

B형 간염바이러스(HBV) DNA 양성이나 HBV 표면항원 방사선면역측정 음성인 B형 간염 환자의 임상상 및 S 유전자 변이 분석

손용학¹ · 오흥범¹ · 고선영¹ · 임영석² · 권오중³

울산의대 서울아산병원 진단검사의학과¹ · 내과², 서울의과학연구소³

Analysis of Clinical Characteristics and S Gene Mutation of Hepatitis B Virus (HBV) in Patients with Hepatitis B Surface Antigen RIA Negative and HBV DNA Positive

Yong-Hak Sohn, M.D.¹, Heung-Bum Oh, M.D.¹, Sun-Young Ko, M.D.¹, Young-Suk Lim, M.D.², and Oh-Joong Kwon, Ph.D.³

Departments of Laboratory Medicine¹ and Internal Medicine², University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul; Seoul Medical Science Institute³, Seoul, Korea

Background : We investigated hepatitis B virus (HBV) infection cases, who were HBsAg negative by radioimmunoassay (RIA) and HBV DNA positive for their clinical characteristics, the S gene mutation of hepatitis B virus (HBV), and usefulness of other HBsAg immunoassay.

Methods : Among the patients requested for HBV DNA quantification, 16 patients positive in HBV DNA but negative in HBsAg RIA (BNIBT HBsAg Kit, China) were enrolled. The "a" determinant of HBV S gene was sequenced and clinical characteristics were reviewed. Additional HBsAg assay was performed using Architect HBsAg kit (Abbott laboratories, USA) employing chemiluminescent immunoassay method.

Results : Eleven of the 16 patients showed multiple mutations in the "a" determinant. These patients received liver transplantation several years ago and have been treated with hepatitis B immune globulin (HBIG) and antiviral drugs. G145R mutation was found in 8 patients and G145K, D144G, and D144A were also frequently found. Among 9 of the 11 patients tested for HBsAg by Architect HBsAg kit, 8 showed positive results. Among 4 of the remaining 5 patients, only 2 showed weak positive results (≤ 1 IU/mL) in Architect HBsAg kit.

Conclusions : HBV DNA-positive/HBsAg RIA-negative results were mostly observed in the patients treated with HBIG after liver transplantation, in whom HBIG escape mutations were found. Majority of these cases were positive in Architect HBsAg assay, and it is recommended to use other HBsAg immunoassay methods that are more sensitive than RIA in the detection limit as well as in the detection of escape mutant in hospitals performing liver transplantation. (*Korean J Lab Med* 2009;29:224-30)

Key Words : Hepatitis B virus, Occult hepatitis B virus infection, HBIG escape mutation, HBsAg assay

Received : November 26, 2008

Manuscript No : KJLM2204

Revision received : February 19, 2009

Accepted : February 19, 2009

Corresponding author : Heung-Bum Oh, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center,
388-1 Poongnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea
Tel : +82-2-3010-4505, Fax : +82-2-478-0884
E-mail : hboh@amc.seoul.kr

*본 연구는 한국과학재단을 통해 교육과학기술부의 미래유망융합기술파이오니아사업으로부터 지원받아 수행되었습니다(과제번호: M10711270001-08M1127-00110).

서론

B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV) DNA 검출에 있어 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)과 같이 검출 예민도가 높은 방법들이 최근 도입되면서 B형 간염 표면항원(Hepatitis B surface antigen, HBsAg)이 검출되지 않음에도

혈중에서 HBV DNA가 검출되는 경우가 발생하고 있다. 이는 HBsAg 출현 이전의 초기 HBV 감염이거나 혹은 잠복 HBV 감염(Occult hepatitis B virus infection)인 경우로 간주된다.

잠복 HBV 감염은 HBsAg 음성인 사람에서 간조직이나 혈청에 장기간 HBV DNA가 검출되는 경우로 정의되고 있다[1, 2]. 잠복 HBV 감염은 만성간질환과 간세포암(HCC)의 유발인자로 알려져 있고, 면역억제 상태에서는 재활성화되어 임상상을 유발하기 때문에 임상적으로 관심이 증가하고 있다. 더욱이 헌혈자에 대한 HBV DNA선험이 대부분의 국가에서 이루어지고 있지 않기 때문에 수혈전파성 감염을 유발할 수 있는 문제점도 있다.

