

만성 B형 간염에서 간세포내 HBcAg에 대한 연구 II

예수병원 병리과 및 내과*

이혜경 · 이광민 · 정동규 · 이용웅*

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

Hye Kyung Lee, M.D., Kwang Min Lee, M.D. and Dong Kyu Chung, M.D.

Department of Anatomic Pathology, Presbyterian Medical Center, Jeonju

Routine use of commercially available antisera against hepatitis B core antigen(HBcAg) has permitted a reevaluation of the histochemical distribution of the antigen in liver tissue. HBcAg, classically described almost exclusively in the nucleus, was found with a very high frequency in the cytoplasm of liver cells as well. To elucidate the biologic significance of HBcAg expression and its relation to the natural course of hepatitis B virus(HBV) infection, the patterns of activity in 33 needle liver biopsies of HBsAg carriers were analysed. A good correlation of liver HBcAg with disease activity was demonstrated. HBcAg was present in the hepatocyte nuclei(nHBcAg) or cytoplasm(cHBcAg), or in both(mixed). Pure nHBcAg was seen mainly in non-aggressive reactive liver tissue and cHBcAg was predominantly associated with chronic active hepatitis(95%). The results suggest that expression of HBcAg correlates with the liver pathology and the possibility of HBcAg to be an immunological target for T cell mediated hepatocyte damage. (Korean J Pathol 1992; 26: 355~359)

Key Words: Hepatitis B virus, nHBcAg, cHBcAg, Target for T cell

서론

만성 B형 간염의 병인에 대해서 아직 확실한 이론은 밝혀져 있지 않지만 바이러스의 증식상태와 그에 따르는 면역계의 반응에 의한다고 생각되고 있으며 이러한 상호작용에 의한 만성 B형 간염은 다음과 같은 경로를 거친다고 한다. ① 바이러스 복제가 왕성하고 혈청학적으로 높은 HBeAg과 HBV-DNA역가를 가지며 임상적으로 경미한 상태로 면역 내성 상태, ② 바이러스 복제가 감소하기 시작하는 면역 제거 상태, ③ 복제가 거의 없으며 혈청내 anti-HBe 양성이며 임상적으로나 조직학적으로 간염의 활성도가 거의 없는 상태 등이다^{1~3)}.

이러한 병의 진행과정은 바이러스의 증식상태와 관계되는 여러가지 표지자들, 즉; ① 혈청내 hepatitis B virus(이하 HBV라 함)의 표지자들(HBV-specific DNA polymerase, HBV-DNA, 전자현미경상 virion)^{4,5)}, ② 간 생검조직 표본상 HBcAg과 HBsAg의 발현 양상^{6~10)}, ③ 간 추출물에서 free 또는 integrated HBV-DNA, ④ 혈청내 HBeAg^{11~13)}과 함께 연구되어 왔으며 많은 경우에서 간조직소견상 염증의 활동성과 관계있음을 시사하였다¹⁴⁾.

최근 HBV의 precore 단백질이 바이러스의 증식상태와 예후판정에 중요한 역할을 함이 알려짐과 함께 면역 조직 화학적 검색상 간세포내 HBcAg의 발현 양상의 변화가 주목되고 있다.

이에 저자들은 면역조직화학적 방법에 의한 간세포내 HBcAg의 발현 양상과 바이러스의 증식상태의 표지자인 혈청내 HBeAg 그리고 간조직내 변화와의 상관 관계를 분석하고자 하였다.

접 수: 1992년 1월 15일, 게재승인: 1992년 3월 21일
주 소: 전북 전주시 중화산동 1가 300번지, 우편번호 560-750
전주 예수 병원 해부 병리과, 이혜경

연구 재료 및 방법

연구재료로는 전주 예수병원에서 생검된 간조직중 환자의 혈청이 HBsAg 양성이었다 환자 33예를 대상으로 하였으며 혈청 내 HBeAg/anti-HBe 상태와 조직소견상 염증의 정도를 간조직내 HBcAg와의 발현 양상과 비교하였다.

