감염된 후 만성보유자가 되는 확률은 감염시기에 따라 크게 차이가 나는 것으로 알려져 있는데, 주산기에 감염된 경우 그 확률은 60-90%로, 그 이후의 감염에서는 약 30% 정도로 추정되고 있다(Hadler & Margolis, 1993). 1980년대 우리 나라 임신부중 HBsAg 양성자는 약 6.5%로 추정되었으며, 이들에게 태어난 신생아중 16.4%가 주산기에 감염되는 것으로 밝혀져 있어, 전체적으로 보면 출생아 100명중 1명이 출생시 또는 주산기에 HBV에 감염된 것으로 추정된다(Ahn et al., 1992). 이들 대부분은 만성보유자로 남게되어 타인에의 감염은 물론 본인도 만성간질환에 이환될 위험도도 높은 집단이 된다.

주산기 감염외에 가족내 감염, 특히 세대간 감염도 HBV의 주요한 감염경로로 밝혀진 바 있다. B형간염의 가족 집적성 감염양상이 이를 말해주고 있는데, 가족중 HBsAg 만성보유자가 있는 가족에서의 HBsAg 양성자율이 대조군보다 6.8배 높으며(Bernier et al., 1982), 만성보유자 어머니로부터 태어난 자녀들에서 특히 현저한 가족 집적성을 보인다(Lok et al., 1987). 우리 나라의 연구보고에서도 부모중 한 사람이 만성보유자인 경우 자녀가 HBV에 감염될 상대위험도는 6.6배 정도로 보고하고 있다(Kim & Ahn, 1993). 가족 외에서 일어나는 감염 경로(extrafamilial transmission)에 대하여는 아직 확실하게 밝혀진 내용이 없으나 이는 주로 청년기 이후에 일어나는 것으로 1980년대 우리 나라에서 20세 이후의 감염력은 약 4% 전후로 추계된 바 있다(Ahn, 1996). 그러나 이들에서 만성보유자로 이행되는 확률은 낮은 것으로 알려져 있다.

가족 감염자의 HBV는 과연 동일한 형태의 바이러스인가? 혹은 형태가 다른 바이러스인가? 하는 문제는 HBV의 가족내

감염경로를 추적하거나 질병관리를 위한 연구에서 중요한 단서가 될 수 있다. 예를 들어 어떤 가족감염자는 건강보유자로 지속되고, 다른 가족감염자는 만성간질환으로 이행되고 하는 현상에 대하여, 만일 동일한 형태의 바이러스를 가족내 구성원이 공유하고 있다면 바이러스의 특정 부위 돌연변이가 관여되는 것인지 혹은 숙주의 유전적 소인이 관여할 것인지 등의 가설이 가능하기 때문이다.

HBV 만성보유자가 처음 건강보유자에서 임상적 만성간염으로 진행하는데 관여하는 요인은 무엇인가? 여기에 관한 명백한 설명 기전은 아직 없다. 다만 숙주 요인과 바이러스 요인이 각각 또는 함께 작용할 것으로 추측된다. 숙주 요인에 관하여는 숙주의 유전적 소인 분석 연구(Grossman et al., 1975), 만성 간염과 특정 HLA와의 관련성에 관한 연구(Hillis et al., 1977), 뉴욕 거주 중국계 민족이 백인들보다 만성간염 보유 정도가 높아, 만성 감염의 질병 발현에 유전적 소인이 관여될 것이라는 연구(Szmuness et al., 1978)등에서 제기하였는데, 그 기전으로는 면역 반응과 관련있는 HLA 형태가 존재한다는 설(Bertoletti et al., 1991), 인터페론, 사이토카인 등 세포 매개 독성 T세포 자극 물질에 의한다는 설(Roitt, 1991) 등이 있으나 아직 가설 수준에 있다. 바이러스 요인에 관하여는 만성 B형간염의 질병 정도와 돌연변이 바이러스 사이의 상관성을 제시한 연구(Raimondo et al., 1990), pre-core 돌연변이 바이러스 중 특히 복제능력이 높은 독성 바이러스가 전격성 간염 혹은 심한 활동성 간염을 일으킬 수 있다는 연구(Kosaka et al., 1991), core 돌연변이 바이러스가 만성 간염의 질병 정도에 영향을 준다는 연구(Takaji et al., 1991)등에서 제기하고 있다. 그리고 바이러스의 특정 부위 돌연변이로 인하여 T세포의 항원 인식 부위에 변화가 초래되어 면역 반응이 지속된다는 설(Naoumov et al., 1984), 태생기 모체로부터 받은 핵 항체의 역가가 시간이 지날수록 감소되어 면역 관용이 사라진다는 설(Chu et al., 1987) 등이 있으며 숙주의 유

전적 소인과 돌연변이 바이러스가 함께 관여한다는 보고들도 있다. 이중 core 돌연변이의 특정 단백질과 주조직적합체 I형의 복합체가 세포 독성 임파구를 자극하여 전격성 간염을 일으킨다는 연구(Sato et al., 1995), 만성 활동성 간염 환자에서 T세포항원 결정기를 가지는 core의 특정부위 돌연변이와 주조직적합체 I형과의 관련성에 관한 연구(Ehata et al., 1992), 바이러스 특정 부위 단백질이 특정 주조직적합체 I형의 발현을 억제시킬 때는 건강 보유자로 존재하다가, 만약 이 특정 부위의 변화가 초래되면 이를 인식하는 세포 독성 T세포가 자극되어 활동성 간염을 초래한다는 연구(Foster et al., 1991)등이 있다. 그러나 이들 연구에서는 대상자들의 유전적 배경이 전혀 다르고, 감염된 바이러스의 형태나 돌연변이의 형태가 모두 다르다는 제한점이 지적되고 있는데, 만약 가족 감염자를 연구대상으로 한다면 상기 연구에서 지적되는 제한점의 많은 부분이 보완될 것이다.

본 연구의 목적은 가족 집적성을 보이는 B형간염 감염자 가족에서 그 원인 바이러스가 동일한 것인가를 확인하고, 동일한 데도 불구하고 감염자 가족간의 질병 경과가 다른 것이 바이러스 유전자 구조와 연관이 있는지 혹은 감염자의 주조직적합체(Major Histocompatibility, MHC)와 관련이 있는지를 탐색하는 데 있다. 동일한 바이러스인지를 확인하기 위하여 바이러스 유전자의 염기 서열과 nonsense 돌연변이 형태를 검사 비교하였고, 질병 경과에 관련한 바이러스 유전자 구조를 파악하기 위하여 pre-core 및 core의 missense 돌연변이 형태를 조사하였다. 그리고 감염자들의 주조직적합체 형태는 MHC-class I을 분석하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

2대 이상에 걸친 가족 구성원 대다수가 HBsAg 양성자인 경우를 일차적 연구대상으로 하였다. 영남대학교 병원에서 B형 간염 치료 및 관리를 받고 있는 환자군들

중에서 연구대상에 해당되는 2 가족을 찾아 이들을 연구대상으로 하였다. 1세대 형제자매와 그들의 자녀를 대상으로 HBV만성보유자(chronic carrier)를 확인하여 본 연구의 대상으로 하였다.

가족 구성원 중 HBsAg 음성자(또는 음성 전환자)는 제외하였으며, 이전에 인터페론 요법을 받았거나, 간 기능에 영향을 주는 약물(예, 결핵약, 경구 무좀약)과 면역 상태에 영향을 줄 수 있는 스테로이드 제제의 복용 여부를 문진하여 과거력이 있는 사람은 대상에서 제외하였다. 그리고 과거 수술 받은 사람 및 혈액이 필요한 수술을 받았던 환자도 제외하였다.

