

Virological Characteristics in Chronic Hepatitis B Patients with Concurrent HBsAg and anti-HBs Positivity

Hyeok-Jae Lee^{1,†} and Min-Hyeok Lee²

¹Department of Clinical Laboratory Science, Seonam University, Namwon 590-711, Korea

²Department of Laboratory Medicine, Suncheon Hankook Hospital, Suncheon 540-725, Korea

In this study, we investigated the virological characteristics, HBV DNA levels and presence of mutations of "a" determinant in the HBsAg S gene in chronic hepatitis B patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. The 18 patients who were diagnosed with chronic hepatitis B were both positive for HBsAg and anti-HBs. HBV Among them, 15 patients were DNA positive. The median of HBV DNA levels in serum was 2.18×10^7 copies/mL with the HBsAg+/anti-HBsAb+ patients. Also, 4 of 8 HBeAg negative patients had HBV DNA levels higher than 10^4 copies/mL and the median of HBV DNA levels was 2.03×10^6 copies/mL, which were significantly high. These results showed that viral replication still existed in most of the patients of the concomitant HBsAg and anti-HBs, and even in the some HBeAg negative patients. Furthermore, mutation within the "a" determinant of HBV were found in 7 of 15 patients. The most frequent changes were located at positions aa126. In addition, one mutation observed for HBsAg only positive.

Key Words: HBV, HBsAg, Anti-HB, HBeAg, HBV DNA, "a" determinant, Mutation

서 론

B형 간염은 전 세계적으로 약 5% 정도의 유병률을 보이는 흔한 감염성 질환의 하나로 우리나라를 비롯해 전 세계적으로 급, 만성 간염과 간경변증 그리고 간세포암종의 중요한 원인으로 알려져 있다. 국내의 HBsAg 양성률은 B형 간염 예방백신이 상용화되기 이전인 1980년대 초에는 남자는 8~9%, 여자는 5~6%로 보고되었고, 1983년 B형 간염 예방백신이 도입된 이후에 국가 예방접종 사업 등을 통해 2008년에는 HBsAg 양성률이 남자는 3.2%, 여자는 2.7%로 조사되었다 (Ahn et al., 2010). 또한 최근 조사에 따르면 10대에서는 HBsAg 양성률이 0.44%, 10세 미만에서는 0.2%로 감소되었다 (Park et al., 2010). 그러나 만성 B형 간염의 주요 감염경로인 임신부의 B형 간염 표면항원 양성률은 1980년대에는 감소 추세

였지만 1990년에 들어서는 별다른 감소를 보이지 않고 있으며, 주산기 감염 빈도도 1995년 3.4%, 2006년 3.2%로 줄지 않고 있으며, 산발적 급성 B형 간염 발생은 오히려 2001년부터 증가 추세를 보이고 있다 (Ministry of Health & Welfare 2006). 또한 우리나라 만성 간염 및 간경변증 환자의 약 70%, 간세포암종 환자의 65~75%에서 HBsAg이 검출되는 점을 고려할 때 (Kim et al., 2008) 아직도 만성 B형 간염이 우리나라 국민 보건에 미치는 영향은 작지 않다고 생각된다.

B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus, HBV)에 의한 감염 평가를 위해 여러 혈청학적 표지자가 진단에 사용되어 왔으나 최근에는 HBV DNA를 정량화하는 여러 분자생물학적 분석기법들이 개발되고 빠르게 발전하고 있다. HBV 증식능 검출은 HBeAg 검사, HBV DNA 정량 측정법 등이 있다. 자연경과 혹은 치료에 의한 HBeAg 유·무는 만성 B형 간염을 판단하는데 필수적인 요소이며, 항바이러스제 치료 후, 효과 판정의 기준이 된다. 하지만 돌연변이가 있는 경우 HBeAg이 음성으로 나타날 수 있으므로 임상상태를 정확히 반영하지는 못한다. 혈청 HBV DNA 정량법은 바이러스 증식 정도를 직접 측정하는 것으로써 초기 HBV 감염이나 잠복 HBV 감염 (occult

*Received: June 25, 2012 / Revised: September 15, 2012
Accepted: September 17, 2012

†Corresponding author: Hyeok-Jae Lee, Department of Clinical Laboratory Science, Seonam University, Namwon 590-711, Korea.
Tel: +82-63-620-0120, e-mail: primo-uomo@hanmail.net

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

hepatitis B virus infection)의 진단이 가능하다. 따라서 HBV 복제 정도에 대한 정보를 제공하여 치료 여부를 결정하며, 예후나 항바이러스제에 대한 반응 지침으로 이용될 수 있다. 또한 간경변증으로의 진행과 간세포암종 발생 위험을 예측하는데 있어서도 중요하다. 최근에 가장 많이 사용되는 방법은 실시간중합효소연쇄반응 (real-time PCR) 법이다. 이는 HBV DNA 검출 폭이 $10 \sim 10^8$ IU/mL로 넓은 측정 범위와 높은 민감도를 보인다 (Lindh and Hannoun, 2005).

