

B형 간염 바이러스 (Hepatitis B Virus: HBV)의 성상과 HBV DNA 정량검사

이 원 길

경북대학교 의과대학 진단검사의학과

Characteristics of Hepatitis B Virus(HBV) and HBV DNA Quantitative Tests

Won-Kil Lee

Department of Clinical Pathology, Kyungpook National University, School of Medicine Taegu, Korea

서 론

B형 간염 바이러스(Hepatitis B Virus: HBV)는 인간의 간세포에 강한 친화성을 보이고 간 기능 장애를 초래하는 DNA 바이러스이며, 분류학적으로는 이런 뜻을 포함하고 있는 *Hepadnaviridae*에 속한다. *Hepadnaviridae*에 속하는 바이러스로는 인간의 HBV가 원형이며 이외에도 미국산 모르모트(woodchuck hepatitis virus[WHV]), 다람쥐(ground squirrels hepatitis virus[GSHV]) 및 북경 오리(duck hepatitis B virus[DHBV])에서 각각 발견되는데, 이들은 HBV와 형태가 비슷한데다 항원을 공유하고 있으며, 각각의 숙주에 대해 만성 간염과 간세포성 간암을 일으킨다[1].

HBV는 1965년 Blumberg 박사가 호주 원주민의 혈액 속에서 항원을 처음 발견하여 오스트레일리아 항원으로 명명하였으며, 이 항원에 대한 항혈청과 반응하는 바이러스 입자를 전자현미경으로 검출하여 Dane particles[2]이라 하였다. 이후 HBV에 대한 특이도와 예민도가 높은 검사방법이 개발됨에 따라서 B형 간염의 자연사가 규명되었으며, 혈액 내 HBsAg 선별 검사법이 개발됨으로써 수혈로 인한 B형 간염을 예방할 수 있게 되었다. anti-HBs 양성인 수혈용 혈액으로 B형 간염 면역 글로불린(hepatitis B immune globulin ; HBIG)을 만들어 사용하였는데, 초기 연구에서 이것은 B형 간염을 예방하거나 감염의 경과를 변형시키는데 유효하였다. 또한 HBsAg 양성인 혈청

을 1분간 끓였더니 바이러스의 감염성은 파괴되고, 항원성은 남아 있어서 부분적인 예방효과가 있음을 발견함으로써 혈장에서 비동화된 백신을 개발하게 되었다[2]. 다만에서는 소아를 대상으로 광범위하게 예방 접종을 함으로써 소아에서 발생하는 간세포 암 발생률을 많이 감소시켰다[1].

만성간염은 간 질환의 2대 사망원인인 간 경변증과 간세포성 간암의 소인[4]이므로, interferon- α 나 lamivudine 치료로써 HBV의 증식을 억제[5,6]하고, ALT(alanine aminotransferase)와 간 조직검사 결과를 정상화하여 간 질환을 개선하는데 그 중요성이 있으며, 환자의 추적에는 바이러스 표지자가 유용하며, 특히 HBV DNA 농도의 정량 검사[1]가 제일 중요하다.

HBV의 구조

HBV는 크기가 42 nm로서 DNA 바이러스 중 가장 작으며, 내부에는 원형의 DNA가 피각(capsid)으로 되어있는 20면체의 외피로 둘러싸여 있다(그림 1). DNA는 분자량이 1.6×10^6 이고, 3,200 bp이며, (-)와 (+)의 두 가닥으로 되어 있다. (-) 가닥은 거의 완벽한 원형이며, pre-S, 표면 및 핵의 구조단백과 중합효소와 X-단백으로 된 재생단백의 유전자들이 중복되게 존재하고, (+) 가닥은 불완전한 원형으로 (-) 가닥보다 짧고 길이에 변이가 있는데, 내인성 DNA 중합효소가 역할하면 모자라는 부분을 채워 완전한 원형으로 만든다(그림 2).

HBV의 항원은 바이러스의 표면에서 발견되는 표면 항원인 HBsAg (hepatitis B surface antigen)와 내부 핵에 있는 초기 항원인 HBeAg (hepatitis B early antigen)와 핵 항원인 HBcAg (hepatitis B core antigen)가 있다. HBsAg는 이것 단독으로 과잉 생산되어 말초 혈액 내에서 핵이 없는 빈 원형이나 튜브모양의 입자로도 발견된다. 내부 핵에

* 본 연구는 1998년 경북대학교 공모과제 연구비로 이루어졌음.