제1가족의 할아버지 및 할머니는 이미 사망하였었는데 두 분의 사망원인은 모두 만성간질환이었다는 진술이 있었다. 제1가족에서 HBV 만성보유자로 확인이 되어 본 연구의 대상이 된 가족은 1세대 4명, 2세대 7명으로 모두 11명이었는데 2세대 7명은 1세대 여자형제 3명의 자녀들이었다.

제2가족의 할아버지는 아직 생존하고 있고 할머니는 만성간질환으로 이미 사망하였다. 1세대 형제자매 6명(2남4여)은 모두 HBV 만성보유자로 본 연구의 대상이었고, 2세대에서는 여자형제 2명의 자녀 3명이 연구대상자가 되었다. 모두 9명이었다.

대상자 모두 C형간염 표식자 검사를 거쳤으며 모두 음성이었다

2. 연구방법

1) 문진 및 설문을 통한 일반 특성 자료 수집

대상자를 직접 면담하여 성, 연령, 수술 과거력, 수술 과거력, 음주력, 결핵 약, 관절염 약, 피부병 약 등등을 1년이상 복용 여부, B형 간염 진단 시기, 어머니 간염 보유 여부, 부모 중 간염 여부, 과거 간 조직검사 여부, 과거 급성간염 이환 여부 등을 조사하였다.

2) HBs Ag, anti-HBs, anti-HBc HBe Ag, anti-HBe, anti-HCV, HBV-DNA 검사방법

(1) HBV serologic markers 와 anti-

HCV: Abott 사의 Axysm을 이용하였으며 Abott 사의 검사 kit(RIA)를 사용하였다.

(4) HBV-DNA : Abbott 사 serum hepatitis DNA probe 분석 protocol에 따라 검사하였으며, 검사 결과의 해석도 Abott 사의 manual을 참고하였다.

3) 건강보유자 및 만성간염 환자 분류
총 20명 대상자를 HBV에 대한 혈청 검사와 임상상 및 과거 병력 등을 조사하여 만성간염(CAH) 환자와 건강보유자(CARR)로 분류하였는데, 과거 2년 동안에 증상이 없었고 간기능이 정상이며 HBs Ag(+), anti-HBs(-), anti-HBc(+))인 경우를 건강보유자로 하였고, 2년 추적기간 중 피로, 식욕 부진 등의 증상을 동반하였으며, 간기능 검사에 이상이 있고 HBsAg(+), anti-HBs(-), anti-HBc(+))인 경우는 만성간염 환자로 분류하였다.

4) 혈청에서 HBV-DNA 분리
serum 200-300ul를 추출하여 proteinase K(100ul/ml), 0.5%(wt/vol) SDS, 5mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8.0과 혼합하여 3 시간 동안 70 °C 에서 배양하였다. 이 용액을 phenol-chloroform에 처리하여 HBV-DNA는 ethanol로 침전시켰다.

5) HBV-DNA 의 pre-core 및 core 부위의 증폭과 염기서열 분석 방법

전체 pre-core 및 core 부위를 포함하고 있는 HBV-DNA 분절을 증폭하기 위하여 김 등의 방법을 따랐다(Kim et al, 1988). sense primer (nt 1604-1623, 5'-CATGGAGACCACCGTGAACG-3') 와 antisense primer (nt 2526-2547, 5'-GTGAGGAAAGGAGGGAGTTTGC-3')를 사용하여 1604에서 2547번까지 944개의 핵산 서열을 PCR로 분석하였다. PCR법은 검체 DNA 10ul, 2.5U Taq polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA), 각 dNTP 400mM, 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂와 각 primer 0.5uM이 들어 있는 100ul 혼합액에서 시행하였으며, 혼합액은 85 °C에서 예열한 뒤 각 primer를 첨가하였다. 증폭 과정은 94 °C에서 변

성화 과정(denaturation) 30초, 55 °C에서 30초간 식힘(annealing), 그리고 72 °C에서 1분간 확산 과정(expansion)으로 하였는데, 전 과정이 프로그램된 thermal cyclor(GeneAmp 9600, Perkin-Elmer/Cetus)를 사용하여 35번 반복하였다. 여기에서 PCR의 위양성 결과를 방지하기 위하여 Kwok 등(1989)이 권고하는 방법에 따랐다.

HBV-DNA를 직접 염기서열 분석하기 위하여 Magic PCR Prep kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 간접 자외선 시야 하에서 각 PCR product를 0.8% agarose gel slice로부터 추출하였다. 다음으로 몇 개의 sequencing primer를 사용하여 양쪽에서 염기서열 분석을 시행하였다. 여기에 사용된 sense primer를 보면,

P1 (nt 1741-1758, 5'-GGGAGGAGATTAGGTTAA-3'),

P2 (nt 1843-1867, 5'-CATGTTCA TGTCCTACTGTTCA-3'),

P3 (nt 2047-2071, 5'-CTCATCATAC AGCACTCAGGCAAGC-3'),

P4(nt 2292-2310, 5'-TACAGACCA CCAAATGCC-3')이고,

antisense primer로는,

M1 (nt 2472-2497, 5'-AGAATAAAG CCCAGTAAAGTTTCCC-3'),

M2 (nt 2287-2310, 5'-GGGCATTTG GTGGTCTGTA-3'),

M3 (nt 2114-2138, 5'-TGCTGGGT CTCCAAATTACTTCCC-3'),

M4 (nt 2047-2067, 5'-GCCTGA GTGCTGTATGATGAG-3'),

M5 (nt 1910-1934, 5'-AGAAGCTC CAAATCTTTATAGC-3')를 각각 사용하였다. 각 sequencing primer에는 T4 polynucleotide kinase 를 사용하여 γ -³²P-ATP로 방사선 표식자를 부착하였다. 정제된 PCR product 40-100 fmol과 각 방사 물질 부착된 primer 1.5 pmol을 cycle sequencing 반응(Carroters et al., 1989)을 위하여 thermostable DNA polymerase (fmol™ sequencing system, Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. 반응

물은 8% sequencing gel에서 분석하였다.

돌연변이 부위를 찾기 위하여 nontraditional gel-loading format을 사용하였는데, 이 방법은 각 단일 primer로부터 유래된 모든 G-terminated 반응 물질만 정렬되고, 그 옆에 모든 A terminated 반응 물질이 정렬되는 방식이다(Hedden et al., 1993).

6) 대상자 MHC Class-I 형태분석

(1) DNA의 분리

환자의 정맥 혈액 10cc와 heparin 3cc를 섞고 5분간 충분히 섞은 다음, 원심분리기에 넣고 3000 rpm으로 15분간 원심분리 후 상층액을 뽑고, 그 아래 buffy coat를 추출하였으며, Ficoll-Hypaque (Pharmacia사 제품)를 사용하여 림프구를 분리하고, 1 x 10⁶ 림프구에 PCR-K buffer (10 x PCR buffer 1ml, NP-40 40 µl, Tween-20 45 µl, proteinase K (20mg/ml 30 µl, D/W 8.8ml) 0.5ml를 첨가하여 58℃에서 60분간 처리하고 용해시킨 후 95℃에서 10분간 처리하여 DNA를 추출하였다.

(2) PCR primer 및 조건

PCR primer들은 ARMS(amplification refractory mutation system)의 원리를 이용하여 class-I 각각의 locus의 exon 2, 3부분을 중심으로 고안하였다. 합성한 primer는 HLA-Class I A locus의 30개 대립 유전자형을 구별하기 위하여 21개의 coding primer와 19개의 non-coding primer를, C locus의 20개의 대립 유전자형을 구별하기 위해 10개의 coding primer와 16개의 non-coding primer를 사용하였다. 또한 PCR 성공 여부를 확인할 수 있도록 positive internal control로서 APC(adenamoutous polyposis coli) 유전자의 exon 15 부분에서 primer 4개를 고안하여 사용하였다. 이들 primer의 MT(Melting Temperature)값의 범위는 58℃에서 62℃ 사이가 되도록 하였다. Positive internal control primer를 제외한 총 105개의 primer를 class-I 유전자 형별이 가능하도록 조합하여 A locus 32개, B locus 27개, C locus 23개의 primer 조합을 구성하였다.

