대한간학회지 제5권 제3호 1999 ; 173-183

단기간의 라미부딘 투여중 라미부딘 내성을 가진 HBV 변이형의 출현에 관한 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실, 소화기병연구소, 임상의학연구센터1

백용한 · 한광협 · 정효영1 · 전재윤 · 문영명

Abstract

Emergence of YMDD Motif Mutant Hepatitis B Virus during Short-term Lamivudine Therapy

Yong Han Paik, M.D., Kwang Hyub Han, M.D., Hyo Young Chung1 M.S.
Chae Yoon Chon, M.D., Young Myoung Moon, M.D.

Department of Internal Medicine, Institute of Gastroenterology, Yonsei Medical Research Center1
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: The emergence of lamivudine-resistant mutant hepatitis B virus (HBV), with aminoacid substitution in the YMDD motif of DNA polymerase, has been reported in the long-term lamivudine use group. However there is no report about the emergence of mutant viruses during the short-term lamivudine therapy. The objective of this study was to investigate the emergence of YMDD mutant HBV during short-term lamivudine therapy. **Methods:** We evaluated twenty-eight chronic hepatitis B patients who were HBeAg and HBV DNA positive and treated with lamivudine 100mg p.o. daily for 12 weeks. First, we investigated the emergence of YMDD mutants by nested polymerase chain reaction (PCR) method developed by Chayama et al in 19 patients who lost HBV DNA during lamivudine therapy but showed HBV DNA re-emergence 2 weeks after the end of therapy. Second, DNA subcloning and sequencing of HBV DNA polymerase including YMDD motif was undertaken in one patient's serial blood samples at 0, 8, 12 weeks to confirm the results of nested PCR. **Results:** YMDD motif mutation was detected in 17(90%) out of 19 patients at the end of therapy and the type of mutations were YIDD only. At the end of therapy, mutant was predominant in 5 patients, both mutant and wild type were similar in proportion in 3 patients, and wild type was predominant in 9 patients. When we carried out nested PCR serially with samples of 0, 2, 4, 8, 12, 14 weeks after initiation of therapy in 5 patients who were mutant predominant at 12 weeks, YIDD mutant began to be detected from 2 weeks in 4 patients and from 4 weeks in one patient. However, rapid turnover from mutant to wild type happened after the end of therapy, so only wild type was detected in 3 patients and wild type became predominant in 2 patients at 2 weeks after the end of therapy. All the sequencing results of serial blood samples in one patient were consistent with nested PCR data. **Conclusions:** The presence of YMDD motif HBV polymerase mutant may be possible before administration of lamivudine in Korean chronic hepatitis B patients. Nested PCR assay would be an useful method to detect YMDD mutant. (Korean J Hepatol 1999;5:173-183)

Key Words : Chronic hepatitis B, Lamivudine, HBV DNA polymerase, YMDD mutant

■ 책임저자 : 한광협, 서울시 서대문구 신촌동 134 연세의료원 내과학교실, 소화기내과
본 논문의 요지는 1999년 춘계 대한간학회에서 구연으로 발표된 바 있음.