접수번호: CM 6-2-10

교신저자: 이원길

(700-422) 대구시 중구 동인동 2가 101

경북대학교 의과대학 진단검사의학과

TEL : (053) 420-5292 FAX : (053) 426-3367

E-mail : leewk@knu.ac.kr

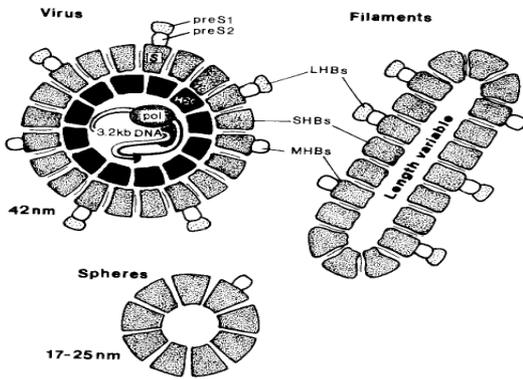


Fig. 1. Schematic diagram of hepadnavirus particles. Individual subunits containing SHBs protein only. HBs protein plus pre-S2 (MHBs), and HBs protein plus pre-S1 and pre-S2 (LHBs) are shown in intact virus, among filaments and spheres. The virus particles contain an internal nucleocapsid (Hbc) and viral genome. pol, polymerase. SHB: major surface antigen protein, MHB: middle HBs protein, LHB: large HBs protein. Reprinted from reference 2.

는 HbcAg와 HBeAg 외에도 2가닥의 DNA 분자와 DNA 중합효소가 있다(그림 1). HBV가 복제될 때 유전정보를 전사한 후 해독하는 과정에서 4분자의 mRNA가 생산된다. 3.5 kb로서 가장 긴 mRNA는 계놈을 복제할 원형(template)과 precore/core와 중합효소를 위한 것이며, 그 다음 2.4-kb mRNA는 pre-S1, pre-S2 및 HBsAg의 유전정보를 나타내며, 2.1-kb mRNA는 단지 pre-S2와 HBsAg의 유전정보만을 나타낸다. 가장 작은 mRNA는 0.7 kb로서 X-단백의 유전정보를 나타낸다(그림 3). HbcAg와 HBeAg는 같은 유전자정보로부터 해독된 산물인데, 전사된 후 HbcAg는 내형질 세망(endoplasmic reticulum)에서 갈라져서 HBeAg (precore fragment)가 분비되며, HbcAg는 바이러스의 단위인 nucleocapsid를 합성하는데 필수이다[7]. HbcAg는 혈청 중에서 발견되지 않고, 환자의 간 조직에서 발견되며, HBeAg는 바이러스의 역가가 높은 환자의 혈청 중에서 검출되는 가용성 단백질이다. surface/pre-S 유전자는 바이러스 외피의 유전정보를 갖고 있다. HBsAg를 구성하는 3가지 중 SHBs (small HBs protein)는 가장 작은 유전자 산물이나 주요 표면 단백질이며, 중간 크기의 MHBs (middle HBs protein)는 pre-S2 성분이 포함되어 있고, 가장 큰 표면 단백질인 LHBs (large HBs protein)는 pre-S1을 함유하고 있는데 HBsAg 입자의 구성요소로 들어가고 완벽한 바이러스 입자에서 주로 발견된다. pre-S 단백질 역할은 HBV가 간세포에 부착하는데 중요하다(그림 1). 분자 레벨에서 보면 SHB는 HBV가 간세포에 부착하는 결합부위라 하며 현재의 백신이 성공하는 주요 이유 중 하나는 SHBs 단백질의 중화 에피토프(epitope)를 포함하는 것이며, 이 에피토프는 cross-link된 S-S 결합으로 결정되는 SHBs 단백질의 구조에 달려 있다. 주항원 결정기인 'a'

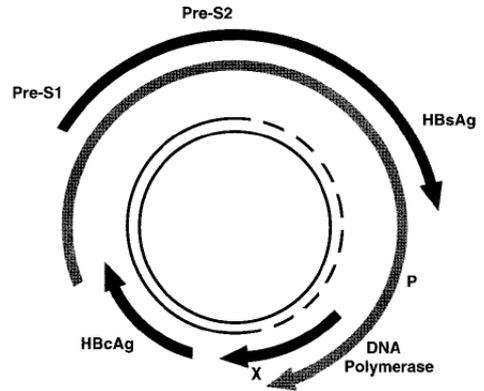


Fig. 2. Structure and organization of HBV genome. Reprinted from reference 2.

항원은 바이러스의 표면에 튀어 나온 이중 loop 구조물을 포함한 120과 147 아미노산에 의해 경계지어지는 domain 내에 있다(그림 4). HBsAg에는 'a' 항원이다, 대립인자 결정기가 2쌍이 있는데 *d*, *y* 쌍과 *w*, *r*의 쌍이 있어서 *adw*, *ayw*, *adr*, *ayr*의 4 주요 아형이 있다. 그러나 *w*는 항원의 이질성이 있어서 *ayw*는 *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*로 다시 나누어지고 *adw2*, *adw4*, *adrq+*, *adrq-* 주요 혈청형이 있다. 미국에서 가장 흔한 형이 *adw*이고 *ayw*가 두 번째로 흔하다. 공통 항원인 'a' 결정기에 대한 항체는 HBV의 아형이 달라도 예방되나, 아형 결정기에 대한 항체는 다른 아형에는 예방하지 못한다[2,6].