PCR은 13 µl, 100ng의 DNA, 0.8 x buffer (40mM KCl, 1.2nM MgCl₂, 8.0mM Tris-HCl, pH 8.8. 0.08% Triton X-100), 5%(v/v), dimethyl sulphoxide (DMSO), 200µM의 dNTP, 1µM의 각각의 primer와 0.2µM의 internal control primer를 혼합하였다. 이때 Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim)는 0.25 unit를 사용하였다. 증폭 과정은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer Corporation)에서 수행하였다. PCR은 총 30 cycle로 5회 반복하였으며, 96℃에서 1분간 denaturation, 96℃에서 25초, 70℃에서 45초로 5회 반복하였으며, 55℃에서 60초, 72℃에서 120초로 4회 반복 후 72℃에서 1분간 방치하는 식으로 진행되었다. 증폭된 DNA는 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에서 100 V로 40분간 전기영동하여 특이한 증폭 여부를 확인하였다.

(3) MHC class-I의 표준 microlymphocytotoxicity 분석

림프구 MHC class-I의 HLA-A, B, C를 표준 microlymphocytotoxicity 분석을 통하여 세부적인 형태를 파악하였다.

연구성적

1. 건강보유자 및 만성간염 현황

제1가족 감염자 1세대 4명(남 54세, 여 47세, 39세, 및 37세) 모두 만성간염 환자이었다. 2세대 7명은 1세대 3명 여자형제의 자녀로서 각각 2남(26세와 24세), 1남 1여(16세 남자, 15세 여아), 그리고 2여 1남(15세 및 12세 여아, 8세 남아)인데, 7명중 1명(남 24세)이 만성간염 환자이었고 나머지 6명 모두는 건강보유자이었다. 만성간염 환자의 어머니는 1세대중 맏 언니에 해당하는데, 이 환자는 연구기간 중에 간경변 및 간암으로 사망하였다(Fig. 1). 전체적으로 만성간염 환자 5명(평균연령 40.2세), 건강보유자 6명(평균연령 15.3세)이다.

제2가족 감염자 1세대 6명(2남4여)중 3명(여 48세, 여 43세, 여 40세)은 만성간염 환자이고 3명(여 52세, 남 45세, 남 38세)은 건강보유자이었다. 2세대 3명은 모두 건강보유자이었는데, 2명(남 28세, 남 26세)은 1세대의 가장 맏 언니(건강보유자, 52세)의 자녀이었고 1명은 1세대 넷째(만성간염, 여 45세)의 딸(15세)이다. 전체적으로 만성간염 환자 3명(평균연령 43.7세), 건강보유자 6명(평균연령 34.0세)이었다(Fig. 2).

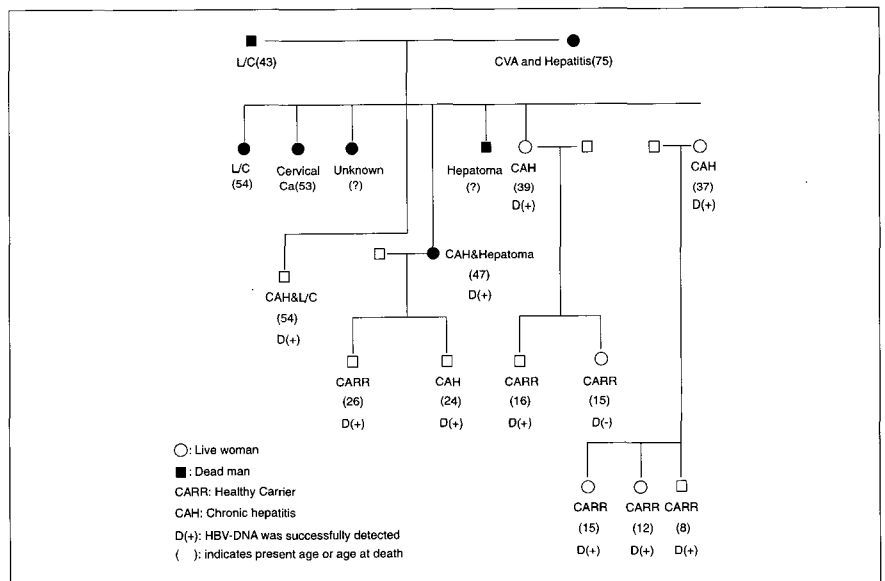


Fig. 1. Pedigree and selected characteristics related to HBV infection of No. 1 Family members

제1 및 2가족 모두를 합하여 보면 20명 중 만성간염 환자 8명(평균연령 41.5 ± 9.0세)이고 건강보유자는 12명(평균연령 24.5 ± 14.1세)이다.

2. HBV-DNA 동정

20명 대상자 혈액에서 HBV-DNA 검출이 가능했던 경우는 13명이었다. 제1가족 11명중 2세대 여자(건강보유자, 15세)만 제외하고 10명에서 검출되어 1세대 4명(남 1, 여 3), 2세대 6명(남 4, 여 2)의

HBV-DNA가 동정되었다. 제2가족 9명 중 3명에서만 HBV-DNA가 검출되었는데, 모두 여자로서 1세대 2명(건강보유자, 52세와 만성간염, 40세)과 2세대 1명(건강보유자, 15세)이었다. 13명 전원의 표면항원 형태는 모두 adr 형이었으며 e 항원도 모두 양성으로 나타났다.

3. HBV-DNA의 mutation 양상

1) 제 1가족에서의 HBV-DNA 돌연변이 양상

제1가족 감염자에서 검출한 HBV-DNA의 core nonsense 돌연변이 형태는 모두 일치하였는데, 따라서 동일한 바이러스로 감염되었음을 확인할 수 있었다. 한편 pre-core의 nonsense 돌연변이는 1896번째 G → A 정지코돈으로 모두에서 발견되었으며, 6명에서는 원형(wild type) 바이러스와 돌연변이 바이러스가 공존하는 형태(혼합형)를 나타냈고 4명에서는 돌연변이 바이러스 우성 형태를 보였다. 그리고 남자 1명에서는 1899번째 G → A 정지코돈 우성형이 발견되었다 (Table 1).

Pre-core nonsense 돌연변이 혼합형 또는 우성형 형태와 만성간염 또는 건강보유자와의 상관성은 관찰되지 않았다. 6명의 혼합형에서 3명은 만성간염, 3명은 건강보유자이었다. 우성형 4명에서도 만성간염 환자 및 건강보유자가 각각 2명씩이었다. 세대에 따른 돌연변이 형태의 분포도 차이가 없었다. 1세대 4명중 3명은 혼합형, 1명은 돌연변이 우성형이었다. 자녀들 6명에서는 3명이 혼합형이고 나머지 3명은 1896번째 정지코돈을 가진 돌연변