1. 병리조직학적 검색

일반적인 조직소견을 위하여 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 실시하였고, 조직화학적 상상을 알기 위하여 Masson's trichrome, reticulin, periodic acid-Schiff 및 orcein 염색을 실시하여 감성하였다.

2. 조직내 HBcAg에 대한 면역세포화학적 검색

포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 블록을 연속 절편하여 HBcAg에 대한 면역세포화학적 검색을 시행하였으며, 생검조직의 적합성은 간조직내 세개 이상의 문맥이 관찰될수 있을 때로 정하였다. 면역세포화학적 검색은 상용화된 peroxidase-antiperoxidase(PAP)Kit (Histogen kit, Biogenex Co)를 이용하였다. 염색의 양성 대조로는 kit에 포함되어 있는 양성대조 슬라이드를 사용하였고 음성 대조로는 1차 항체대신 phosphated 완충용액을 사용하였다. HBcAg은 핵과 세포질에서 갈색으로 염색된 세포들을 관찰하였으며 발현정도에 따라 -, +, ++, +++로 판정하였다. 즉 양성반응을 보인 세포가 없을 때 '-'로, 세포 한 두개가 산발적으로 양성반응을 보이는

경우는 '+'로 몇개의 세포들이 모여 집단적인 양성반응을 보일 때 '-+'로 그리고 세포의 반수 이상이 양성반응을 보일 때 '+++'로 판정하였다.

결 과

검사 대상이었던 총 33예를 병리 조직학적으로 구분하던 비특이적 반응성 간조직의 소견을 보인 예가 5예, 만성 지속성 간염이 7예, 만성 일성 간염이 1예, 만성 활동성 간염이 8예 그리고 기교상 괴사들 동반한 만성 활동성 간염이 12예였다.

1. 병리학적 진단에 따른 조직내 HBcAg의 발현 양상

조직내 core antigen이 발현된 것은 모두 31예(94%)였고 그 중 5예(16%)가 핵내에만, 그리고 11예(36%)가 세포질에서만 발현되었으며, 핵과 세포질에서 공히 발현된 경우가 15예(48%)였다. 병리학적 진단에 따른 세포내 HBcAg발현 양상의 차이로는 핵내에서만 발현된 5예 중 3예가 비특이적 조직의 소견을 보였으며(Fig. 1) 세포질 내에서만 발현된 경우 중 5예는 기교상 괴사들 동반한 만성 활동성 간염의 소견을 보였다(Fig. 2). 또한 문맥의 확장과 함께 조각 괴사들 보이는 만성 활동성 간염 이상의 병변을 보이는 20예 중 19예가 다양한 정도의 세포질내 양성의 소견을 보였다(Table 1).