잠복 HBV 감염이 일어나는 기전은 크게 두 가지 가설로 설명되고 있다[1, 3]. 즉, B형 간염 바이러스의 S 유전자 변이로 인해 HBsAg이 검출되지 않는다는 가설과 바이러스 복제가 강하게 억제되어 면역검사의 검출한계 미만의 농도로 바이러스가 존재한다는 가설이다. 전자의 가설은 HBsAg의 주요 에피토프에 변화가 발생하여 검사상 위음성을 보일 수 있다는 것이므로, 검사 시약에 포함된 항체의 성상에 따라 검사결과에 차이를 보이는 현상을 설명할 수 있다. 반면 잠복 HBV 감염의 대부분이 면역억제 상태에서는 재활성되면서 검출된다는 점은 후자의 가설을 더 지지하는 것으로 간주할 수 있다.

S 유전자 중 HBsAg이 B형 간염 표면항체와 결합하는 부위는 주요 친수성 부위(Major hydrophilic region, MHR)로서 100번째 아미노산에서 160번째 아미노산 사이를 말하며 cysteine 아미노산에 의해 큰 고리(loop)를 형성하게 되는데, 107-138번째 아미노산들과 139-147번째 아미노산들이 2개의 주요 고리를 형성하게 된다. 이 중 HBsAg에 대한 항체결합을 결정하는 부위를 “a” 결정기(“a” determinant)라고 부르는데, 그 범위는 124번째 아미노산에서 147번째 아미노산 사이를 지칭한다. 특히 139-147번째 아미노산들이 매우 잘 보존되어(highly conserved) 있으며, B형 간염 표면항체에 강한 친화도를 보이는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 부위에 변이가 발생할 경우에는 검사방법에 따라 HBsAg이 검출되지 않을 수 있다는 보고가 있다[4, 5].

저자들은 단일 대학병원 검사실에서 HBV DNA 정량검사가 의뢰된 검체 중에서 결과가 양성이었음에도 불구하고 방사선면역 측정법(radioimmunoassay, RIA)에서 HBsAg 음성(이하 HBV DNA 양성/HBsAg RIA 음성)이었던 검체들을 대상으로 어떠한 임상적 상황에서 이러한 경우가 일어나는지, 다른 면역검사법에서는 어떠한 반응을 보이는지, 그리고 S 유전자의 “a” 결정기에는 어떤 변이들이 주로 발생하는지에 대해 알아보아 HBsAg RIA 검사의 위음성에 대한 원인을 분석하고 이에 대한 대책을 마련하는데 도움을 주고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2008년 2월에서 6월까지 울산의대 서울아산병원에 HBV DNA 정량검사가 의뢰된 총 11,059건 중에서 HBV DNA가 15 IU/mL 이상이면서, 같은 날 채혈한 검체로 HBsAg 결과가 음성이었던 환자 16명을 대상으로 하였다. HBV DNA 정량검사는 Abbott m2000rt (Abbott Molecular Inc., Abbott Park, IL, USA)를 이용하여 Abbott RealTime HBV Quantification Kit (Abbott Molecular Inc.)로 시행하였고 검출민감도는 15 IU/mL 이었다. Abbott m2000sp System (Abbott Molecular Inc.)을 이용하여 혈청 200 μ L에서 HBV DNA를 추출한 후, 이 HBV DNA에 50 μ L의 반응혼합물(master mix)을 혼합하고 반응 plate에 옮긴 후 Abbott m2000rt로 증폭과정을 시행하였다. HBV DNA 정량 검사는 본 기관에서는 항바이러스제 투여 환자의 추적 검사용, HBV 감염 간이식환자의 추적 검사용, 급만성 B형 간염 환자의 진단용으로 의뢰되고 있다. HBsAg 검사는 BNIBT HBsAg Kit (Beijing North Institute of Biological Technology, Beijing, China)를 이용한 RIA로 시행하였다. RIA 검사는 1회 검사로 결과가 보고 되었고 처음 양성이거나 전검사가 음성인 경우 재검을 시행하였으며, 정도관리는 검사실의 규정에 따라 정상적으로 시행되었다. 대상 환자들은 병록지를 통해 임상 정보를 확인하였다.

2. HBV S 유전자 염기서열 분석

각 검체에 대해 S 유전자의 MHR (100-160번째 아미노산)을 직접염기서열분석법으로 분석하였다. 염기서열 분석은 BioCore HBV DR sequencing kit (BioCore Co, Seoul, Korea)로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행 후 염기서열 분석을 사용하였으며 간단한 방법은 다음과 같다.