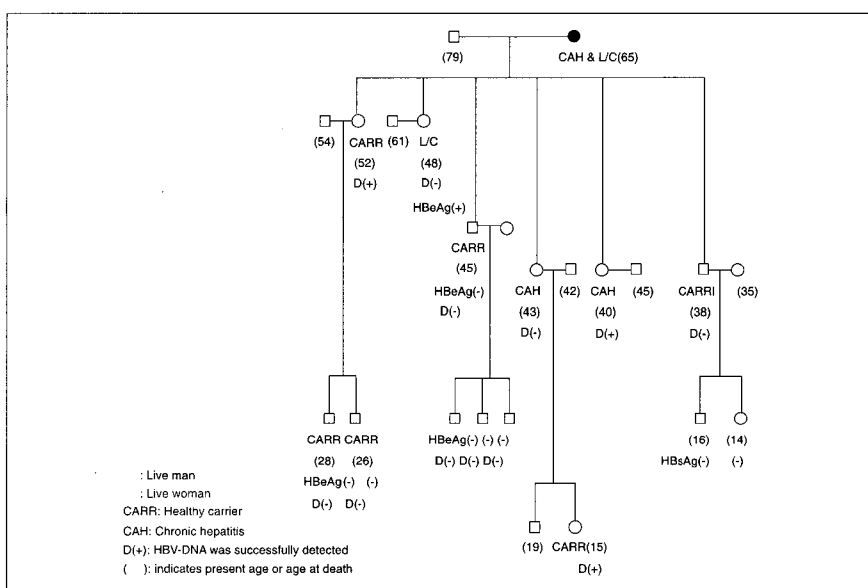


Fig. 2. Characteristics of No. 2 Family members

Table 1. Detected HBV-DNA core and precore mutation in No. 1 family members

Family member & degree of relatives	Sex/ Age	Clinical diagnosis	Nonsense mutation							Missense mutation		
			Core							Pre-core#		Core (Amino Acid)
			39 Arg	51 His	58 Ala	116 Leu	120 Val	166 Arg	1896	1899		
Son 1	M/54	CAH	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	G/A	A	13 T-C (Val/Ala) 148 C-T (Val/Ile) 168 C-G (Glu/Gly)	
Daughter 1 =Grandson11	F/47	CAH	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	G/A	-	168 C-G (Glu/Gly)	
	M/26	CARR	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	G/A	-	147 G-A (Val/Ile) 168 C-G (Glu/Gly)	
=Grandson12	M/24	CAH	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	A	-	168 C-G (Glu/Gly)	
Daughter2 =Grandson21	F/39	CAH	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	G/A	-	-	
	M/16	CARR	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	G/A	-	5 C-A (Pro/Thr)	
Daughter 3 =G-daughter31 =G-daughter32 =Grandson33	F/37	CAH	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	A	-	5 C-A (Pro/Thr)	
	F/15	CARR	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	G/A	-	-	
	F/12	CARR	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	A	-	-	
=Grandson33	M/8	CARR	A-C	T-C	T-A	T-C	T-C	T-C	A	-	-	

Note: Among 11 HBV carriers, HBV-DNA detection was successful in 10 cases.

=: 2nd generation, CAH: Chronic active hepatitis, CARR: Healthy carrier, #: A: Mutant, G/A: Mixed wild and mutant precore

이 우성 형태로 나타났다. 한편 돌연변이 우성형을 가진 만성간염 어머니(daughter 3)로부터 태어난 자녀 3명(건강 보유자) 중 2명에서 어린 나이에도 불구하고 돌연변이 우성형 바이러스를 보유한 것으로 나타났다(Table 1).

Core missense 돌연변이는 가족 10명 중 6명(1세대 3명, 2세대 3명)의 HBV-DNA에서 발견되었다(Table 1). 6명중 4명이 만성간염이었고 2명은 건강보유자이다. 만성간염 환자 5명중 4명, 건강보유자에서는 5명중 2명에서 돌연변이가 발견되었다. 만성간염 환자에서의 돌연변이 부위는 168번째 C → G (Glu/Gly) 형태의 돌연변이가 3명에서 발견되었고, 1명은 5번째 C → A (Pro/Thr)의 돌연변이 형태를 가지고 있었다. 건강보유자 2명(모두 2세대임)에서 발견된 돌연변이 형

태는 각각 168번째와 5번째이었다. 건강 보유자 1명이 가지고 있었던 5번째 돌연변이 형태는 만성간염 환자인 작은 이모(daughter 3)의 돌연변이 형태와 동일하였다.

2) 제 2가족에서의 HBV-DNA 돌연변이 양상

제2가족 감염자에서 검출한 3명의 HBV-DNA core nonsense 돌연변이 형태는 동일하였다. 동일한 바이러스에 감염되었음을 나타냈다. Pre-core nonsense 돌연변이 형태는 만성간염 유무와 관계없이 3명 모두 1896번째 정지 코돈을 가진 돌연변이 바이러스와 원형 바이러스가 혼합되어 있는 형태로 나타났다 (Table 2). Core의 missense 돌연변이는 1세대 2명(건강보유자와 만성간염 환자)에서만 120번째 A → G (Tyr/Cys) 돌연변이 형

태를 보였다 (Table 2).

4. 가족 감염자 MHC class-I 형태

1) 제 1가족에서의 형태

예상한 바와 같이 4촌 이내의 가족이기 때문에 MHC class-I 형태는 비슷하였다. A type에서는 A*3301을 10명중 8명이 가지고 있었고, B type에서는 B*5801(10명중 9명), C type은 Cw*0302(10명중 9명)를 공통적으로 가지고 있어 A*3301, B*5801, C*0302가 가족공통 형태라고 할 수 있었는데 10명중 7명이 보유하고 있었다. 나머지 3명중 1명(Grandson11, 남 26세, 건강보유자)은 B, C type이 다른 가족과 달랐고, 나머지 2명은 어머니-아들(Daughter 2 만성간염 39세와 Grandson21 건강보유자 16세)로서 A type이 다른 가족과 차이를 보였다(Table 3)

Table 2. Detected HBV-DNA core and precore mutation in No. 2 family members

Family member & degree of relatives	Sex/ Age	Clinical diagnosis	Nonsense mutation									Missense mutation	
			Core							Pre-core#		Core	
			22 Asp	26 Ser	51 His	115 Val	130 Pro	132 Tyr	167 Arg	1896	1899	(Amino Acid)	
Daughter 1	F/52	CARR	T-C	C-T	T-C	T-G	C-T	C-T	A-G	G/A	-	120	A-G (Tyr/Cys)
Daughter 4	F/40	CAH	T-C	C-T	T-C	T-G	C-T	C-T	A-G	G/A	-	120	A-G (Tyr/Cys)
=G-daughter31	F/15	CARR	T-C	C-T	T-C		C-T	C-T	A-G	G/A	-	-	-

Note: Among 9 HBV carriers, HBV-DNA detection was successful only in 3 cases.
 =: 2nd generation, CAH: Chronic active hepatitis, CARR: Healthy carrier, #: A: Mutant, G/A: Mixed wild and mutant precore

Table 3. Detected major histocompatibility class-I types in No. 1 and 2 family members

Family No.	Family member and relationship	Sex/Age	Clinical diagnosis	MHC Class-I type		
				A-type	B-type	C-type
No. 1 Family	Son 1	M/54	CAH	A*2601, 3301	B*5801	Cw*0302
	Daughter 1	F/47	CAH	A*3301	B*4402, 5801	Cw*0302
	=Grandson11	M/26	CARR	A*3301	B*4402	Cw*0701, 1401
	=Grandson12	M/24	CAH	A*3301	B*1501, 5801	Cw*0302, 0303
	Daughter 2	F/39	CAH	A*02, 2601	B*5801, 62	Cw*0302, 0701
	=Grandson21	M/16	CARR	A*02, 2601	B*2702, 5801	Cw*0101, 0302
	Daughter 3	F/37	CAH	A*3301	B*4402, 5801	Cw*0302
	=G-daughter31	F/15	CARR	A*02, 3301	B*1502, 5801	Cw*0101, 0302
	=G-daughter32	F/12	CARR	A*3301	B*4402, 5801	Cw*0302, 0701
=Grandson33	M/8	CARR	A*3301	B*5801	Cw*0302	
No. 2 Family	Daughter 1	F/52	CARR	A*2402, 3301	B*51/52, 5801	Cw*0302, 1201
	Daughter 4	F/40	CAH	A*2402, 2601	B*1501, 51/52	Cw*0801, 1201
	=G-daughter31	F/15	CARR	A*2402, 3201	B*1401, 1501	Cw*0801

Note: Major histocompatibility(MHC) type was analysed for them whose HBV-DNA was detected
 =: 2nd generation, CAH: Chronic active hepatitis, CARR: Healthy carrier,

2) 제2가족에서의 형태

A type에서는 A*2402를 3명 모두 공통적으로 가지고 있었고, B type에서는 1세대 자매간에서 B*51/52를 공유하였으며 숙질간인 Daughter 4와 G-daughter31에서 B*1501을 공유하고 있었다. C type은 1세대 자매간에 Cw*1201를 같이 가지고 있었고 Daughter 4와 G-daughter31의 숙질간에 Cw*0801을 공유하고 있었다(Table 3).

