

만성 B형 간염 환자의 파라핀 포매 간 조직에서 중합효소 연쇄반응법에 의한 B형 간염 바이러스의 검출에 관한 연구

전북대학교 의과대학 임상병리과학교실¹, 병리학교실² 및 의과학연구소³

이혜수^{1,3} · 오강렬² · 김주현² · 김윤정¹
최삼임^{1,3} · 이동근^{2,3} · 김상호^{2,3}

Detection of HBV DNA in Needle Biopsied Paraffin Embedded Liver Tissues of Chronic Hepatitis B Patients by PCR

- Comparison with Serological and Immunohistochemical Studies -

Hye Soo Lee, M.D.^{1,3}, Kahng Yeul Oh, M.D.², Joo Heon Kim, M.D.²
Yoon Jeong Kim, M.D.¹, Sam Im Choi, M.D.^{1,3}
Dong Geun Lee, M.D.^{2,3} and Sang Ho Kim, M.D.^{2,3}

Department of Clinical Pathology¹, Pathology², and Institute of Medical Science³
Chonbuk National University School of Medicine

In this study, the prevalence of Hepatitis B virus(HBV) DNA in the needle biopsied paraffin embedded liver tissues of chronic hepatitis B patients by rapid nested PCR was examined. DNA was extracted by NaOH with boiling, and amplified by rapid air thermocycler with glass capillary tubes and nested PCR with two primer sets specific for the surface and the core genes of HBV. The PCR results were compared to that of serum HBeAg, serum HBV DNA by dot blot hybridization with a radioactive DNA probe, and tissue immunohistochemical (HBsAg/ HBcAg) studies.

Among 44 patients with chronic hepatitis with serum HBsAg positivity, HBV DNA could be detected by PCR in 43 liver tissues (98%). This results were comparable to the positive rates of 94%(31/33) for serum HBV DNA, 80%(35/44) for serum HBcAg, and 59%(26/44) and 75%(33/44) for tissue HBsAg and HBcAg, respectively. The accordance rate between tissue PCR and serum DNA probe testing was 91%.

The results indicate that HBV DNA detection by rapid nested PCR of paraffin embedded liver tissues by needle biopsy is a more sensitive method to detect the HBV DNA carrier than the serum HBeAg or tissue HBsAg/HBcAg status, and is well correlated with the result of serum HBV DNA probe testing. Therefore this method is a practical indicator for the diagnosis and replication status in retrospective analysis. (Korean J Pathol 1996; 495 ~ 504)

Key Words: Liver, Rapid nested PCR, HBV DNA, Hepatitis viral markers, Immunohistochemical stain

접 수 : 1995년 10월 12일, 게재승인 : 1996년 5월 29일

주 소 : 전주시 덕진구 금암동 산 2-20, 우편번호 560-182

전북대학교 의과대학 임상병리과학교실, 이혜수

*본 논문은 1995년도 전북대학교병원 공동 연구비의 일부지원으로 이루어졌음.

서 론

B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus; HBV)는 3,200 개의 nucleotide로 구성된 가장 작은 DNA 바이러스로서, 급성 또는 만성 B형 간염을 유발시키며, 간경변증 및 간암으로 진행되기도 하는데, 이의 진단을 위해서는 여러가지 생화학적검사 및 간염에 대한 혈청학적 표지자 검사 외에 간 조직의 조직학적 검사가 필수적이다.

Alanine aminotransferase(ALT)나 aspartate aminotransferase(AST)와 같은 생화학적 검사 및 간염표면항원(HBsAg)은 급성 혹은 만성 간염의 진단에 일차 표지로 이용되지만 바이러스의 증식이나 감염능의 평가에는 큰 도움이 안된다. 감염상태를 잘 반영해주는 표지로는 혈청 HBcAg을 들 수 있으나¹, 역시 간접적인 방법으로 HBV DNA를 직접 검출하는 방법에 비해 예민도가 떨어지는 형편이다^{2,3}.

HBV의 증식 및 감염능을 정확히 검사할 수 있는 방법은 혈청이나 간 조직내의 HBV DNA를 직접 검출하는 것으로, 핵산탐식자(DNA probe)를 이용한 dot blot hybridization법이나⁴⁻¹⁰ 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction; PCR)에 의하여 검출이 가능하다¹¹⁻²⁶. 또한, 면역조직화학적 염색법의 발달로 간 세포 내에 존재하는 HBsAg과 HBcAg을 검색할 수 있게 됨에 따라 이를 간 조직내 HBV의 표지자로 이용할 수 있게 되었으며, 특히 HBcAg과 동일한 유전자 부호를 가지고 있는 HBcAg은 간 세포 내에만 한정되어 있고 HBeAg검출율과도 밀접한 관계가 있기 때문에 간 조직에서 HBV의 증식을 알기 위한 방법으로 이용되고 있다²⁸⁻³³.

PCR은 원형 DNA의 denaturation, 시발체(primer)의 annealing 및 핵산중합효소에 의한 elongation을 반복 시킴으로써 특정 부위의 DNA서열을 증폭시키는 방법으로, 이론상으로는 한 개의 DNA만 있어도 검출이 가능하기 때문에, 침 생검 조직같이 아주 적은 양의 검체에 포함되어 있는 바이러스를 검출하기에 적합한 방법이라 할 수 있다²⁷. 그러나 기존의 검사 방법은 과정이 복잡하고 시간 및 시약도 많이 소모될 뿐 아니라 위양성 및 위음성의 가능성도 배제할 수 없기 때문에 rapid nested PCR 등 신속하고 간편한 방법들이 연구되어 왔다^{12,19,20,38-43}.