HBsAg, anti-HBs, anti-HBc의 출현유무에 따라 급성 혹은 만성 감염으로 분류하는데 이용되며, HbcAg은 감염력과 관련이 있는 제3의 항원이다. Anti-HBs가 전형적으로 회복의 최종 표지자로서 일반적으로 면역을 획득하여 바이러스가 제거된 것으로 간주하며, 이 중 4% - 10%에서는 anti-HBs가 없어지기도 하나 대부분은 anti-HBc와 같이 평생 지속된다고 한다. 실제로는 피검자의 0.2% - 6.6%에서 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 공존하는데, HBeAg 양성에서는 100%, HBeAg 음성에서는 75%에서 HBV DNA가 각각 검출되었다[8].

현재까지 HBV의 유전자형은 A부터 G까지 7개가 알려져 있으며, 지역적으로 유행하는 유전자형이 있고 질환의 임상경과 및 항원-항체 발현과 관련하여 다양한 염기 변화가 관찰되고 있다. 우리나라, 중국, 일본 등에는 임상경과가 좋지 않은 C형이 주로 분포하며, 동남아 지역에는 B형이 대만은 B형과 C형이 혼재해 있다[9-11].

전 파

우리나라 성인에서의 HBsAg의 유병율은 대략 6%이고, 미국의 경우 0.1%-0.5%정도이다. 사람이 병원소임과 동시에 매개체이며, HBsAg는 혈액 소변 타액 정액 질분

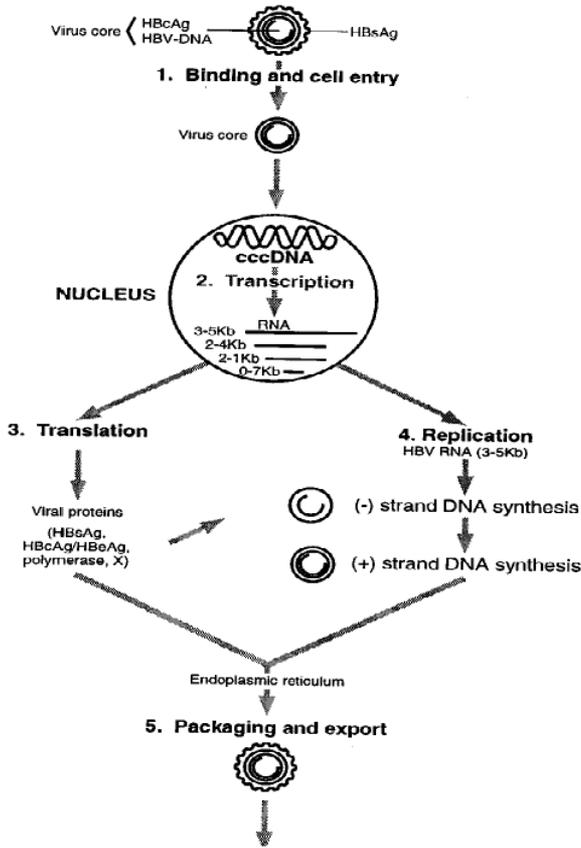


Fig. 3. Binding and replication of HBV. Reprinted from reference 2.

비물, 초유 위액 및 기타 체액에서 발견되지만 대변에서는 잘 발견되지 않는다. 전형적인 주 감염경로는 경피 감염으로서 HBV에 오염된 혈액을 수혈하거나 주사 바늘에 찔려서 체내에 들어오고, 또한 수직감염으로서 어머니가 임신 중에 아기에게 직접 전파되는 외에 키스나 성적 접촉 등 집안에서 환자의 분비물에 노출되어 직접 전파되는 것도 주요경로이다. 구미지역 등 보건자의 빈도가 낮은 지역에서는 주로 성인이 된 후 수평 감염되지만, 특히 우리나라와 대만이나 적도 아프리카 등 감염빈도가 높은 지역에서는 최초의 감염 시기는 영유아와 소아기이고, 주 감염 경로는 수직감염 외에 신체 접촉에 의한 수평 감염이다. 이처럼 수직 전파가 감염의 전파뿐만 아니라 경과에도 중요한 역할을 하고 있으며, 만성 보균자의 약 반 정도는 수직전파에 의해 생겼다고 추정된다[1-3].

잠복기가 6주 - 6개월이며, 감염 후의 결과는 변이가 대단히 심한데, 증상의 발현은 특히 연령과 상당히 관계가 있다. 신생아는 전혀 증상을 나타내지 않으며, 1세-5세 아이는 5%-15%만이 전형적인 증상을 나타내며, 청소년과 성인에서는 33%-50%가 증상을 나타낸다. 급성감염의 대부분은 증상과 황달이 없는 무증상이며, 증상이 있는 감염이라도 경증에서 사망까지 다양한데, 일부는 황달이

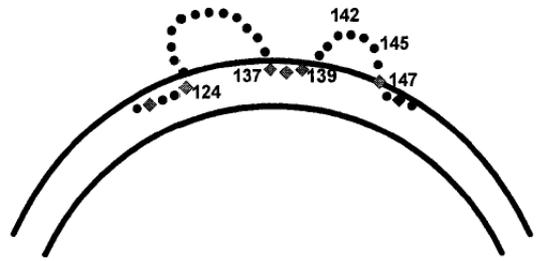


Fig. 4. Schematic diagram of two loops of the "a" determinant of HBs protein. The major epitope is located in the second loop between amino acids 139 and 147. Reprinted from reference 2.