5. HBV-DNA 돌연변이 및 MHC class-I 형태와 질병경과와의 관계

HBV-DNA 돌연변이 형태 및 MHC class-I 형태와 질병상태와의 관련성에 대한 분석에서 제 2가족은 대상이 너무 작아 생략하고 제 1가족에서만 살펴보았다(Table 4)

MHC형태와 질병경과를 비교하면, 먼저 가족공통 형태(A*3301, B*5801, Cw*0302) 보유자 7명중 만성간염 환자가 4명(총 만성간염 환자를 분모로 하면 4/5), 건강보유자 3명(총 건강보유자를 분모로 하면 3/5)이었다. 가족을 보다 세분하여 모-자녀군별로 만성간염과 건강보유자간의 MHC 형태 차이, 즉 Daughter 1 가족에서 건강보유자인 Grandson1과 나머지 가족과의 차이, Daughter 2와 Grandson21과의 차이, 그리고 Daughter 2와 나머지 자녀와의 차이는 주로 B 또는 C-type에서 나타난다.

Pre-core nonsense 돌연변이 형태(혼합형 6명, 돌연변이 우성형 4명)와 MHC type과를 비교해 보면, MHC 가족공통 형태 7명중 혼합형 3명, 돌연변이 우성형 4명이었다. MHC type과 Pre-Core 돌연변이 형태를 동시에 고려한 질병경과에 특이점이 발견되지 않았다.

MHC type과 core missense 돌연변이 형태(168부위 4명, 5부위 2명, 돌연변이 무 4명) 및 질병경과와의 관계를 보면 가족공통 형태 MHC를 가지고 있으나 core missense 돌연변이가 없는 3명 모두가 건강보유자로 남아 있었다.

Table 4. Relationship between clinical diagnosis, HBV-DNA mutations, and major histocompatibility class-I type in No. 1 family members

HBV-DNA mutation type	MHC type (family common type@)		MHC type (not common type)	
	CAH	CARR	CAH	CARR
pre-core sense				
G/A	2	1	1	2
A	2	2	-	-
core missense				
168 C→G	3	-	-	1
5 C→A	1	-	-	1
no mutation	-	3	1	-
Total	4	3	1	2

@: Family common type denotes A*3301, B*5801, Cw*0302
 A: Mutant precore, G/A: Mixed wild and mutant precore
 CAH: Chronic hepatitis CARR: Healthy carrier

고찰

우리 나라는 B형간염 감염율이 높은 지역에 속하고 있는데(Ahn, 1996), 강한 가족집적성 감염양상을 보이는 것이 C형간염 감염양상과는 다르다(Kim et al., 1994). 본 연구의 주요한 연구가설의 하나는 가족집적성 감염자는 동일한 바이러스에 의한 것인가? 이었다. 두 가족의 2세대에 걸쳐 혈청학적으로 HBsAg 만성보유자로 판정한 20명중에서 HBV-DNA가 동정된 13명의 HBV 염기서열을 분석한 결과, 표면항원은 모두 adr형으로 나타나 동일한 표면항원에 감염되었음을 확인하였다. 그러나 핵항원 및 전핵항원을 모두 분석해 본 결과에서는 같은 가족에서 감염된 바이러스는 동일하였으나 가족이 다른 경우에선 동일하지 않았다. 요컨대, 표면항원 형태로는 두 가족에 감염된 바이러스가 동일한 것으로 보이지만 염기서열상으로 보면 같은 가족원의 바이러스만 동일한 것으로 나타나고 있어 가족집적성을 보이는 감염은 거의 대부분 동일한 감염원에 의한 것이라고 할 수 있다.

본 연구의 주요한 또 다른 연구가설은, 만일 동일한 바이러스 감염이라면 가족 감염자들의 질병경과에 관여하는 요인은 무엇인가? 하는 것이었다. B형간염의 만성화 과정에 관여하는 요인은 이론적으

로 볼 때, HBV의 간세포내 지속적인 증식 및 돌연변이 정도와 숙주의 면역학적 능력이라고 할 수 있다. 특히 혈중 바이러스의 지속은 B형간염 바이러스 항원을 인식하는 T세포의 특수한 장애와 연관이 있다는 주장이 있다(Lau et al., 1992). 또한 동일한 유전적 배경을 가진 숙주라 하더라도 동일한 항원에 대한 면역반응의 정도가 신체적 조건, 예를 들어 성, 영양상태, 약물복용, 호르몬의 변화, 긴장상태, 임신, 방사선 조사 그리고 질병상태 등에 따라서 달라질 수 있다.

일반적으로 바이러스 감염에서 바이러스 유전자의 점 돌연변이는 병리기전에 중요한 영향을 미치는 것으로 되어있다. 예를 들면 Polio 바이러스 3형태에서 한 개의 유전자 변이는 바이러스의 신경 독성을 없애는 결과를 초래함이 알려져 있다(Evans et al., 1985). HBV는 바이러스 복제에 있어서 역전사(reverse transcription)기전을 사용하는데, RNA에서 DNA로 전사되는 동안 발생하는 오류가 잘 교정되지 않아 다른 DNA 바이러스 보다 돌연변이율이 높아(Summers et al., 1982), HBV핵산 돌연변이율은 1.4×10^{-5} 에서 $3.2 \times 10^{-5}/\text{year}$ 로 추정하고 있다(Okamoto et al., 1987). HBV 돌연변이가 질병경과에 미칠 수 있다는 근거로 보고된 내용은 다음과 같다. 첫째, 돌연변이가 일어나도 바이러스가 제거되지 않고 그

대로 존재한다(Blum et al., 1991), 둘째, 바이러스 복제 정도가 감소한다(Shafritz et al., 1991), 셋째, pre-core 돌연변이 환자에서 간세포 손상 정도가 증가한다(Sato et al., 1995), 넷째, 표면항원 혹은 조절 유전자의 돌연변이로 인한 체액성 면역의 변화 가능성(Melegari et al., 1994), 다섯째, 세포 매개 독성 T세포 항원 결정기의 변화로 인하여 세포 독성 T세포 길항작용(Wakita et al., 1991), 그리고 여섯째로, 낮은 복제 정도로 인한 원인 미상의 간염 초래 가능성(Kaneko et al., 1989) 등이다.