이에 저자들은 HBsAg이 양성인 만성간염 환자의 간 침 생검 조직의 파라핀 포매 절편 조직에서 rapid nested PCR에 의하여 간염 바이러스를 후향적으로 검출하고, 그 결과를 간 조직내 HBsAg 및

HBcAg에 대한 면역조직화학적 검색과 DNA probe에 의한 혈청 HBV DNA검출, 그리고 혈청 HBeAg의 검사결과와 비교하여 보았다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

연구 재료로는 혈청 HBsAg이 양성으로 조직학적 진단이 의뢰되었던 만성 간염 조직 44예의 포르말린 고정, 파라핀 포매 간 침 생검 조직을 이용하였다.

2. 연구 방법

각 조직에 대해서는 PCR과 면역조직화학적 염색을 시행하였으며, HBsAg, HBeAg 등의 혈청 간염표지자(EIA, Abbott Quantum II, USA)와 혈청 HBV DNA(Dot blot hybridization using cloned HBV DNA labeled with ³²P)에 관한 환자의 의무기록을 조사하였다.

1) 면역조직화학적검색: HBsAg 및 HBcAg에 대한 면역조직화학적 검색은 Anti-HBs (Biomed, LA)와 Anti-HBc (Zymed, San Francisco)를 면역염색용 일차항체로 사용하여 제조사의 술식에 따라 시행하였으며, microprobe detection system (Biomed, LA)을 이용하여 항원의 발현여부 및 발현양상을 검색하였는데, HBsAg염색에서는 세포막 또는 세포질이, 그리고 HBcAg염색에서는 핵 또는 세포질이 적갈색으로 염색된 경우를 양성으로 판독하였으며, 양성으로 염색되는 세포의 수와 염색의 강도는 고려하지 않았다(Fig. 1, 2).

2) PCR에 의한 간 조직내 HBV DNA 검출

(1) HBV DNA의 추출: 파라핀을 제거하기 위하여, 5 μ m두께의 파라핀 포매조직 한 장을 100 μ l의 histoclear가 들어 있는 microcentrifuge tube에 넣고 파라핀을 용해시킨 후, 동량의 무수 에탄올을 넣어 잘 섞은 후 13,000 rpm이상의 고속으로 10분간 원심시켜 파라핀이 포함되어 있는 상층액을 조심스럽게 제거한 후 공기 중에 건조시켰다. 여기에 10 μ l의 증류수와 동량의 0.2 M NaOH를 가하고 혼합한 후 마개를 꼭 닫은 상태에서 끓는 물에 넣고 10분간 가열 후 원심시키고 10 μ l의 0.2 M HCl를 가하여 중화시킨 후 바로 또는 냉장보관 후 사용하였다.

(2) 시발체 (primer)합성: HBV DNA에 적합한 시발체로는 Genbank (Accession No. X51970)로부터 표면 및 핵심 유전자에서 외측 및 내측 각 두쌍씩 총 8개의 시발체를 선택한 후, DNA 합성기기 (Gene

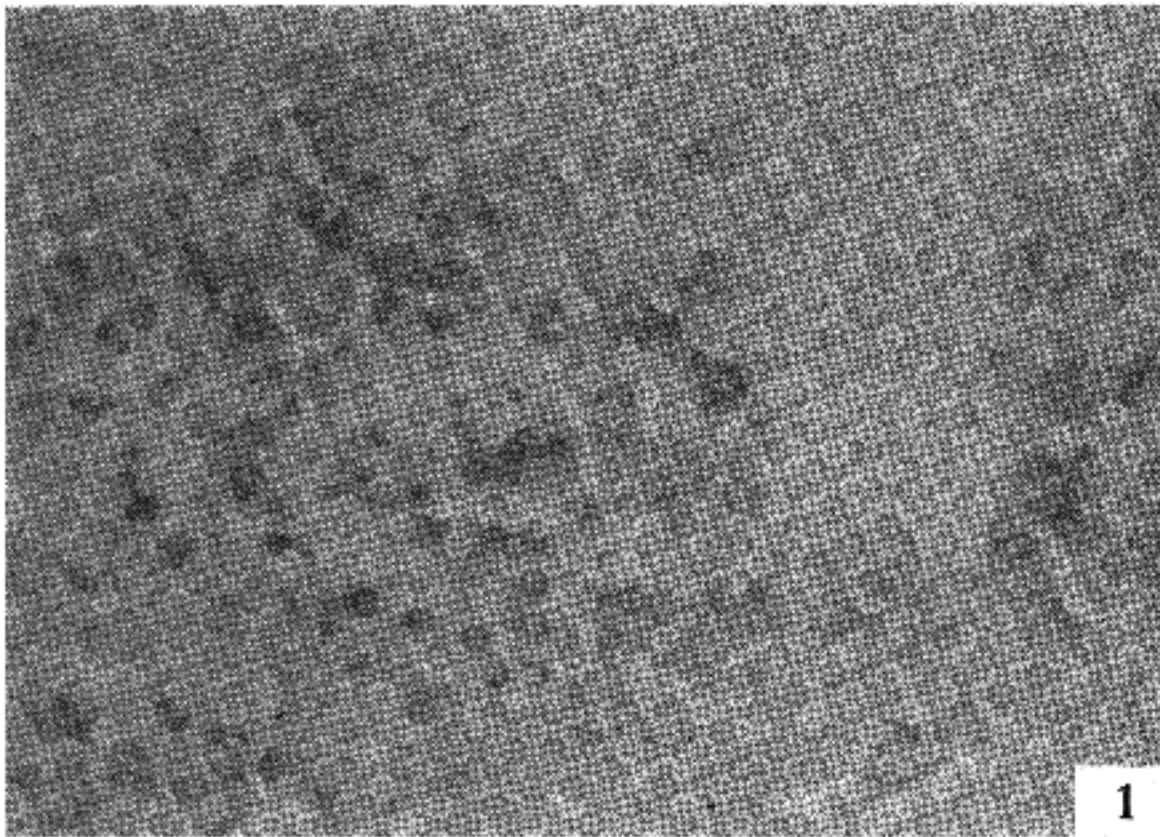


Fig. 1. The intracytoplasmic expression of hepatocellular HBsAg (cHBsAg) in chronic hepatitis liver tissue with HBsAg positive.