없는 간염 증상(anicteric hepatitis)을 나타내며, 25%-35%가 증상과 황달(icteric hepatitis)을 동시에 나타내고, 1%-2%가 치명적인 광범위한 간세포의 괴사를 동반하는 전격성 간염인데 이는 대부분 HDV(hepatitis D virus)와 같이 감염되어 간세포의 손상이 증가되어서 63%-93%가 사망하기도 한다. 그러나 HDV가 완전히 표현되고 복제되기 위해서는 HBV의 표면 항원을 반드시 필요로 하는 불완전한 바이러스이다. 또 급성감염 이후 90%는 완전회복이 되고, 나머지 10%에서 적어도 6개월 이상 혈청에서 HBsAg가 지속하는 즉, 바이러스 복제가 지속되어 간 손상이 계속되는 만성 감염이 된다. 만성 간염의 경우도 다양하여 나중에 HBs Ag가 없어져 회복되는 경우, 간염소견이 없는 무증상 보균자, 간질환이 진행되지 않는 예후가 좋은 만성 지속성 간염 및 간 손상이 진행되어 예후가 나쁜 만성 활동성 간염이 된다. 이렇게 급성감염이 만성 감염으로 발전할 위험성은 나이가 적을수록 많아서, 임산부에서 신생아로 수직 전파된 경우는 90%, 1세-5세 감염된 아이들은 25%-50%, 10대부터는 점차 줄어들어 청소년들과 성인들은 6%-10%에서 만성 보균자가 된다. 그 이외의 환자관련 요소로서 신부전, HIV 감염, 당뇨병과 같은 만성병이 있는 경우에 만성감염으로 발전할 위험성이 증가한다. 또한 만성 감염 중 적어도 2%에서는 만성활동성 간염이 되고 마침내는 간경변증으로 발생하는데, 간경변증은 간세포암의 주요 위험요소이다. 이처럼 간경변증이나 간암으로 발전할 위험은 청소년기와 성인에서 15%인데 비해 유아나 나이가 어릴 때 감염된 경우의 25%이다. 만성지속성 간염, 만성활동성 간염 및 간경변증의 3가지는 조직소견으로 나누게 되는데, 만성활동성 간염이 간의 섬유화를 나타내고, 간경변을 일으키는 유인이 된다. 간경변은 불가역적인 간 손상으로서 간세포의 재생이 증가된 효과로 인하여 간암을 유발한다. HBV는 감염 후 25년-30년이 지나면 간암을 일으키는 발암성으로 작용하나 HBV에는 특이한 종양유전자를 가지는 염기서열은 없다고 한다. HBV감염은 백신으로 예방이 가능하며, 특히 감염된 어머니에게서 태어난 신생아나 예방

주사를 맞지 않은 직원들 중에서 바늘에 찔린 경우에는 면역 예방요법이나 치료가 요구된다. 특히 대만에서는 소아를 대상으로 광범위한 백신 접종을 시행함으로써 소아에서 발생하는 간세포 암의 발생율을 많이 감소시켰다고 한다[1].

병적 기전은 HBV가 직접 감염된 간세포에 세포병변을 일으키지는 않고, 몇몇 바이러스 단백에 대한 세포반응이 질병의 중증도와 바이러스의 제거와 관련이 있다. HBsAg에 대한 항체반응이 바이러스의 제거에 관여하고, 세포독성 T 림프구가 감염세포를 죽임으로써 바이러스를 제거한다. 세포독성 T 림프구는 항바이러스 작용을 하는 사이토카인을 분비하여 HBV의 유전자 표현을 억제하고, 이 사이토카인의 표현이 감염동안 바이러스를 제거하는 주기전이 된다. 만성 간염은 바이러스 항원에 대하여 T세포의 반응이 약한 것과 관련이 있으며, 바이러스 항원에 대한 신생아의 면역관용은 출생 때 감염된 환자에서 바이러스가 지속되는데 중요한 역할을 하는 것 같으나, 성인에 있어서 T-세포의 반응이 좋지 않은 것은 아직 잘 알려져 있지 못하다[3,4].

HBV의 혈청 표지자(2,3)