서 론

라미부딘(Lamivudine, (-)- β-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine, 3TC)은 싸이토신 누클레오사이드 아날로그(cytosine nucleoside analogue)로서 처음 human immunodeficiency virus(HIV)의 역전사효소를 억제하는 약물로 알려졌으나 B형 간염 바이러스(HBV)의 역전사효소(RNA dependent DNA polymerase)에도 강력한 억제작용이 있는 것이 밝혀져[1-4] B형 간염의 새로운 치료제로 대두되고 있는 약물이다. 그러나 6개월 이상 장기간 라미부딘 치료를 받은 만성 B형 간염 환자에서 라미부딘에 저항성을 갖는 HBV가 보고되었는데, 이러한 저항성은 HBV 역전사효소내의 YMDD motif (아미노산 549 - 552th)의 점돌연변이가 그 원인으로 밝혀져 있다.[5-9] 제일 중요하고 대표적인 돌연변이로서 550번째 아미노산인 methionine이 isoleucine으로 치환된 YIDD 변이형과 valine으로 치환된 YVDD 변이형이 있으며, 이들 변이형은 YMDD 야생형에 비하여 라미부딘에 강한 저항성을 나타내는 것으로 밝혀져 있다.[10,11] 그러나 이러한 변이형 발생에 대한 보고들은 대부분 6개월 이상 장기간 약물을 투여 받은 환자들에서의 결과로서 단기간 라미부딘 투여시 HBV YMDD motif의 변이형 출현여부는 잘 알려져 있지 않다. 이에 저자 등은 만성 B형 간염 환자에서 단기간의 라미부딘 투약 중 HBV YMDD motif에서의 변이형 출현여부와 임상양상과의 연관성을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1998년 1월부터 1999년 2월까지 총 28명의 환자가 Glaxo-welcome사의 라미부딘 (Zeffix®) 3상 임상연구에 참여하여 라미부딘을 매일 100 mg씩 12주간 투여 받았으며 이들중 남녀는 각각 18명, 10명이었고 평균 연령은 38(24-60)세였다. 이들은 모두 연구시작 1개월 내의 HBeAg과 HBV DNA가 양성이었으며 anti-HCV는 모두 음성이었다. 약물 투여 종료시점인 12주째에 치료반응을 평가한 결과 16명(57%)에서 ALT가 정상화되었고 22명(79%)에서 HBV DNA가 음전되었다. 4명은 일시적으로 HBV DNA가 음전되었으나 다시 양전되었고 2명은 HBV DNA가 감소되는 추세였으나 한번도 음전되지는 않았다. HBV DNA가 음전되었던 환자 22명중 13명에서 투여 종료 2주후에 다시 HBV DNA가 양성화되었다. 본 연구의 대상환자는 약물 투여 종료시점인 12주째에 HBV DNA 양성을 보였던 6명과 종료시점엔 음전을 보였으나 치료종료 2주만에 다시 양전된 13명을 합친 총 19명을 대상으로 하였다. 남녀는 각각 13명, 6명이었으며, 평균연령은 39(26-60)세였다. 대상 환자들의 약물 투여 전 alanine aminotransferase (ALT) 수치는 123.8±44.9(47-190) IU/L이었고 HBV DNA는 3305.3±5325.4(24-17000) pg/mL였다(Table 1).

2. 방법

대상 환자 19명에서 약물 투여 전, 투여 후 2, 4, 8, 12주째, 투여 종료 후 2주째에 각각 채혈하여 혈청을 냉동 보관하였다. 먼저 19명 모두에서 라미부딘 투여 전과 투여종료 시점인 12주째의 혈청으로 nested PCR 방법을 이용하여 변이형 발생여부를 조사하였다. 다음으로 시간경과에 따른 변이형 발생변화를 보기 위하여 nested PCR 결과 12주째에 변이형이 야생형보다 우세하게 나타났던 5명에서 라미부딘 투여 전과 투여 후 2, 4, 8, 12주째 그리고 투여종료 후 2주째의 혈청으로 nested

Table 1. Clinical Characteristics of 19 Patients with Chronic Hepatitis B Treated with Short-term(12 weeks) Lamivudine in Whom Nested PCR Assay Was Done

Patient	Age	Sex	ALT(IU/L)		HBV DNA(pg/mL)			Nested PCR results of YMDD motif at 12 weeks
			baseline	12weeks	baseline	12weeks	14weeks	
1	35	F	168	36	130	ND	7.6	YIDD>>YMDD
2	58	M	184	32	400	ND	190	YIDD>>YMDD
3	42	F	47	26	24	ND	26	YIDD>>YMDD
4	35	M	122	50	82	ND	1300	YIDD>>YMDD
5	28	F	64	13	81	ND	3.1	YIDD>>YMDD
6	35	M	144	81	540	21	3500	YMDD only
7	40	M	166	49	2200	ND	240	YIDD<<YMDD
8	36	M	122	92	370	ND	180	YIDD<<YMDD
9	41	M	58	47	90	ND	330	YIDD<<YMDD
10	31	M	132	49	2900	4.6	8600	YIDD<<YMDD
11	35	F	180	30	83	ND	27	YIDD=YMDD
12	27	F	89	33	4000	ND	13	YIDD=YMDD
13	39	F	148	54	2000	2.9	1200	YIDD<<YMDD
14	28	M	88	79	1600	ND	1900	YIDD<<YMDD
15	60	F	106	90	17000	32	17000	YMDD only
16	56	M	135	131	17000	ND	1200	YIDD<<YMDD
17	42	M	190	23	1900	ND	21	YIDD=YMDD
18	51	M	67	41	2800	3.9	470	YIDD<<YMDD
19	36	M	142	110	9600	7.8	7900	YIDD<<YMDD

ND: Not detectable

PCR을 시행하였다. 다음으로 nested PCR결과의 정확성을 검증하기 위하여 변이형이 출현했던 한 환자의 투여 전, 8주, 12주째의 연속적인 혈청검체 3가지의 PCR 결과물을 5개씩 subcloning하여 염기서열 자동분석기로 유전자 배열을 검색한 뒤에 PCR 결과와 비교하였다.