2. 혈청 HBeAg/anti-HBe 상태와 병리학적 소견과의 상관관계

병리학적 진단과 혈청 내 HBeAg/anti-HBe상태

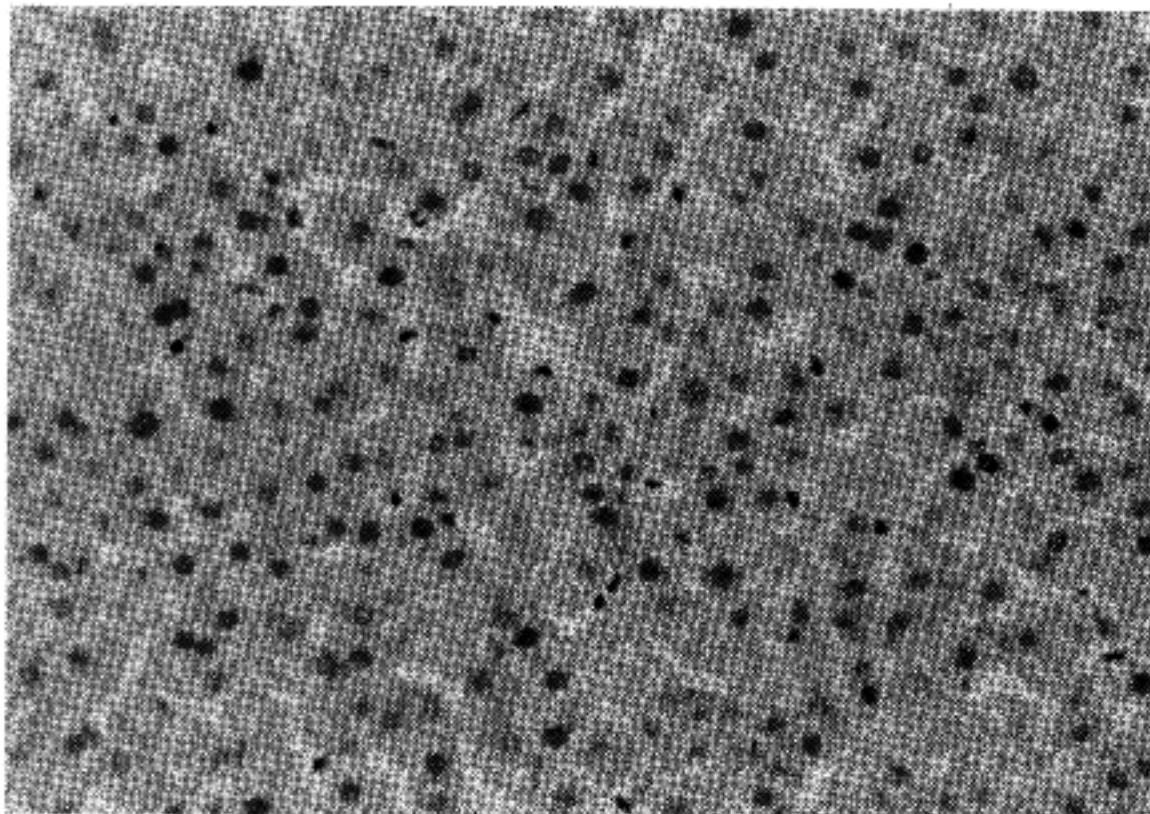


Fig. 1. Generalized nuclear HBcAg type in HBsAg carrier with nonspecific reactive hepatitis. PAP stain for HBcAg