HBV의 혈청검사방법은 면역 확산법에서 역수신 혈구 응집반응과 더욱 예민도가 높은 효소면역분석법과 방사면역분석법(0.1 ng/ml이상 검출 가능)으로 발전하였다. 임상증상만으로는 다른 바이러스 간염과 구별이 되지 않으므로 진단은 HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, HBcAg 및 anti-HBc 중의 3-6개의 혈청학적 표지자를 동시에 검사한다. 급성 B형 간염은 혈청 중에 HBsAg와 IgM anti-HBc가 출현하는 것이 특징이며, HBsAg는 감염 후 평균 4-12주 후에 검출되는 첫 번째 혈청 표지자이며, IgG anti-HBc는 급성감염이 있는 사람에서 HBsAg 출현 이후 곧 나타나거나 혹은 급성기 후 10일-15일 후부터 나타나고, 일반적으로 평생 지속된다. 바이러스의 복제를 나타내는 간접 표지자인 HBeAg는 임상 증상이 나타나기 직전부터 혈청 중에 출현하며, anti-HBe는 질병 경과와 첫 2-4주 동안에 검출될 수 있으며, 이것은 바이러스의 복제가 감소하고 있음을 의미한다. 회복기가 되면 HBsAg와 HBeAg가 제거되고, anti-HBs, anti-HBc, anti-HBe가 나타난다. anti-HBs는 바이러스를 중화하는 보호작용이 있는 항체로서 급성 감염 후에 anti-HBs의 출현은 회복된과 재감염에 대한 면역을 뜻하며, 또한 예방 접종 후에도 검출이 된다. IgG와 IgM이 포함된 총 anti-HBc는 현재 혹은 과거에 바이러스에 노출된 것과 바이러스의 복제를 의미한다. 따라서 총 anti-HBc은 급성 감염환자에서 좋은 표지자가 되지 못하나 IgM anti-HBc는 급성 B형 바이러스 감염에 진단적이다. 급성 감염의 약 10%에서 다른 표지자는 음성이고 IgM anti-HBc만 양성인 경우는 최근 감염으로 core window기에 있는 환자에서 나타나며, 그 외 경

우로는 감염 후 회복된 지 오래된 환자와 B형 간염 바이러스가 검사 상 나타나지 않을 정도로 항원이 낮은 만성 보균자 등에서 anti-HBc만 양성으로 나타난다.

급성기 후에도 HBeAg의 농도가 높고, HBsAg의 역가가 지속적으로 높은 경우는 만성감염과 관련이 있다. 만성 HBV감염 환자에서 HBsAg는 일반적으로 평생동안 지속적으로 검출되며, HBeAg의 유무는 변이가 심하데, HBeAg을 만들지 못하는 돌연변이가 있을 때는 HBV가 활발히 복제되는데도 불구하고 HBeAg이 검출되지 않을 수 있고, IgM anti-HBc는 일반적으로 급성 감염 6개월 후부터는 검출이 되지 않는다.

HBV의 치료약(2, 5, 6)

치료의 목적은 바이러스 복제의 지속적인 억제로서 항바이러스제인 lamivudine과 interferon- α 를 병용하여 사용하면 치료의 폭을 넓힐 수 있다. 인터페론이나 역전사 효소를 억제하는 뉴클레오사이드 유사체는 만성 복제성 감염을 비복제성 또는 억제된 상태로 바꾸어서 유용하다. 그러나 30%-40%의 환자가 지속적인 바이러스 반응을 나타낸다.

항바이러스 및 면역계통 조절제로서 뉴클레오사이드 유사체인 famciclovir와 라미부딘은 경구용이며, 두 약제가 모두 HBV DNA를 신속하게 감소되도록 유도하여, HBeAg는 제거되고, ALT가 감소한다. 그러나 단기간 치료로는 바이러스 DNA가 치료 전 수치로 신속하게 돌아가지만, 만성 간질환의 지속적인 호전은 없었다.

만성 B형 간염 환자의 인터페론 치료 목적은 HBV의 증식 혈청 표지자를 제거하는 것이고, ALT와 간조직검사 결과의 정상화하여 간질환을 개선하는데 있다. 혈청에서 HBeAg가 제거되는 것으로 조사한 것에 의하면 치료하지 않은 대조군에서 12%인 반면에 치료환자에서 32%가 반응하였다. 만성간염이 알파 인터페론으로 관해가 유도되려면 오랜 시간이 걸린다. 만성B형 간염환자 중 알파 인터페론 치료가 요구되는 환자는 1. 혈청 내에 ALT가 지속적으로 증가가 있는 환자 2. HBsAg, HBeAg 및 HBV DNA가 검출되는 경우 3. 조직 생검에서 만성 간염 4. 대상성(compensated) 간질환 등이다. 매일 5백만 단위나 1주일에 천만단위를 3회 피하주사로 4개월 간 주입한다. 치료에 잘 반응하는 특성으로는 치료 전 HBV DNA가 200pg/ml이하로 낮은 경우, 치료 전 ALT가 100IU/ml 이상으로 높을 것, 감염의 기간이 짧은 경우, 성인에서 감염이 된 경우, 조직 소견이 활동성, 신부전이나 HIV감염 등 합병증이 없는 경우 등이다.