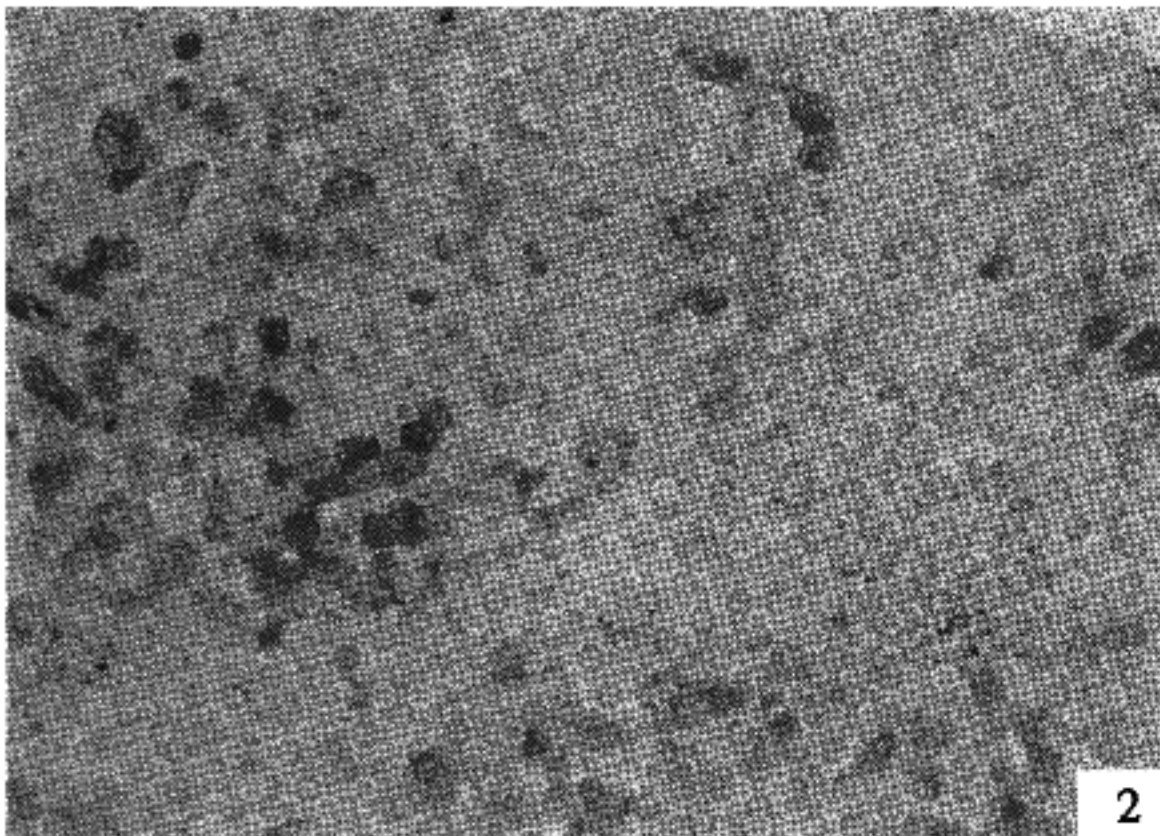


Fig. 2. The intracytoplasmic expression of hepatocellular HBcAg (cHBcAg) in chronic hepatitis liver tissue with HBsAg positive.

Assembler Plus, Pharmacia LKB, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 합성, 정제하여 사용하였으며, 그 위치와 서열은 Table 1과 같다.

(3) **HBV DNA의 증폭:** U shaped well microtiter plate에 0.5 μ M의 표면 또는 핵심 유전자의 외측시발체 (S1/S2 또는 C1/C2)와 0.4 U Taq polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 0.2 mM dNTPs, 50

mM Tris, 500 μ g bovine serum albumin, 0.5 % Ficoll, 1 mM Tartazine, 2 mM $MgCl_2$ 가 포함된 반응액 9 μ l 와 1 μ l의 DNA용액을 잘 섞어 총 10 μ l의 반응액이 되게 하여 25 μ l의 유리 모세관에 모세관 현상을 이용하여 넣은 후 양끝을 Bunsen burner에서 봉하고 DNA Air thermocycler (Idaho Technology, Idaho Falls, ID, USA)에 넣은 후 증폭시켰다 (Table 2). 또

Table 1. Oligonucleotide primers for nested PCR of hepatitis B virus (HBV) DNA

	Primers	Position	Sequence
Surface gene			
Outer primer	HBV S1	108	CTCACATCTCGTCAATCTCC
	HBV S2(C)	434	AGAAGATGAGGCATAGCAGC
Inner primer	HBV S3	320	CCAACCTCCAATCACTCACC
	HBV S4(C)	420	AGCAGCAGGATGAAGAGGAA
Core gene			
Outer primer	HBV C1	1770	GTATTAGGAGGCTGTAGGCA
	HBV C2(C)	2113	CCAGGTAGCTGAAGTCATCA
Inner primer	HBV C3	1927	TGGAGCTCATGTGGAGTTAC
	HBV C4(C)	2037	TCAGGAGACTCTAAGGCTTC

Table 2. Amplification protocol for nested PCR of HBV DNA.

