

만성 B형 간염에서 간세포내 HBcAg에 대한 면역 조직 화학적 연구

전주 예수 병원 해부 병리과

이 혜 경

전북대학교 의과대학 병리학 교실

김 상 호

서 론

만성 B형 간염에서 간세포가 파괴되는 정확한 기전이 아직 정립되어 있지 않지만 병의 진행 상태와 바이러스의 증식상태가 서로 연관되어 있음이 알려져 있다¹⁾. 과거에 바이러스의 증식상태는 혈청내 HBeAg의 양성으로 표현되어 혈청내 HBeAg이 anti-HBe로 이행되면서 병의 진행상태도 역시 호전된다고 하여 이러한 결과는 바이러스가 증식할때 hepatitis B virus(이하 HBV라 함)가 직접적으로 간세포내 영향을 주어 괴사를 일으킨다는 가정을 가능케 했다²⁻⁶⁾. 그러나 증상을 나타내지 않는 HBV 보균자가 혈청내 HBeAg 양성을 나타내기도 하고 만성 활동성 간염 환자가 혈청내 anti-HBe을 나타내는 경우가 보고되면서 예후 판정에 있어서 혈청내 HBeAg/anti-HBe의 의미에 간조직내 HBcAg의 분포와 HBV DNA의 상관 관계에 대한 연구가 첨가되었다⁷⁻⁹⁾.

간조직 내 HBcAg의 분포는 바이러스에 대한 숙주의 면역반응으로 조직학적 소견, 병변의 진행 정도에 따라 다르게 나타나며(즉 미만성, 국소적, HBcAg-free HBsAg type), 주로 핵 내에만 발현되는 것으로 알려졌던 HBcAg이 간세포의 세포질 내에도 존재함이 밝혀지면서 HBV의 생성 과정에 따라 HBcAg의 발현 부위가 다른 것으로 생각되고 있다¹⁰⁻¹⁴⁾.

저자들은 1988년 5월부터 1989년 3월까지 전주 예수 병원에서 채취된 일련의 간 생검 조직중 혈청내 HBsAg

양성인 환자 40예를 대상으로 HBcAg의 항체(Bio-Genex-Laboratories)을 사용하여 indirect immunoperoxidase 법으로 간조직내 HBcAg을 발현시켜 그 분포양상을 검색하고 이 결과를 간질환의 유형 및 혈청내 HBeAg/anti-HBe 상태와 비교 분석하여 그 의의를 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

1988년 5월부터 1989년 3월까지 전주 예수 병원에서 만성 B형 간염의 의진하에 간생검을 실시한 환자중 혈청에서 HBsAg이 양성으로 검출된 40예를 대상으로 하였다. 남자가 30예, 여자가 10예로 평균 나이는 27세였다. 만성 간염의 조직 소견에 따른 분류는 standard criteria에 준하였으며 만성 분엽성 간염은 만성 지속성 간염의 소견과 다양한 정도의 점상 괴사가 동반되어 있는 경우로 하였다¹⁵⁻¹⁷⁾. 이에 따라 만성 활동성 간염 31예(77.7%), 만성 지속성 간염 2예(5%), 만성 분엽성 간염 2예(5%), 비특이적 변화를 보인 5예(12.3%)로 구성 되었다. 혈청학적 검사상 26명은 HBeAg에, 12명은 anti-HBe에 양성이었으며, 2명은 HBeAg과 anti-HBe에 음성이었다. 생검한 간조직은 10% 중성 포르말린에 고정하여 파라핀 포매를 거친 후 형태학적 검사를 위해 hematoxylin-eosin, periodic acid-schiff, Masson's trichrome, reticulin 염색 후 검경하였다.

간조직 내 HBcAg에 대한 Immunoperoxidase 염색을 위해 1차 항혈청으로 rabbit antisera을, 2차 항혈청으로 Biotinylated goat antirabbit IgG를 사용한 immunoperoxidase을 이용하였으며, 3%과산화수소 용액이 섞인 용액에 담구어 5~10분간 실온에 두어 내인

*본 논문은 제14차 대한 병리학회 춘계학술대회에서 포스터 전시 되었음.

