

肝炎 B 바이러스 감염 백서의 자연 치유기전과 肝의 화학적 및 물리적 손상이 미치는 영향에 관한 연구

仁濟醫科大學 病理學敎室

石 東 壽

緒 論

HB virus는全世界에 널리 퍼져 있으며, 人間은 막대한 數가 HBV에 感染이 되고, 其中 一部 사람들은 慢性으로 進行되어 保菌者로 되는 同時에 自身도 만성 간염, 간경변증 그리고 나아가서 肝癌까지 되어 간다¹⁾. 國民의 全人口에 對한 HBV 保菌者의 比率은 바로 그 나라의 衛生 環境이나 健康管理의 狀態하고 反比例 되어 있다. 卽 Africa나 Asia의 가장 나쁜 環境의 나라들의 國民에는 30~40%가 保菌者라고 하며²⁾, 대만은 15.2%³⁾, 우리나라는 6%정도^{4,5)} 日本은 2~3%⁶⁾ 그리고 美洲서는 0.1~1.5%의 保菌者가 있다고 한다²⁾. HBV가 血液, 體液서 傳播되고, 또 免疫狀態가 低下된 사람들에 잘 感染이 되니, 이런 경우 美國人에서는 15%까지가 保菌者로 있다고 한다. 또 美國의 麻藥中毒者들은 그 98%가 過去에 HBV에 걸렸든가 現在 걸려 있다고 한다⁷⁾. 우리나라서도 社會의 上流層에 屬하는 사람들에서는 1.7%의 保菌者의 比率을 보여주고 있다⁴⁾. 一般적으로 HBV 感染者의 11%가 나중에 保菌者로 된다고 하니⁸⁾ 아마도 全世界 人口의 半數以上은 HBV 感染을 받을 것이고 따라서 그 被害는 막심하고 지금은 그 治療와 豫防에 全世界가 合心하여 努力하고 있는 것은 當然하다고 보겠다. 이와같이 사람에게 널리 퍼져 있는 HBV는 人間 以外의 動物에게는 그리 큰 被害를 가져오는 것 같지가 않다. 그러나 Woodchuck, Pekin duck, ground squirrel에서 自然發生의 肝炎을 觀察하며 간염 바이러스를 分離하고 있다⁹⁾.

Tabor과 그 共同研究者들은 chimpanzee에 HBV를 感染시켜 實驗적으로 간염을 유발시켜 방사면역측정법으로 항원과 항체를 檢査하였다¹⁰⁾. 人間과 同居同食하는 rat에서는 肝炎이 있다는 말은 없다. 그것은 HBV에 對한 感受性이 弱해서 그렇다는줄 믿는다. 卽 HBV하고 접촉이 있어도 임상질병까지 가져오지 않고 지나간다고 思料된다. HBV의 여러 marker를 檢査하는데 使用된 monoclonal antibody(단세포군항체)나 vaccine(백신) 生産에 mice의 細胞를 利用하는 것을 볼 때¹⁰⁾ rat가 自然環境에서 HBV에 전혀 感染이 안된다고 생각하기 어려우며 따라서 人爲적으로 HBV를 rat에 感染시켜 그 自然治癒의 經過를 觀察하는 것도 興味있는 일이라고 생각하였다.

또 한편, perinatal infection(주산기의 感染)된 小兒에 있어 30年, 40年을 經過하면서 만성 간염, 간경변증 간암으로 癌이 進行이 되는데 男兒에서는 90%가 까지 이런 經過로 가는데 比해 女兒서는 極히 少數만이 이런 經過를 간다는 觀察은 아직 原因을 說明하지 못하고 있다¹¹⁾. 그러나 한가지 可能性은 成人 男性과 女性의 生活樣式의 差異가 관련이 있지 않을까하는 點이다. 卽 男性들은 肝細胞를 損傷케 하는 生活環境을 많이 가지는 것이 特長이다. Alcohol, 여러가지 加工食品에 있는 化學物質, 吸煙을 포함한 industrial air pollution 등은 男性들이 每日같이 접촉하고 있는 肝에 對한 부담들이다. A型 肝炎바이러스 感染과 發病의 機轉도 역시 正確하게 說明은 못하여도, 肝損傷과 HAV 感染이 一時的으로 關聯되어 있지 않을까 專門家들은 생각하고 있다¹²⁾. 이런 點들을 생각하여 rat의 肝에 物理的 化學的 損傷을 加하여 肝細胞의 再生과 DNA의 synthesis를 초래시켜 HBV infection과의 關係도 추적하려고 하였다.

