

## 말디토프 질량 분석을 이용한 한국인의 B형간염 바이러스 유전자형 및 임상적 의의에 대한 재평가

연세대학교 의과대학 내과학교실, 소화기병 연구소, (주)진매트릭스\*

이종민 · 안상훈 · 장혜영 · 신지은 · 김도영 · 심명기 · 홍선표\*  
정현재\* · 김수옥\* · 한광협 · 전재윤 · 문영명

### Abstract

#### Reappraisal of HBV Genotypes and Clinical Significance in Koreans Using MALDI-TOF Mass Spectrometry

Jung Min Lee, M.D., Sang Hoon Ahn, M.D., Hye Young Chang, M.D., Ji Eun Shin, M.D.,  
Do Young Kim, M.D., Myoung Ki Sim, M.D., Sun Pyo Hong, Ph.D.\*, Hyun Jae Chung, Ph.D.\*,  
Soo-Ok Kim, Ph.D.\*, Kwang-Hyub Han, M.D., Chae Yoon Chon M.D. and Young Myoung Moon, M.D.

Department of Internal Medicine, Institute of Gastroenterology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea,  
GeneMatrix Inc\*

**Background/Aims:** Recent studies have shown that the genotype of hepatitis B virus (HBV) may correlate with the disease natural history and treatment outcome. However, several of these studies used low sensitivity assays in a small number of patients, and this has precluded an accurate evaluation of Korean HBV genotypes. We analyzed Korean HBV genotypes in a large population by employing a new technology, restriction fragment mass polymorphism (RFMP) using MALDI-TOF mass spectrometry, in a sensitive and specific manner. **Methods:** Between February 1995 and December 2003, a total of 475 patients with chronic HBV infection were enrolled. The assay is based on the mass measurement of oligonucleotides having genotypic variations of the S gene. Clinical features including the virologic status and disease progression were also evaluated. **Results:** The median age of the total patients was 35.5 years. Out of 475 patients, there were 162 (34.1%) inactive carriers, 172 (36.2%) had chronic hepatitis, 77 (16.2%) had liver cirrhosis and 64 (13.5%) had hepatocellular carcinoma (HCC). There were 454 patients (95.6%) with genotype C, 4 patients (0.8%) with genotype A, 16 patients (3.4%) with the mixed A and C genotype [7 patients (1.4%) with A<C versus 9 patients (2.0%) with C>A], and 1 patient (0.2%) with B genotype. Comparing genotype A and C, genotype A patients were all inactive carriers without HCC, whereas genotype C patients included those with chronic hepatitis, liver cirrhosis and HCC. **Conclusions:** HBV genotype C is highly prevalent in Korea. Although it is a small percentage, genotype A also exists and it seems to take a more benign clinical course than genotype C. Further studies are necessitated to assess the relationship between HBV genotypes and the various aspects of the diseases' clinical course. (*Korean J Hepatol* 2004;10:260-270)

**Key Words:** Hepatitis B virus (HBV), Genotype, Restriction fragment mass polymorphism (RFMP)

- ◇ 접수 2004년 8월 18일; 수정본 접수 2004년 10월 21일; 승인 2004년 11월 15일
- ◇ Abbreviations: AFP, alpha-fetoprotein; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; anti-HBe, hepatitis B virus e antibody; anti-HBs, hepatitis B virus s antibody; HBsAg, hepatitis B virus s antigen; HBeAg, hepatitis B virus e antigen; HBV, hepatitis B virus; HBV-DNA, hepatitis B virus deoxyribonucleic acid; HCC, hepatocellular carcinoma; IC, inactive carrier; LC, liver cirrhosis; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism; RFMP, restriction fragment mass polymorphism
- ◇ 책임저자 : 안상훈, 서울시 서대문구 신촌동 134번지 연세대학교 의과대학 내과학교실 (우) 120-752  
Phone: 02) 361-5484; Fax: 02) 393-6884; E-mail: ahnsh@yumc.yonsei.ac.kr

## 서 론

B형간염 바이러스(Hepatitis B Virus; HBV)에 의한 감염은 임상 경과가 매우 다양하다. 대부분의 성인 감염에서는 급성 감염 후에 자연 회복되는 경우가 많지만, 일부에서는 만성화하여 비활동성 보유자, 만성 간염, 간경변증 및 간세포암종으로 진행하기도 한다. 이와 같은 다양한 임상 경과의 원인은 성별, 연령, 알코올 섭취 및 면역 상태 등의 숙주 요소, 다른 바이러스와의 혼합 감염 및 항바이러스치료 등의 환경 요소, 그리고 복제의 정도, 돌연변이의 발생 및 유전자형 등의 바이러스 요소가 서로 복합적으로 작용하기 때문인데, 최근에는 HBV 유전자형에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>1</sup>

HBV 유전자형은 전체 염기서열에서 8% 이상의 상이성을 기준으로 분류하고 있으며 현재까지 A-H까지 8가지가 보고되었다.<sup>1,2</sup> HBV 유전자형은 지역적 분포에 차이가 있고 임상 경과와도 관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 지금까지 여러 연구에서 유전자형에 따라 e 항원(hepatitis B e antigen; HBeAg) 혈청 전환, 간질환의 중증도 및 치료 반응에 차이가 있는 것으로 밝혀졌다. 특히, 유전자 B형과 C형을 비교한 연구에서는 대체적으로 B형이 C형보다 양호한 임상 경과를, 유전자 A형과 D형을 비교한 일부 연구에서는 A형이 D형보다 양호한 것으로 보고되었다.<sup>3</sup>

HBV 유전자형을 검사하는 방법은 다양하여, 염기서열에 따른 계통발생학적 분석(phylogenetic analysis), 특이 시발체(specific primer)를 이용한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 제한효소 분절길이 다형성(RFLP; restriction fragment length polymorphism) 및 MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry)를 이용한 제한효소 분절질량 다형성(RFMP, restriction fragment mass polymorphism) 방법 등이 있다.<sup>4,5</sup> 이 중에서 RFMP는 가장 최근에 개발된 방법으로 정확도, 민감도, 혼합 감염 진단능이

기존의 방법보다 우수하여 새로이 각광을 받고 있고, 실제로 최근에는 라미부딘 내성 변이를 검사하는 데 사용되고 있다.<sup>6</sup>

국내의 HBV 유전자형에 대한 몇몇 연구에서 주된 유전자형은 C형인 것으로 보고되었다.<sup>7-12</sup> 기존 연구의 조사 방법으로는 염기서열 분석, 특이 시발체를 이용한 PCR 방법 또는 RFLP를 이용하였고, 이들 방법으로 유전자형을 분석하였을 때 극히 일부 환자에서만 A형 혹은 B형이 존재하는 것으로 밝혀져 유전자형과 임상적인 경과와의 관련성은 알아낼 수 없었다.