	Primer	D(t)	A(t)	E(t)	C
First amplification					
	S1/S2	94(0)	42(0)	72(5)	30
	C1/C2	94(0)	42(0)	66(0)	30
Nested amplification					
	S3/S4	94(0)	42(0)	72(0)	30
	C3/C4	94(0)	42(0)	66(0)	30

D: Denaturation temperature(°C)
 A: Annealing temperature(°C)
 E: Elongation temperature(°C)
 C: Cycle number t : Time (sec)

한 nested PCR을 위한 증폭은 1차증폭때와 같은 반응액에 0.5 μM의 표면 또는 핵심 유전자의 내측시발체 (S3/S4 또는 C3/C4)와 1차 증폭된 DNA산물 1 μl를 넣고 증폭시켰다.

(4) 증폭된 DNA의 검출: Nested PCR에 의하여 증폭된 DNA 산물을 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel (Seakem ME, FMC)에 전기영동 시킨 후, UV transilluminator상에서 band를 관찰하였다. Nested PCR시 증폭되어 나타날 수 있는 분절 산물의 base pair(bp)는 표면 유전자로부터는 101bp, 핵심 유전자로부터는 111bp의 band가 관찰될 수 있으며, PCR의 결과는 표면 유전자와 핵심 유전자중 한쪽 또는 양쪽에서 양성을 보인 경우를 양성으로 하였다 (Fig. 3).

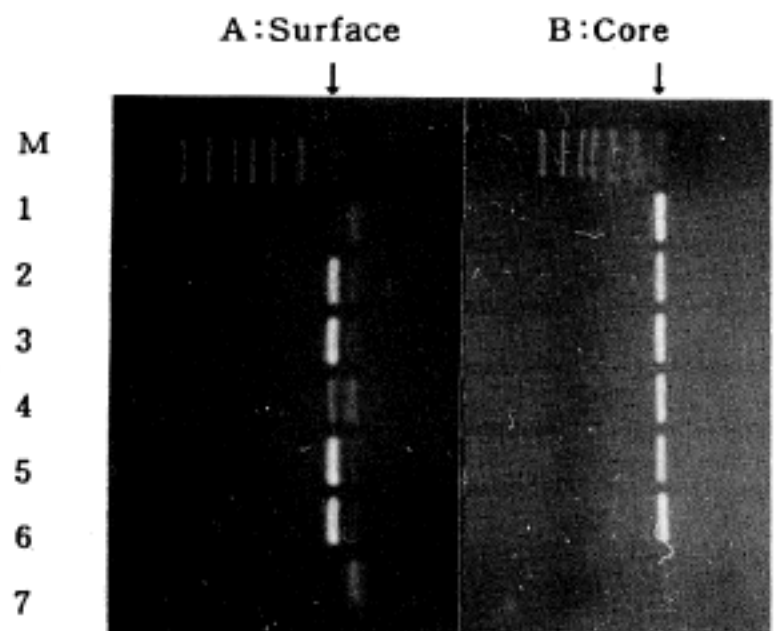


Fig. 3. Ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis of nested PCR product from formalin-fixed, paraffin-embedded liver needle biopsy tissue with HBsAg positive chronic hepatitis. The 101 base pair bands (↓) in (A) are main products amplified from the surface gene by nested PCR, and the 111 base pair bands (↓) in (B) are main products amplified from the core gene by nested PCR.

M : Molecular marker for DNA (BioVentures) with bands at 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100, and 50 base pairs

1-5 : HBV DNA positive patients samples
 6 : positive control serum
 7 : negative control without template DNA

(5) 정도관리: 오염에 의한 위양성을 배제하기 위해서 DNA추출과 증폭 과정은 서로 다른 방에서 실시하였으며, 모든 과정은 자외선 조사 상태의 lami-

nar flow cabinet 내에서 시행하였고, 일회용 파이렛 tip 및 microcentrifuge tube 등은 멸균하여 사용하였으며, 일회용 장갑을 사용하였고, 매 실험이 종료되면 70% 에탄올이나 1% 클로락스를 이용해 주위를 소독하였다. 반응 시약은 DNA와 시발체를 제외한 premaster mix 를 준비하여 사용하였으며, 양성 및 음성 대조로서 HBV DNA양성 혈청 및 DNA가 포함되지 않은 증류수를 매 실험마다 포함시켰다.

결 과

혈청 HBsAg이 양성이고 조직학적으로 만성간염으로 진단된 44예의 조직에서 PCR법에 의한 HBV DNA검출율은 43예로 98%의 양성율을 보였으며, 혈청 DNA probe는 검사된 33예 중 31예에서 양성을 보여 94%의 양성율을 나타내었으나, 혈청 HBeAg은 44예 중 35예(80%)에서 양성이었다. 면역조직화학적 인 검색에서 HBsAg은 26예에서만 발현하여 59%의 양성율을 보였으며, HBcAg은 33예에서 발현하여 75%의 양성율을 보였다(Table 3). 또한 각종 검사결과와 PCR에 의한 간조직의 HBV DNA의 검출결과와의 일치율을 보면 혈청 HBeAg과는 77%, 간 조직의 HBsAg 및 HBcAg에 대한 면역조직화학적 발현율과는 61% 및 73%의 비교적 낮은 일치율을 보인 반면, 혈청 DNA probe와는 91%의 높은 일치율을 보였다(Table 4).

한편, 혈청 HBeAg이 양성인 35예 중 조직내

Table 3. Results of serum HBeAg, HBV DNA by DNA probe, immunostaining for HBsAg and HBcAg, and rapid nested PCR of paraffin-embedded liver tissue of chronic hepatitis patients with positive serum HBsAg.