Nested PCR 방법은 HBV 역전사효소의 YMDD motif의 변이형 출현여부를 검사하기 위해 Chayama 등[12]이 고안한 방법으로서, 먼저 환자의 혈청에서 HBV DNA를 추출한 뒤에 YMDD motif를 포함한 HBV 역전사효소 DNA를 PCR로 증폭하였다. 이때 사용하는 PCR용 시발체(primer)는 PCR 결과물에 YMDD 점돌연변이형에만 있고 야생형에는 없는 새로운 제한효소 장소를(SspI for YIDD 변이형, Alw44I for YVDD 변이형) 만들도록 제작하였다. 다음으로 PCR 산물에 제한효소를 가하고 전기영동시켜 제한효소 분절 길이 다형성(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)의 원리로 HBV 역전사효소의 변이형의 출현을 관찰하였다.

1) HBV DNA 추출

Serum 50 μL에 buffer 350 μL와 proteinase K(20 mg/ml) 4 μL를 넣고 37℃에서 한 시간동안 incubation 하였다. DNA extraction buffer의 조성은 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA (pH 8.0), 0.25% SDS, 150 mM NaCl을 사용하였다. 다음 Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol extraction을 2회 실시한 후 chloroform extraction을 실시하였다. 1/10 volume 3M Sodium acetate를

가한 뒤 2-3 volume absolute ethanol을 섞어주어 -70℃에서 5분 이상 두었다. 다음 4℃, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 1ml 70% ethanol로 pellet을 세정한 후 4℃, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 버리고 난 후 다음 액체가 모두 제거될 때까지 상온에서 말렸다. Pellet에 증류수 30 ul를 가하고 녹인 후 -20℃에서 보관하였다.

2) Nested Polymerase Chain Reaction 후 변이형 확인

YMDD 변이형을 검출하기 위하여 야생형에는 없는 새로운 제한효소 장소를(SspⅠ for YIDD 변이형, Alw44I for YVDD 변이형) 만드는 시발체를 사용하였다. 먼저 YIDD 변이형을 검출하기 위하여 viral DNA 10 ul를 주형(template)으로 하고 시발체로 BF108과 BR112을 사용하여 94℃에서 5분간 변성(denaturation) 시킨 후 35회 결합반응(94℃;1분, 58℃;1분, 72℃;1.5분)을 반복한 뒤 72℃에서 7분간 연장반응(extension)시켰다. 첫 번째 PCR 산물 1 ul과 primer로 YNSsp1, BR109을 사용하여 위와 유사한 조건으로 두 번째 PCR을 시행하였다. 다음 10 ul의 두 번째 PCR 산물을 SspI 제한효소로 처리한 후 2% agarose gel 에서 전기영동시켰다. YVDD 변이형의 검출을 위해서는 첫 번째 PCR을 위한 시발체로 BF107, TMPpu101을 사용하였으며, 두 번째 PCR을 위한 시발체로는 TMApaL1, BF111을 사용하였고 나머지 PCR 조건은 YIDD 경우와 동일하였다. 두 번째 PCR 산물은 Alw44I 제한효소를 처리한 후 2% agarose gel 에서 전기영동 시켰다. PCR에 사용한 양성 및 음성 대조군은 HBV 역전사효소의 DNA를 subcloning 한 후 자동염기서열분석 결과 YMDD 변이형과 야생형으로 확인된 만성 B형 간염 환자의 혈청을 각각 사용하였다.