환자 혈청 200 μ L에서 바이러스 핵산 추출키트인 QuickGene DNA Tissue Kit S (Fujifilm, Tokyo, Japan)를 사용하여 HBV DNA를 분리한 후 S 단백질의 63번째 아미노산에서 마지막 아미노산 부분을 포함하도록 PCR을 이용하여 증폭하였다. 반응액은 6 μ L의 BioCore HBV DR sequencing kit (BioCore Co.)에 4 μ L의 분리한 DNA를 첨가하여 총량 10 μ L로 반응하였다. PCR은 DNA Engine Dyad (Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 95°C에서 5분간 전변성 반응 후 변성반응 94°C 60초, 결합반응 61°C 60초, 연장반응 72°C 90초를 40회 반복한 후

72°C에서 5분간 추가 연장반응을 시행하였다. PCR의 산물은 2% agarose gel (Promega, Madison, WI, USA)에 5 μ L를 loading 후 전기영동하여 PCR 산물(966 bp)을 확인하였다.

남아있는 PCR 시발체와 dNTP들을 제거하기 위해 10X buffer (670 mM glycine-KOH, 67 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol [DTT]) 0.8 μ L, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Promega) 1 μ L, Exonuclease (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) 0.2 μ L와 3차 멸균 증류수 4 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응하였으며 SAP와 Exonuclease의 비활성화를 위해 85°C에서 15분간 반응을 실시하였다. PCR 산물에 염기서열 분석용 dye를 붙여주기 위해 20-100 ng/ μ L로 희석한 PCR 산물 1 μ L, 3차 증류수 2 μ L, 2 pmol/ μ L 농도의 염기서열 분석 시발체(CATCCTGCTGCTATGCCTC) 1 μ L 및 Big-Dye 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 용액 2 μ L를 혼합하여 96°C에서 10초, 결합반응 50°C 5초, 연장 및 label 반응 60°C 4분을 25회 반복하였다. 염기서열분석반응 후 33 μ L의 magnetic resin (Promega)을 사용하여 반응하지 않고 남은 산물을 제거하고 DNA자동분석기 ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied-biosystems)에 넣어 염기서열을 분석하였다.

3. HBV MHR 및 “a” 결정기 변이 분석

분석된 염기서열을 S 단백질 서열로 변환한 후 한국인에서 검출된 HBV의 거의 모두가 C형 유전자형이므로 이에 해당하는 X04615 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>)의 S 단백질 서열과 비교하여 변이를 확인하였다[6]. 122번째(K 또는 R)와 160번째 아미노산(K 또는 R)은 혈청형을, 127번째 아미노산(P, T 또는 L)은 혈청아형을 결정하는 것으로 알려져 있어 이 아미노산들은 변이 분석에서 제외하였다.

4. 다른 면역검사법을 이용한 HBsAg 검사

S 단백질 변이에 의한 HBsAg 검사간의 차이를 확인하기 위해 -70°C에 보관된 혈청을 이용하여 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories, Abbott Park, IL, USA)로 추가검사를 시행하여 측정법 간의 결과 차이를 알아보았다. Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)는 화학발광 면역측정법(chemiluminescent immunoassay, CLIA) 방법을 이용한 것으로 단클론 포획 항체(monoclonal capture antibody)와 다클론 접합 항체(polyclonal conjugate antibody)를 사용하며, 0.05 IU/mL 이상을 양성으로 판정한다.

결 과

1. 환자의 임상적 특징

HBV DNA양성/HBsAg RIA 음성의 결과를 보인 총 16명의 임상상은 다음과 같다(Table 1). 11명(중례 1번-11번)은 간이식 후 추적관찰 중인 환자로 HBIG와 항바이러스제제가 투여 중이었다. HBIG는 간이식 후 검사시점까지 3년 이상 계속 투여 중이었으며, 항바이러스 제제는 lamivudine, adefovir, entecavir 등을 투여받았다. 나머지 5명 중 2명(중례 12번, 13번)은 간이식 후 4일 이내인 환자이었고, 3명(중례 14번-16번)은 각각 간세포암, 간경화 환자, 급성간염 후 회복기 환자이었다. 대상 환자들의 HBV DNA 농도는 4×10^2 - 4.2×10^6 copies/mL의 분포를 보였고, 중간값은 1.1×10^3 copies/mL이었다.