	No. of cases	No. of positive cases	Positive rate
Serum			
HBeAg	44	35	80%
HBV DNA	33	31	94%
Liver tissue			
Immunostaining for			
HBsAg	44	26	59%
HBcAg	44	33	75%
HBV DNA by PCR	44	43	98%

Table 4. Results of detection of HBV DNA by PCR from needle biopsy of liver tissue compared with HBeAg, DNA probe and immunostaining for HBsAg/HBcAg in liver tissue from chronic hepatitis

	Tissue PCR		Accordance rate
	Positive (n=43 cases)	Negative (n=1 cases)	
Serum HBeAg			77%
Positive (n=35cases)	34	1	
Negative(n= 9cases)	9	0	
Serum HBV DNA by DNA probe			91%
Positive (n=31cases)	30	1	
Negative(n= 2cases)	2	30	
Tissue HBsAg			61%
Positive (n=26cases)	26	0	
Negative(n=18cases)	17	1	
Tissue HBcAg			73%
Positive (n=33cases)	32	1	
Negative(n=11cases)	11	0	

Table 5. Results of Serum HBeAg and tissue expression of HBsAg and HBcAg

	Serum HBeAg		Accordance rate
	Positive (n=35 cases)	Negative (n=9 cases)	
Tissue HBsAg			57%
Positive(n=26cases)	21	5	
Negative(n=18cases)	14	4	
Tissue HBcAg			68%
Positive(n=33cases)	27	6	
Negative(n=11cases)	8	3	

HBsAg과 HBcAg이 발현된 경우는 각각 21예와 27예로 60%와 77%의 양성율을 보였으나, HBeAg이 음성이었던 9예의 경우에도 조직내 HBsAg과 HBcAg이 각각 5예(56%)와 6예(67%)에서 발현됨으로써, 이들 상호간에 어떤 연관성을 찾기는 어려웠으며, 혈청 HBeAg과 이들 간 조직내 HBsAg과 HBcAg의 발현율과의 일치율도 각각 57%와 68%로 매우 낮음을 알 수 있었다(Table 5).

고 안

B형 간염 바이러스(HBV)에 의한 B형 간염의 일반적인 검사 방법은 주로 혈청내 ALT와 AST 및 HBsAg을 검출하는 것이나, HBsAg는 자체가 감염성을 갖지 않고 바이러스가 간 세포 내에서 증식하여도 HBsAg을 충분히 생산하지 않으면 검출이 안 될 수도 있기 때문에 바이러스의 증식을 나타내는 표지로서는 적합하지 않다. 그 동안 임상적으로 HBV의 증식 상태 및 감염능의 평가를 알려주는 지표로는 혈청 HBeAg 및 anti-HBe가 가장 널리 쓰이고 있었으나¹, 최근 혈청 및 간 조직에서 직접 HBV DNA를 검출할 수 있는 방법이 개발됨에 따라 HBeAg 및 anti-HBe만으로 HBV의 감염능을 평가하기에는 미흡하게 되었다^{2,3}.

그간 혈청에서 HBV를 직접 검출할 수 있는 방법으로는 DNA probe를 이용한 DNA hybridization법을 가장 많이 이용하였는데⁴⁻¹⁰, 감염능을 배제하기에는 부족한 실정이었다⁶⁻¹⁰.

그러나 최근 중합효소연쇄반응(PCR)법이 개발되면서 검사 방법에 따라서는 10^{-5} pg까지의 HBV DNA의 검출이 가능하게 됨에 따라^{12,13} HBsAg보균자뿐 아니라 HBsAg이 음성이고 건강한 사람에서까지도 PCR에 양성으로 판명됨으로써 바이러스의 증식이 적게 일어나고 있는 환자에서도 HBV DNA를 검출할 수 있게 되었다^{14-16,25}. Ulrich등¹⁸은 침팬치에 감염을 일으키지 않을 정도의 적은양의 HBV DNA를 PCR에 의하여 검출하였다고 보고하면서 PCR이 HBV DNA검출에 가장 특이도가 높고 예민한 방법이라 주장하였으며, 따라서 PCR에 의하여 HBV DNA가 검출되지 않았을 경우에는 감염성이 없는 상태로 인정할 수 있다고 하였다.

전술한 바와 같이 많은 혈청학적 검사 방법에도 불구하고, 간 질환에 대한 정확한 진단을 위해서는 간 조직에 대한 조직학적 검색이 필수적인 방법으로, 대부분 파라핀 포매 조직을 이용하게 되는데, 이러한 간 조직을 이용하여 직접 HBV 증식능을 판

단하는 여러 가지 방법이 있다. 즉, *in situ hybridization*이나 HBsAg 또는 HBcAg에 대한 면역조직화학적 방법을 이용하는 방법이다.

*In situ hybridization*은 슬라이드에 처리된 세포 및 조직 표본에 핵산 탐식자를 직접 교잡시켜 표본 내의 표적 핵산 물질을 검출하는 핵산교잡법으로 간염 바이러스의 해부학적 위치와 병리 소견이 동시에 관찰되고 침투된 세포의 유형과 정도를 확인할 수 있는 장점이 있으나, 혈청에서의 Dot blot 방법에 비하여 예민도가 떨어지고, 면역조직화학적 방법에 비하여 시간이 많이 소모되기 때문에 아직 실용적으로 이용되지는 못하고 있다³⁴.