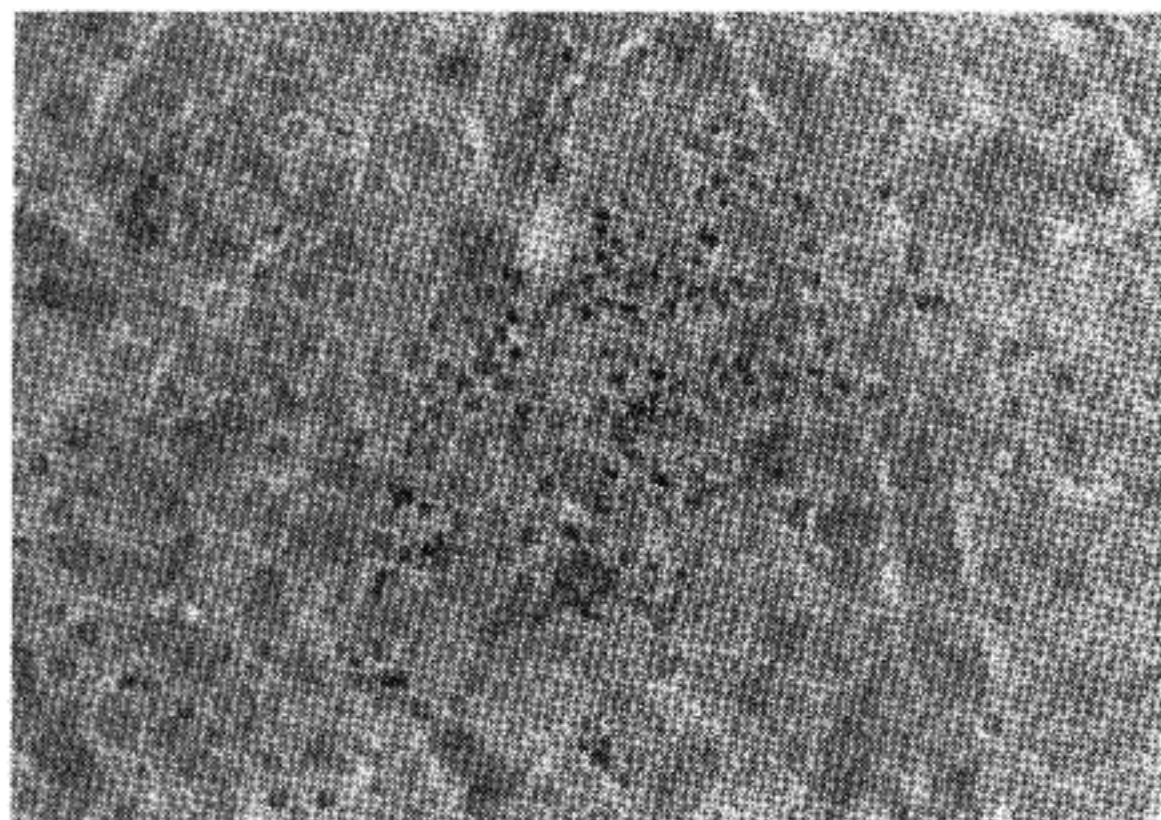


Fig. 2. Predominantly cytoplasmic HBcAg expression in HBsAg carrier with chronic active hepatitis. PAP stain for HBcAg

Table 1. Tissue expression pattern of HBcAg according to pathological diagnosis, serum HBeAg/anti-HBe status

Pathological diagnosis	Total No. of cases	Tissue HBcAg expression			No. of subjects		
		nHBcAg	cHBcAg	mixed	HBeAg in serum(-)	Anti-HBe in serum(-)	HBcAg/anti-HBe in serum(-)
NSRL	5	3		1	4	1	
CPH	7	1	3	3	5	1	
CLH	1			1			1
CAH	8	1	3	4	3	1	
CAH, BN	12		5	6	4	2	4

NSRL: Nonspecific reactive liver.
 CPH: Chronic persistent hepatitis.
 CAH, BN: Chronic active hepatitis with bridging necrosis.
 CAH: Chronic active hepatitis.
 CLH: Chronic lobular hepatitis.
 nHBcAg: nuclear HBcAg.
 cHBcAg: cytoplasmic HBcAg.

사이에는 유의 있는 차이가 없었으며 혈청내 HBeAg/anti-HBe상태와 조직내 HBcAg의 발현 양상에도 연관성이 적었다.

고 찰

만성 HBV감염이 임상적으로 바이러스의 증식상태와 면역기전에 따라 크게 세과정을 거치며 각 과정에

서서 HBcAg의 부포가 다르다고 하여 면역 내성상태에서는 HBcAg이 주로 핵내에서 발현되며 면역 제거 상태에서는 핵내의 발현정도가 감소되면서 세포질내 발현정도가 증가된다고 하였다^{1,2}. 이외 같이 만성 HBV감염시 간세포내 HBcAg의 발현 양상이 달라 나타나는 기전은 아직 불투명하며 연구 진행중이다.

HBV의 core 단백질은 두개의 in-phase initiation codons을 가지는데 core 단백질은 second ini-

tiation codon에서, precore단백질은 first initiation codon에서 해독된다⁴⁾. Precore 단백질은 core 단백질의 전체 아미노산 배열 뿐 아니라 29개의 아미노산 배열로 구성된 precore region을 가지는데 그의 처음 19개의 아미노산 배열의 신호를 통해 precore 단백질은 골지체를 거치면서 arginine-rich carboxyterminal부분의 가수분해과정을 거쳐 혈청내에서 HBeAg으로 불리는 이중의 P22 구조를 분비하게 된다. 이러한 과정 중 precore단백질의 20번에서 29번까지의 아미노산의 영향에 의해 일부의 precore단백질이 소포체를 거쳐 세포질로 그리고 핵으로 이동하게 되며 precore단백질의 이동 경유에 따라 핵과 세포질내에서 면역 조직 화학적 검색상 HBcAg의 발현 양상이 다를 수 있다고 하였다^{4,15)}.