2. HBV S 유전자 분석

16개의 대상 검체 중 11명에서 MHR 부위에 각 검체마다 2-5개의 변이가 관찰되었으며, 변이의 대부분은 “a” 결정기 부위에서 특히 142에서 145번째 아미노산 부위에서 검출되었다(Fig. 1) 변이가 관찰된 11명(중례 1번-11번)은 모두 간이식 후 검사시점까지 계속 HBIG를 투여 받고 있는 환자였다. S 단백질의 위치별 변이를 살펴보면 145번째 아미노산(G) 치환이 10명(R 7명, A 2명, K 1명)으로 가장 높은 빈도를 보였다. 또한, 142번째 아미노산(P) 치환이 5명(L 3명, P/H 1명, P/V 1명)에서, 144번째 아미노산(D) 치환이 4명(G 2명, A 1명, E 1명)에서 관찰되었다. 이외에도 “a” 결정기에서 관찰된 변이는 I126T 3명, I126V 2명, G130N 2명, S132F 2명, S132Y 1명, K141R 1명이 있었다. “a” 결정기 이외의 MHR 부위에서 관찰된 변이는 Y100C 2명, Y100S 1명, Y100Y/X 1명, L110I 1명, L110R 1명, P120Q 2명, A159V 1명의 변이가 관찰되었다. 변이가 관찰되지 않은 5명 중 2명(중례 12번, 13번)은 간이식 직후로 HBIG 투여 2일, 4일째였고, 나머지(중례 14번-16번)는 HBIG가 투여되지 않은 경우이었다.

3. Architect HBsAg Kit (Abbott laboratories)에 의한 HBsAg 검사결과

16예 중 보관된 검체가 있어 추가 검사가 가능했던 13예 중 10예(76.9%)에서 화학발광면역측정법(CLIA)인 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)으로 검사하였을 때 양성 결과를 보였다. 변이가 관찰되었던 11명 중 보관된 검체가 있었던 9

Table 1. Clinical characteristics of 16 patients with HBsAg RIA (-) and HBV DNA (+)

No. case	Age	Sex	Clinical diagnosis	HBIG treatment	Antiviral drug treatment (Months)	ALT/AST (IU/mL)	HBV DNA quantity (copies/mL)	HBsAg by Architect HBsAg kit (IU/mL)
1	43	M	LT 5 yr ago (HBV LC)	Yes	Lamivudine (24) Adefovir (36)	22/18	1.6×10^3	Positive (64.5)
2	60	M	LT 3 yr ago (HBV LC)	Yes	Lamivudine (21) Adefovir (21) Entecavir (2)	73/49	6.4×10^3	Positive (14.4)
3	57	M	LT 5 yr ago (HBV LC)	Yes	Lamivudine (43) Adefovir (31)	33/34	1.2×10^4	Positive (73.6)
4	62	M	LT 4 yr ago (HBV LC & HCC)	Yes	Lamivudine (9) Adefovir (9)	39/39	2.4×10^3	Positive (101.0)
5	43	M	LT 5 yr ago (HBV LC & HCC)	Yes	Lamivudine (36) Entecavir (4)	26/31	5.0×10^2	Positive (24.7)
6	51	F	LT 3 yr ago (HBV LC)	Yes	Lamivudine (18) Adefovir (18)	50/42	4.0×10^2	NT
7	63	M	LT 6 yr ago (HBV LC & HCC)	Yes	Lamivudine (4)	85/62	2.3×10^5	NT
8	41	M	LT 8 yr ago (HBV LC)	Yes	Adefovir (4) Entecavir (4)	84/58	1.3×10^3	Positive (117.9)
9	62	M	LT 9 yr ago (HBV LC)	Yes	Lamivudine (1) Entecavir (1)	656/276	7.5×10^2	Positive (3.0)
10	62	F	LT 5 yr ago (HBV LC)	Yes	Adefovir (1) Entecavir (1)	26/26	4.2×10^6	Positive (>250.0)
11	52	F	LT 3 yr ago (HBV LC & HCC)	Yes	Lamivudine (20)	484/242	4.6×10^2	Negative
12	58	F	LT 4 days ago (HBV LC)	Yes (4 days)	0	1761/6924	4.9×10^3	Negative
13	53	M	LT 2 days ago (HBV LC)	Yes (2 days)	Unknown	64/34	3.0×10^2	Negative
14	18	M	Recovery phase of acute hepatitis B	No	0	22/20	9.0×10^2	Positive (0.26)
15	68	M	CHB & HCC	No	0	35/42	7.4×10^2	NT
16	61	M	LC	No	0	16/26	5.1×10^2	Positive (1.0)

Abbreviations: HBV, Hepatitis B virus; LT, liver transplantation; LC, liver cirrhosis; HCC, hepatocellular carcinoma; HBIG, hepatitis B immune globulin; CHB, chronic hepatitis B; NT, not tested.