성 peroxidase와의 반응을 차단하였다. 그 후 1차 항혈청을 조직 절편위에 도포하여 실온에서 20분간 부란하고 phosphate buffered solution (이하 PBS라 함)으로 수세한 후 2차 항혈청에서 20분간 부란하고 PBS로 수세하였다. 그리고 peroxidase-labelled avidin으로 반응시킨 후 발색용 수매질 용액으로 hydrogen-peroxide, AEC (3-amino-9-ethylcarbaza), acetate buffer의 혼합 용액을 사용하여 발색하고 deionized water에 씻은 후 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색을 하여 광학 현미경하에 검경하였다. 양성 대조는 본 실험을 통해 양성 반응이 저명 하였던 간조직을 이용하였고 음성 대조는 1차 항원으로 PBS를 사용하였다.

HBcAg은 발현 부위에 따라 핵에 국한된 경우, 세포질에 국한된 경우, 핵과 세포질에 공존한 경우로 구분하였으며, 발현 정도는 아래의 기준에 따라 -, +, ++, +++로 판정하였다. 즉 양성 반응을 보인 세포가 없을 때 '-'로, 세포 한 두 개가 산발적으로 양성 반응을 보이는 경우는 '+'로, 몇 개의 세포들이 모여 집단적인 양성 반응을 보일 때 '++'로, 그리고 세포의 반수 이상이 양성 반응을 보일 때 '+++로 판정하였다.

결 과

1. 간조직내 HBcAg의 발현 양상

HBcAg은 32예 (80%)에서 간세포의 핵과 세포질 내

에 갈색으로 염색되었는데, 핵에만 국한된 경우는 2예 뿐으로 부분적으로 그리고 드물게 존재하였으며 (Fig. 1), 나머지 30예는 핵과 세포질에 동시에 관찰되었으며 이는 비교적 미만성으로 분포하고 있었다 (Fig. 2). 간 실질내의 HBcAg의 분포는 다양하였으며, 강하게 양성으로 염색된 부분과 전혀 염색이 되지 않은 음성인 부분, 그리고 산발적으로 양성으로 염색된 부분이 공존하는 양상이었으며 이러한 염색상은 간문맥, 중심정맥 구조와 연관성을 찾기 어려웠다. HBcAg이 핵 내에서 과립양으로 양성을 보인 경우는 hematoxylin-eosin 염색상에서 'sanded nuclei'을 보였으며 세포질내에서 양성을 보인 경우는 hematoxylin-eosin 염색에서 특이한 소견을 볼 수 없었다.

2. 혈청 및 조직내의 HBV 표지자와 간 질환과의 관계

각 질환에 따른 혈청 내 HBeAg/anti-HBe의 결과와 간 조직내 HBcAg의 발현양상의 연관성은 Table 1과 같다. 간 조직에서 HBcAg이 양성인 32예 중 26예 (81%)가 혈청내 HBeAg 양성이었고 6예 (19%)가 혈청내 anti-HBe 양성이었으며 간 조직에서 HBcAg이 음성인 8예는 모두 혈청내 anti-HBe 양성이었다. 그리고 혈청내 HBeAg이 양성인 26예 모두 간 조직내 HBcAg 양성이었으며, 혈청내 anti-HBe에 양성인 11예중 6예 (55%)가 간 조직내 HBeAg 음성이었다. 혈청내