HBsAg이나 HBcAg에 대한 면역조직화학적 방법은 슬라이드 위의 조직에 직접 항체를 적용하는 방법으로 표적 세포를 직접 현미경하에서 관찰할 수 있다는 장점이 있어 HBV 감염의 진단이나 병인을 이해하는데 이용되고 있으나, 그 발현도에 있어서는 보고자마다 많은 차이가 있어서 만성 간 질환의 경우 간 조직에 HBsAg이 발현하는 빈도는 30%~95%, HBsAg의 경우에는 60~95%의 다양한 발현 빈도를 보고하고 있다²⁸⁻³³.

또한 이들의 발현 양식은 HBsAg염색에서는 세포막 (mHBsAg) 또는 세포질(cHBsAg)이, 그리고 HBcAg염색에서는 핵(nHBcAg) 또는 세포질(cHBcAg)이 적갈색으로 발현되는바, 이러한 발현 양식이 바이러스의 증식 상태와 예후 판정에 중요한 역할을 한다고 하며, 특히 cHBcAg이 발현할 경우 활동성임을 의미한다고 한다. 본 실험의 경우 HBsAg염색에서는 모두 cHBsAg으로 발현되었으며, HBcAg염색에서는 1예에서만 nHBcAg로 발현되었고, 나머지는 모두 cHBcAg으로 발현되었다.

이에 반하여 최근 개발된 PCR법은 소량의 조직내에 들어 있는 HBV DNA를 효과적으로 검출할 수 있는 가장 예민도가 높은 방법으로 평가받고 있다¹⁹⁻²². Lampertico등¹⁹은 간암 조직을 비롯한 각종 간 질환 조직에서 면역조직화학적 방법에서는 혈청HBsAg 음성 조직은 물론 양성인 조직에서도 간염 항원을 검출해 내지 못하였으나, PCR에 의해서는 HBsAg 양성 조직은 물론 음성인 조직에서도 HBV DNA가 검출되었다고 보고하였는데, 이는 PCR이 면역조직화학적 방법에 비해서 훨씬 예민도가 높다는 것을 증명한 것이라 하겠으며, Wirth등²¹은 DNA probe에 음성인 어린이의 혈청 및 간 조직에서 PCR을 시행한 결과, HBcAg이 양성인 어린이는 물론, anti-HBe를 가진 어린이에서도 PCR에 의하여 HBV DNA가 검출되었다고 하여 DNA probe법보다 더 예

민한 방법이라고 보고하였다. 또한 Chen등²⁰은 면역 화학적 검색 및 혈청학적 소견이 음성인 환자들에서 조직 내 HBV DNA에 대한 PCR 검사 결과가 양성이라 보고하였으며, Diamentis등²²도 모든 혈청학적 및 조직학적 소견에 음성인 환자의 간 조직에서 PCR에 의하여 HBV DNA를 검출하였다고 보고하였는데, 이는 간 조직에서의 PCR에 의한 HBV DNA의 검출이 다른 어느 혈청학적 방법보다 예민하다는 증거들로서 HBV의 증식능을 알기 위해서는 반드시 PCR을 필수적으로 시행하여야 한다고 말할 수 있다.

그러나 진단 목적으로 이용되는 기존의 PCR은 검체로부터의 DNA의 추출과 특정서열의 증폭, 그리고 이의 검출과정의 과정이 복잡하고 시간 및 시약이 많이 소모되어 경제적이지 못할 뿐 아니라 위양성 및 위음성의 가능성을 배제할 수 없기 때문에 보다 간편하고 신속한 검사 방법이 연구되어 왔다^{12,19,20,38-43}. 이등⁴³은 NaOH (alkaline)용해법에 의하여 간 침 생검 조직에서 DNA를 추출하고 25 μ l의 작은 유리 모세관에 10 μ l의 반응 시약을 넣은 후 rapid hot air thermocycler를 사용하여⁴⁴⁻⁴⁶, 외측과 내측의 시발체를 연속으로 이용하는 nested PCR법으로 DNA를 증폭시키고 이를 ethidium bromide가 포함된 gel상에서 전기영동에 의하여 HBV DNA를 검출하였는데¹², 전 과정을 3~4시간에 끝낼 수 있었으며, 시약 및 검체의 소모도 훨씬 줄일 수 있었다고 보고하였다.

본 연구에서는 위의 방법으로 혈청 HBsAg이 양성인 44예의 파라핀 포매 간 침 생검 조직에서 HBsAg 및 HBcAg에 대한 면역조직화학적 염색과 PCR을 시행하고 그 결과를 일반적인 혈청학적 검사 소견과 비교하여 보았다. 그 결과 혈청 HBeAg은 80%에서 양성을 보였고, 조직내 HBsAg 및 HBcAg은 각각 59%와 75%에서만 발현하였으나, DNA probe에 의한 혈청 HBV DNA는 94%, PCR에 의한 조직내 HBV DNA의 검출율은 98%의 높은 양성율을 보였다.

특히 DNA probe법에 의한 혈청 내 HBV DNA 검출 및 PCR에 의한 간 조직 내 HBV DNA의 검출 성적과도 91%의 일치율을 보여 밀접한 상관관계가 있음이 증명되었다. 또한 혈청 내 HBcAg이 음성인 경우에서도 PCR과 DNA probe에서 모두 양성을 보였는데, 이는 위에서 언급 한대로 HBeAg이 음성일 지라도 감염능이 있음을 시사하고 있는 소견이라 할 수 있다. 혈청 HBsAg이 양성인 1예에서 PCR음성을 보인 것은 HBcAg와 DNA Probe 결과가 양성인 것을 감안하여 불 때 위음성의 결과라고 사료된

다. 이러한 위음성 결과는 파라핀 포매 및 포르말린 고정 등 조직을 준비하는 과정에서 DNA가 소실되었거나, 조직 내에 존재하는 중합효소의 방해 물질 등에 의하여 일어날 수 있으며^{23,35}, 또한 시발체가 annealing 할 수 있는 자리가 없어지거나 변형을 일으켰을 가능성¹⁹ 및 돌연변이의 가능성³⁶도 배제할 수 없다. 따라서 동결 절편을 이용하거나 여러 가지 시발체를 이용하는 것도 이러한 위음성을 방지하는데 좋은 방법이라 할 수 있다^{19,37}.