HBsAg에 대한 항체결합을 결정하는 부위를 "a" 결정기 ("a" determinant)라고 부르는데, 이 부위에 대한 항체가 형성되면 어떤 아형의 HBV 감염도 막을 수 있다고 알려져 있으며, HBsAg이 사라지고 HBV 감염으로부터 회복되게 된다 (Cha and Chae, 2000). 그러나 실제 HBsAg과 anti-HBs에 대한 검사를 시행해 보면 보고자에 따라 조금씩 다르나 동시에 양성으로 검출되는 경우가 있으며, 이의 임상적 해석에 대해서는 여러 가지 의견이 많이 제시되어 왔다. 따라서 HBsAg과 anti-HBs가 공존하는 경우 HBV DNA 검출 여부 및 검출량을 분석하여 바이러스학적인 특성을 연구하는 것은 임상적 의의를 평가하는데 있어 매우 유용할 것이다 (Cha, 2005).

본 연구에서는 HBsAg과 anti-HBs가 동시 양성인 예에서 HBV 감염 진단에 일반적으로 시행되는 혈청학적 표지자인 HBeAg과 HBV DNA 정량검사 및 생화학적 간기능 검사인 Alanine aminotransferase (ALT)를 비교 분석하여 HBV 증식상태의 상관성을 분석하고 만성 B형 간염 임상경과에 영향을 미치는 HBV S 유전자 아미노산 변이 유형의 바이러스학적인 특성을 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

대상

2010년 3월부터 2011년 3월까지 전남 동부지역에 위치한 순천한국병원에 내원한 만성 B형 간염 환자 중 항바이러스제 치료력이 없는 환자로 진단검사의학과에 HBsAg과 anti-HBs 검사가 동시에 의뢰된 환자를 대상으로 하였다. 실험군은 HBsAg, anti-HBs 동시 양성을 보인 18명이었으며, 대조군은 HBsAg만 양성을 보인 7명을 대상으로 하였다. 대상자들은 본 연구의 취지에 대해 사전에 충분히 설명 듣고 이에 동의한 환자들로 임상시험윤리기준에 준하여 연구를 실시하였다.

ALT와 B형 간염 표지자 검사

ALT는 자동화학분석기기인 TOSHIBA Accute TBA-120FR (Toshiba, Tokyo, Japan)로 측정하였고 B형 간염 표지자 검사는 VITROS ECI-Q 자동화학발광면역분석장치로 분석하였다 (Ortho-Clinical Diagnostics Inc, NY, USA). HBsAg은 기준치 COI (cut-off index)가 1.0 이상을 양성으로 anti-HBs는 12 mIU/mL 이상을 HBeAg, anti-HBe는 1.2 이상을 양성으로 판정하였다.

혈청 HBV DNA 정량검사

HBV DNA는 COBAS[®] AmpliPrep & COBAS[®] TaqMan[®] HBV Test System Version 2.0 (Roche, Basel, Switzerland)을 사용하였으며, 측정 범위는 $2.00E+01$ IU/mL (1.16×10^2 copies/mL)에서 $1.70E+08$ IU/mL (1.10×10^8 copies/mL)까지이며, 최소 검출량은 20 IU/mL이다. 또한 WHO International Standard for Hepatitis B Virus DNA for Nucleic Acid Technology (NAT) Assays Testing (NIBSC 97/746)²⁹을 이용하여 HBV IU/mL 값에 변환계수 5.82을 곱하여 copies/mL로 환산하였다.