이에 저자들은 본 연구에서 많은 수의 환자를 대상으로 기존의 방법보다 더 예민하고 정확한 RFMP 방법을 이용함으로써 HBV 유전자형을 분석하고 임상적 의의를 재평가하고자 하였다.

## 대상과 방법

### 1. 대상

1995년 2월부터 2003년 12월까지 진단된 만성 HBV 감염 환자 475명을 대상으로 하였다. 환자의 혈액은 원심분리 후 -20℃에서 보관하였고, 혈액 채취 당시의 생화학적 검사(AST, ALT, bilirubin, albumin, creatinine, prothrombin time), 혈청학적 검사(HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe) 및 바이러스학적 검사(HBV-DNA 정량)를 시행하였고, HBV 감염에 대한 과거력 및 가족력, 임상 양상을 후향적으로 분석하였다. 만성 HBV 감염 환자는 표면항원(HBsAg)이 6개월 이상 양성이었고, 미국간학회 기준에 따라 임상 진단을 비활동성 보유자, 만성 간염, 간경변증, 간세포암종으로 구분하였다.<sup>13</sup> 간경변증은 조직검사에서 진단되거나 복수, 황달, 식도정맥류 또는 간성혼수 등의 명확한 합병증이 동반된 경우로 하였다. 간세포암종의 진단은 대한간학회의 진단기준에 합당한 경우로 하였다.<sup>14</sup>

### 2. 방법

#### 1) RFMP 방법의 개요

GenBank 데이터 베이스(NCBI, Bethesda, MD,

USA) 검색을 통해 추출한 256개의 HBV 유전자형 염기서열을 Clustal X와 GeneDoc 프로그램을 이용하여 염기서열 다정렬(multiple alignment)을 한 후 계통 분석을 통하여 HBV 유전자형에 따라 특이한 염기서열을 갖는 3개의 motif인 GT-1 (nucleotide number 285-300), GT-2 (nucleotide number 491-495), GT-3 (nucleotide number 621-625)을 선정하였다.<sup>15,16</sup> 상기의 유전자 특이 motif의 flanking 부위에 결합하고 TypeIIIS 제한효소 인지 부위가 삽입된 두 쌍의 PCR 시발체를 RFMP 방법을 응용하여 제작함으로써,<sup>6</sup> 해당 제한 효소로 PCR 산물을 절단할 경우 유전자 특이 motif를 포함하여 유전자형을 결정할 수 있는 유전자형 진단 절편 올리고머(genotype-diagnostic fragment oligomers)가 생산되도록 하였다. 256개의 HBV genome을 유전자 진단 절편의 분자량 양상으로 분류할 경우, 유전자 A형은 9 종류, B형은 7 종류, C형은 28 종류, D형은 8 종류, E형은 3 종류, F형은 3 종류 및 G형은 5 종류로 구분되었으며 유전자형 사이에 중첩되는 질량 양상은 없었다(표 1). GT-1 motif의 분석을 위해 사용된 PCR 시발체는 순방향 HBV-GT1-F, 5'-GGTGGACTTC TCTCAATTGGATGTCTAGGGG-3' (nucleotide number 257-284), 역방향 HBV-GT1-R, 5'-AG[A/G]TT[G/T]GGGACTGCGAAGGATGTTTG GCCA-3' (nucleotide number 301-326)을 사용하였다. GT-2와 GT-3 motifs의 분석을 위해서는 순방향 HBV-GT2-F, 5'-TTGCCCGTTTGTCCTC TAGGATGTTCCAGGA-3' (nucleotide number 463-489)과 역방향 HBV-GT3-R, 5'-AAACGG[A/G]CTGAGGCC[C/A/G/C]CTCGGATGCATAGG-3' (nucleotide number 637-663)을 사용하여 PCR을 시행하였다(서열 내의 밑줄은 인위적으로 삽입된 FokI (BstF5I의 isoschizomer)의 인지부위를 표시하였다). 염기 번호는 Ono 등<sup>17</sup>의 번호 지정에 따랐다.