한편, 간염 조직 내 및 HBcAg발현율은 HBsAg보다 높았는데 이는 김등²⁸의 보고와 거의 유사한 소견으로 면역조직화학적 방법에 의하여 HBV의 감염능을 평가하기 위해서는 HBsAg보다 HBcAg이 더 유용함을 확인할 수 있었다. 그러나 혈청 HBcAg과 간 조직 내 HBsAg 및 HBcAg와의 일치율은 각각 57%와 68%로 낮아 이들 상호간에 어떤 연관성을 인정하기는 어려웠다.

이상과 같은 연구 결과, 간염 환자의 간 침 생검 포르말린 고정, 파라핀 포매 조직으로부터의 rapid nested PCR에 의한 HBV DNA의 검출은 간 질환의 진단 및 치료 지침의 설정에 많은 도움이 될 것으로 생각되는 바, 조직학적 검사를 시행할 때 동시에 실시하는 것이 좋을 것으로 생각되며, 아울러 보관된 파라핀 조직을 이용한 후향적 연구에도 유용하리라 사료된다.

결 론

혈청 HBsAg양성인 만성 B형 간염 환자의 간 침 생검 조직의 파라핀 포매 조직에서 alkaline(NaOH)용해법에 의한 HBV DNA 추출, rapid hot air thermocycler에 의한 DNA증폭, 두 쌍의 primer로 DNA를 연속 증폭시키는 rapid nested PCR을 이용하여 B형 간염 바이러스를 검출하고, 그 성적을 혈청 HBeAg, DNA probe에 의한 혈청 HBV DNA 및 간 조직 내 간염 항원(HBsAg/ HBcAg)의 검출율과 비교하여 보았다.

혈청 HBsAg이 양성이고 조직학적으로 만성간염으로 진단된 44예의 조직에서 PCR법에 의한 HBV DNA검출율은 43예로 98%의 양성율을 보였으며, 혈청 DNA probe는 검사된 33예 중 31예에서 양성을 보여 94%의 양성율을 나타내었고, 혈청 HBeAg은 44예 중 35예에서 양성으로 80%의 양성율을 보였다. 면역조직화학적 검색에서 HBsAg은 26예에서 발현하여 59%의 발현율을 보였으며, HBcAg은 33예에서 발현하여 75%의 발현율을 보였다. 또한 각 검

사와 PCR 과의 일치율을 보면, HBeAg와는 77%, 간조직 내 HBsAg, HBcAg와는 61%, 73%로 일치율이 비교적 낮은데 반하여 혈청 DNA probe에 의한 HBV DNA의 검출 결과와는 91%의 높은 일치율을 보였다.

이상의 결과에서 B형 간염 환자의 파라핀 포매간 침 생검 조직으로 부터의 rapid nested PCR에 의한 HBV DNA의 검출은 B형 간염 바이러스에 의한 간 질환의 진단이나 증식능의 평가에 유용하리라 생각되며, B형 간염의 후향적 연구를 하는데도 많은 도움이 되리라 생각된다.

참 고 문 헌

- Shikata T, Karasawa T, Abe K, Uzawa T, Suzuki H, Oda T, et al. Hepatitis Be antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1977; 136: 571-6.
- Matsuyama Y, Omata M, Yokosuka O, Imazeki F, Ito Y, Okuda K. Discordance of hepatitis Be antigen/antibody and hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in serum. *Gastroenterology* 1985; 89: 1104-8.
- Krogsgaard K, Wantzin, Aldershvile J, Kryger P, Anderson P, Nielsen JO. Hepatitis B virus DNA in hepatitis B surface antigen-positive blood donors: Relation to the hepatitis Be system and outcome in recipients. *J Infect Dis* 1986; 153: 298-303.
- Bonino F, Hoyer B, Nelson J, Engle R, Verme G, Gerin J. Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: a marker of active hepatitis B virus replication in the liver. *Hepatology* 1981; 1: 386-91.
- Scotto J, Hadchouel M, Hery C, Yvart J, Tiollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B Virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for the other viral markers. *Hepatology* 1983; 3: 279-84.
- Beringer M, Hammer M, Hoyer B, Gerin JL. An assay for the detection of the DNA genome of hepatitis B virus in serum. *J Med Virol* 1982; 9: 57-68.
- Weller IVD, Fowler MJF, Monjardino J, Thomas HC. The detection of HBV-DNA in serum by molecular hybridization: a more sensitive method for detection of complete HBV particles. *J Med Virol* 1982; 9 : 273-80.
- Brechot C, Degos F, Lugassy C, Thiers V, Zafrani S, Franco P, et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Eng J Med* 1985; 312: 270-6.
- Leiberman HM, LaBrecque R, Kew MC, Hadziyannis SJ, Shafritz DA. Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test: comparison to HBeAg/anti-HBe status in HBsAg carriers. *Hepatology* 1983; 3: 286-91.
- Seef LB. The gold standard serologic marker for hepatitis B virus infectivity. *Hepatology* 1988; 8: 1711-3.
- Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N, et al. Detection of serum hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 86: 312-6.
- Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1930-3.
- Kaneko S, Miller RH, Di Bisceglie AM, Feinstone SM, Hoffnagle JH, Purcell RH. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. Application for clinical diagnosis. *Gastroenterology* 1990; 99: 779-804.
- Shih LN, Sheu JC, Wang JT, Huang GT, Yang PM, Lee HS, et al. Serum hepatitis B virus DNA in healthy HBsAg negative Chinese adults evaluated by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1990; 32: 257-60.
- Pao CC, Yao DS, Lin CY, Kao SM, KC, Sun CF, et al. Serum hepatitis B virus DNA in hepatitis B virus seropositive and seronegative patients with normal liver function. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 591-96.
- Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Shih LN, Lin JT, Chen DS. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1991; 163: 397-9.
- Larzul D, Guigue F, Sninsky JJ, Mack DH, Brechot C, Guesdon JL. Detection of hepatitis B sequences in serum by using in vitro enzymatic amplification. *J Virol Method* 1988; 20: 227-37.
- Ulrich PP, Bhat RA, Seto B, Mack D, Sninsky J, Vyas GN. Enzymatic amplification of hepatitis B virus DNA in serum compared with infectivity testing in chimpanzees. *J Infect Dis* 1989; 160: 37-43.
- Lampertico P, Malter JS, Colombo M, Gerber MA. Detection of hepatitis B virus DNA in formalin fixed, paraffin embedded liver tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1990; 137: 253-8.
- Chen ML, Carol Shieh YS, Shim KS, Gerber MA.