최근의 몇몇 연구에서 보면 e항원 양성인 만성간염 환자들에게서 세포 독성 T림파구의 공격으로 인하여 core 유전자의 nonsense 돌연변이가 특정 부위에 집중적으로 생긴다는 보고가 있으며, 이들 부위가 나라마다 서로 다르게 나타난다는 연구가 있다. 이중 일본의 경우 84-101(Ehata et al., 1992), 중국의 경우 48-60, 84-101, 147-155(Chuang et al., 1993), 한국의 경우 21-34, 85-100(Koh et al., 1995) 부위의 집중 현상을 보고하고 있다. 이는 돌연변이 집중 부위에 인종간 차이가 있다는 것을 시사하는 것인데, 이러한 차이의 원인은 아직 모르고 있다. 아마도 이것은 HLA 항원의 분포가 인종마다 차이가 나기 때문이며, HBV의 아형에 따라 단백질에 차이가 있기 때문으로 추측하고 있다(Kumagai et al., 1979; Lin et al., 1982; Kim et al., 1993). 그러나 이들 연구에서는 대상자들의 유전적인 배경(가족 감염자가 아님)이 전혀 다르며, 감염된 바이러스의 아형도 모두 달랐다. 본 연구에서 core nonsense 돌연변이를 보면 제1가족은 구성원 모두에게 39-58, 116-166 부위에 있었으며, 제2가족에서는 22-51, 115-169 부위였고, 가족 구성원들 간에 동일한 양상으로 나타나고 있어 nonsense부위의 돌연변이는 특정 MHC 형태와는 상관없이 없으며, 다만 바이러스의 아형과 상관이 있을 것으로 생각된다.

바이러스 돌연변이와 질병양상 간의 관련성을 보고한 연구중, 특히 pre-core 부위 즉 1898번째 염기 서열의 돌연변이

바이러스와 전격성 간염간의 상관성에 관한 연구가 있다(Brunetto et al., 1989; Kosaka et al., 1991; Liang et al., 1991; Omata et al., 1991; Carman et al., 1992; Sato et al., 1995). HBV로부터 자연 면역된 10명과 심한 활동성 및 전격성간염 환자 9명의 pre-core 유전자 비교를 한 결과 1896 번째 G->A 돌연변이가 후자 그룹에서 발견됨을 보고하면서(Omata et al., 1991), pre-core의 특정 부위에 돌연변이가 생겨 정지 코돈을 발생시키면 e 항원이 더 이상 혈청으로 분비되지 않거나 또는 e 항체가 생겨 바이러스의 관해가 일어나는데, e 항체를 가진 환자 중 일부는 전격성 간염이나 심각한 재발성 간염을 초래하는 것으로 해석하였다. 다른 연구에서도 pre-core 부위 (1898 혹은 1901)의 돌연변이는 전격성간염 발생과 유의한 상관성이 있다고 하였다(Liang et al., 1991; Hasekawa et al., 1994). Kosaka 등(1991)은 전격성간염 환자 10명과 급성 비전격성간염 환자 8명을 대상으로 연구를 하였는데, 대조군 8명에서는 돌연변이가 전혀 발견되지 않았던 것에 비하여 전격성 간염 환자군에서는 10 명중 9 명(90%)에서 pre-core 부분의 돌연변이를 가진 바이러스 유전자를 검출하였음을 보고하였다. 이들은 e 항체 양성자들에게서 DNA 증식을 증가시키는 pre-core 돌연변이가 만성 활동성 간염을 초래하는 요인으로 작용할 것이라는 가설을 제시하였다. 이들은 pre-core 돌연변이 바이러스들 중에서 복제 능력이 높은 특히 독성을 가지는 바이러스가 전격성 간염 혹은 심한 활동성 간염을 일으키며 간 조직의 손상을 가져오는 것이라는 주장을 하고 있다. 특히 Raimondo 등(1990)은 재발을 자주하는 만성 간염 환자 1명을 4 년간 추적해본 결과 재발 과정에서 e 항원을 분비하지 못하는 새로운 변형 바이러스가 출현하는 것을 증명하였으며, 만성 B형 간염의 재발 과정에 변형 바이러스가 관여할지도 모른다는 가설을 제시하였다. Brunetto 등(1989)은 e 항원 양성자 42 명과 e 항체 양성자 64 명을 대상으로 바이러스 형태와 간염의 정도를 비교하여, 바

이러스 형태에 따라 병리 조직학적인 차이는 유의하지 않으나 돌연변이 바이러스를 가진 군에서 재발성 간염이 유의하게 높다고 하였다. 즉, e 항원이 존재하는 경우 원형(wild type) 바이러스 빈도가 매우 높으며, 이들이 주로 면역 반응을 조절하여 만성 보유자로 남게되는데, 시간이 지나면서 e 항체가 생성되면 e 항원 음성 돌연변이 바이러스가 상대적으로 살아남게 되어, e 항원과 원형 바이러스에 의한 면역 조절에 변화를 가져오게 되고 동시에 간염의 재발을 일으킨다고 해석하였다. 그러나 이러한 주장은 아직 가설수준에 있다. 왜냐하면 바이러스 돌연변이가 생길 수 있는 부위가 너무 많고, 일정 규모의 환자를 대상으로 경시적인 관찰을 하여야 정확한 질병경과와의 관련성을 알 수 있기 때문이다.

본 연구의 대상자는 HBV 만성보유자로서 그 대부분은 아마도 주산기에 감염되었을 것으로 추정된다. HBsAg양성자 20명중 8명이 만성간염이었고 12명은 건강보유자이었는데 이들의 평균 연령에서 유의한 차이를 보인 것으로 보아 감염기간 또는 항원보유기간은 질병경과에 영향을 미치는 주요한 요인의 하나라고 해석된다. 그러나 HBV-DNA가 동정된 13명 모두에서 pre-core 1896(G->A) 변이로 정지 코드가 있는 것으로 확인되었는데, pre-core 돌연변이가 질병경과에 관련된다는 이전의 주장과는 반대되는 소견이다. 본 연구가 이전의 연구들에 비하여 가지는 장점의 하나는 연구 대상이 동일한 바이러스에 감염된 만성보유자라는 점인데, 이러한 관점에서 본 연구의 성격이 이전의 연구결과들에 비하여 보다 신뢰성을 가진다고 판단한다. Pre-core 돌연변이가 HBV 감염 후 어린 나이에 일어난 경우(제1가족 daughter 3의 자녀들)에도 건강보유자로 남아 있는 사례가 있고, 주산기에 돌연변이가 이미 일어난 바이러스에 감염되었을 것으로 추정되는 경우(동일한 core missense mutation이 관찰된 경우)에서도 질병경과가 서로 다른 사례(제1가족 Grandson 11과 12)도 있어 pre-core 돌연변이 자체가 만성간염 이행

요인의 하나라는 주장은 받아들이기 어렵다.

B형간염의 만성화 과정과 주조직적합체(MHC)간의 관련성에 관한 지금까지의 연구 결과들을 다음과 같이 요약할 수 있다. HBV는 반드시 살아있는 세포내에서만 증식할 수 있는데 직접 간 세포를 공격하여 세포 독성을 일으키지 않고, 간 세포 괴사는 간 세포 표면에 발현되어 있는 바이러스 부속물들에 대한 숙주의 면역 반응에 의존하며(Edington et al., 1975), 간세포 파괴의 지속은 세포 매개성 면역 반응이 관여한다(Parnetto et al., 1975; Wands, 1975; Eddelston, 1980; Mondelli et al., 1982). 이는 HBsAg보다 핵항원(HBcAg)에 대한 세포매개성 면역반응의 결과로 확인되었다(Vento et al., 1985). 일반적으로 HBV의 pre-core 및 core 유전자는 두 가지 형태의 항원 즉 c-항원과 e-항원을 만드는데, c-항원은 간세포 표면에, e-항원은 혈청으로 분비된다. 이 두 가지의 항원은 비슷한 삼차원 구조를 가지고 있으며, 이들 항원중 일부만이 class-I 제한성, 세포 독성 T세포의 활동을 유도하는 단백질을 포함하고 있다는 것이 보고되었으며(Ishioka et al., 1989), MHC class-I 제한 세포 매개성 면역반응과 class-II 제한성 면역 반응에 관여하는 단백질 서열도 분석되었다(Alexander et al., 1991; Kirsten et al., 1991). 이후 만성 B형간염의 간세포 괴사에 핵 항원과 MHC가 관여한다는 수평의 연구결과가 보고된 바 있다(Bertoletti et al., 1991; Ehata et al., 1992; Tsai et al., 1992).