3) Nested PCR 산물의 subcloning을 통한 HBV 역전사효소 염기서열 분석

Nested PCR 결과의 정확성을 확인하기 위해 patient 2에서 약물 투여 전, 투여 후 8주, 12주째의 혈청에서 추출한 HBV DNA의 PCR산물로 자동염기서열분석(automatic sequencing)을 시행하였다. PCR로 증폭한 HBV 역전사효소 DNA 산물을 pGem-Teasy vector (Promega, Madison, U.S.A.)에 ligation 시킨 후 *Escherichia coli* XL1 blue에 transformation한 뒤 배양하여 plasmid를 정제하였다. 각 표본에서 5개의 clone씩을 automatic sequencer (Amersham pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

결 과

1. Nested PCR을 통한 YMDD motif 변이형의 검출

Nested PCR에 의한 YMDD motif 분석 결과, 라미부딘 투여 전에는 대상 환자 19명 중 YMDD 변이형이 한 명도 검출되지 않았으나 약물 투여 12주째에는 19명 중 17명(89.5%)에서 YMDD 변이형이 발생하였다. 변이형이 나타난 17명 모두 YIDD 변이형이었고 YVDD 변이형은 한 명도 없었다. 약물투여 12주에 변이형이 관찰되었던 17명 중 PCR 산물 내에 야생형과 변이형이 차지하는 상대적인 비율을 전기영동상의 band의 강도로써 살펴보았을 때, 변이형의 비율이 더 높았던 경우가 5명, 비슷한 경우가 3명, 야생형의 비율이 더 높았던 경우가 9명이었다(Table 1).

변이형의 출현시기를 알아보기 위하여 라미부딘 투여 12주째에 변이형 비율이 야생형보다 높았던 환자 5명에서 약물 투여 전, 투여 후 2주, 4주, 8주, 12주(투여종료시점), 투여종료 후 2주때의 혈청으로 연속적인 nested PCR을 시행한 결과, 라미부딘 투여 전에는 5명 모두 야생형만 나타났으나, 5명중 4명은 투여 2주째부터, 나머지 1명은 4주째부터 YIDD 변이형이 나타나기 시작하여 그 비율이 시간의 경과에 따라 점차 증가하였다. 그러나 투여종료 2주만에 야생형으로의 빠른 전환을 보여 3명에선 야생형만이 검출되었고, 나머지 2명에서는 야생형이 변이형보다 우세하게 검출되었다(Table 2).

Table 2. Longitudinal Data of HBV DNA and Emergence of YIDD Mutant in Patients Who Showed Predominance of YIDD Mutant at 12 Weeks after Lamivudine Therapy

		Baseline	2 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks	14weeks
Patient 1	DNA	130	5.8	-	-	-	7.6
	Mutant	Wild	Wild	W>>Mi	W>>Mi	W<<Mi	W>>Mi
Patient 2	DNA	400	-	-	-	-	190
	Mutant	Wild	W>>Mi	W>>Mi	W=Mi	W<<Mi	Wild
Patient 3	DNA	24	-	-	-	-	26
	Mutant	Wild	W>>Mi	W>>Mi	W>>Mi	W<<Mi	Wild
Patient 4	DNA	82	-	-	-	-	1300
	Mutant	Wild	W>>Mi	W>>Mi	W>>Mi	W<<Mi	Wild
Patient 5	DNA	81	-	-	-	-	3.1
	Mutant	Wild	W>>Mi	W>>Mi	W=Mi	W<<Mi	W>>Mi

DNA: HBV DNA level (pg/mL)
Mutant: YIDD type mutant (Wild: wild only, W>>Mi: mutant predominant, W=Mi: similar proportion of wild and mutant type, W<<Mi: mutant predominant)

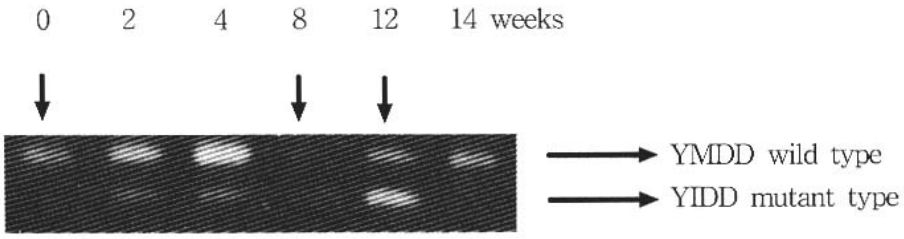

Figure 1. Longitudinal data of nested PCR after restriction enzyme application in the patient 2.