접 수 : 1985년 2월 28일

* 1984年度 文敎部 學術研究助成費로 本實驗을 實施하였음.

特殊染色法으로 Orcein 染色法을 써서 HBV 항원을 보여 주고 했다^{15,16)}.

材料 및 方法

成숙한 白鼠를 平均體重이 300 gm 内外의 것을 使用하였다. 正常의 2群을 포함하여 全部 10群으로 나누고 各群은 4匹의 rat 로 구성되었다. 처치는 간절제술(約 1/2의 肝組織을 切除하였음)¹³⁾과 CCl₄를 腹腔內 注射 實施하였다¹⁴⁾. 모든 實驗群은 HBV 를 2日後부터 注射 하였는데 어떤 群은 1日, 他群은 3日間 注射하였다. 4 個群은 아무런 처치를 가하지 않고 HBV 注射만을 주었다. 희생 時期 등은 Table 1에 表示하였다. HBV 는 釜山 白病院 入院 患者 中에서 本 檢査室에서 HBV 抗原이 强하게 陽性을 보여준 血清 3例를 선택하여 pooling 을 하고 生理的 食鹽水로 5倍 희석하고 各 rat 에 0.05 ml 를 腹腔內로 注射하였다. HBV marker 檢査는 各 rat 의 心臟血液을 1~2 ml 採取하여 各群의 動物의 것을 모두 pooling(混注)하여 本病院 檢査室에서 人間 血液 표본과 同一한 方法으로 HBs, HBc, HBe 의 抗原 및 抗體를 檢査하였다. 檢査方法은 日本 富士 レビオ 株式會社 製品인 kit 를 使用(serodia-HBs, serodia-Anti HBs), 그리고 美國 Abbott Laboratories Diagnostics Division 의 製品으로 HBe 항원, HBe 항체, HBc 항체를 방사면역측정법으로 檢査하였고, 「이타리아」의 Sorin Biomedica 의 immunoradiometric assay kit 로 IgM anti-HBc 를 測定하였다. 組織檢査는 거의 全部의 重要臟器를 取하였으며 特히 肝과 淋巴組織, 造血組織에 重點을 두었다. 염색은 H & E 와

成績 및 考察

H & E 染色으로 特別한 所見을 觀察하지 못하였다. 단지 간절제群들의 肝의 Kuffer 세포들이 增殖되어 있었다. 이것은 간절제 後 급격히 再生하는 肝組織의 일부 현상으로 생각한다. 이때 肝細胞에 ground glass balloon 現象¹²⁾, 細胞核의 增大¹⁷⁾等 HBV 感染을 의심할 조직變化는 觀察하지 못하였다. 卽, rat 의 肝細胞의 核의 DNA synthesis 가 HBV 感染에 特別한 活性化를 보여주지 않았다. Orcein 染色으로도 HBs 를 의심할 肝細胞內 陽性物質을 뚜렷하게 보지 못하였다. 그러나 여러 淋巴組織에서 弱하게 Orcein 에 陽性으로 나타나는 細胞質이 풍부한 單核細胞들이 淋巴 follicle(여포) 주변과 sinusoids 에 간혹 出現하고 있었다. 이들 細胞들은 H&E 로 큰 好鹽基性 單核細胞(tissue basophils)로서 正常 rat 서도 觀察되었다. 그러나 HBV 注射群에서 더욱 자주 出現하였다. 이들 細胞들은 rat 의 自然防禦機轉에 重要한 役割을 하고 있다고 보며, HBV 에 對한 感受性이 弱하다고 해도 淋巴組織內에서 이들 細胞들이 反應하여 HBV 感染에 對抗하는 것으로 思料됨. 이 單核細胞들은 두가지가 있다. spindle shaped cell 들은 흉선의 fibrotic capsule 과 trabecle 에 多數 散在되어 있는데, 이것은 生理的으로 恒常存在하는 細胞로 看取된다. 이 細胞는 진하게 鹽基性인 과립들이

Table 1. Experimental Schedule

Group	Treatment	Date of HBV inj. after Treatment				Date of Sacrifice after the last HBV inj.		
		2 nd,	3 rd,	4 th	5 th D,	1 W,	2 W,	4 W.
I a	control	no HBV injection				sacrificed any date		
I b	control	no HBV injection				sacrificed any date		
II a	none	+			+			
II b	none	+	+	+		+		
II c	none	+	+	+			+	
II d	none	+	+	+				+
III a	hepatectomy	+					+	
III b	hepatectomy	+	+	+				+
IV a	CCl ₄ i.p. inj.	+					+	
IV b	CCl ₄ i.p. inj.	+	+	+				+