B형 간염 바이러스 DNA 추출

혈청 150 μ L에 Viral Gene-spin[™] Viral DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 과정은 다음과 같았다. 검체 150 μ L씩 넣고, 각각 용해용 완충액 250 μ L씩 분주 후, 15초 혼합 후, 실온에 10분 정치하였다. 결합용 완충액 350 μ L를 첨가 후, 15초 혼합하였다. 시료를 칼럼에 옮기고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후, 상층액을 버리고 세척용 완충액 A를 500 μ L씩 분주 후, 13,000 rpm에 1분간 원심침전 하였다. 수 집관을 비운 후, 세척용 완충액 B를 500 μ L씩 분주하고 13,000 rpm에 1분간 원심분리 시켰다. 새롭게 표지한 PCR tube에 칼럼을 옮긴 후, 용출용 완충액을 30 μ L씩 분주 후, 1분간 반응시켰다. 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 시킨 후, DNA를 용출하였다.

B형 간염 바이러스 PCR

검체에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 S 유전자를 증폭하는 특이적 시발체를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Table 1). PCR 증폭은 dNTP (2.5 mM) 1.0 μ L, $10 \times$ buffer 2.0 μ L, BV 1F 시발체 (10 pmol) 1.0 μ L, BV 1R 시발체 (10 pmol) 1.0 μ L씩 첨가하고, Taq 중합효소 (5 U) 0.2 μ L,

Table 1. The primers used for amplifying S gene of HBV

	Primer	Sequences (5'→3')
1st PCR	1F	5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTT-3'
	1R	5'-GCAAAGCCCAAAGACCCACAAT-3'
2nd PCR	2F	5'-CATCCTGCTGCTATGCCTC-3'
	1R	5'-GCAAAGCCCAAAGACCCACAAT-3'

DNA 4.5 μ L를 첨가하고 증류수 10.3 μ L를 적정 후, 최종 반응 부피를 20 μ L하여 94°C에서 90초 전변성 시키고 94°C에서 30초 변성하고 56°C에서 30초간 결합하여 68°C 1분 동안 연장시키는 과정을 45회 반복하였고 마지막으로 72°C에서 5분 연장하여 1차 PCR을 실시하였다. 2차 nested PCR은 1차 PCR에서 획득한 산물을 주형으로 하여 BV 2F 시발체 (10 pmol), BV 1R 시발체 (10 pmol) 각 1.0 μ L를 이용하여 같은 PCR 조건으로 30회 반복하였고 72°C에서 5분간 연장하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% TBE agarose gel에서 30분간 전기영동 하여 611 bp 크기의 증폭 산물을 얻고 ethidium bromide (EtBr)로 DNA를 염색하였다.

B형 간염 바이러스 염기서열 분석

PCR 산물의 순수분리는 Dual PCR purification kit (Bionic, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 Big-Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열 분석을 수행하였으며, 시발체는 PCR에서 사용한 것과 동일하며, 과정은 다음과 같았다. Ready reaction premix 4 μ L, Big-Dye sequencing buffer 2 μ L, 시발체 (3.2 pmol/ μ L) 1 μ L, 주형 (100 nmol/ μ L) 1 μ L에 3차 증류수 12 μ L로 총 20 μ L 되게 하였다. 96°C에서 1분간 1회 변성 후, 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분간 총 25회 반복하였다. 반응이 완결된 후, 염기서열 분석용 PCR 생성물을 에탄올로 정제한 후, DNA 자동분석기 (ABI PRISM 3730[®] DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 넣고 염기서열 분석을 수행하였다. 각각의 염기서열은 National Center for Biotechnology Information의 Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)로 GenBank에 등재된 염기서열과 비교하였다.

결 과

환자의 임상적 특징

실험군인 HBsAg과 anti-HBs 동시 양성자 18명 중 HBV DNA가 20 IU/mL (116 copies/mL) 이상 양성자는 15명이었다. 이들의 연령 분포는 34세부터 70세까지 다양하였으며, 평균 연령은 50.1세였고 남자가 10명, 여자가 5명이었다. ALT가 40 IU/L를 초과해 이상 소견을 보인 경우가 7명이었다 (Table 2). 또한 HBV DNA 양성자 15명의 anti-HBs 역가를 분석한 결과 12~50 mIU/mL가 7명, 51~100 mIU/mL 6명, 101~200 mIU/mL 1명, 201 mIU/mL 이상이 1명이었다. 이들의 평균 역가는 95.1 mIU/mL이었다 (Table 3). HBsAg만 양성인 대조군 7명 중 HBV DNA 양성은 6명이었다.