본 연구 대상자 모두 핵 항원이 양성이었으며 핵 항체는 한사람도 발견되지 않았는데, 이는 현재 혈중에 바이러스가 증식되고 있는 상태이거나, 또는 일부에서 핵항체가 생성되기 이전 단계에 있을 가능성이 생각할 수 있으나 전자의 가능성이 많을 것으로 판단한다. 이전 연구에서 보면 활동성 B형간염을 가진 산모가 임신을 하고 있을 때 어머니의 anti-HBc가 태아에게 전달되어, 태아의 간 표면에 바이러스 핵 항원의 발현을 억제하여 면역 관용이 생겨 결과적으로 바이러스의

제거를 어렵게 한다고 설명하고 있다(Chu et al., 1987). 그리고 감염된 바이러스는 지속적으로 핵 항원을 일정 농도 이상 분비하여 숙주의 면역 기구가 바이러스 감염을 인식할 수 없도록 한다는 가설이다. 그러나 바이러스 혈증이 지속되다가 어떤 사람은 급성 간염 과정을 겪고난 후 바이러스가 관해되는 반면, 대부분은 만성 간염 바이러스 보유자가 되거나 활동성 간염 상태가 된다. 여기에 MHC class-I 형태가 관여할 것인가? 서론에서도 밝혔듯이 세포 매개 T 임파구에 의하여 지속적으로 면역 공격(immune pressure)을 받는 항원결정기(epitope)가 존재하며 이 부위가 세포독성 T임파구의 공격부위로 나타난다는 보고가 있다(Ferrari et al., 1987). B형 간염 바이러스가 세포질내로 유입된 후 우선 세포질내의 단백 분해효소에 의하여 펩타이드로 처리된 후 조면형질내세망(RER)으로 운반된다. 이 소기관은 class I 및 class II 항원을 포함한 세포막 단백을 합성하고 조립하는 기관이다. 여기에서 펩타이드는 새로 합성된 class I 분자와 효과적으로 조립된다. 일반적으로 HBc 항원이 RER 내에서 함께 합성되어 지는 것은 MHC class I 형태이고, 파괴된 세포 표면에 노출된 항원이나 세포 외에 있는 바이러스 항원은 세포막으로 전입되어 세포내 소낭에서 MHC class II와 결합하여 세포 표면에 발현되는 것으로 설명하고 있으며, RER에서 처리된 단백질이 MHC class-I과 함께 세포막에 발현되어 세포매개 T임파구의 면역공격을 받는 기전이 제시된 바 있다 (Van Bleek et al., 1990). 본 연구에서 조사한 MHC class-I 형태를 질병경과와 비교하면 주로 B 또는 C-type에서 차이를 보이고 있어 MHC class-I과 질병발현과 관련이 있을 가능성이 있음을 시사하고 있다. 그리고 질병경과와 관련하여 pre-core 돌연변이와 MHC 형태의 상호작용 가능성을 살펴볼 때 특이한 소견은 없었다. 반면, 가족공통의 MHC 형태를 가지고 있으나 core missense 돌연변이가 없는 경우는 건강보유자로 남아 있었는데, 이는 질병경과에

있어 MHC형태와 core missense 돌연변이의 상호작용이 관여할 것이라는 가능성을 시사하고 있어 후속적인 추가 연구가 필요하다고 판단한다.

결론

2세대 이상에 걸쳐 가족집적성을 보이는 HBsAg 만성보유자 2가족군 20명(제1가족 11명과 제2가족 9명)을 대상으로 HBV의 건강보유 또는 만성간염 여부를 확인하고 혈청에서 HBV-DNA를 동정하였으며, HBV의 표면항원 형태, e항원-항체, 그리고 HBV 염기서열 및 Pre-Core와 Core 돌연변이 등을 검사하였다. HBV-DNA 검출이 가능하였던 13명에 대하여는 주조직적합체(MHC-Class I)형을 검사하였다. 이상의 자료를 분석하여 다음과 같은 소견과 결론을 얻었다.

1. 제1가족 11명중 1세대 4명은 모두 만성간염 상태이었으며 2세대 7명중 1명이 만성간염이었고 나머지 6명은 건강보유자이었는데, 만성간염 5명의 평균 연령은 40.2세로서 건강보유자 6명의 평균연령 15.3세보다 많았다. 제2가족 9명(1세대 6명과 2세대 3명)중 1세대 3명이 만성간염 상태이었고 나머지 6명은 건강보유자였는데, 만성간염 3명의 평균 연령은 43.7세, 건강보유자 6명의 평균연령은 34.0세이었다. 두 가족의 비교에서 연령이 많은 군에서 만성간염 분율이 높은 것으로 미루어, HBsAg 만성보유 기간(연령)이 길수록 만성간염으로 이행하는 위험도가 높아지는 것으로 판단된다.

2. HBV 표면항원 형태는 모두 adr형이었으며, e항원도 모두 양성이었다. 바이러스 염기 서열 분석에 의하여 제1가족에서 검출된 HBV는 모두 동일한 것으로 판명되었으며, 제2가족 3명의 바이러스도 동일한 것이었다. 2세대 이상 가족집적성을 보이는 가족감염자는 거의 대부분 동일한 바이러스에 의하여 감염되고 있음을 보였다.

3. 동일한 바이러스 감염에서 pre-core 및 core 부위의 돌연변이가 만성간염 등

의 질병경과와 관련이 있다는 증거는 발견할 수 없었으나, MHC-class I 형태와는 그 관련성을 일부 시사하는 소견이 관찰되었는데 특히 B 또는 C-type과 관련이 있을 것으로 추측되었다. 이 분야에 대하여는 차후 합당한 연구방법을 적용한 추가 연구가 요구된다고 생각한다.

감사의 말씀

본 연구의 취지를 이해하시어 흔쾌히 연구 대상으로 참여하여 주신 20명의 만성 HBV 보유자 여러분께 충심으로 감사드립니다.