2. Nested PCR 산물의 subcloning을 통한 HBV 역전사효소 염기서열분석

Nested PCR 결과의 정확성을 확인하기 위해 patient 2에서 약물 투여 전, 투여 후 8주, 12주째의 혈청에서 추출한 HBV DNA의 PCR산물로 clone 5개씩 자동염기서열분석(automatic sequencing)을 시행하였다. 그 결과 투여 전에는 nested PCR 결과 야생형만 검출되었는데(Figure 1), 염기서열분석에서도 5개 clone 모두 야생형으로 나타났다(Table 3). 8주때에는 야생형과 YIDD 변이형이 거의 같은 비율로 나타났는데, 염기서열분석결과 5개 clone중 야생형이 3개, YIDD 변이형이 2개로 나타났다. 12주때에는 YIDD 변이형의 비율이 야생형보다 높은 것으로 나타났는데, 염기서열분석결과 5개 clone중 YMDD가 1개, YIDD 변이형이 4개로 나타났다. 따라서 YMDD motif의 변이형 검출에 있어서 nested PCR방법의 정확성을 확인할 수 있었다.

3. 환자의 ALT 및 HBV DNA와 Mutant 출현비율의 변화양상 비교

Patient 1에서 라미부딘 투여중 ALT 수치는 점차 감소하였으며 투여종료 2주 후까지 감소된 상태를 유지하였다. HBV DNA는 투여 직후 곧 음성이 되었으나 종료 2주 후에 다시 약간 상승하였다. YIDD 변이형은 투여 4주 후부터 나타나기 시

Table 3. Comparison between Nested PCR Results and Automatic Sequencing Result of HBV DNA Including YMDD Motif

Sampling time	Nested PCR result	Subcloning and automatic sequencing of HBV DNA(5 clones for each sample)
Baseline	YMDD wild only	clone A-1 5'------T----TAT/ATG/GAT/GAT---------- ------A-3' YMDD
		clone A-2 5'------T----TAT/ATG/GAT/GAT---------- ------A-3' YMDD
		clone A-3 5'------T----TAT/ATG/GAT/GAT---------- ------A-3' YMDD
		clone A-4 5'------T----TAT/ATG/GAT/GAT---------- ------A-3' YMDD
		clone A-5 5'------T----TAT/ATG/GAT/GAT---------- ------A-3' YMDD
8 weeks	Wild type = Mutant	clone B-1 5'------C----TAT/ATT/GAT/AAT---------- ------G-3' YIDD
		clone B-2 5'------T----TAT/ATT/GAT/AAT---------- ------A-3' YIDD
		clone B-3 5'------T----TAT/ATG/GAT/AAT---------- ------A-3' YMDD
		clone B-4 5'------T----TAT/ATG/GAT/AAT---------- ------A-3' YMDD
		clone B-5 5'------T----TAT/ATG/GAT/AAT---------- ------A-3' YMDD
12 weeks	Wild type << Mutant	clone C-1 5'------T----TAT/ATT/GAT/GAT---------- ------G-3' YIDD
		clone C-2 5'------T----TAT/ATT/GAT/GAT---------- ------G-3' YIDD
		clone C-3 5'------T----TAT/ATT/GAT/GAT---------- ------G-3' YIDD
		clone C-4 5'------T----TAT/ATT/GAT/GAT---------- ------G-3' YIDD
		clone C-5 5'------T----TAT/ATG/GAT/GAT---------- ------G-3' YMDD

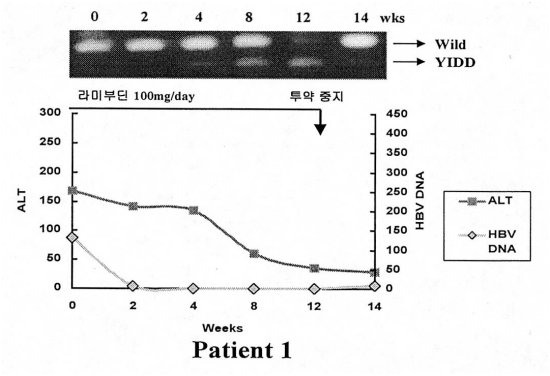

Figure 2. Longitudinal data of serum ALT and HBV DNA and nested PCR results after restriction enzyme application in patient 1.

작하여 12주 때는 YIDD 변이형 비율이 야생형보다 높아졌다. 그러나 투여종료 2주 후에는 다시 야생형으로의 빠른 전환을 보였다(Figure 2).