HBeAg과 HBV DNA levels 분석

HBsAg과 anti-HBs가 동시 양성인 18예를 분석하였으나 HBV DNA 최소 검출 한계인 20 IU/mL (116 copies/mL) 이상은 15예였다. 이 중 HBeAg은 7예에서 양성으로 나타났고 anti-HBe는 4예에서 양성을 보였다. 1예에서 HBeAg과 anti-HBe가 동시 양성이었다고 5예에서는 HBeAg과 anti-HBe가 모두 음성이었다.

분석된 15예의 HBV DNA 농도 평균치는 2.18×10^7 copies/mL이었다. HBV DNA 정량 분포는 10^4 copies/mL 이하가 4예, $10^4 \sim <10^5$ copies/mL가 2예, $10^5 \sim <10^6$ copies/mL가 1예, $10^6 \sim <10^7$ copies/mL가 5예, 10^8 copies/mL 이상이 3예 이었다 (Table 4).

HBeAg이 양성인 7예 모두 HBV DNA 정량검사에서 10^6 copies/mL 이상 검출되었으며, ALT 검사에서 치료 기준치의 두 배 이상은 1명이었고 이들의 평균 농도는 61.7 IU/mL이었다. HBeAg 음성인 8예 중 2예에서 HBV DNA가 $10^4 \sim <10^5$ copies/mL 검출되었으며, 1예에서는 $10^5 \sim <10^6$ copies/mL 검출되었고 $10^6 \sim <10^7$ copies/mL는 1예에서 HBV DNA가 검출되었다 (Table 4). 따라서 HBeAg 음성이면서 HBV DNA가 10^4 copies/mL 이상 검출은 총 4예에서 확인되었다. 또한 ALT 검사에서 치료 기준치의 두 배 이상은 아무도 없었으며 이들의 평균 농도는 34.3 IU/mL이었다.

HBV HBsAg 변이 검출 분석

25명에서 HBsAg S 유전자 변이 검출을 시도하였으나

Table 2. Clinical characteristics of 15 patients with HBsAg and anti-HBs positivity at the same time of HBV DNA positivity

No case	Age	Sex	Clinical diagnosis	ALT (IU/mL)	anti-HBs titer	HBeAg	anti-HBe	HBV DNA Quantity (copies/mL)
1	35	f	CHB	31	50.3	Negative	Positive	2.0×10^3
2	39	m	CHB	63	75.5	Positive	Negative	1.0×10^8
3	59	m	CHB	34	20.1	Negative	Negative	2.4×10^3
4	44	m	CHB	34	30.2	Negative	Positive	2.2×10^3
5	67	m	CHB	67	65.2	Positive	Negative	8.4×10^6
6	53	f	CHB	29	76.7	Negative	Negative	2.2×10^3
7	70	m	CHB	40	15.8	Positive	Negative	3.5×10^6
8	61	m	CHB	87	14.2	Positive	Negative	1.0×10^8
9	49	m	CHB	39	38.2	Negative	Negative	3.2×10^5
10	53	f	CHB	28	50.3	Negative	Positive	7.2×10^4
11	46	m	CHB	76	143.3	Positive	Positive	1.0×10^8
12	34	f	CHB	41	30.5	Positive	Negative	3.5×10^6
13	56	m	LC	58	702.0	Positive	Negative	1.6×10^6
14	44	f	CHB	29	24.5	Negative	Negative	4.0×10^4
15	42	m	CHB	51	91.0	Negative	Negative	7.7×10^6

Abbreviations: CHB, chronic hepatitis B; LC, liver cirrhosis

Table 3. Distribution of anti-HBs titers in 15 patients with HBV DNA positivity

anti-HBs titer	Number	Average of anti-HBs titer
12~50 mIU/mL	7	95.1 mIU/mL
51~100 mIU/mL	6	
101~200 mIU/mL	1	
201 mIU/mL↑	1	

Table 4. HBV DNA levels in concomitant HBsAg and anti-HBs cases according to HBeAg

HBV DNA (copies/mL)	HBeAg		Total
	Positive	Negative	
$<10^4$	0	4	4
$10^4 \sim <10^5$	0	2	2
$10^5 \sim <10^6$	0	1	1
$10^6 \sim <10^7$	4	1	5
$>10^8$	3	0	3
Total	7	8	15

HBsAg과 anti-HBs 동시 양성자 3명과 HBsAg만 양성자 1명에서 HBV DNA를 검출하지 못하였다. 따라서 HBV DNA가 검출된 21명에서만 염기서열 분석을 실시하였다. 분석된 염기서열을 X04615 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Table 5. The pattern of mutation in "a" determinant of HBV

Positions of amino acid	Test group	Control group
I126S	2	1
I126T	3	
T131N	1	
M133T	1	
Not Mutation	8	5
Total	15	6

entrez/)의 HBsAg S 단백질 아미노산 서열과 비교하여 변이를 확인하였다.