		"a" determinant									
Reference (X04615)	101	111	121	131	141	151					
	Y	QGMFLPVCPLL	PGTSTTSTGP CRT	CTIPAQG	TSMFPSCCCT	KPSDGNC	TCI	PIPSWAFAR			
Patient 1	x	-----	-----Q	-K-	-----	---R-	---	-----k			
Patient 2	-	-----I	-----	-K-	-----	---R-	---	-----VK			
Patient 3	C	-----	-----	-V-	-----	-L-A-	---	-----			
Patient 4	S	-----R	-----	-K-	-----	-h-GA-	---	-----			
Patient 5	-	-----	-----	-K-	---T-	-Y-	---	-----			
Patient 6	-	-----	-----	---T-	-N-	---	R---	---			
Patient 7	-	-----	-----	---	---	---	-v-R-	---			
Patient 8	C	-----	-----	-K-	-V-	-F-	-L-R-	---			
Patient 9	-	-----	-----	-K-	-T-	-F-	-L-R-	---			
Patient10	-	-----	-----	-K-	---	---	-ER-	---			
Patient11	-	-----	-----Q	-K-	---T-	-N-	---	GA-			
Patient12	-	-----	-----	-K-	---	---	---	---			
Patient13	-	-----	-----	-K-	---	---	---	---			
Patient14	-	-----	-----	-K-	---	---	---	---			
Patient15	*	*****	*****	***	***	---	---	---			
Patient16	-	-----	-----	-K-	---	---	---	---			

Fig. 1. Amino acid sequences of major hydrophilic region (100-160) including "a" determinant (124-147) in HBV S gene of 16 patients. Lower cases mean that its amino acids are mixed with reference amino acids. "*" shown in pt 15 indicates that its sequence could not be read due to background noise.

명에서는 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)에 의한 HBsAg 검사 결과, 8명은 양성(3.0 IU/mL 이상, 중간값 69.0 IU/mL), 1명은 음성을 보였다. 변이가 관찰되지 않았던 나머지 5명 중 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)으로 검사

가 가능했던 4명 중 2명만이 양성 결과를 보였다. 음성을 보인 2명은 간이식으로 HBIG를 투여받은 후 각각 2, 4일째이었다. 그리고 양성을 보인 2명은 만성 보균자와 급성감염 회복기 각 1명으로 모두 약양성(1 IU/mL 이하)의 결과를 보였다(Table 1).

고 찰

본 연구의 대상인 HBV DNA 양성이면서 HBsAg 음성인 경우의 원인 중 잘 알려진 경우는 잠복 HBV 감염이다. 일반 헌혈자를 대상으로 한 연구에서는 검사의 검출민감도에 따라 다소 다르긴 하지만 HBsAg 음성/anti-HBc 양성인 헌혈자의 대략 1% 가량에서 HBV DNA 양성이 보고된다고 하였다. 따라서 anti-HBc 양성률이 0.5%에서 10% 이상 다양한 것을 감안할 때 대략 10^{-3} 에서 10^{-5} 정도의 빈도로 잠복 HBV 감염이 발생한다고 추정할 수 있다[3]. 잠복 HBV 감염은 오래 전에 HBV에 감염되었지만 무증상으로 지내고 있는 경우이므로 문진을 통해 HBV 감염의 위험요인을 알아내기 어렵고 또 면역검사로 선별되지 않으므로 수혈전파성 간염을 유발할 가능성이 높다. 실제로 잠복 HBV 감염에 의한 수혈전파성 간염의 보고는 최근까지 지속적으로 보고되고 있으며, 수혈로 감염되는 HBV의 주요한 원인으로 여겨지고 있다[1, 7-9]. 그러나, 최근 일본에서 시행된 연구에서는 HBV가 전파되었을 경우 잠복 HBV 감염에 의한 것은 드물다는 보고도 있어 이에 대한 연구는 보다 더 필요할 것으로 생각된다[10].

아직까지 국내에서 HBV DNA 양성/HBsAg RIA 음성인 경우는 원인이 될 수 있는 임상적 상황, 검사적 오류 혹은 바이러스 특성에 대한 보고가 충분하지 않았다. 특히 환자진료와 관련된 검사업무를 주로 수행하는 대학병원과 같은 일선 검사실에서 어떠한 경우에 해당 증례가 발생하는지에 대한 보고는 없었다. 그런데 본 연구를 통해 분석해 본 결과 HBV DNA 양성/HBsAg RIA 음성인 환자 검체는 만성 B형 간염으로 항바이러스 제제를 치료 중이거나 혹은 간이식으로 HBIG 투여를 받는 환자들 대부분임을 알 수 있었다. 이는 간이식을 많이 하는 병원의 특성에 기인한 것으로 생각된다. 그러나 5명에서는 간이식이 아닌 다른 임상상황에서도 관찰되었으므로, 병원의 환자 특성에 따라 빈도는 다소 다를 수 있어도 HBV DNA 양성/HBsAg RIA 음성인 현상은 여러 병원에서 관찰될 것으로 사료된다.