- Comparative studies on the detection of hepatitis B virus DNA in frozen and paraffin sections by the polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1991; 4: 555-8.
21. Wirth S, Mollers U, Schaefer E, Winterpacht A. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in serum and liver of children with chronic hepatitis B negative for hepatitis B virus DNA by conventional hybridization tests. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 209-12.
 22. Diamantis ID, McGandy C, Pult I. Polymerase chain reaction detects hepatitis B virus DNA in paraffin embedded liver tissue from patients sero and histonegative for active hepatitis B. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 420: 11-5.
 23. Lo YMD, Methal WZ, Fleming KA. In vitro amplification of hepatitis B virus sequences from liver tumor DNA and from paraffin wax embedded tissues using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1989; 42: 840-6.
 24. Kuhns M, McNanara A, Mason A, Campbell C, Prrillo R. Serum and liver hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B after sustained loss of surface antigen. *Gastroenterology* 1992; 103:1649-56.
 25. Zhang YY, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, Nordenfelt E. Hepatitis B virus in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg. *Hepatology* 1993; 17: 538-44.
 26. de Lamballerie X, Chapel F, Vignoli C, Zandotti C. Improved current methods for amplification of DNA from routinely processed liver tissue by PCR. *J Clin Pathol* 1994; 47: 466-7.
 27. Frank TS, Cook SM, Del Buono EA, Wilson MD. A simplified method for detecting cytomegalovirus by polymerase chain reaction from histologic sections of small biopsies. *Modern Pathology* 1992; 5: 449-54.
 28. 김상표, 김찬환, 이상숙, 정재홍. 간 조직 내 B형 간염 표지자의 검색. *대한병리학회지* 1988; 22: 404-14.
 29. 안희정, 김경호, 박영년, 김호근, 박찬일. 비활성 혈청 HBsAg 보유자의 간 조직 내 HBcAg 및 HBsAg 발현 양상. *대한병리학회지* 1990; 24: 120-7.
 30. 이해경, 이광민, 정동규, 이용용. 만성 B형 간염에서 간 세포내 HBcAg에 대한 연구. *대한병리학회지* 1992; 26: 355-9.
 31. Gowans EJ, Burrell CJ. Widespread presence of cytoplasmic HBcAg in hepatitis B infected liver detected by improved immunochemical methods. *J Clin Pathol* 1985; 38: 393-8.
 32. Hsu HS, Su 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.
 33. 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.
 34. 강진한. In situ hybridization을 이용한 바이러스 질환의 진단과 연구. *감염* 1993; 25: 189-94.
 35. De Franchis RNC, Cross P, Foulkes NS, Cox TM. A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucl Acids Res* 1988; 16: 10355.
 36. Sommer R, Tautz D. Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucl Acids Res* 1989; 59: 6749.
 37. Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, Terre S, D'Errico A, Grigioni W, et al. Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequence in primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen. *N Eng J Med* 1990; 323: 80-5.
 38. Rolf A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I. PCR: Clinical diagnosis and research. Berlin: Springer Verlag, 1992: 61-7.
 39. Spadaro JP, Dragon EA. Quality control of the polymerase chain reaction. In: Farkas DH, ed. *Molecular biology and pathology: A guidebook for quality control*. New York: Academic Press 1993: 149-58.
 40. Cheyrou A, Guyomarch C, Jasserand P, Blouin P. Improved detection of HBV DNA by PCR after microwave treatment of serum. *Nucl Acids Res* 1991; 19: 4006.
 41. Manzin A, Salvoni G, Bagnarelli P, Menzo S, Carlon G, Clementi M. A single step DNA extraction procedure for the detection of serum hepatitis B virus sequences by polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991; 32: 245-53.
 42. Boom R, Sol CJA, Heijtkink R, Wertheim-van Dillen PME, van der Noordaa J. Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1804-1811.
 43. 이해수, Wittwer CT. 중합효소연쇄반응법에 의한 B형 간염바이러스의 검출에 관한 연구. *대한임상병리학회지* 1993; 13: 617-23.
 44. Wittwer CT, Fillmore GC, Hillyard DR. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot

- air. Nucl Acids Res 1989; 17: 4353-7.
45. Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. BioTechniques 1991; 10: 76-83.
46. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. Anal Biochem 1990; 186: 328-31.
-