HBsAg과 anti-HBs 동시 양성 15명 중에서 "a" 결정기(aa 124~147번) 변이는 7명에서 관찰되었고 대조군 1명에서도 변이가 관찰되었다 (Fig. 1). 변이의 대부분은 126번에서 133번째 아미노산 부위에서 발생하였다. 위치별 변이를 살펴보면 126번째 아미노산인 isoleucine이 serine으로 치환된 I126S가 2명, threonine으로 치환된 I126T가 3명으로 126번째 아미노산에서 가장 높은 빈도를 보였다. 또한 131번째 아미노산인 threonine이 asparagine로 치환된 T131N이 1명, 133번째 아미노산인 methionine이 threonine으로 치환된 M133T가 1명에서 관찰되었다. HBsAg만 양성인 대조군 1명에서 126번째 아미노산인 isoleucine이 serine으로 치환된 I126S 변이가 관찰되었다 (Table 5).

Reference (X04615)	"a" determinant																													
	121			131											141						150									
	C	R	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N	C	T	C	I
Patient 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 5	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 9	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 10	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 12	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 14	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patient 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Control 1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Control 6	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fig. 1. Amino acid sequences of "a" determinant (124~147) in HBV S gene of 15 patients. Positions of mutation in deduced amino acid residues are indicated by vertical line below the surface protein of HBV. A dashes means the absence of amino acid substitution. Patients 1 to 15 were positive for HBsAg and anti-HBs, Control 6 were positive for HBsAg only.

고 찰

최근 만성 B형 간염의 치료 가이드라인은 장기적인 HBV 증식 억제를 통해 염증을 완화시키고 질병 진행을 억제하여 간의 섬유화를 예방하며, 간경변증, 간세포암으로의 진행을 예방함으로써 간질환에 의한 합병증을 감소시키고 사망률을 낮추어 생존율을 향상시키는 것이다. 가장 이상적인 치료는 HBsAg의 혈청 내 소실이지만 치료에도 불구하고 HBV의 완전 치료는 현재까지 거의 불가능하다고 볼 수 있다. 실제 임상에서 치료 여부에 대한 지표로 혈청 ALT 수치, HBeAg 유·무, HBV DNA 농도를 이용한다. ALT는 간 손상 및 치료 반응의 좋은 예측 인자로 간 조직의 괴사염증 소견을 반영할 뿐 아니라 질병 진행의 위험도와 관련되어 항바이러스 치료를 결정하는 데에 중요한 기준이 된다 (Yuen et al., 2005). 따라서 정상 범위를 벗어나 장시간 높게 지속될 경우 간경변증이나 간세포암종 발생의 위험성과 사망률이 높아진다. 현재까지는 정상 상한치의 두 배가 치료 시작의 기준으로

통용되고 있으나 최근 연구결과 기준치를 하향 조정할 필요성이 제기되고 있다. 우리나라에서 수행된 임상연구에서도 ALT가 40~45 IU/mL 이하인 만성 B형 간염 환자 중 20 IU/mL 이상인 환자는 의미 있게 간질환의 위험성이 높고 간질환의 합병증으로부터의 사망률도 유의하게 높았다라고 보고하였다 (Kim et al., 2004). 또한 만성 B형 간염 환자에서 ALT가 정상 상한치의 1배 이상~2배 이하 상승한 경우 간의 섬유화 정도를 나타내는 METAVIR score에서 환자의 약 2/3 정도에서 F2 이상의 섬유화 소견을 보이며 (Park et al., 2008), 혈청 HBV DNA가 20,000 IU/mL 이상인 경우 ALT가 정상으로 유지되더라도 치료를 요하는 섬유화/염증 소견을 나타낼 수 있다고 보고하였다 (Kumar et al., 2008). 최근 Keeffe 등 (2008)이 제안한 만성 B형 간염 치료 알고리즘에 의하면 치료를 시작해야 하는 ALT의 상한치를 남자는 30 IU/mL, 여자는 19 IU/mL로 권고하고 있다. 본 연구에서도 나타났듯 HBeAg 양성자 7명 모두에서 혈청 HBV DNA 농도가 10⁵ copies/mL 이상으로 나타났으나 이들의 ALT는 치료 기준치인 두 배를 초과하는 환자는 1명을 제외하고는 없었다. 또

한 HBeAg 음성 8명 중 HBV DNA 농도가 10^4 copies/mL 이상이 4명이었으나 모두 치료 기준치 이하였다. 따라서 간염 치료 시작의 ALT 기준에 대한 신중한 재검토가 필요하다고 사료된다.