Patient 2,3,4,5에서도 마찬가지로 라미부딘 투여 중 환자의 ALT 수치는 점차 감소하는 경향을 보였으며 HBV DNA는 투여 후 곧 감소하였으나 투여종료 후 2주만에 다시 상승하였다. Mutant는 네 환자 모두 투여 2주 후부터 나타나기 시작하여 12주 때는 YIDD 변이형의 비율이 야생형보다 높아졌다. 그러나 투여종료 2주만에 네 환자 모두 다시 야생형이 우세해졌다(Figure 3).

고 찰

전세계적으로 약 2억 5천만 명이 B형 간염바이러스의 보유자이며 우리나라에도 전 인구의 약 7-10%가 B형 간염바이러스 보유자로 알려져 있다.[13] 만성 B형 간염은 간경변, 간암 등을 일으켜 사망에 이르게 하며 특히 바이러스가 활동적으로 증식하는 경우 진행성 간질환에 빠질 위험이 높다고 알려져 있다. 따라서 바이러스의 증식을 효과적으로 억제하여 더 이상 간질환이 진행하는 것을 막는 것이 중요하다. 이러한 만성 B형 간염의 치료제로는 인터페론이 널리 쓰이고 있으나 주사로만 투여해야하며 상당한 부작용을 갖고 있다. 치료효과도 일반적으로 약 30-40%에서만 HBeAg이 음전되는 것으로 알려져 있으며,[14,15] 특히 국내에서 보고된 만성 B형 간염에서의 인터페론 반응률은 약 25-30%로서 유럽이나 미국에 비해 낮은 실정이다.[16-18] 따라서 B형 간염의 효과적인 치료제의 개발이 절실한 상태에서 누클레오사이드 아날로그제재들이 등장하였다.[19,20] 이중에서 가장 유망한 약제는 라미부딘으로 라미부딘은 사이토신 누클레오사이드 아날로그로서 B형 간염바이러스

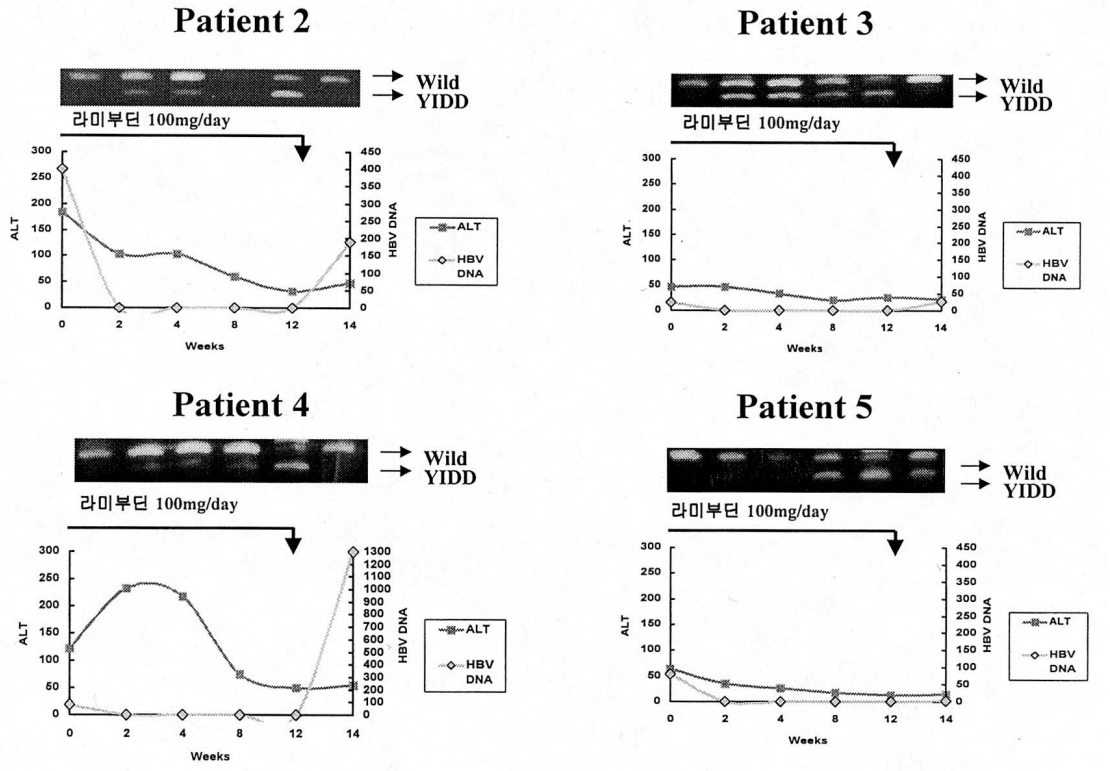

Figure 3. Longitudinal data of serum ALT and HBV DNA and nested PCR results after restriction enzyme application in patient 2,3,4,5.