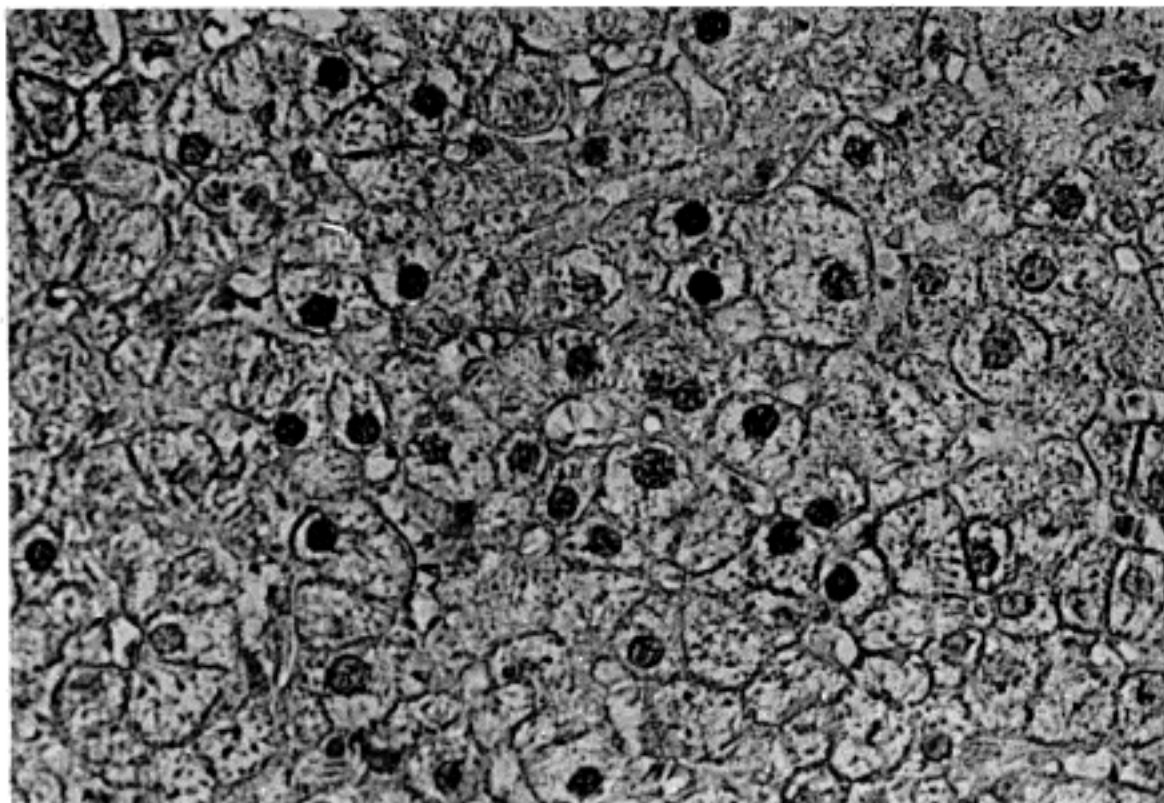


Fig. 1. Generalized nuclear HBcAg expression in a 28-year-old asymptomatic HBeAg-positive HBsAg carrier with nonspecific reactive hepatitis. PAP stain for HBcAg (x400).