보통 HBV는 다른 DNA 바이러스보다 10배 이상 돌연변이 발생빈도가 높은 것으로 알려져 있다. 특히 만성 B형 간염에서 돌연변이의 발생률은 1.4×10^{-5} – 3.2×10^{-5} 변이/부위/년 정도이지만 간이식 상황에서는 이보다 100배정도 더 높은 것으로 알려져 있다[11]. 이는 바이러스가 저농도로 존재하고 있어도 감수성이 높은 새로운 간이 환자에게 이식되면 바이러스의 증식이 활발해지고, 여기에 HBIG와 같은 고농도의 항체에 의해 압력이 가해지면 돌연변이가 높은 훨씬 더 높은 빈도로 발생할 수 있는 것으로 설명하고 있다[11].

본 연구 결과 간이식 후 HBIG와 항바이러스제제를 투여받고 있는 환자에서 HBsAg의 Y100, L110, P120, I126, G130, S132, K141, P142, D144, G145, A159부위에서 변이가 관찰되었다. 특히 G145 부위는 11명 중 10명의 환자에서 검출되었다. 그리고 G145 부위의 변이가 관찰되지 않은 경우에는 D144 변이가 관찰되었으며, 간 이식 후 HBIG를 투여받은 환자들은 G145, D144부위 중 어느 하나의 돌연변이는 가지고 있었다(Fig. 1). 이는 간이식후 HBIG를 계속 투여 받는 환자의 경우 G145R 변이가 가장 많고, 더불어 G145K/E/A와 D144G/A/E/V 변이도 흔히 검출된다는 기존의 연구와 일치하는 소견이다[12-14]. G145R은 백신 도피 돌연변이(vaccine escape mutant)로 이미 20년 전부터 보고되어 왔었다[15, 16]. 이들 변이들은 수동 혹은 능동 면역화(immunization)에 대해 선택 우위(selective advantage)를 가지게 되어 결국 우세한 바이러스 클론이 된다고 한다. 이들 돌연변이가 우세 클론이 되면 환자가 간이식 전후로 계속 HBIG를 투여 받는다고 하더라도 아무런 임상적 효과를 얻을 수 없는 문제가 발생한다. G145R은 시간이 지난 후에도 안정하게 유지되고, 가족내 감염을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다[17, 18]. 또한, 본 연구에서 G145, D144 이외에 여러 돌연변이가 관찰되었다. 그러나, 치료받지 않은 한국인 만성 B형 간염바이러스 감염환자를 대상으로 자연적으로 일어나는 S 단백질 변이에 대한 연구를 감안하면, 이들 중 일부는 자연적으로 존재하는 변이가 동반되었을 가능성이 있다[19].

본 연구에서 변이가 관찰되었던 11명 모두는 HBIG 이외에 항바이러스 제제를 투여 받고 있던 환자들이었다. 따라서 이들에게서 발생한 변이는 HBIG에 의한 영향뿐만 아니라 항바이러스 제제에 의한 돌연변이 발생 가능성도 고려해야 할 것이다. 항바이러스 제제에 의한 돌연변이는 HBV 중합효소에 발생하는 돌연변이로 잘 알려져 있지만, HBV 중합효소 유전자와 S 유전자는 같은 염기서열을 공유하기 때문에 S 단백질의 변이를 유발할 수 있기 때문이다. P120A 변이[20], I126S, T131N, M133T, S136Y 변이[21]와 MHR 이외의 부위에서 보고된 E164D+I195M 변이(HBV 중합효소에서 rtV173L+rtI180M+rtM204V 변이에 해당) [22] 등은 HBsAg의 위음성을 유발할 수 있는 것으로 보고된 바 있다. 그런데 본 연구에서는 이들 돌연변이가 관찰되지 않았다.

“a” 결정기에 있는 아미노산의 변화는 항체 결합 부위의 구조 변화를 일으켜 중화항체 결합에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[11]. 이는 항원-항체 반응에 기반한 면역검사법에서 위음성 검사가 초래될 수 있다는 논리와 일맥 상통하는 것이다. G145R과 같은 S 단백질의 변이가 존재할 때 실제 HBsAg에 반응하는 항체의 차이에 의해 결과가 상이하다는 보고가 있어왔다[4, 5].