이와 같이 혈청 내 HBeAg분비와 core단백질의 간세포내의 발현 상태는 서로 밀접한 관계를 가지며 둘다 precore region의 영향을 받는다고 하였으며 precore region의 아미노산배열의 분석 결과 자연적으로 또는 인터페론 후 anti-HBe의 생성과 함께 임상적으로 간염 회복을 보인 환자에서 HBV DNA의 precore region의 83 뉴클레오티드에서 guanine에서 adenine으로의 돌연변이를 밝혔으며 이러한 변화들이 HBeAg의 생성과 분비를 불가능하게 한다고 일부 저자들은 말하였다¹⁶⁾.

Chu등¹⁾은 바이러스의 증식능에 따른 만성 B형 간염의 임상 경과에서 core항원의 면역조직 화학적 방법에 따른 발현 양상의 차이를 언급하였는데 저자들이 관찰한 소견에 의하면 대체로 핵 내에만 갈색으로 양성의 소견을 보이는 환자는 거의 정상에 가까운 비특이적 반응 상태의 조직학적 소견을 보였으며, 세포질내 양성반응을 보인 환자들은 활동성의 염증 반응을 보였다. 이러한 소견은 바이러스의 증식 상태에 따라 세포질내 core항원의 발현 양상이 다르며 이러한 core항원이 세포독성 T-림파구를 활성화시켜 염증 반응을 유발시킨다는 가정¹⁷⁾과 가까운 소견으로 생각하였으며, Chu등¹⁷⁾과 이동⁹⁾의 결과와 같은 결과로 간세포 괴사의 정확한 기전은 아직 알려져 있지 않지만 세포독성 T-림파구, 주 조직 적합성 항원 물질 Class I antigen(HLA class I) 그리고 바이러스 항원이 같이 관련되어 있음을 시사하는 소견으로 생각된다¹⁸⁻²⁰⁾.

그러나 core항원에 대한 면역 조직 화학적 검색의 결과와 바이러스의 증식능의 표지자로 알려져 있는 혈청내 HBeAg와는 어떤 관련성을 찾기 어려웠으며 이는 언급한 바와 같이 core 단백질의 가수분해 과정을 거쳐 HBeAg이 혈청 내 출현하게 되는 이론적 근거에서 서로 공존하지 않음을 이해하기 어려웠으나 병의 진행과정상 시간의 차이에 의한 것으로 추측하였다.

이러한 소견들이 환자의 예후 판정에 어느정도의 중요성으로 인정될 것인가에 대해서는 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 생각되었으며 특히 후향성의 추적

검사와 더불어 환자의 면역 상태에 대한 주기적인 검사가 필요하다고 생각되었다.

결 론

혈청 내 HBsAg보유자 33예를 대상으로 병리학적 진단(비특이적 반응성 조직변화 5예, 만성 지속성 간염 7예, 만성 염성 간염 1예, 만성 활동성 간염 8예, 가교상 괴사를 동반한 만성 활동성 간염 12예), 혈청내 HBeAg/anti-HBe 상태, HBcAg의 면역조직화학적 발현 양상을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 총 33예 중 면역 조직화학적 검색상 HBcAg에 발현된 예는 31예로 91%였다.
- 2) HBcAg의 발현 양상은 핵에만 발현된 경우(16%), 세포질내에만 발현된 경우(36%) 핵과 세포질내 공히 발현된 경우(48%)가 있었다.
- 3) 병리 조직학적으로 문맥의 확장과 함께 조각괴사를 동반한 만성 활동성 간염이상의 소견일 때 95%가 다양한 정도의 세포질 내 양성의 소견을 보였다.
- 4) HBcAg의 발현 양상과 혈청 내 HBeAg/anti-HBe와는 상관관계가 적었다. 본 연구 결과 HBcAg의 발현 양상은 병리학적 진단과 관련이 깊다고 생각하였다.