Table 2. Basophilic Mononuclear Cells and Slightly Orcein-Positive Mononuclear Cells in the Lymphoid Tissue of the Rats After HBV Antigen Injection

Group	HBV daily inj.		Sacrificed Date after HBV inj.	Spleen	LN-1	LN-2	Remarks
	×1	×3					
I a	1			+		+	control
	2						
	3						
	4						
I b	1					+	control
	2			+		+	
	3			+	+	+	
	4			+	+	++	
II a	1	×1	5 th day	++	+	+	
	2			++	+	++	
	3			++	+	*	
	4			+		###	
II b	1		1 week	++	+	*	
	2	×3		++	+	++	
	3			++	+	+	
	4			++	+	+	
II c	1		2 weeks	++	+	+	
	2	×3		+	+	##	
	3			+	+	*	
	4			++	+	+	
II d	1		4 weeks	+	++	##	
	2	×3		+	+	+	
	3			+	+	##	
	4			+	+	++	
III a	1	×1	2 weeks	+	+		hepatectomy
	2			+		*	
III b	2		4 weeks	+		+	hepatectomy
	3	×3		+			
	4			+			
IV a	1	×1	2 weeks	++	+		CCl ₄ i.p. injection
	2			+			
	3			+	+		
	4			+	+		
IV b	1		4 weeks	+	++		CCl ₄ i.p. injection
	2	×3		+	+	+	
	3			+	+		
	4			+	+		

* No organ or tissue. LN-1: Mesenteric lymph nodes LN-2: Mediastinal lymph nodes
 Thymus: Many spindle-shaped basophilic mononuclear cells in the fibrotic capsule and fibrotic trabecles in normal and treated animals.
 Bone Marrow: Many large basophilic mononuclear cells which have slightly Orcein-positive cytoplasm in normal and treated animals.

Table 3. Hepatitis B virus markers of rat's serum

Group	Treatment	HBV daily inj.		Date after HBV injection	HBc-Ab
		×1	×3		
I a	control				-
I b	control				-
II a	none	×1		5 th day	+
II b	none		×3	1 week	+
II c	none		×3	2 weeks	+
II d	none		×3	4 weeks	-
III a	hepatectomy	×1		2 weeks	±
III b	hepatectomy		×3	4 weeks	-
IV a	CCl ₄ i.p. inj.	×1		2 weeks	±
IV b	CCl ₄ i.p. inj.		×3	4 weeks	-

* Other four markers(HBs-Ag, HBs-Ab, HBe-Ag, HBe-Ab) were negative

그 세포질에 꼭 차여 있다. 다음은 圓形의 鹽基性單核細胞들인데, 이것은 骨髓組織에 가장 많이 位置하고 있고, 少數가 免疫反應이 있는(HBV 注射群들) rats의 脾, 淋巴節에 出現하고 있다. 正常群에서는 두 群中 한 群에서는 거의 나타나지 않았고 他 한 群에서는 약간 出現하고 있었다. HBV 注射한 群을 正常과 比較할 때, 더 많은 이와같은 單核細胞가 나타나고 있었다. 간절제와 CCl₄ 投與群도 이들 細胞의 出現이 미약하게 나타났다(Table 2). Orcein 染色으로는 이들 과립들은 陽性으로 염색이 되고, 때로는 큰 單核細胞가 그 細胞質이 아주 풍부하고 Orcein에 弱하게 染色되고 있었다. 이런 單核細胞는 간혹 가다가 氣管枝의 淋巴組織이나 消化管壁의 淋巴組織의 follicle內에 한箇 出現할 때가 있다. 이들은 macrophage나 組織鹽基性 單核細胞로서 rat의 免疫機轉에 寄與하는 것으로 생각한다. 血清內 HBV marker 檢査는 HBV 注射 後 2週以內의 모든 實驗群에서 HBc 抗體가 陽性으로 나타났는데 간절제와 CCl₄ 群에서는 特別히 弱하게 나타났다(Table 3). 이것은 이와같은 損傷이 抗體生産에 阻害를 가져오는 것으로 해석이 된다. 4週에 檢査한 모든 群에서는 아무런 marker도 나오지 않았다. 卽 rat에 있어서는 HBV에 對해서 感受性이 弱한 同時에 體內서의 處理가 早速한 時日內로 되는 것 같다. 또 core antibody를 쉽게 生産하고, 쉽게 소실한다고 보겠다. 卽 HBV는 rat에서 적당한 숙주를 發見하지 못하고, 마치 사람에게 감기의 바이러스가 왔다가 지나가는 것과 같이 短時日內로 感染되고 抗體도 오래 계속 維持 못한다. 사람에게 있어 임상의 간염 B가 나타나기까지 잠복기가 긴