HBV DNA의 정량검사방법

HBV DNA는 급성 및 만성 감염이 있을 때 혈청과 간장 내에서 검출되지만, 임상적으로 회복되어 anti-HBs가 양

성이고, HBsAg가 제거된 환자에서는 검출되지 않으나 중합효소연쇄반응법과 같은 예민도가 높은 검사로는 혈액 내에서 검출되기도 한다. 이런 낮은 수치의 의의는 아직 확실히 모르지만, HBsAg 음성인 환자의 간이나 혈청에서 HBV DNA가 검출되는 경우는 간세포와 결합한 HBV DNA가 있거나 적은 양의 바이러스 복제가 지속되기 때문이다. 임상적으로 HBV DNA 정량검사는 진단 목적으로는 유용성이 제한적이지만, 만성 B형 간염환자에서 인터페론과 라미부딘을 포함한 항바이러스 치료에 대한 반응의 평가뿐만 아니라, 환자에서 예후나 viremia를 평가하고, HBV의 복제 활성 정도와 질병의 경과를 추적하는데 가장 중요한 표지자로서 사용이 증가되고 있다 [6]. HBV DNA의 농도의 추적검사는 만성 HBV 감염의 치료에 대한 반응을 결정하는데 유용하며, B형 간염바이러스의 핵산이 지속적으로 없다는 것의 가장 믿을 만한 지표가 된다. 핵산의 염기서열 분석은 바이러스의 유전적 변이종을 확인하는 데와 HBV 유행시 감염원을 조사하는데 사용된다[10,11]. 정량검사방법으로는 여러 가지 검출방법이 개발되었거나 개발되고 있는데, 크게 프로브법과 증폭법이 있다[12]. 일반적으로 증폭법은 유전자 개수가 50/uL이하이며 정성검사에서의 장점이 나타나며, 반면에 프로브 수기법은 정량검사에 널리 사용되고 있다. 먼저, 방사성 혹은 비방사성으로 라벨된 프로브를 이용하는 프로브법은 액상에서의 하브리드형성법(hybridization)으로는 Genotics (Abbott, USA)와 Hybrid capture assay (Digene and Murex)[13-15]가 있고, solid-phase[16-18]에서는 dot blot와 Southern 하브리드형성법, in situ 하브리드형성법이 있다. 증폭법은 표적을 증폭하는 중합효소연쇄반응법[17,20-23], transcription-mediated (TMA) 핵산증폭법[19]과 신호(signal)를 증폭하는 branched-chain DNA (bDNA) 신호증폭법[17,24] 등이 있다. 정량검사의 결과는 pg/mL와 계놈의 개수로 나타내는데, pg/mL는 계놈의 개수를 2.85×10^5 로 나눈 값이며, HBV DNA 1 당량 (Eq/mL)은 3.2Kb HBV genomic DNA 1분자이며, 이것은

약 2.5pg/mL에 해당된다(표 1). 이들 중 중합효소연쇄반응, bDNA 및 TMA 검사방법들은 결과가 매우 다를 수 있고, 수기가 복잡하고, 비싼 장비가 요구되며 숙련된 기술과 검사비가 비싸다는 것이 단점이다.

HBV DNA를 중합효소연쇄반응법으로 증폭하고 이후 증폭산물을 검출하는 방법으로 전기영동[16], 하브리드형성법[16], 화학발광법[21]이나, 염기서열을 조사하는 방법[25]이 있다. 중합효소연쇄반응법이 가장 예민도와 특이도가 높은 검사방법이지만, 상용검사로 사용하기에는 표준화가 부족하고, 결과적으로 충분한 정도판리의 부족한 점이 장애이다[26]. 그래서 예민도, 특이도가 높고 신뢰할 만한 증폭방법과 검출방법이 요구된다. 특히 이전에 증폭방법을 사용한 일이 없는 검사실과 같은 환경에서도 검사가 가능하도록 특이한 전문기술이 별로 필요 없는 방법이 요구되는데, 간편하고 경비가 비교적 싼 효소면역검사법에 의한 시도가 해결방법의 하나이다. HBV의 nucleocapsid는 HBcAg의 90 혹은 120 dimer로 구성되어 있는데, 피막이 쌓이고 나서 혈류로 유출된다. 따라서 혈청에서 HBcAg의 정량검사가 HBV DNA와 마찬가지로 바이러스의 load를 나타낸다고 한다[27].

하브리드형성법과 중합효소연쇄반응법에 의한 HBV DNA 검출의 임상적 의의는 전혀 다르다. 일반적으로 중합효소연쇄반응법에 의한 검출은 HBsAg의 검출과 같은 의의로서 현재의 HBV 감염을 의미한다. 반면에 하브리드형성법에 의한 검출은 HBeAg과 비슷하며, 상당한 양의 바이러스 복제를 의미하고 활동성 간 질환일 가능성이 높다.

HBeAg은 역사적으로 순환하는 바이러스 입자의 존재를 검출하는데 이용하여 왔다. HBe Ag의 수치와 HBV DNA의 양은 서로 상관 관계가 좋다. 만성 B형 간염 환자 중 약 1%-1.5%에서 매년 저절로 HBeAg이 없어지는데, 어떤 사람은 회복된 것이지만 다른 사람들의 HBV DNA가 세포의 계놈에 통합되어 비복제기로 들어간 것이다. 이런 이행기에는 AST, ALT 증가가 있고 황달이 종종 동

Table 1. HBV DNA quantitative tests and their sensitivity

Tests	Sensitivity pg/mL(genomes per mL)
I. Probe tests	
slot or dot blot hybridization	$5(1.5 \times 10^6)$
liquid-phase hybridization	$1.5(4 \times 10^4)$
Hybrid Capture System (Digene)	$10(3 \times 10^6)$
II. Target amplification tests	
polymerase chain reaction	$10^{-3}(100-1,000)$
transcription-mediated amplification and hybrid protection assay	(5×10^3)
III. Signal amplification tests	
branched DNA hybridization (Chiron Corp.)	$2.5 (5 \times 10^2-2 \times 10^5)$
Quantiplex (Chiron)	$(0.7 \times 10^6-5,000 \times 10^6)$

반된다. 드물게 HBe Ag이 다시 검출되기도 한다. 다음은 각 방법에 대해 약술하였다.