본 연구에서 RIA에서 HBsAg 음성이었던 13검체 중 10예 (76.9%)는 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)으로 검사하였을 때 양성 결과를 보였다. 검사자체의 검출 민감도에 의한 영향도 있을 수 있으나, 변이를 보인 군에서의 DNA 정량값이 $4.6 \times 10^2 - 4.2 \times 10^6$ copies/mL의 분포를 보였고 CLIA법에 의한 정량값도 3.0 IU/mL 이상 높게 검출되었으므로 낮은 농도의 HBsAg에 의한 검출한계의 문제 보다는 S 단백질에 발생한 돌연변이에 의해 RIA에서 검출되지 못했을 가능성이 더 높은 것으로 사료된다. 반면 변이가 없는 군에서는 HBV DNA 정량값이 대개 1,000 copies/mL 미만이었으며, Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)으로 측정된 경우 4명 중 2명에서만 양성되었고, 이 경우도 정량값이 1.0 IU/mL 이하로 낮아서 측정법의 검출한계 차이에 의한 원인이 주요했을 것으로 판단된다. 그러나, HBIG 도피 돌연변이가 있었던 한 명(중례 11번, G145A+D144A)의 경우 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)에 의한 HBsAg 검사에서 음성 결과를 보였는데, 460 copies/mL 정도의 낮은 DNA양에 의한 영향과 다른 돌연변이에 의한 추가적인 영향으로 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)에서 검출이 안 되었을 가능성이 있으나 본 연구에서는 확인하기는 어려웠다.

본 연구에서 사용된 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)는 다른 연구결과에서도 G145R과 같은 돌연변이에 영향을 받지 않는다고 하였다[5]. 국내에서 시행한 연구에서도 몇몇 면역검사법에서 G145R에 의한 돌연변이가 있을 때 HBsAg 검사에 문제가 있음을 보여주었으나 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)는 검출이 가능하다고 하였다[23]. 그러나, 이러한 연구는 주로 효소면역측정법(Enzyme immunoassay, EIA) 또는 CLIA간의 비교가 대부분이었으며, RIA에 대한 보고는 거의 없었다. 그러나 본 연구결과를 볼 때 HBIG 도피 돌연변이가 발생하였을 때 RIA 검사는 위음성의 결과를 초래할 가능성이 있으므로 이러한 돌연변이를 검출할 수 있는 다른 면역검사법으로의 전환이 필요하다고 여겨진다.

결론적으로 본 연구를 통해 HBV DNA 정량검사가 의뢰된 검체 중에서 HBV DNA 양성/HBsAg RIA 음성의 결과는 대부분 간이식을 전후하여 HBIG를 투여받는 환자군에서 발견되므로 병원의 환자분포에 따라 달라질 수 있음을 알 수 있었다. 이들 환자에서는 G145R 변이 등이 발생하는 것 또한 확인할 수 있었다. 본 연구의 중례에서는 RIA법에서 음성이지만 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories)에서 양성을 보인 경우가 많았으므로 간이식을 많이 시행하는 병원에서는 향후 HBsAg 검사의 위음성을 줄이기 위해 RIA 보다는 돌연변이 등을 검출할 수 있는 다른 검사법의 사용을 고려해 볼 필요가 있다고 사료된다.

요 약

배경 : B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV) 항원(HBsAg) 방사선면역 측정법 음성이면서 HBV DNA 증폭검사상 양성인 경우의 임상적 상황, S 유전자 변이와 다른 HBsAg 검사법의 유용성을 알아보고자 하였다.

방법 : HBV DNA정량검사가 의뢰된 환자 중 결과가 양성이면서 방사선면역측정법에 의한 HBsAg (BNIBT HBsAg Kit, China) 검사상 음성인 16명을 대상으로 하였다. 각 검체에 대해 S 유전자 “a” 결정기의 염기서열을 분석하였고 이들의 임상적 특징을 분석하였다. 또한 화학발광면역측정법 (CLIA) 원리를 이용하는 Architect HBsAg kit (Abbott laboratories, USA)로 HBsAg 추가검사를 시행하였다.

결과 : 대상 16명 중 11명에서 “a” 결정기에 다수의 변이가 관찰되었다. 이들 11명은 수년 전에 간이식을 받고 B형 간염바이러스 면역글로블린(Hepatitis B immune globulin, HBIG)과 항바이러스제제를 투여 중인 환자이었다. G145R 변이가 8명에서 관찰되었으며, 그 외 G145K, D144G, D144A 등이 흔히 관찰되었다. 이들 11명 중 9명에서 Architect HBsAg kit으로 HBsAg을 검사하였는데, 8명에서는 양성(3.0 IU/mL 이상, 중간값 69.0 IU/mL) 결과를 보였다. 변이가 관찰되지 않은 나머지 5명 중 4명에서 Architect HBsAg kit으로 추가검사를 시행한 결과 2명에서만 약양성(1 IU/mL 이하)을 보였다.