참고문헌

- 김정룡, 김진욱, 이효석, 윤용범, 송인성. 만성간염 및 간경변증 환자의 자연경과와 생존율에 관한 연구-20년간의 자료분석. 내과학회지 1994; 46: 168-180
- Ahn YO, Kim YS, Lee MS, Shin MH. Hepatitis B virus infection rate among Koreans. *Seoul J Med* 1992; 33: 105-144
- Ahn YO. Strategy for vaccination against hepatitis B in areas with high endemicity: Focus on Korea. *GUT* 1996; 38(suppl 2): S63-66
- Ahn YO. Recent changes in HBV carrier rate among Koreans, editorial. *JAMA Korea* 1999; Sept./Oct.: 5
- Alexander YR, Paula PH, Hong SC, Barlow A, C.A. Janeway Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991; 353: 622-627
- Bernier RH, Sampliner R, Gerety R, Tabor E, Hamilton F et al. Hepatitis B infection in households of chronic carriers of hepatitis B surface antigen. *Am J Epidemiology* 1982; 116: 199-211
- Bertoletti A, Ferrari C, Fiaccadori F, Penna A, Margolske R et al. HLA class II restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10445-10449
- Blum HE, Galun E, Liang TJ. Naturally occurring missense mutation in the polymerase gene terminating hepatitis B virus replication. *J Virol* 1991; 65: 1836-1842
- Brunetto MR, Stemler M, Schodel F. Identification of HBV variant which cannot produce precore derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis. *Ital J Gastroenterol* 1989; 21: 151-154
- Carman WF, Thomas HC. Genetic variation in hepatitis B virus. *Gastroenterology* 1992; 102: 711-719
- Caroters AM, Urlaub G, Mucha J, Grunberger D, Chansin LA. Point mutation analysis in the mammalian gene; rapid preparation of total RNA PCR amplification of cDNA and Taq sequencing by a novel method. *Biotechnics* 1989; 7: 494-499
- Chu CM, Shyu WC, Kuo RW. HLA class I antigen display on hepatocyte membrane in chronic hepatitis B virus infection: Its role in the pathogenesis of chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1987; 7: 1311
- Chuang WL, Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Ohto M. Precore mutations and core clustering mutations in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1993; 104: 263-271
- Eddelston ALWF. Immunology of the liver. In: C.W. Parker ed. *Clinical Immunology*. Philadelphia: W.B Saunders; 1980. p.1009
- Edington TS, Chisari FV. Immunologic aspects of hepatitis B virus infection. *Am J Med Sci* 1975; 270: 213
- Ehata T, Omata M, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Variation in codons 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatocellular injury in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 1992; 89: 332-338
- Evans DMA, Dunn G, Minor PD. A single nucleotide change in the 5' non-coding region of the genome of the sabin type 3 poliovaccine is associated with increased neurovirulence. *Nature* 1985; 314: 548-550
- Ferrari C, Penna A, Giuberti T, Tong MJ, Ribera E et al. Intrahepatic, nucleocapsid antigen-specific T cells in chronic active hepatitis B. *J Immunology* 1987; 139: 2050-2058
- Foster GR, Ackrill AM, Goldin RS, Kerr IM, Thomas HC et al. Expression of the terminal protein region of hepatitis B virus inhibits cellular responses to interferon alpha and gamma and double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2888-2892
- Grossman RA, Benenson MW, Scott RM. Epidemiologic study of hepatitis B virus in Bangkok, Thailand. *Am J Epidemiology* 1975; 101: 144-149
- Hadler SC, Margolis HS. Epidemiology of hepatitis B virus infection. In: Ellis RW, ed. *Hepatitis B vaccines in clinical practice*. New York: Marcel Dekker; 1993. p.148-149
- Hasegawa K, Huang J, Rogers SA, Blum HE, Liang TJ. Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *J Virol* 1994; 68: 1651-1659
- Hedden V, Callen W, Short JM, Kretz K. Improved sequence analysis of mutations identified with the Big Blue System: New protocol can be completed in 2 days. *Strategies in Mol Biol* 1993; 6: 27-28
- Hillis WD, Hillis A, Bias WB. Association of hepatitis B surface antigenemia with HLA locus B specificities. *NEJM* 1977; 296: 1310
- Ishioka GY, S. Colon, C. Miles, HM Grey, RW Chesnut. Induction of class-I MHC-restricted, peptide-specific cytolytic T lymphocytes by peptide priming in vivo. *J Immunology* 1989; 143: 1094-1100
- Kaneko S., Miller RH., Finstone SM. Detection of serum hepatitis B virus DNA using the PCR assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 312-316
- Kim KT, Hyun SW, Kim YS, Rho HM. Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus(subtype adr). *Korean J Biochem* 1988; 21: 319-331
- Kim YS, Ahn YO. Factors associated with intrafamilial transmission of hepatitis B virus infection in Korea. *J Korean Med Sci* 1993; 8: 395-404
- Kim YS, Ahn YO, Kim DW. Familial clustering of hepatitis B and C viruses in Korea. *J Korean Med Sci* 1994; 9: 444-449
- Kim TG, Han H, Lim BU, Kim WI, Kim SM. Distribution of HLA class-I alleles and haplotypes in Korean. *J Korean Med Sci* 1993; 8: 180-186
- Kirsten F, Olaf R, Stefan S, Jung G, Rammensee HG. Allele specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991; 351: 290-296
- Koh KC, Lee HS, Kim CY. Association of the Core Clustering Mutations(Codon 21-34) and the Severity of Chronic Hepatitis in Korean Patients. *Korean J Int Med* 1995; 10: 87-93
- Kosaka Y, Takase K, Kojima M, Shimizu M. Fulminant hepatitis B. Induction by hepatitis B virus mutants in the precore region and incapable of encoding e antigen. *Gastroenterology* 1991; 100: 1087-1094
- Kumagai M. Genetic factors(HLA) and cellular immunity in the pathogenesis of asymptomatic HBsAg carrier. *Act Hepatol Jpn* 1979; 20: 339-345
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positive with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238
- Lau JYN, Konkouli G, Mieli-vergano G et al. Syncytial giant-cell hepatitis: A specific disease entity? *J Hepatology* 1992; 15: 216

- Liang TJ, Hasegawa K, Riman M. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *NEJM* 1991; 324: 1899-1904
- Lin DY, Liaw YF, Chu CM, Chen GH. Histocompatibility profile of hepatoma in Taiwan. *J Formosan Med Assoc* 1982; 81: 1126-1131
- Lok AS, Lai CL, Wu PC, Wong VC, Yeoh EK, Lin HT. Hepatitis B virus infection in Chinese families in Hongkong. *Am J Epidemiology* 1987; 126: 492-499
- Melegari M, Bruno S, Wands JR. Properties of hepatitis B virus Pre-S1 deletion mutants. *Virology* 1994; 199: 292-300
- Mondelli M., G.M. Vergani, A. Alberti, D. Vergani, B. Portman, Eddelston. A.L.W.F, R. Williams. Specificity of T lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: Evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J Immunology* 1982; 129: 2773-2778
- Naoumov NW, Mondelli M, Alexander GJM. Relationship between expression of hepatitis B virus antigens in isolated hepatocytes and autologous lymphocyte cytotoxicity in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1984; 4: 13
- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-yr-old woman who contracted the infection through maternal-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 1987; 57: 231-236
- Omata M, Ehata T, Yokosuka O. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *NEJM* 1991; 324: 1699-1704
- Park BJ. Longitudinal study on the negative conversion rate of HBsAg among male adults in Korea. *Seoul J Medicine* 1989; 30: 243-248
- Parnetto F, Vernace SJ. Immunological studies in patients with chronic active hepatitis. Cytotoxic activity of lymphocyte to autochthonous liver cells grown in tissue culture. *Clin Exp Immunol* 1975; 19: 99
- Raimondo G, Schneider R, Stemler M, Smedile V, Rodino G, Will H. A new hepatitis virus variant in a chronic carrier with multiple episodes of viral reactivation and acute hepatitis. *Virology* 1990; 179: 64-68
- Roitt IM. Essential immunology. 7th ed. Oxford: Blackwell Scientific Pub.; 1991.
- Sato S, Suzuki K, Akahane Y. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med* 1995; 122: 241-248
- Shafritz D. Variants of hepatitis B virus associated with fulminant liver disease. *NEJM* 1991; 324: 1737-1739
- Summers J, Mason WS. Replication of genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403-415
- Szmunes W, Stevens CE, Ikram H. Prevalence of hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Chinese-Americans. *J Infect Dis* 1978; 137: 822
- Takaji W, Shinichi K, Motohiro S, Kentaro Y, Yuji I, Tadashi S. Detection of precore and core region mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Invest* 1991; 88: 1793-1801
- Tsai SL, Chen PJ, Lai MY, Yang PM, Sung JL, Huang JH et al. Acute exacerbation of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B c and e antigens. *J Clin Invest* 1992; 89: 87-96
- Van Bleek GM, Nathenson SG. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2KB molecule. *Nature* 1990; 348: 213-216
- Vento S, Hegarty JE, Alberty A, O'Brien CJ, Alexander GJM, Eddelston ALWF et al. T lymphocyte sensitization to HBcAg and T-cell mediated unresponsiveness to HBsAg in hepatitis B virus-related chronic liver disease. *Hepatology* 1985; 5: 192-197
- Wakita T, Kakumu S, Shibata M. Detection of pre-core and core region mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Invest* 1991; 88: 1793-1801
- Wands JR, Isselbacher KJ. Lymphocyte cytotoxicity to autologous liver cells in chronic active hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 1301