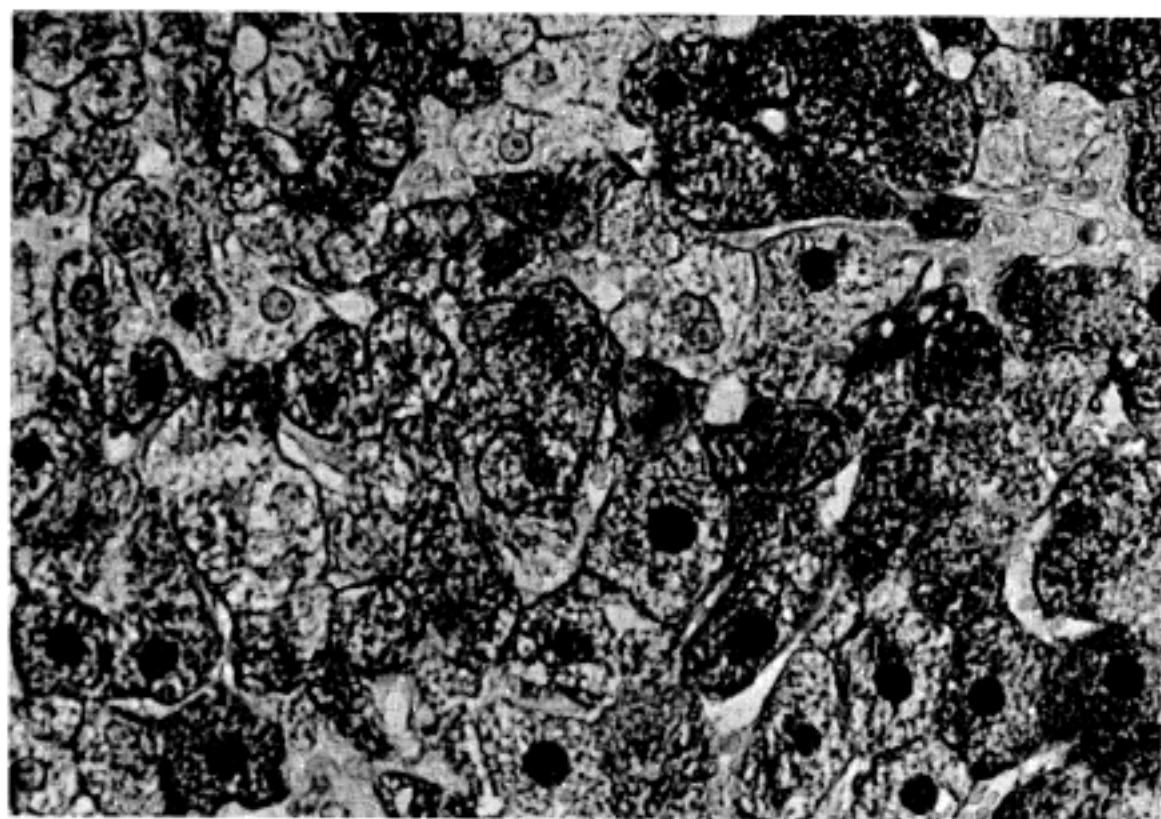


Fig. 2. Predominantly cytoplasmic HBcAg expression mixed with some nuclear HBcAg-positive cells in a 33-year-old HBeAg-positive HBsAg carrier with chronic active hepatitis. PAP stain for HBcAg (x400).

Table 1. Histological diagnosis and correlation between serum HBeAg/anti-HBe status in relation of liver HBcAg

| Diagnosis | HBcAg in liver | Total No of cases | No. of subjects | | |
|--------------------------------|----------------|-------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | | | HBeAg in serum (+) | Anti-HBe in serum (+) | HBeAg/anti-HBe in serum (-) |
| Chronic active hepatitis | positive | 26 | 21 | 3 | 2 |
| | negative | 5 | | 5 | |
| Chronic persistent hepatitis | positive | 2 | 2 | | |
| | negative | 0 | | | |
| Chronic lobular hepatitis | positive | 0 | | | |
| | negative | 2 | | 2 | |
| Nonspecific reactive hepatitis | positive | 4 | 4 | | |
| | negative | 1 | | 1 | |
| Total | | 40 | 27 | 11 | 2 |

HBeAg/anti-HBe 양자에 음성이었던 환자는 2명으로 모두 조직내 HBcAg에 양성을 보이는 만성 활동성 간염 환자였다.

고찰

본 연구에서와 같이 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 간조직을 이용한 HBcAg의 검색에 진단에 결정적 역할을 하지는 않지만, 만성 B형 간염이 바이러스에 대

한 면역 반응에 의한 것이며 바이러스의 증식 상태와의 관련성이 시사됨에 따라 병의 진행에 대한 이해와 치료를 위해 필요하다고 생각된다¹⁸⁾.

본 연구에서 조직내 HBcAg의 염색상은 비교적 연하게 염색되는 HBsAg의 염색과는 다르게 진한 갈색으로 염색되어 주변의 염색이 안된 부분과 분명한 대조를 이루었으며 핵에만 국한된 경우, 세포질에만 국한된 경우, 그리고 핵과 세포질에서 동시에 나타나는 경우와 같이 다양한 염색상을 보였는데 핵에서만 검색되는 경우는 부

분적으로 그리고 드물게 나타났으며, hematoxylin-eosin 염색상에서 비특이적 반응성 간염의 소견으로 염증의 정도는 미약하였다. 이에 반해 세포질에 국한되었거나 핵과 세포질에서 동시에 나타나는 경우는 간실질에 미만성으로 분포하고 있었으며, hematoxylin-eosin 염색상에서 진행성의 심한 염증소견을 보였다. 또한 검색되는 양상은 간문맥 중심 정맥과 관련이 없었다.