## 2) HBV 유전자형의 분석

HBV DNA는 혈청 200  $\mu$ L에서 QIAamp DNA

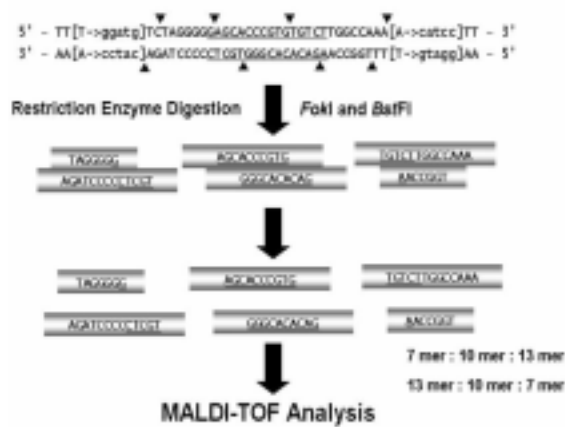
Blood Kit (QIAGEN Inc, Chatworth, CA, USA)를 이용하여 제조사의 방법대로 분리하였다. 바이러스 DNA 용액 2  $\mu$ L와 PCR 반응액 18  $\mu$ L로 PCR을 시행하였다. 반응액은 Platinum Taq DNA 중합효소(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 0.4 units, 양방향 시발체 각각 0.4  $\mu$ M, 0.2 mM dNTP, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)이었다. PCR은 94°C에서 2분간 전변성 후 94°C에서 15초, 50°C에서 15초, 72°C에서 15초씩 35회 반복하였다. 증폭된 산물은 제한효소 절단 반응액 10  $\mu$ L와 혼합하였는데 반응액의 조성은 5 mM potassium acetate, 2 mM Tris-acetate, 1 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol 및 각각의 제한효소 1 unit이었다. FokI 제한효소(NEB, Boston, MA, USA) 반응을 37°C에서 2시간 시킨 후, 연속하여 BstF5I 제한효소(NEB)와 45°C에서 2시간 반응시켰다. GT-1 motif의 PCR 산물을 제한효소로 절단한 경우는 두 쌍의 7 mer, 10 mer, 13 mer로 구성된 유전자 진단 절편이 생성되며, GT-2/GT-3는 두 쌍의 7 mer, 13 mer로 구성된 유전자 진단 절편이 생성된다(그림 1). 제한효소 절단 산물을 각 well당 5 mg polymeric 용매를 함유한 384-well 시료 정제관(Waters, Miliford, MA, USA)을 이용해 진공 여과(vacuum filtration) 하였다. 진공이 부하된 상태에서 각 well을 1 M triethylammoniumacetate (TEAA, pH 7.6) 90  $\mu$ L로 equilibration하였다. Well마다 PCR/제한효소 절단 반응액 28  $\mu$ L와 1M TEAA (pH 7.6) 70  $\mu$ L를 가하였다. 0.1 M TEAA (pH 7.0) 85  $\mu$ L로 5회 세척 후 vacuum manifold에 장착하고, 60% 수성(aqueous) isopropanol 60  $\mu$ L로 용출하여 수집판(collection plate) (Waters, Miliford, MA, USA)에 모았다. 수집판을 heating block을 이용해 115°C에서 90분 간 방치하였다. 탈염된 반응 혼합물을 50 mg/mL 3-hydroxy picolinic acid (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 0.05 M ammonium citrate picolinic acid (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 30% acetonitrile picolinic acid (Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 함유한 기질 용액과 재부유(resuspension) 후 3  $\mu$ L

**Table 1.** Predicted Mass Patterns for the Three Genotype-specific Motifs in S Gene by HBV Genotypes in Mass Spectrometry