의 DNA 중합효소를 억제함으로써 바이러스의 증식을 강력히 억제하는 것으로 알려져 있다.[1,21,22] Lai 등[23]은 1년간 매일 라미부딘 100mg을 복용한 143명의 만성 B형 간염 환자에서 치료종료시 16%의 HBeAg 음전율과 98%의 HBV DNA 감소율, 72%의 ALT 정상화율을 보고하여 우수한 HBV 억제효과를 보고하였으며, 국내에서도 한 등[24]은 45명의 만성 B형 간염 환자에게 라미부딘을 100 mg씩 1년간 투여하여 79.5%의 지속적 HBV DNA 음성화율과 87.8%의 ALT 정상화율을 보고한 바 있다.

그러나 라미부딘을 투여 받던 중 라미부딘에 저항성을 보이며 HBV DNA와 ALT가 재상승한 환자들이 출현했으며 이 환자들에게서 B형 간염 바이러스 역전사효소 내의 YMDD motif(아미노산 551 - 554th)의 점돌연변이형인 YIDD 변이형과 YVDD 변이형이 발생했음이 Ling과 Tipple에 의해 보고되었다.[5,6] HBV는 hepadnavirus의 일종이지만 HIV와 마찬가지로 역전사효소(viral RNA-dependent DNA polymerase)에 YMDD (tyrosine, methionine, aspartate, aspartate) motif를 갖고 있으며 이 부위는 nucleotide가 결합하는 부위로 알려져 있다.[25] HBV RNA-dependent DNA polymerase의 YMDD motif에서 552번째 아미노산인 methionine이 isoleucine으로 치환된 YIDD 변이형과 valine으로 치환된 YVDD 변이형은 HIV와 마찬가지로 야생형에 비하여 라미부딘에 강한 저항성을 나타내는 것이 in vitro 실험을 통해 밝혀졌다.[10,11,26] 그후 여러 보고자들에 의하여 6개월 이상 라미부딘을 투여 받은 만성 B형 간염 환자들의 14-29%에서 YIDD 또는 YVDD 변이형이 발생했음이 보고되었다.[8,9,12,27] 그러나 이들 보고들은 대부분 6개월 이상 장기간 라미부딘을 투여한 환자들에서 변이형의 출현율을 보고한 것으로서 단기간 라미부딘 투여시 HBV YMDD motif의 변이형 출현여부는 잘 알려져 있지 않다. YMDD 변이형을 검출하기 위하여 PCR 후 DNA 염기서열

분석을 시행하는 방법이 이용되어 왔는데, 변이형이 적은 비율로 야생형과 섞여 있을 땐 변이형의 검출이 어려운 단점이 있었다. Nested PCR법은 Chayama 등이 고안한 방법으로 HBV DNA의 PCR 결과물에 YMDD 점돌연변이형에만 있고 야생형에는 없는 새로운 제한효소 장소를 만들도록 primer를 제작하여 PCR을 시행한 후 제한효소 분절 길이 다형성(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)의 원리로 HBV 역전사효소의 변이형의 출현을 검출하는 방법으로 변이형 대 야생형의 비율이 1:100 또는 1:1,000 정도까지 변이형을 검출할 수 있는 것으로 알려져 있다.[12]