이러한 결과는 Gudat¹¹⁾가 언급하였던 HBcAg이 간문맥, 중심정맥을 중심으로 핵에만 존재한다는 결과와는 다른 것으로 Hsu등¹³⁾이 병변의 진행과정과 면역 반응상태에 따라 핵과 세포질에서 발견되는 HBcAg의 양상을 구분한 이후로 연구 진행 중이다. 저자들은 본 연구에서 나타난 간조직내 HBcAg의 발현 양상이 HBV의 생성 과정과 관련이 있다고 생각하였다. 즉 처음 간세포의 세포질내에서 HBcAg이 nonparticulate 형태로 생성되어 핵막 공을 통해 핵으로 이동하여 particulate 형태의 HBcAg이 형성되기 때문에¹⁹⁾ 핵과 세포질 양쪽에 공히 HBcAg이 검색되는 것으로 이해하였다. 그러나 Hsu등이 언급하였던 발현 양상에 따른 면역 반응과 바이러스의 증식상태를 설명하기에는 한계가 있었다. 즉 조직내 HBcAg이 핵에 국한된 경우가 2예 뿐이었으며 30예는 다소의 정도 차는 있었지만 대개가 미만성으로 핵과 세포질에 동시에 염색이 되었고 바이러스의 증식 상태의 표지자로서 가장 정확하다고 알려져 있는 HBV DNA대신 혈청내 HBeAg을 사용했다는 점이다. 그러나 그 결과는 거의 동일하여 HBcAg이 핵 내에만 발현시에는 hematoxylin-eosin 염색상에서 미약한 염증 반응을 보이면서 혈청내 HBeAg 양성이고 세포질내에서 발현시에는 진행성 염증 반응을 보였다. 만성 B형 간염이 T-cell mediated 면역 반응으로 이해되는 관점에서 볼 때 전자의 경우를 immune tolerance 상태로 후자를 immune response 상태로 생각할 수 있으며 환자의 면역 반응을 대변 할 수 있는 표지자와 간조직내 HBcAg의 발현 양상과의 비교 연구가 필요하다고 생각되었다. 또한 바이러스의 증식 상태의 표지자로서 간조직내 HBcAg의 염색상과 혈청내 HBeAg/anti-HBe의 비교 결과는 높은 일치율이 있었는데 간 조직내 HBcAg 양성인 환자가 혈청내 HBeAg 양성인 경우는 81%, 간 조직내 HBcAg 음성인 환자가 혈청내 anti-HBe 양성인 경우는 100%, 혈청내 HBeAg 양성인 환자가 간조직내 HBcAg에 양성인 경우는 100%로 높은 비율이었다. 이

에 따라 간조직내 HBcAg과 혈청내 HBeAg/anti-HBe가 HBV의 증식과 밀접한 관계가 있을것으로 추론되며 in situ hybridization을 이용한 조직내 HBV-DNA의 연구로 보완될 수 있을 것으로 생각되었다.

결 론

저자들은 혈청내 HBsAg 양성인 40예의 간조직에서 HBcAg을 indirect immunoperoxidase법에 의해 검색하고 그 발현 양상을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 대부분의 HBcAg은 핵과 세포질에서 공히 양성으로 검색되었다(93%).
- 2) 핵의 HBcAg 발현 양상은 부분적으로 그리고 드물게 나타났으며 세포질에서의 발현 양상은 미만성으로 나타났다.
- 3) 핵에서만 양성 반응을 보인 예에서는 hematoxylin-eosin 염색상에서 미약한 염증 소견을 보였으며 세포질내에서 양성 반응을 보인 예에서는 진행성의 심한 염증소견을 보여 병변의 진행과정과 조직내 HBcAg의 발현 양상이 서로 관련있을 것으로 시사된다.
- 4) 간조직내 HBcAg과 혈청내 HBeAg/anti-HBe은 서로 밀접한 관계를 보여 이들이 HBV 증식이 표지자가 될수 있을 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