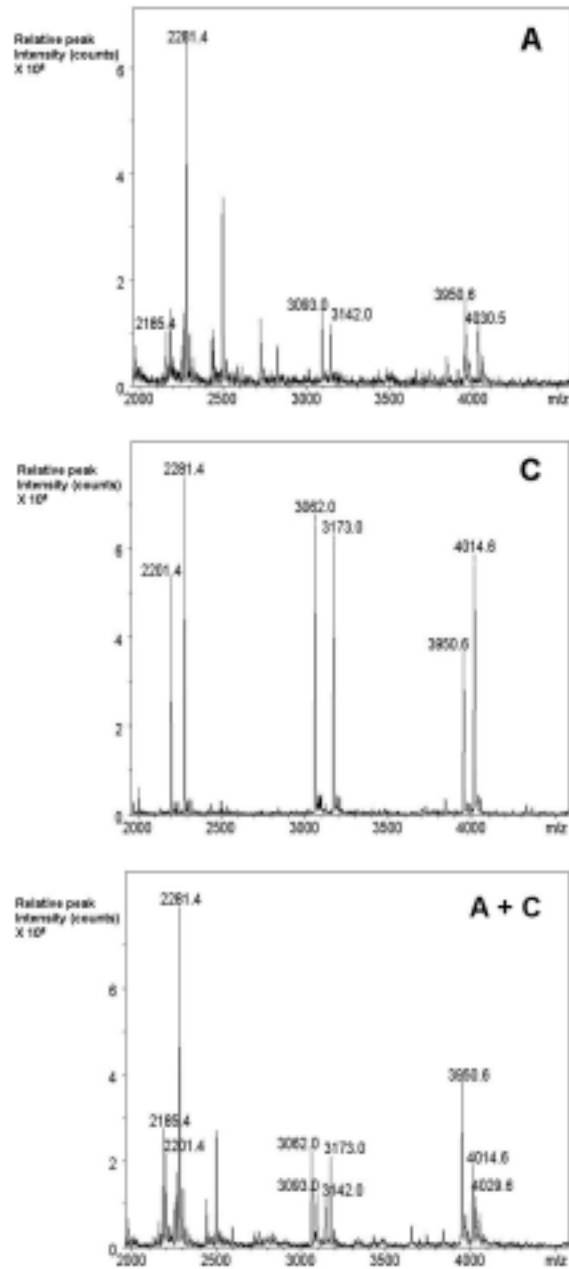
Genotype Motif	GT-1						GT-2 / GT-3				Accession No.*	
	F-7mer	R-7mer	F-10mer	R-10mer	F-13mer	R-13mer	F-7mer	R-7mer	F-13mer	R-13mer		
A	1	2281	2185.4	3093.0	3142.0	3950.6	4029.6	2185	2215.4	4069.6	4006.6	M57663
	2	2281	2185.4	3068.0	3142.0	3974.6	4029.6	2185	2215.4	4069.6	4006.6	V00866
	3	2281	2185.4	3044.0	3142.0	3999.6	4029.6	2185	2215.4	4094.6	4006.6	X69458
	4	2281	2185.4	3068.0	3142.0	3974.6	4029.6	2185	2215.4	4094.6	4006.6	M21030
	5	2281	2185.4	3068.0	3142.0	3983.6	4029.6	2185	2215.4	4069.6	4006.6	X02763
	6	2281	2185.4	3068.0	3142.0	3974.6	4029.6	2194	2215.4	4060.6	4006.6	M54898
	7	2281	2185.4	3084.0	3142.0	3959.6	4029.6	2185	2215.4	4069.6	4006.6	X70185
	8	2281	2185.4	3084.0	3158.0	3959.6	4014.6	2185	2215.4	4069.6	4006.6	S50225
	9	2306	2185.4	3092.0	3142.0	3950.6	4029.6	2194	2215.4	4060.6	4006.6	X65258
B	1	2281	2185.4	3077.0	3142.0	3965.6	4029.6	2185	2215.4	4078.6	4006.6	D23677
	2	2265	2185.4	3077.0	3142.0	3980.6	4029.6	2185	2215.4	4078.6	4006.6	D00331
	3	2265	2185.4	3077.0	3142.0	3980.6	4029.6	2185	2224.4	4078.6	3997.6	AF121251
	4	2266	2185.4	3053.0	3142.0	3990.6	4029.6	2185	2215.4	4078.6	4006.6	D50521
	5	2281	2201.4	3062.0	3158.0	3965.6	4014.6	2185	2215.4	4069.6	4006.6	X97850B
	6	2281	2185.4	3077.0	3142.0	3965.6	4029.6	2185	2224.4	4078.6	3997.6	AB073835B
	7	2281	2185.4	3053.0	3142.0	3990.6	4029.6	2185	2215.4	4078.6	4006.6	D50522
C	1	2281	2201.4	3062.0	3173.0	3950.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	D23680
	2	2281	2201.4	3046.0	3173.0	3965.6	4014.6	2194	2209.4	4069.6	4013.6	AB014395
	3	2281	2201.4	3078.0	3158.0	3950.6	4014.6	2194	2209.4	4069.6	4029.6	AY217372
	4	2281	2201.4	3078.0	3158.0	3950.6	4014.6	2194	2209.4	4053.6	4013.6	AY206388
	5	2281	2201.4	3062.0	3189.0	3950.6	3999.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	M23805
	6	2281	2201.4	3086.0	3148.0	3950.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	3997.6	AY206385
	7	2281	2201.4	3093.0	3142.0	3950.6	4014.6	2194	2209.4	4069.6	4028.6	X75665
	8	2281	2201.4	3109.0	3093.0	3959.6	4053.6	2185	2224.4	4069.6	3997.6	AB048704
	9	2265	2201.4	3062.0	3173.0	3965.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	D50489
	10	2281	2210.4	3086.0	3148.0	3950.6	4005.6	2194	2209.4	4085.6	4013.6	S75184
	11	2241	2185.4	3062.0	3173.0	3990.6	4029.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	M38454
	12	2265	2201.4	3126.0	3108.0	3965.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4028.6	X75656
	13	2281	2185.4	3062.0	3173.0	3950.6	4029.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	M23808
	14	2281	2201.4	3070.0	3148.0	3965.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	X52939
	15	2281	2201.4	3093.0	3142.0	3950.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4028.6	X75665
	16	2281	2226.4	3062.0	3173.0	3950.6	3990.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	D00630
	17	2290	2201.4	3062.0	3173.0	3941.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	M23806
	18	2290	2201.4	3062.0	3157.0	3941.6	4029.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	M23807
	19	2265	2201.4	3062.0	3173.0	3965.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	D16667
	20	2265	2201.4	3126.0	3108.0	3965.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4028.6	X75656
	21	2281	2201.4	3062.0	3173.0	3950.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	3997.6	Y18857
	22	2281	2201.4	3062.0	3173.0	3950.6	4014.6	2194	2224.4	4060.6	4013.6	AB033550
	23	2281	2161.4	3062.0	3173.0	3950.6	4054.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	AB049610
	24	2281	2201.4	3062.0	3173.0	3950.6	4014.6	2194	2224.4	4054.6	4013.6	AB031262
	25	2281	2201.4	3062.0	3173.0	3950.6	4014.6	2194	2215.4	4069.6	4006.6	AB031265
	26	2281	2201.4	3070.0	3148.0	3950.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	X52939
	27	2281	2201.4	3078.0	3158.0	3950.6	4014.6	2194	2224.4	4069.6	4013.6	AF182802
	28	2281	2201.4	3086.0	3148.0	3950.6	4014.6	2194	2224.4	4085.6	4013.6	D28880
D	1	2281	2185.4	3092.0	3117.0	3974.6	4029.6	2194	2224.4	4078.6	4037.6	X68292
	2	2306	2185.4	3092.0	3117.0	3950.6	4029.6	2194	2215.4	4060.6	4006.6	X65258
	3	2281	2185.4	3077.0	3117.0	3990.6	4029.6	2185	2224.4	4087.6	4037.6	X72702
	4	2281	2185.4	3092.0	3142.0	3974.6	4029.6	2185	2224.4	4103.6	4037.6	X75668
	5	2281	2185.4	3092.0	3117.0	3974.6	4029.6	2185	2224.4	4103.6	4037.6	J02203
	6	2281	2185.4	3092.0	3117.0	3974.6	4029.6	2185	2224.4	4087.6	4037.6	Z35716
	7	2281	2185.4	3092.0	3117.0	3974.6	4029.6	2185	2224.4	4078.6	4037.6	X75662
	8	2281	2185.4	3077.0	3117.0	3990.6	4029.6	2185	2224.4	4103.6	4037.6	X80925
E	1	2281	2185.4	3093.0	3142.0	3950.6	4029.6	2185	2224.4	4078.6	4037.6	L24071
	2	2281	2185.4	3084.0	3142.0	3959.6	4029.6	2185	2224.4	4078.6	4037.6	X75664
	3	2281	2201.4	3084.0	3142.0	3959.6	4014.6	2185	2224.4	4078.6	4037.6	L29017
F	1	2281	2201.4	3077.0	3133.0	3974.6	4014.6	2185	2215.4	4094.6	4046.6	X75663
	2	2281	2201.4	3093.0	3118.0	3974.6	4014.6	2185	2215.4	4094.6	4046.6	X69798
	3	2281	2201.4	3093.0	3118.0	3974.6	4014.6	2185	2215.4	4078.6	4046.6	X75661
G	1	2240	2201.4	3078.0	3118.0	4029.6	4014.6	2185	2215.4	4078.6	4046.6	AB059659
	2	2256	2201.4	3078.0	3118.0	4014.6	4014.6	2185	2215.4	4087.6	4046.6	AB064315
	3	2281	2185.4	3118.0	3118.0	3950.6	4029.6	2185	2215.4	4069.6	4006.6	AB064314
	4	2281	2201.4	3102.0	3118.0	3965.6	4014.6	2185	2215.4	4094.6	4046.6	AB064316
	5	2281	2210.4	3124.0	3142.0	3919.6	4005.6	2185	2215.4	4103.6	4006.6	AY168428