것은 아마도 HBV 感染後에 오는 면역기전이 發達하기 까지 平均 100日이라는 長時日이 要한다. 卽 B型 肝炎이 초래되려면 他 자가면역병(autoimmune disease)과 마찬가지로 두 段階를 거치는 것 같다. 初期의 感染으로 오는 淋巴組織의 反應, 그리고 T-lymphocyte가 抗體의 도움을 받아 antibody-dependent cellular cytotoxicity(항체 의존성 세포독성)를 自身の 肝細胞에 對해서 發揮하여 臨牀的인 肝炎이 發展되게 된다¹⁰⁾. 本實驗에서는 初期의 淋巴組織서의 變化로서 HBV 感染은 4週 以內로 解決을 다보고 끝나는 것 같다. 이것은 마치 연쇄상 구균의 인후감염(throat infection)이 治癒되고, 나중에 autoimmune disease(자가면역성 질환)인 glomerulonephritis(사구체 신염)를 招來할 수 있는 課程으로 갈 수 있는데, 大多數의 患者는 이 2次的인 疾病까지 가지 않는다. 本實驗에 있어서도 後者の 경우와 동일하게, 2次的인 疾患이라고 할 비루스 肝炎까지 病進行을 하지 않는 것으로 생각한다.

結 論

正常 白鼠에다 HBV 感染을 일으켜 그 組織學的 所見과 血清의 HBV marker 檢査를 實施하였다. 또 hepatectomy(간절제), CCl₄ 投與로 肝을 損傷케 하여 肝細胞의 再生과 HBV 感染과의 關係도 추적하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) H&E 染色으로나 Orcein 染色으로 特記할 變化는 肝細胞에서 觀察되지 않았음. 卽 HBV는 白鼠의 肝細胞에 感染을 초래하지 않는다고 생각됨.

2) 白鼠의 淋巴組織에 鹽基性 單核細胞가 HBV 感染後에 增加되는 경향이 있는 것을 보았으며, 이것은 血清中에 HBc 항체가 陽性으로 나타나는 것과 對照해서 볼 때 이들 細胞는 白鼠의 免疫機轉의 正常的인 effector cell로 認定됨. 肝損傷을 준 두 群에서는 上記單核細胞의 出現이 미약하였음.

3) HBc 항체는 HBV 注射後 5日, 1週日, 2週日에서 陽性으로 나왔고, 4週의 모든 群에서는 陰性이었음. 肝을 損傷시킨 두 群(간절제, CCl₄投與)에서는 2週日 檢査에 弱陽性으로 나왔음. 이것은 鹽基性 單核細胞의 弱한 出現과 좋은 對照가 됨.

4) HBV 는 白鼠의 淋巴組織에 初期에 單核細胞의 약간의 增殖反應을 보여주나, 感染은 여기서 끝나는 것으로 보임. 나중에 antibody-dependent cellular cytotoxicity(항체 의존성 세포독성)를 發揮하여 T-淋巴球가 肝細胞를 파괴하여 臨牀的인 肝炎을 일으키는 段階에는 가지 않는 것으로 思料됨.

Acknowledgement

本實驗에 있어서 많은 助言을 아끼지 않으시고, 特別 Orcein 特殊染色을 實施하는데 도와주신 國立釜山大學校 醫科大學 臨牀病理學 教室 金順鎬教授任에게 感謝를 드립니다.

(本論文의 要旨는 1985年度 病理學會 春季學術大會에서 發表할 豫定임)

REFERENCES

- 1) 차상복, 정완국 : 한국에 있어서의 비활동성 만성 간염의 자연병력. 가톨릭大學醫學部論文集 33(4): 785, 1980
- 2) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V: *Pathologic Basis of Disease. 3rd Edition. Philadelphia, WB Saunders, 1984, p.900*
- 3) Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS: *Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis B virus. A Prospective Study of 22,707 Men in Taiwan. Lancet Nov. 21, 1981, p.1129*
- 4) 김금룡 : 서울 및 경기도지역 주민에서의 B형 간염항원에 대한 조사보고(제1보). 가톨릭大學醫學部論文集 34(3):411, 1981
- 5) 안윤옥외 : 韓國人獻血者에서의 肝炎 B 表面抗原發顯樣態에 관한 疫學的研究. 대한의학협회지, 26