- 1) Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJF, et al: Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: Studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 5:431, 1985
- 2) Fay O, Tanno H, Roncoroni M, et al: Prognostic implications of the e antigen of hepatitis B virus. *JAMA* 238:2501, 1977
- 3) Realdi G, Alberti A, et al: Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 79:195, 1980
- 4) Hoofnagle JH, Dusheiko GM, et al: Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann Intern Med* 94:744, 1981
- 5) Liaw YF, Chu CM, et al: Clinical and histological events preceding hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* 84:216, 1983

- 6) Eleftheriu N, Thomas HC, et al: Incidence and clinical significance of e antigen and antibody in acute and chronic liver disease. *Lancet* 13:1171, 1975
- 7) Hadziyannis SJ, Lieberman HM, et al: Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis. *Hepatology* 3:656, 1983
- 8) Eddleston ALWF, Mondelli M, et al: Lymphocytic cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 3:122 S, 1982
- 9) Thomas HC, Montano L, et al: Immunological mechanisms in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2:116 S, 1982
- 10) Gudat F, Bianchi L, et al: Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. *Lab Invest* 32:1, 1975
- 11) Gowans EJ, Burrell CJ: Widespread presence of cytoplasmic HBcAg in hepatitis B infected liver detected by improved immunochemical methods. *J Clin Pathol* 38:393, 1985
- 12) Sansonno DE, Fiore G, et al: Cytoplasmic localization of hepatitis B core antigen in hepatitis B virus infected liver. *J Immunol Methods* 109:245, 1988
- 13) Hsu HC, Su LJ, Lai MY, et al: Biologic and Prognostic significance of hepatocyte hepatitis B core antigen expression in the natural course of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 5:45, 1987
- 14) 김상표, 김찬환, 이상숙, 정재홍: 간조직 내 B형 간염 표지자의 검색, 대한 병리 학회지 22:404, 1988
- 15) International Group. Morphological criteria in viral hepatitis: *Lancet* 2:914, 1977
- 16) Masween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ: Pathology of the liver. 1st edition. Churchill Livingstone 1979, p 248
- 17) De Groote J, Desmet VJ, Gedigk P, et al: A classification of chronic hepatitis. *Lancet* 2:626, 1968
- 18) Sangnelli E, Piccinino F, Manzillo G, et al: Effect of immunosuppressive therapy on HBsAg-positive

chronic active hepatitis in relation to presence or absence of HBeAg and anti-HBe. *Hepatology* 3:690, 1983

- 19) Macsween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ: Pathology of the liver. 2nd edition. Churchill Livingstone, 1987, p 311

= Abstract =

Biologic Significance of Hepatocyte Hepatitis B Core Antigen Expression in Chronic Hepatitis B Virus Infection

Hye Kung Lee, M.D.

Department of Pathology, Presbyterian Medical Center

Sang Ho Kim, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine
Jeonbuk National University, Jeonju

To elucidate the biologic significance of hepatocyte B core antigen (HBcAg) expression and its relation to the natural course of hepatitis B virus (HBV) infection, we tried to correlate the patterns of HBcAg with the HBV replication state and with disease activity in 40 needle biopsies performed on hepatitis B surface antigen (HBsAg) carriers aged from 15 to 46 years.

In 32 of 40 cases, HBcAg was present in the hepatocyte nucleus (nHBcAg), in the cytoplasm (cHBcAg) or in both (mixed). Pure nHBcAg was seen only in minimal hepatitis, but a diffuse pattern of expression of cytoplasmic HBcAg and mixed cytoplasmic and nuclear expression of HBcAg were seen in active hepatitis. There was also a good correlation between liver HBcAg and serum HBeAg. Cases in which HBcAg expression were observed were positive for serum HBeAg (81%) and the cases negative for HBcAg were all positive for serum anti-HBe.

Key Words: Hepatocyte HBcAg, nHBcAg, cHBcAg, serum HBeAg/anti-HBe