Abbreviation: F, forward; R, reverse; Int, internal-positioned oligomer fragments  
 \* GenBank database of NCBI (Bethesda, MD, USA)

을 384-well anchorchip plate (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)에 점적하였다. Linear MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Biflex IV) workstation을 이용해 질량 분포를 얻어온, 지연 추출 모드(delayed extraction mode)로 얻었다. 각 20-50개의 레이저 파동으로부터 time-of-flight 자료를 transient digitizer에서 기록하였고, 평균으로 환산된 질량 분포를 자료 처리 프로그램(Bruker DataAnalysis for TOF 1.6 m)을 통해 질량으로 전환하였다. 얻어진 각 질량값을 유전자형별 예상 질량 양상과 비교하여 유전자형을 결정하였다(표 1, 그림 2).



**Figure 1.** Schematic diagram of the RFMP strategy for HBV genotyping. Based on the alignment of the published HBV sequences, a genotype-specific variable motif, termed GT-1 (nucleotides 285-300) with underline, was chosen. PCR were performed with primers designed to introduce a type IIS restriction endonuclease recognition sequence (*FokI*; GGATG) outside the genotype-specific motif upon amplification. The enzymatic cleavage of the products leads to excision of multiple oligonucleotide fragments representing the motif, and then masses of the resulting oligonucleotide fragments were examined by MALDI-TOF MS. Cleavage sites of *FokI* and an isoschizomer, *BstF5I*, are indicated by arrow heads. Type IIS restriction enzymes like *FokI* and *BstF5I* cleave DNA outside the recognition sequence: *FokI*, 9 bases 3' to the recognition site on one strand and 13 bases from the recognition site on the other strand, leaving a four base overhang protruding 5' end; *BstF5I*, 2 bases 3' to the recognition site on one strand and immediately 3' to the recognition site on the opposite strand, leaving a two base overhang. Artificially introduced recognition sites of *FokI* are shown in parenthesis.



**Figure 2.** Representative MALDI-TOF MS spectra in patient samples. Mass spectra results for genotype A (upper), C (middle), and a mixture of A and C (lower) are shown. Genotype calling fragments are indicated by their molecular weights, as predicted in Table 1. X- and y-axis represent relative peak intensity (counts) and mass to charge (m/z) ratio, respectively.

**Table 2.** Clinical Characteristics and HBV Genotype of Patients

N=475	
Age (yrs)	35.5±13.7 (16-70)
Sex (M:F)	393 (82%):82 (17%)
Diagnosis	
Inactive carrier	162 (34.1%)
Chronic hepatitis	172 (36.2%)
Liver cirrhosis	77 (16.2%)
Hepatocellular carcinoma	64 (13.5%)
Genotype	
A	4 (0.8%)
A, C mixed	16 (3.4%)
A>C	7 (1.4%)
A<C	9 (2.0%)
C	454 (95.6%)
B	1 (0.2%)

### 3. 분석 및 통계 처리

유전자형과 임상 경과와의 관련성을 조사하기 위해 Fisher's exact test를 이용하였고 자료의 통계처리를 위해 SPSS for Windows 11.0을 사용하였다. P값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 대상 환자의 임상적 특성

총 475명의 환자 중 남자가 393명, 여자가 82명이었다. 평균 연령은 35.5±13.7세(범위: 16-70)였고, 혈액 채취 당시 비활동성 보유자, 만성 간염, 간경변증, 간세포암종이 각각 162예(34.1%), 172예(36.2%), 77예(16.2%) 및 64예(13.5%)였다(표 2).

**Table 3.** Clinical Characteristics of Patients with HBV Genotype A

Pt. No.	Genotype	Age	Sex	FHx	HBV duration (years)	Diagnosis	HBeAg/ Anti-HBe
1	A	20	M	-	2	IC	-/+
2	A	25	M	+	25	IC	-/+
3	A	32	M	+	32	IC	-/+
4	A	49	F	+	49	IC	-/+
5	A>C	27	M	-	8	IC	-/+
6	A>C	27	F	+	27	IC	-/+
7	A>C	37	M	+	37	IC	-/+
8	A>C	38	F	-	14	IC	-/+
9	A>C	35	M	+	35	IC	-/+
10	A>C	57	M	+	57	IC	-/+
11	A>C	70	M	-	3	IC	-/+
12	A<C	63	M	-	6	HCC	-/+
13	A<C	33	M	-	3	IC	-/+
14	A<C	29	M	+	29	CH	-/+
15	A<C	37	M	+	37	LC	+/-
16	A<C	49	M	-	23	IC	-/+
17	A<C	65	M	-	4	IC	-/+
18	A<C	66	M	-	17	IC	-/+
19	A<C	32	M	+	32	HCC	-/+
20	A<C	46	M	-	12	HCC	-/+

CH, chronic hepatitis; FHx, family history; HCC, hepatocellular carcinoma; IC, inactive carrier; LC, liver cirrhosis

**2. HBV 유전자형의 빈도 및 A형 유전자형의 임상적 특성**

총 475명의 환자 중 454명(95.6%)의 환자에서 HBV 유전자형이 C형이었고, 4명(0.8%)에서 A형, 16명(3.4%)에서 A와 C형의 혼합형, 1명(0.2%)에서 B형인 것으로 나타났다. 혼합형 중에서 A 우세형이 7명(1.4%), C 우세형이 9명(2.0%)이었다.