가. 하브리드형성법

1. slot blot/dot blot assay

방사성 동위원소 프로브를 이용하여 환자의 혈청에 존재하는 HBV DNA를 반정량적으로 검출하는 방법이다.

2. 액상 하브리드형성법

방사성 동위원소를 부착한 프로브를 액체상태로 검체와 반응시키는 방법이다. 상품화된 것으로는 Genotics와 Hepatitis B Viral DNA (Abbott, USA)가 있으며, 예민도는 4×10^4 HBV DNA분자이다.

3. RNA-DNA 하브리드형성법

RNA 프로브를 이용한 방법으로 Hybrid Capture System (Digene Corp., U.S.A.)과 Hybrid Capture II (Digene Corp., USA)가 있다. 예민도는 3×10^6 에서 6×10^8 HBV DNA분자이다.

나. 표적증폭법

1. 중합효소연쇄반응법

Amplicor HBV Monitor Test (Roche, USA)가 대표적인 방법이다. 10 HBV DNA/mL까지 측정가능하여, 예민도가 dot 블랏보다 100-1000배 높다. 이중 중합효소연쇄반응을 하면 2nd round에 10^{12} 이상 증폭하나 오염으로 인한 위양성 문제로 이것 대신에 민감도가 높은 라벨된 프로브로 하브리드형성법으로 대체할 수 있다. 만성 B형 간염에서는 HBsAg 양성, anti-HBe Ab양성환자에서 HBV의 복제가 활발하게 일어나고 있는 사람을 확인하는데 특히 유용하다. 임상적으로 사용하기에는 정량검사법이 필요하다. 간을 이식한 프로그램에서 HBV 감염의 추적에도 유용하고, HBV DNA가 10pg/mL 이상인 경우에 항바이러스 치료의 효과를 모니터하는데 이용할 수 있고, 직접 염기서열검사와 관련을 지어하면 HBV의 유전자 변이를 동정하는데도 이용될 수 있다. PCR은 바이러스의 계놈을 직접 고도의 민감도로 확인할 수 있으나, 오염으로 인한 위양성 결과의 위험이나 정량검사법의 개발의 어려움 등이 제한점이며, 또한 이외에도 온도가 적절한 것보다 낮거나, DNA를 불완전하게 변성이나 검체 채취나 처리 등에서의 에러 등으로 위음성을 나타낸다[26].

2. TMA와 hybridization protection assay (HPA)

Gen-Probe방법이다.

다. 신호증폭법

1. bDNA

가장 널리 이용되는 방법이며, Quantiplex HBV DNA Assay (Chiron Diagnostics, USA)가 있으며, 표적하나에 60 - 300효소분자가 부착되어 신호가 증폭된다. 재현성이 높아서 일차적 응용은 정량 및 치료반응의 추적검사이며, 예민도는 0.7×10^6 HBV이다. 증폭시의 오염문제가 낮다는 것이 장점이지만, 표적증폭법에 비해 예민도가 낮다는 것과 reporter 프로브의 비특이 결합에 의한 배후 간섭이 단점이다.

2. Digene Hybrid Capture System :

RNA-DNA hybrid가 항체에 부착, 이에 특이적인 항체가 반응, 이때 신호가 증폭, 화학발광법으로 검출, SHA-RP signal system[18]도 비슷하다.

방법에 따라 그 값이 매우 달랐으며, bDNA는 농도가 증가함에 따라 Hybrid Capture System보다 2.6배 이상 높은 결과를 나타내었는데 이유는 검사원리의 차이에 기인하며, 또 상품화 된 kit에 포함된 HBV DNA 표준물질은 서로 방법이 다를 경우에 최고 120배까지 차이가 발생한다.

Table 2. Comparison of detection sensitivities

Method	Approximate copy number detectable
Ethidium bromide staining	10^8
Radiolabeled oligonucleotide probes	10^6
Radiolabeled full-length probes	10^4
Enzyme-coupled probes	10^4
Chemiluminescent probes	10^4
Compound or branched probes	10^4
Nucleic acid amplification	≤ 10

라. 증폭후 검출 및 분석(표 2)

(1) 젤 전기영동

프로브법에 의한 DNA 검출법은 염기서열의 특이도와 예민도를 증가시키는 장점이 있다.

(2) 비색 microtiter plate (MTP) 분석

장점은 젤 전기영동보다 10 - 100배 검출민감도가 증가한다.

(3) capture 프로브를 사용하므로 산물의 특이도가 증명된다.

(4) 96 well thermocycler를 사용하면 동시에 여러 개의 반응을 신속하게 분석(4시간이내)

결 론

B형 간염 바이러스(hepatitis B Virus: HBV)는 인간의 간세포에 강한 친화성을 보이고 간 기능 장애를 초래하는 바이러스로서 만성 간염 후 치명적인 간 경변증과 간 세포성 간암으로 진행된다. 이를 예방하기 위해 B형 간염백신주사를 맞아야 하며, 특히 만성간염이 있는 경우에는 인터페론 등으로 진행되는 것을 막는 것이 치료 목적이다.