(5):425, 1983

- 6) 長谷川茂 : B型肝炎ウイルスに對する最近の日本の狀況. 特別講演, 1984年 5月, 釜山 성분도病院.
- 7) Kissane JM: *Anderson's Pathology, 8th Edition, CV Mosby, St. Louis, 1985, p.1114*
- 8) Frommel D, et al: *Immunologic Aspects of Woodchuck Hepatitis. Am J Path 115:125, 1984*
- 9) Tabor E, Frösner G, Deinhardt F, et al: *Hepatitis Be Antigen and Antibody: Detection by Radioimmunoassay in Chimpanzees during experimental hepatitis B. J Me Virol 6:91, 1980*
- 10) Wands JR, Carlson RI, Schoemaker H, Isselbacher KJ, Zurawski VR, Jr.: *Immunodiagnosis of hepatitis B with high-affinity IgM monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Scien 78: 1214, 1981*
- 11) 최하진 : B型 肝炎 特別講義, 부산백병원 1984年
- 12) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V: *Pathologic Basis of Disease. 3rd Edition. Philadelphia, WB Saunders, 1984, p903*
- 13) Higgins GM, Anderson RM: *Experimental Pathology of the Liver. 1. Restoration of the Liver of the White Rat following Partial Surgical Removal. Arch Path 12:186, 1931*
- 14) Higgins PJ, et al: *Multiparameter Flow Cytometric Analysis of Hepatic Nuclear RNA and DNA of Normal and Hepatotoxin-treated Mice. Am J Path 115:31, 1984*
- 15) 주종은, 이종무 : 간질환의 생검표본에서의 Orcein 염색소견과 혈청간염 B 표면 항원검사소견과의 비교. 가톨릭大學醫學部論文集 35(3):501, 1982
- 16) 김순호 : Immunoperoxidase 염색에 의한 간조직의 HBsAg에 관한 연구. 부산의대잡지 19(2):17, 1979
- 17) Chun ML, Gerber MA, Thung SN, Thornton JC, Chung WK: *Morphometric Study of Hepatocytes Containing Hepatitis B Surface Antigen. Am J Path 114:217, 1984*
- 18) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V: *Pathologic Basis of Disease. 3rd Edition. Philadelphia, WB Saunders, 1984, p.907*

=Abstract=

Study on the Natural History of Hepatitis B Virus-infected Rats, and its Relationship with Chemical and Physical Injury of the Liver

Dongsoo Suk, M.D.

Department of Pathology, Inje Medical College

Normal, hepatectomied(partial) or CCl₄ injected rats are infected intraperitoneally with human HBV-infected serum, and histopathological examination of major organs, and serologically HBV markers are checked. In the latter groups, the relationship between the regenerating hepatocytes and their infectivity toward HBV are investigated.

1) There are no specific histological changes in the liver which might suggest HBV infection of hepatocytes.

2) There is a tendency to increase basophilic

mononuclear cells in the lymphoid organs. At the same time, HBcAb are positive in the rats' serum suggesting that these cells are immunologically oriented effector cells in the defense system. In the groups which received hepatic injury, the number of these cells are decreased.

3) HBcAb are positive in the groups of 5 th day, 1 week, and 2 weeks' post-HBV injection. All groups with hepatic injury show trace in the 2 weeks post-HBV injection which corresponds to the concomitant decreased number of basophilic mononuclear cells in the lymphoid organs.

4) Above findings suggest that HBV will promote a proliferative reaction of the mononuclear cells in the lymphoid organs in the early stage of HBV infection. It appears that the infection stops there, and there would be no activation of the mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity followed by injury of hepatocytes due to the attack of T-lymphocytes manifesting the clinical hepatitis.

Legends for Figures

- Fig. 1. Spleen, II d-2, H & E Staining, $\times 200$. Increased number of large mononuclear cells around the lymph follicle forming a slight halo.
- Fig. 2. Spleen, II d-2, H & E Staining, $\times 400$. Higher magnification of the above showing individual cells with abundant clear cytoplasm(right lower 2/3 area).
- Fig. 3. Spleen, II b-2, Orcein staining, $\times 400$. Large mononuclear cells with faintly positive granules in the cytoplasm located around the lymph follicle (arrow).
- Fig. 4. Lymph node, Nb-1, Orcein staining, $\times 400$. Large mononuclear cells with Orcein-positive granules in the cytoplasm.
- Fig. 5. Bone Marrow, H & E staining, $\times 400$. Many basophilic mononuclear cells scattered.
- Fig. 6. Thymus, Orcein staining, $\times 200$. Many large mononuclear cells with Orcein-positive granules in the cytoplasm located in the fibrotic trabecles.