결론 : HBV DNA 양성/HBsAg RIA 음성은 간이식 후에 HBIG를 투여받는 환자군에서 주로 발견되었으며 HBIG 도피 변이가 관찰되었다. 이들 중례의 대부분에서 Architect HBsAg kit에서 양성을 보인 점을 고려할 때 간이식을 많이 시행하는 병원에서는 RIA 보다는 변이를 더 잘 검출할 수 있으며 낮은 수준의 HBsAg까지 검출할 수 있는 다른 면역검사법을 사용하여 HBsAg을 검사하는 것이 권장된다.

참고문헌

1. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. J Hepatol 2007;46:160-70.
2. Carreno V, Bartolome J, Castillo I, Quiroga JA. Occult hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. Rev Med Virol 2008;18:139-57.
3. Hollinger FB. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. Transfusion 2008;48:1001-26.
4. Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. J Med Virol 1999;59:19-24.

5. La'ulu SL and Roberts WL. The analytic sensitivity and mutant detection capability of six hepatitis B surface antigen assays. *Am J Clin Pathol* 2006;125:748-51.
6. Cha CH, Sohn YH, Jang S, Lee HJ, Lee KJ, Shin ES, et al. Genotype analysis of hepatitis B virus isolated from Korean hepatitis patients. *Korean J Lab Med* 2003;23:352-6. (차충환, 손용학, 장성수, 이한주, 이관제, 신은순, 오홍범. 국내 환자에서 분리된 B형 간염바이러스의 유전자형 분석. *대한진단검사의학회지* 2003;23:352-6.)
7. Soldan K, Ramsay M, Collins M. Acute hepatitis B infection associated with blood transfusion in England and Wales, 1991-7: review of database. *BMJ* 1999;318:95.
8. Liu CJ, Lo SC, Kao JH, Tseng PT, Lai MY, Ni YH, et al. Transmission of occult hepatitis B virus by transfusion to adult and pediatric recipients in Taiwan. *J Hepatol* 2006;44:39-46.
9. Saraswat S, Banerjee K, Chaudhury N, Mahant T, Khandekar P, Gupta RK, et al. Post-transfusion hepatitis type B following multiple transfusions of HBsAg-negative blood. *J Hepatol* 1996;25:639-43.
10. Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion* 2007;47:1197-205.
11. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 2005;32:102-12.
12. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K, Dornan E, McIntyre G, et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996;24:489-93.
13. Terrault NA, Zhou S, McCort RW, Pruett TL, Lake JR, Roberts JP, et al. Incidence and clinical consequences of surface and polymerase gene mutations in liver transplant recipients on hepatitis B immunoglobulin. *Hepatology* 1998;28:555-61.
14. Cooreman MP, Leroux-Roels G, Paulij WP. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci* 2001;8:237-47.
15. Zanetti AR, Tanzi E, Manzillo G, Maio G, Sbreglia C, Caporaso N, et al. Hepatitis B variant in Europe. *Lancet* 1988;2:1132-3.
16. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990;336:325-9.
17. Oon CJ, Chen WN, Goo KS, Goh KT. Intra-familial evidence of horizontal transmission of hepatitis B virus surface antigen mutant G145-R. *J Infect* 2000;41:260-4.
18. Chakravarty R, Neogi M, Roychowdhury S, Panda CK. Presence of hepatitis B surface antigen mutant G145R DNA in the peripheral blood leukocytes of the family members of an asymptomatic carrier and evidence of its horizontal transmission. *Virus Res* 2002;90:133-41.
19. Song BC, Kim SH, Kim H, Ying YH, Kim HJ, Kim YJ, et al. Prevalence of naturally occurring surface antigen variants of hepatitis B virus in Korean patients infected chronically. *J Med Virol* 2005;76:194-202.
20. Hsu CW, Yeh CT, Chang ML, Liaw YF. Identification of a hepatitis B virus S gene mutant in lamivudine-treated patients experiencing HBsAg seroclearance. *Gastroenterology* 2007;132:543-50.
21. Lee SY, Choi MS, Lee D, Lee JH, Koh KC, Paik SW, et al. Overlapping gene mutations of hepatitis B virus in a chronic hepatitis B patient with hepatitis B surface antigen loss during lamivudine therapy. *J Korean Med Sci* 2005;20:433-7.
22. Bartholomeusz A and Locarnini S. Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *J Med Virol* 2006;78(S1):S52-5.
23. Huh HJ, Chae SL, Cha YJ. Comparison study with enzyme immunoassay and chemiluminescence immunoassay for hepatitis B virus surface antigen detection. *Korean J Lab Med* 2007;27:355-9. (허희진, 채석래, 차영주. 효소면역측정법과 화학발광면역측정법을 이용한 B형간염표면항원 검사의 비교. *대한진단검사의학회지* 2007;27:355-9.)