혈청 HBV DNA는 간염 환자에서 바이러스 증식, 항바이러스제 치료 효과 지표로서 간경변증, 간세포암종과 같은 합병증의 발생 위험과 직접 강한 연관이 있는 매우 중요한 검사이다 (Chen et al., 2006). HBV DNA 농도가 증가되어 있는 활동성 간염 환자에게 치료를 통해 HBV DNA 농도를 감소시키면 조직 소견이 호전되고 HBeAg 혈청전환이 가능하며, ALT가 정상화되면서 간염의 진행을 억제할 수 있다 (Schiff et al., 2011). 따라서 최근에는 혈청 HBV DNA 농도 감소가 더 중요한 간염 치료의 목표로 제시되고 있다.

Zaaijer 등 (2002)은 방사면역측정법에서 HBsAg과 anti-HBs가 동시 양성을 보인 10예에 대한 HBV DNA의 검출에 모두 양성을 보였다. HBsAg과 anti-HBs 공존에 대상으로 HBV DNA 정량과 HBeAg의 관계를 연구한 오 등 (2003)은 HBeAg 양성인 환자의 100%, 음성인 환자의 92%에서 HBV DNA를 검출하였다. 본 연구에서도 동시 양성을 보이는 18명의 환자 중 HBV DNA 최소 검출 한계인 20 IU/mL (116 copies/mL) 이상의 양성자는 15명이었다.

2009년에 발표된 EASL (European Association for the Study of the Liver) 가이드라인에서는 HBeAg 양성 간염에서도 혈청 HBV DNA 수치가 10^5 copies/mL 이상이 아니라 더 낮은 10^4 copies/mL 이상이면 치료할 것을 권고하고 있다 (EASL Clinical Practice Guidelines 2009). 초기 가이드라인에서 항바이러스제 치료 적응증의 기준으로 제시된 HBV DNA 농도가 10^5 copies/mL 보다 더 낮은 혈청 HBV DNA 농도를 보이는 환자 중 상당수가 특히 HBeAg 음성 간염 혹은 간경변증을 가진 환자 중 다수가 간질환의 진행을 보이며 항바이러스 치료를 필요로 한다 (Lok and McMahon, 2009). HBeAg 양성자 7명의 HBV DNA 농도는 10^5 copies/mL 이상이었으며, 이들의 평균 농도는 4.50×10^7 copies/mL이었다. HBeAg 음성자 8명 중 HBV DNA 농도가 10^4 copies/mL 이상을 보인 환자는 4예였고 이 중 10^5 copies/mL 이상은 2예로 나타났다. 1예에서 HBeAg과 anti-HBe 동시 양성 소견을 보였으며, ALT 농도는 76 IU/mL이었고 HBV DNA 농도는 1.0×10^8 copies/mL 이상으로 높게 관찰되었다. 그리고 HBeAg 음성 만성 B형 간염과 비활동성 B형 간염 보균자를 비교해 볼 때

HBeAg 음성 만성 B형 간염군에서의 혈청 HBV DNA 농도는 2.03×10^6 copies/mL로 비활동성 B형 간염 보균자에서의 2.2×10^3 copies/mL 보다 현저히 높았으며, 현재 통용되는 치료 기준으로 제시된 10^4 copies/mL 보다 높은 경우가 4예로 나타났다. 이처럼 HBeAg 음성 만성 B형 간염의 50%에서도 10^4 copies/mL 이상 검출되어 바이러스 증식이 활발하게 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 만성 B형 간염 진단에 있어 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성인 경우 HBV 감염상태 확인을 위해 HBV DNA 정량검사가 절대적으로 필요할 것으로 사료된다.