유전자 A형이 포함된 20예를 분석했을 때, A 단독형 4명 및 A 우세형 7명의 환자는 모두 비활동성 보유자이었던 반면에, C 우세형 9명에는 만성 간염, 간경변증, 간세포암종이 포함되어 있었다(표 3).

**3. 유전자 A형과 C형의 임상적 차이**

A 단독 또는 우세형을 A군(11명)으로, C 단독 또는 우세형을 C군(463명)으로 분류하여 양군을 비교했을 때, A군에서는 11명 모두 비활동성 보유자인 반면에 C군에서는 151명의 비활동성 보유자, 171명의 만성 간염 및 77명의 간경변증이 있었다(표 4). HBV 감염에 의한 질병이 비활동성 보유자, 만성 간염, 간경변증으로 진행되는 관점으로 보았을 때 A군과 C군의 임상 진단을 비교하면 의미 있는 차이가 관찰되었고( $P < 0.001$ ), 간세포암종의 동반 여부를 비교하였을 때 A군에서는 간세포암종이 없었으나 C군에서는 64명(13.8%)에서 동반하여 차이를 보였다(표 5).

**Table 4.** Comparison of Clinical Status between Genotype A and C of Non-HCCs

Diagnosis	Genotype		P
	A (A+A>C)	C (A<C+C)	
Inactive carrier	11 (100%)	151 (37.8%)	
Chronic hepatitis	0 (0.0%)	171 (42.9%)	<0.001
Liver cirrhosis	0 (0.0%)	77 (19.3%)	
Total	11 (100%)	399 (100%)	

Fisher's exact test

**Table 5.** Comparison of Occurrence of HCC between Genotype A and C

Occurrence of HCC	Genotype		P
	A (A+A>C)	C (A<C+C)	
Yes	0 (0.0%)	64 (13.8%)	>0.05
No	11 (100%)	399 (86.2%)	
Total	11 (100%)	463 (100%)	

Fisher's exact test

**고 찰**

HBV 유전자형은 1998년에 처음 제안된 이후<sup>18</sup> 현재 전세계적으로 각 유전자형의 분포가 다르다는 것이 잘 밝혀져 있다. A형은 북유럽, 북아메리카, 아프리카에서 주로 발견되고 B형은 동남아시아, C형은 극동아시아, D형은 전세계적으로 널리, E형은 아프리카 일부, 그리고 F형은 중앙아메리카에서 주로 발견된다. G형은 프랑스와 미국 일부에서 발견되었으며,<sup>19</sup> F형과 계통발생학적으로 유사한 유전자형이 최근에 중앙아메리카에서 분리되어 H형으로 불리고 있다.<sup>2</sup>

국내에서의 HBV 유전자형에 대한 몇몇 연구에서는 C형이 대부분을 차지하고 다른 유전자형은 극히 드문 것으로 보고되었다.<sup>7-12</sup> 본 연구에서 살펴본 HBV 유전자형의 빈도에 있어서도 총 대상 환자의 95.6%에서 C형이 검출되어 앞선 연구들과 마찬가지로 우리 나라의 주된 HBV 유전자형이 C형이라는 사실을 다시 확인할 수 있었다. 그러나 국내에서 유전자 A형은 현재까지 단 1예만 보고된 반면에 본 연구에서 단독형 4예 및 혼합형 16예를 발견하여 유전자 A 포함형이 총 20예였다는 것은 주목할 필요가 있다.

이전보다 많은 유전자 A형의 발견은 다음과 같은 원인으로 설명할 수 있다. 첫째, 이전 연구보다 대상 환자 수가 월등히 많다는 것이다. 이전의 이등<sup>7</sup>의 보고에서는 대상 환자 수가 214명이었고 조등<sup>8</sup>의 보고에서는 136명이었으며 다른 보고<sup>9-12</sup>에서

도 26명에서 65명을 대상으로 하였으나, 본 연구는 대상 환자 수가 475명으로서 표본의 대표성을 더 반영한다고 볼 수 있다. 둘째, HBV 유전자형 검출 방법의 차이로 본 연구에서는 유전자형 분석을 위해 MALDI-TOF MS에 기반을 둔 RFMP 방법을 이용하였다. RFMP 방법은 돌연변이가 생기면 염기 분자량의 차이로 인해 변이를 포함한 올리고머(oligomer)의 질량이 바뀌는 원리를 이용한 새로운 방법으로서, 질량 분석의 특성상 정확도가 높고 혼합 감염에서의 진단 민감도가 우수하며 바이러스 간의 상대적 양을 보여줌으로써 우세 종의 바이러스를 정량적으로 판별할 수 있는 장점을 가지고 있다.<sup>5</sup> RFMP의 유용성은 YMDD 돌연변이를 검출하는 데 이미 상업화되어 이용되고 있는 방법으로서, 40예의 YMDD 돌연변이를 RFMP, RFLP 및 DNA의 직접 염기서열 분석(direct sequencing) 방법을 이용하여 비교하였을 때, RFLP는 혼합 감염을 검출하지 못하는 반면 RFMP는 1 mm당 100개(copies)의 극미량의 HBV 유전자도 측정할 수 있었고, RFMP는 혼합 감염을 포함하여 직접 염기서열 분석과 100% 일치율을 나타내었다.<sup>6</sup>