참 고 문 헌

1. Feitelson M. *Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma*. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:275-301.
2. Mahoney FJ. *Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection*. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:351-66.
3. Hollinger FB and Dienstag JL. *Hepatitis B and D viruses*. In : Murray PR, Baron EJ, ed. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999: 1025-42.
4. Dufour DR. *Evaluation of liver function and injury*. In : Henry JB. ed. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 20th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001: 264-80.
5. Bean B. *Antiviral Therapy : current concepts and practices*. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:146-82.
6. Kimura T, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. *New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigens and relation between levels of HBcAg and HBV DNA*. *J Clin Microbiol* 2003;41:1901-6.
7. Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. *Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load*. *J Clin Microbiol* 2002;40:439-45.
8. 최태윤, 전병열, 신정원, 이우경. B형 간염바이러스 표면항원과 표면항체 공존 예의 HBV DNA 분석. *대한임상미생물학회지* 2003;6(supplement 1): S82.
9. 조지현, 박도심, 이기은, 김학철. 국내 B형 간염바이러스 보유자에서의 HBV 유전자형. *대한임상미생물학회지* 2003;6(supplement 1): S67.
10. Hussain M, Chu CJ, Sablon E, Lok AS. *Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus(HBV) genotype and detection of HBV precore and core promoter variants*. *J Clin Microbiol* 2003;41:3699-705.
11. Repp R, Rhiel S, Heetmann KH, Schaefer S, Keller C, Ndumbe P, et al. *Genotype by multiplex polymerase chain reaction for detection of endemic hepatitis B virus transmission*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1095-1102.
12. Wolcott MJ. *Advances in nucleic acid-based detection methods*. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:370-86.
13. 김소영, 최문희, 이미애, 정화순. Hybrid Capture Assay와 중합효소연쇄반응에 의한 B형 간염바이러스 DNA 검출의 유용성 비교. *대한임상병리학회지* 1998;18:414-9.
14. 기창석, 이남용, 김대원. B형 간염바이러스 DNA 정량을 위한 Hybrid Capture System, Hybrid Capture II 및 Quantiplex HBV DNA assay의 비교. *대한임상병리학회지* 1999;19:202-7.
15. 조성은, 허정원, 이경인, 홍기숙, 정화순. 만성 B형 간염 환자의 추적 관찰시 효소면역법을 이용한 HBeAg 정량검사의 유용성. *대한임상병리학회지* 2002;22:196-201.
16. Garcia F Jr, Garcia F, Bernal MC, Leyva A, Piedrola C, Maroto MC. *Evaluation of enzyme immunoassay for hepatitis B virus DNA based on anti-double-stranded DNA*. *J Clin Microbiol* 1995;33:413-5.
17. Zaaier HL, ter Borg F, Cuypers HT, Hermus MC, Lelie PN. *Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2088-91.
18. Valentine-Thon E. *Evaluation of SHARP Signal System for enzymatic detection of amplified hepatitis B virus DNA*. *J Clin Microbiol* 1995;33:477-80.
19. Kamisango K, Kamogawa F, Sumi M, Goto S, Hirao A, Gonzales F, et al. *Quantitative detection of hepatitis B virus by Transcription-mediated amplification and hybridization protection assay*. *J Clin Microbiol* 1999;37:310-4.
20. Noborg U, Gusdal A, Pisa EK, Hedrum A, Lindh M. *Automated quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by using the Cobas Amplicor HBV Monitor test*. *J Clin Microbiol* 1999;37:2793-97.
21. Erhardt A, Schaefer S, Athanassiou N, Kann M, Gerlich WH. *Quantitative assay of PCR-amplified hepatitis B virus DNA using a peroxidase-labelled DNA probe and enhanced chemiluminescence*. *J Clin Microbiol* 1996;34:1885-91.
22. 이승욱, 오은지, 박연준, 김병기. Amplicor HBV MonitorTM HBV-DNA 측정법의 유용성 평가. *대한임상미생물학회지* 2002;5(supplement 1):S76.
23. 한원선, 신경섭, 손보라. 중합효소연쇄반응을 이용한 HBV-DNA 검사에서 시발체 선택에 따른 결과 비교. *대한임상병리학회지* 1998;18:614-9.
24. 기창석, 양윤선, 김종원. HBsAg 양성 환자의 혈청에서 branched DNA 신호증폭방법을 이용한 정량을 위한 B형 간염바이러스 DNA의 정량. *대한임상병리학회지* 1997;1:870-7.

25. Alestig E, Hannoun C, Horal P, Lindh M. *Phylogenetic origin of hepatitis B virus strains with precore C-1858 variant. J Clin Microbiol 2001;39:3200-3.*
26. Quint WG, Heijtink RA, Schirm J, Gerlich WH, Niesters HG. *Reliability of methods for hepatitis B virus detection. J Clin Microbiol 1995;33:225-8.*
27. Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. *Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. J Clin Microbiol 1999;37:1802-8.*