HBV 감염 진단을 위해 여러 혈청학적 표지자들이 유용하게 사용되고 있으나 드물지 않게 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성으로 나타나 그 결과의 해석에 어려움이 있다. 698예의 HBsAg 양성 중 21예 (3.0%)에서 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성을 보였으며 (Cha and Chae, 2000), 이 등 (2005)의 연구에서도 HBsAg 양성 2,719명 중 동시 양성자는 108명 (4.0%)이었다고 보고하였다. 또한 Colson 등 (2007)은 459예의 HBsAg 양성 중 13예 (2.8%)에서 동시 양성을 보였다고 보고하였다. 이러한 동시 양성은 만성 B형 간염 환자의 자연경과 중 나타날 수 있으며, 또한 HBsAg S 유전자에 변이가 발생하면 동시에 발현될 수 있는 것으로 알려져 있다 (Lada et al., 2006). 국내에서도 HBsAg S 유전자 "a" 결정기 변이가 계속 보고되고 있으며 (Kim et al., 2003; Cha, 2005), HBV 백신 접종이 보편적으로 이루어지고 있어 표면항원 변이가 점차 증가할 것으로 예측하였다 (Cha, 2005). 대만의 경우 예방 접종 프로그램이 도입되기 전에 실시한 역학조사에서 소아 감염자의 7.8%에서 HBsAg 변이가 발견되었으며, 10년 후에는 28.1%로 증가하였다 (Hsu et al., 2004). 본 연구에서도 HBsAg "a" 결정기 변이는 7명에서 관찰되었다. 7명 모두 HBsAg "a" 결정기를 구성하고 있는 2개의 loop 가운데 항원성이 약하여 중화항체와의 친화력에 큰 영향을 주지 않는 주로 자연적으로 발생하는 첫 번째 loop에 해당하는 아미노산 서열 124~137번 사이의 돌연변이이었다. 또한 HBsAg만 양성인 1예에서도 HBsAg "a" 결정기 변이를 관찰할 수 있었다. 또한 HBsAg "a" 결정기 변이를 갖고 있는 7명의 HBV DNA 농도는 평균 1.62×10^7 copies/mL이었고 변이가 없는 8명의 HBV DNA 농도는 평균 2.64×10^7 copies/mL이었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 변이가 있는 환자에서 더 많은 바이러스 증식상태를 보이지는 않아 변이와 바이러스 증식능의 상호 연관성은 없어 보인다.

HBsAg "a" 결정기에 변이가 발생할 경우 바이러스의 표면항원 구조 변화를 일으켜 기존 항체와 반응하지 않을 수 있어 실제 감염이 존재하더라도 감염이 없는 것으로 오인할 수 있어 HBV 감염 진단에 어려움이 있을 수 있다고 보고하였다 (La'ulu and Roberts, 2006). 차 (2005)의 B형 감염바이러스 표면항원 변이 검출에 관한 연구에서 재조합 HBsAg 변이항원 9종류에 대한 검사에서 분석기기에 따라 검출률이 다르다고 보고하였다. 손 등 (2009)의 연구에서도 방사선면역측정법에서 HBsAg 음성인 13 검체 중 10에는 Architect HBsAg kit로 검사하였을 때 양성 결과를 보여 돌연변이에 의해 RIA에서 검출되지 못했을 가능성이 높은 것으로 보고하였다. 따라서 HBV 변이는 B형 감염의 진단, 진행, 예방 및 치료에 있어서 매우 중요하므로 임상적으로 HBV 감염이 강력히 의심되면 HBsAg이 음성이더라도 혈청 HBV DNA 농도를 확인해야 할 것이다. 또한 HBsAg과 anti-HBs가 공존하는 경우 HBV DNA 농도를 분석하는 것은 공존예의 임상적 의의를 평가하는데 있어 매우 중요하리라 생각된다. 아직까지는 변이형의 검출이 보편적이지 않지만 향후 매우 중요한 문제로 부각되리라라고 사료된다.