본 연구에서는 유전자 A형과 C형의 혼합형이 16예 검출되었고, 정량적 측정이 가능했으므로 이를 기준으로 A 우세형 7예 및 C 우세형 9예로 나눌 수 있었다. 유전자 A 포함형 20예 중 가족력이 없는 11예에 대해서는 HBV 감염 경로의 변화의 가능성을 고려해 볼 수 있다. 과거에는 수직 감염이 국내에서의 주된 HBV 감염 경로였으나, 예방접종의 전국적 보급으로 수직 감염의 빈도는 줄어드는 반면 수평 감염 및 외국인과의 접촉 증가에 의한 타국에서의 감염은 상대적으로 늘어나고 있다. 미국에서 전국적으로 시행한 HBV 유전자형 조사에서<sup>3</sup> 출생지가 한국인 환자가 51명이었는데 이들의 유전자 A, B, C, D형의 비율이 각각 6%, 14%, 78%, 2%로서, C형이 차지하는 비율이 국내 연구보다 적었고, 일본의 HBV 유전자 A형 51명을 대상으로 한 연구에서는<sup>20</sup> 15%의 환자에서 수직 감염이 있었으나 부모는 모두 유전자 A형이 아니었다. 이러한 결과들을 종합하면, 본 연구에서 발

견된 유전자 A형은 외국과의 교류가 빈번해짐에 따라 다른 나라에서 전해졌을 가능성을 배제하기 어렵다.

최근에 HBV 유전자형의 종류와 임상 경과 사이에 밀접한 관련이 있음이 밝혀지고 있다.<sup>1</sup> 특히, 아시아에서 유전자 B형과 C형이 혼재되어 있기 때문에 B형과 C형에 대한 비교 연구가 많은데, 합병증에 있어서 두 유전자형 간에 큰 차이가 없고<sup>21</sup> adefovir 치료 반응의 차이도 없다는 일부 연구도 있지만,<sup>22</sup> 전반적으로 B형이 C형보다 양호한 임상 경과를 보인다는 보고가 많다.<sup>23</sup> 지금까지의 결과를 보면, 감염의 활성도에서 C형이 B형보다 악화되는 경우가 많고,<sup>24-28</sup> HBeAg 양성인 경우도 C형이 B형보다 많았다.<sup>29-31</sup> 또한, 간세포암종의 발생률도 B형보다 C형에서 높았다.<sup>32,33</sup> 인터페론 치료 시 HBeAg의 제거율이 B형보다 C형에서 낮으므로, 치료 전 유전자형의 조사가 치료 전략에 도움이 될 수 있음을 주장한 연구도 있다.<sup>34</sup> 유럽에서는 유전자 A형과 D형이 혼재되어 있어 주로 A형과 D형에 대한 비교 연구가 이루어졌는데, A형 감염에서 보다 지속적인 생화학적 호전(sustained biochemical response) 및 HBV DNA의 제거율을 보였다.<sup>35</sup> 최근에 라미부딘에 내성을 보이는 HBV를 비교하였을 때 유전자 A형과 D형이 다른 양상으로 라미부딘에 내성을 얻게 되고 이는 추후 치료 약제를 선택하는 데 있어서 영향을 끼칠 수 있다는 연구가 있었다.<sup>36</sup>

이제까지 국내의 연구는 모두 C형 이외의 유전자형이 거의 없어 유전자형에 따른 HBV 감염의 임상적 의의를 도출하지 못하였다.<sup>7-12</sup> 본 연구에서는 유전자 A형이 다수 검출되었고 이들을 분석하였을 때 연령이나 HBV 감염의 유병 기간에는 차이가 없었지만, A 단독형 4예 및 A, C 혼합형 중 A 우세형 7예는 모두 진단이 비활동성 보유자이었던 반면에, C 우세형 9예는 비활동성 보유자 외에도 만성 감염, 간경변증을 포함하고 있어서 질병의 진행에 있어 A형 유전자가 양호한 결과를 나타내었다. 간세포암종을 제외한 전체 환자를 유전자 A형이 주된 A군 및 C형이 주된 C군으로 나누어 비



교하면 A군에서는 11예가 모두 비활동성 보유자였으나 C군의 399예에서는 만성 간염, 간경변증이 포함되어 있어 통계적 차이를 보였다( $P < 0.001$ ). 또한, A군에서는 간세포암증이 없었고 C군에서는 64명이 포함되어 있어 양군 간에 차이를 보였으나 통계적인 의미는 없었다( $P > 0.05$ ). 이상의 결과로 유전자 A형이 우세한 감염일 경우 임상 경과가 양호하다는 것을 추측할 수 있다.

요약하면, 본 연구는 지금까지의 국내 HBV 유전자형에 대한 연구 중 가장 많은 환자 수를 대상으로 하였고, 기존의 방법보다 정확하고 혼합 감염도 검출 가능한 것으로 알려진 MALDI-TOF MS를 이용한 RFMP 방법으로 유전자형을 결정하였다. 총 475명의 환자 중 454명(95.6%)의 환자에서 HBV 유전자형이 C형이었고, 4명(0.8%)에서 A형, 16명(3.4%)에서 A와 C의 혼합형이었다. A형 유전자 우세의 A군과 C형 유전자 우세의 C군으로 나누어 양군을 비교하였을 때, 유전자 A형이 C형에 비하여 양호한 경과를 보인다는 것을 알 수 있었다.

결론적으로, 국내의 주된 HBV 유전자는 C형임을 다시 확인하였다. 또한 극동아시아에 드문 것으로 알려진 A형이 다수 검출되었고 C형에 비하여 양호한 임상 경과를 보이는 것으로 추측되어 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 요 약

**목적:** HBV에 의한 감염은 임상 경과 및 결과가 매우 다양한데, 이의 원인은 숙주 요소, 환경 요소 및 바이러스 요소가 서로 복합적으로 작용하기 때문이며 이 중에서 HBV 유전자형에 대한 연구가 최근에 많이 이루어지고 있다. 유전자 B형이 C형보다, A형이 D형보다 양호한 경과를 보인다고 알려져 있으나, 국내에서는 유전자 C형이 주된 유전자라고만 알려졌을 뿐 임상 경과와의 관련성에 관한 연구는 없다. 이에 본 연구는 이전의 연구보다 많은 수의 환자를 대상으로 하여 기존의 방법보다 우수한 MALDI-TOF MS를 응용한 RFMP 방법