참 고 문 헌

- 1) Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJF, Monjardio J, Liaw YF, Thomas HC. *Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: Studies of hepatitis B virus DNA in serum. Hepatology* 1985; 5: 431-4.
- 2) Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. *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 B virus. Hepatology* 1983; 3: 656-62.
- 3) Gudat F, Bianchi L, Sonnabend W, Thiel G, Aenishaenslin W, Stalder GA. *Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. Lab Invest* 1975; 32: 1-9.
- 4) Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. *Compact organization of the hepatitis B virus genome. Hepatology* 1989; 9: 322-7.
- 5) Burrell CJ, Gowans EJ, Rowland R, Hall P, Jilbert AR, Marmion BP. *Correlation between liver histology and markers of hepatitis B virus replication in infected patients: A study by In Situ hybridization. Hepatology* 1984; 4: 20-4.
- 6) Gowans EJ, Burrell CJ. *Widespread presence of cy-*

- cytoplasmic HBcAg in hepatitis B infected liver detected by improved immunochemical methods. J Clin Pathol* 1985; 38: 393-8.
- 7) Hsu HS, Su IJ, Lai MY, Chen DS, Chang MH, Chuang SM, Sung JL. *Biologic and prognostic significance of hepatocyte hepatitis B core antigen expression in the natural course of chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol* 1987; 5: 45-50.
 - 8) Sansonno DE, Fiore G, Bufano G, Manghisi OG. *Cytoplasmic localization of hepatitis B core antigen in hepatitis B virus infected livers. J Immunol Methods* 1988; 109: 245-52.
 - 9) 이혜경, 김상호, 만성 B형 간염에서 간세포내 HBcAg에 대한 면역 조직 화학적 연구. *대한병리학회지* 1989; 23: 287-91.
 - 10) 안희정, 김경호, 박영년, 김호근, 박찬일. 비활성 혈청 HBsAg보유자의 간조직내 HBcAg 및 HBsAg 발현양상. *대한병리학회지* 1990; 24: 120-7.
 - 11) Realdi G, Alberti A, Rugge M, Bortolotti F, Rigoli AM, Tremolada F, Ruol A. *Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection. Gastroenterology* 1980; 79: 195-9.
 - 12) Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Seeff LB, Anthony Jones E, Waggoner JG, Buskell Bales Z. *Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. Ann Intern Medicine* 1981; 94: 744-8.
 - 13) Liaw YF, Chu CM, Su IJ, Huang MJ, Lin DY, Chien CS. *Clinical and histological events preceding hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. Gastroenterology* 1983; 84: 216-9.
 - 14) 김상표, 김찬환, 이상숙, 정재홍. 간조직 내 B형 간염 표지자의 검색. *대한병리학회지* 1988; 22: 404-14.
 - 15) Schlicht HJ, Salfeld J, Schaller H. *The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation. J Virol* 1987; 61: 3701-9.
 - 16) Takeda K, Akahane Y, Suzuki H, Okamoto H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. *Defects in the precore region of the HBV genome in patients with chronic hepatitis B after sustained seroconversion from HBeAg to anti-HBe induced spontaneously or with interferon therapy. Hepatology* 1990; 12: 1284-9.
 - 17) Eddleston ALWF, Mondelli M, Mieli-Vergani G, Williams R. *Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection. Hepatology* 1982; 2: 122S-7S.
 - 18) Thomas HC, Montano L, Goodall A, Koning R, Oladapo J, Wiedman KH. *Immunological mechanisms in chronic hepatitis B virus infection. Hepatology* 1982; 2: 116S-21S.
 - 19) Naumov NV, Mondelli M, Alexander GJM, Tedder RS, Eddleston ALWF, Williams R. *Relationship between expression of hepatitis B virus antigens in isolated hepatocytes and autologous lymphocyte cytotoxicity in patients with chronic hepatitis B virus infection. Hepatology* 1984; 4: 63-8.
 - 20) Pignatelli M, Waters J, Lever A, Iwarson S, Gerety R, Thomas HC. *Cytotoxic T-cell responses to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic hepatitis. J Hepatol* 1987; 4: 15-21.