REFERENCES

- Ahn YO, Kim CY, Bae SH, Chang HG. Changing pattern of HBV-related diseases in Korea since after HBV vaccination. *Korean J Hepatol.* 2010. 16: 23-37.
- Cha YJ. Detection of hepatitis B virus surface antigen mutants. *Korean J Lab Med.* 2005. 25: 442-447.
- Cha YJ, Chae SL. Frequency and significance of concurrent presence of HBsAg and anti-HBs among Korean HBsAg positive patients. *Korean J Clin Pathol.* 2000. 20: 206-209.
- Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeie UH. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA.* 2006. 295: 65-73.
- Colson P, Borentain P, Motte A, Henry M, Moal V, Botta-Fridlund D, Tamalet C, Gerolami R. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers. *J Virol.* 2007. 367: 30-40.
- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2009. 50: 227-242.
- Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chen HL. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nation wide vaccination program in Taiwan. *Gut.* 2004. 53: 1499-1503.
- Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: 2008 update. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008. 6: 1315-1341.
- Kim HC, Nam CM, Jee SH, Han KH, Oh DK, Suh I. Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases: prospective cohort study. *BMJ.* 2004. 328: 983
- Kim KH, Lee KH, Chang HY, Ahn SH, Tong S, Yoon YJ, Seong BL, Kim SI, Han KH. Evolution of hepatitis B virus sequence from a liver transplant recipient with rapid breakthrough despite hepatitis B immune globulin prophylaxis and lamivudine therapy. *J Med Virol.* 2003. 71: 367-375.
- Kim SR, Kudo M, Hino O, Han KH, Chung YH, Lee HS. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan and Korea. A review. *Oncology.* 2008. 75: 13-16.
- Kumar M, Sarin SK, Hissar S, Pande C, Sakhuja P, Sharma BC, Chauhan R, Bose S. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus infected asymptomatic patients with persistently normal ALT. *Gastroenterology.* 2008. 134: 1376-1384.
- Lada O, Benhamou Y, Poynard T, Thibault V. Coexistence of hepatitis B virus HBsAg and anti-HBs in chronic hepatitis B virus carriers: influence of "a" determinant variants. *J Virol.* 2006. 2968-2975.
- La'ulu SL, Roberts WL. The analytic sensitivity and mutant detection capability of six hepatitis B surface antigen assays. *Am J Clin Pathol.* 2006. 125: 748-751.
- Lee GE, Kim KH, Kwon JA, Yoon SY, Cho YJ, Lee CK, Kim SY, Lee DK, Son MJ, Lee KN. Serologic markers of viral hepatitis of Korea University Medical Center patients. *Korean J Lab Med.* 2005. 25: 61-65.
- Lindh M, Hannoun C. Dynamic range and reproducibility of hepatitis B virus (HBV) DNA detection and quantification by Cobas Taqman HBV, a real-time semiautomated assay. *J Clin Microbiol.* 2005. 43: 4251-4254.
- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology.* 2009. 50: 661-662.
- Ministry of Health & Welfare, Korea Centers for Disease Control and Prevention. The Third Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES III), 2005: Health

- Examination. Ministry of Health & Welfare. 2006.
- Oh SH, Kim HH, Heo J, Cho M, Chang CL, Lee EY, Son HC. Serum hepatitis B Virus DNA quantitative analysis using polymerase chain reaction in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Korean J Lab Med.* 2003. 23: 39-44.
- Park JY, Park YN, Kim DY, Paik YH, Lee KS, Moon BS, Han KH, Chon CY, Ahn SH. High prevalence of significant histology in asymptomatic chronic hepatitis B patients with genotype C and high serum HBV DNA levels. *J Viral Hepat.* 2008. 15: 615-621.
- Park NH, Chung YH, Lee HS. Impacts of vaccination on hepatitis B viral infections in Korea over a 25-year period. *Intervirology.* 2010. 53: 20-28.
- Schiff ER, Lee SS, Chao YC, Kew Yoon S, Bessone F, Wu SS, Kryczka W, Lurie Y, Gadano A, Kitis G, Beebe S, Xu D, Tang H, Iloeie U. Long-term treatment with entecavir induces reversal of advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011. 9: 274-276.
- Sohn YH, Oh HB, Ko SY, Lim YS, Kwon OJ. Analysis of clinical characteristics and S gene mutation of hepatitis B virus in patients with hepatitis B surface antigen RIA negative and HBV DNA positive. *Korean J Lab Med.* 2009. 29: 224-230.
- Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK-H, Yuen JC-H, Wong WM, Chan AO-O, Wong BC-Y, Lai KC, Lai CL. Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications. *Gut.* 2005. 54: 1610-1614.
- Zaaijer HL, Lelie PN, Vandebroucke-Grauls CM, Koot M. Concurrence of hepatitis B surface antibodies and surface antigen: implications for postvaccination control of health care workers. *J Viral Hepat.* 2002. 9: 146-148.
-