을 이용함으로써 HBV 유전자형을 분석하고, 이 결과를 바탕으로 HBV 감염의 임상적 의의를 재평가하고자 하였다. **대상과 방법:** 1995년 2월부터 2003년 12월까지 HBsAg이 6개월 이상 양성인 만성 HBV 감염 환자의 혈청 475예를 대상으로 하여 MALDI-TOF MS를 응용한 RFMP 방법으로 유전자형을 검출하였고, ALT, HBeAg, anti-HBe와 HBV 감염에 대한 과거력 및 가족력을 분석하였으며, 임상 진단을 비활동성 보유자, 만성 간염, 간경변증, 간세포암증으로 구분하였다. **결과:** 총 475예에서 남자가 393명, 여자가 82명이었고, 평균 연령은  $35.5 \pm 13.7$ 세(16-70)이었으며 진단은 비활동성 보유자, 만성 간염, 간경변증, 간세포암증이 각각 162예(34.1%), 172예(36.2%), 77예(16.2%), 64예(13.5%)이었다. HBV 유전자는 C형이 454예(95.6%)이었고, A형이 4예(0.8%), A와 C형의 혼합형이 16예(3.4%)이었으며 이 중 A 우세형이 7예(1.4%), C 우세형이 9예(2.0%)이었다. B형은 1예(0.2%) 있었다. 전체 대상군을 A군(A형 단독형과 우세형) 및 C군(C형 단독형과 우세형)으로 나누었을 때 A군에서는 11예 모두 비활동성 보유자인 반면에, C군에서는 463예 중에서 151예의 비활동성 보유자, 171예의 만성 간염, 77예의 간경변증 및 64예의 간세포암증이 있었다. **결론:** 국내의 주된 HBV 유전자는 C형임을 다시 확인하였으나, 극동아시아에 드문 것으로 알려진 A형이 다수 검출되어 이의 원인은 대상 환자 수의 차이, 검사 방법의 차이, 감염 경로의 변화에 의한 것으로 생각된다. 또한, 유전자 A형이 C형에 비하여 양호한 임상 경과를 보이는 것으로 추측되며 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 감사의 글

본 연구는 2004년도 연세대학교 학술연구비 지원(6-2004-0024)에 의하여 이루어졌고, 일부는 보건복지부에서 시행한 2004년도 보건의료기술 연구개발사업의 지원(03-PJ10-PG13-GD01-0002)을 받았습니다.

**색인단어:** B형간염 바이러스, HBV 유전자형, 제  
한효소 분절질량 다형성

### 참 고 문 헌

- Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003;46:329-338.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83:2059-2073.
- Chu CJ, Keefe EB, Han SH, et al. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003;125:444-451.
- Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004;14:3-16.
- Kim NK, Hwang SG, Hong SP, et al. Novel mass spectrometric assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus during lamivudine therapy. *Korean J Genetics* 2003;25:63-75.
- Hong SP, Kim NK, Hwang SG, et al. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol* 2004;40:837-844.
- 이승환, 한성희, 조승철 등. 한국인 만성 B형간염 바이러스 감염에서 B형간염 바이러스 유전자형의 분포. *대한간학회지* 2001;7:373-380.
- 조일현, 송정엽, 김덕기 등. 만성 B형간염환자에서 B형간염 바이러스 유전자형의 빈도. *대한간학회지* 2001;7:381-386.
- 오성욱, 황성규, 고광현 등. 경기, 서울 지역에서 조사된 B형간염 바이러스 유전자형. *대한소화기학회지* 2002;40:46-52.
- 김범준, 송병철. 제주 지역 만성 B형 간질환 환자에서 임상양상에 따른 B형간염 바이러스 유전자형의 분포. *대한소화기학회지* 2003;42:496-501.
- 조지현, 박도심, 김태현 등. 제주 지역의 B형간염 바이러스 유전자형. *대한간학회지* 2004;10:42-50.
- 김학철, 서검석, 김용성, 송우건, 문형배, 조지현. 한국인 만성 B형간염 바이러스(HBV) 보유자에서 HBV 유전자형 - 일차 중합 효소 반응법에 의한 온전한 B형간염 바이러스 증폭 및 그의 염기 서열. *대한내과학회지* 2001;61:479-488.
- Lok ASF, McMahon BJ: Practice guideline committee, AASLD. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:1225-1241.
- 박중원. 간세포암종 진료 가이드라인. *대한간학회지* 2004;10:88-98.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876-4882.
- Nicholas HB Jr, McClain WH. Searching tRNA sequences for relatedness to aminoacyl-tRNA synthetase families. *J Mol Evol* 1995;40:482-486.
- Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y, Nishioka K. The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA: subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res* 1983;11:1747-1757.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988;69:2575-2583.
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;81:67-74.
- Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, et al. Clinical features of hepatitis B virus genotype A in Japanese patients. *J Gastroenterol* 2003;38:656-662.
- Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, et al. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complication, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003;37:562-567.
- Westland C, Delaney W, Yang H, et al. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* 2003;125:107-116.
- Sumi H, Yokosuka O, Seki N, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003;37:19-26.
- Chan HL, Wong ML, Hui AY, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients. *J Clin Microbiol* 2003;41:1277-1279.
- Chan HL, Tsang SW, Liew CT, et al. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:406-412.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:1207-1209.
- Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographical origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997;175:1285-1293.
- Lok ASF, Lai CL, Wu PC, Leung EKY, Lam TS. Spontaneous hepatitis e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1987;92:1839-1843.
- Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, et al. Rapid detection of genotypes and mutations in the precore promoter and the precore region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol* 2000;33:430-439.
- Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999;179:775-782.
- Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus genotype in patients with

- chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 2001;34:590-594.
32. Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Gastroenterology* 2001;120:1564-1565.
  33. Tsubota A, Arase T, Ren F, Tanaka H, Ikeda K, Kumada H. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *J Med Virol* 2001;65:257-265.
  34. Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok ASF. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002;36:1425-1430.
  35. Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-1856.
  36. Zollner B, Petersen J, Puchhammer-Stockl E, et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004;39:42-50.