본 연구에서 nested PCR 방법에 의해 변이형 발생여부를 조사한 결과, 대상 환자 19명중 17명(89.5%)에서 투여후 12주째에 변이형이 발생하였으며 발생한 변이형의 종류는 모두 YIDD 형이었다. 변이형이 검출된 17명중 12주째의 변이형의 비율이 야생형보다 높게 나온 5명의 환자에서 약 2주 간격으로 변이형 발생을 조사한 결과, 4명은 투여 2주째부터 변이형이 출현했고 나머지 1명은 4주째부터 변이형이 검출되기 시작하였다. 이와 같은 결과는 기존의 연구들[5-9,27]이 약 6개월 이상 장기간 라미부딘 투여받은 이후에 변이형의 출현이 관찰된 데 비하여 매우 다른 결과라 할 수 있다. 이와 같이 약물 투여 2주만에 변이형이 검출된 배경으로는 첫째, 약물투여 전부터 변이형이 존재했을 가능성을 생각할 수 있으며, 둘째, 변이형이 투여 전에는 없었으나 2주라는 짧은 기간 내에 새로 출현했을 가능성도 있다. 첫 번째 가능성을 먼저 생각해보면, 대상환자 19명 전원은 라미부딘 투여전 야생형만 검출되었으나 변이형이 매우 적은 비율로 야생형과 함께 존재한다면 nested PCR 방법으로도 변이형을 검출해 낼 수 없다. 따라서 이들에서 라미부딘 투여 전에 매우 적은 양이지만 변이형이 이미 존재하고 있다가 라미부딘에 의해 야생형이 억제됨으로써 상대적으로 변이형의 비율이 높아져 조기에 검출되었을 가능성이 있다. 특히 우리나라의 높은 HBV 유병률을 고려할 때 자연상태에서도 매우 적은양의 YMDD motif 변이형이 존재할 가능성이 있다고 생각한다. 두번째로 라미부딘 투여후 수주내의 단기간에 변이형이 새로 출현했을 가능성을 생각할 수 있는데, 라미부딘을 투여받은 HIV 감염 환자에서 투여 1주 후부터 변이형이 발생했음이 보고된 바가 있으나[28] HBV에서는 본 연구처럼 투여 직후부터 변이형의 발생여부를 연속적으로 조사한 보고가 거의 없다. 그러나 Chayama 등[12]은 투여 초기부터 변이형 발생을 조사한 5명에서 가장 빨리 변이형이 출현한 시기가 8개월로 보고하여 본 연구에서 변이형이 수주만에 새로 발생했을 가능성은 다소 떨어진다고 생각한다.

본 연구에서 출현한 변이형의 종류는 모두 YIDD형이었으며 그 이유로는 HIV 환자에서 HIV 역전사효소가 Guanine→Adenine 치환을 더 선호하여 YIDD 변이형이 YVDD 변이형보다 조기에 출현하는 경향이 있음이 보고된 바 있어[28,29] HBV에서도 이와 유사한 원리로 YIDD 변이형이 먼저 출현했을 가능성을 생각해 볼 수 있으며, 이의 확인을 위해 본 연구의 대상 환자들에서 변이형의 종류가 바뀌는지 계속 추적 관찰할 계획이다.

Chayama 등의 nested PCR 방법은 PCR을 두번 시행하므로 직접적인 DNA 염기서열분석(direct DNA sequencing) 방법보다 YMDD motif의 변이형 검출에 예민하다.[12] 본 연구에서는 이 방법의 정확성을 확인하기 위하여 한 환자에서 3개의 서로 다른 시기의 혈청으로 HBV 역전사효소 유전자 부위를 각각 5개의 colony씩 DNA 염기서열분석을 시행하여 nested PCR과 비교한 결과 두 검사의 결과가 거의 일치하여 nested PCR 방법의 정확성을 확인할 수 있었다. 따라서 nested PCR 방법은 YMDD motif 의 변이형 검출에 있어서 향후 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 생각한다.

투여기간에 따른 변이형의 발생변화 양상과 혈청 HBV DNA, ALT 수치의 변화를 보면 라미부딘 투여 후 YIDD 변이형은 2주 내지 4주 후부터 나타나기 시작하여 12주 때는 YIDD 변이형 비율이 야생형보다 높아졌으나 투여종료 2주만에 야생형으로의 빠른 전환을 보여 3명에선 야생형만이 검출되었고, 나머지 2명에서는 야생형이 변이형보다 우세하게 검출되었다. 이러한 결과는 라미부딘

투여 중단시 매우 빠른 속도로 야생형이 증식하는 것을 나타내는 것으로, 이는 변이형이 야생형보다 증식능력이 낮기 때문으로 설명할 수 있으며 자연 상태에서 야생형이 주종을 이루고 있는 원인이 되기도 한다.[11,30] HBV DNA는 약물 투여 후 곧 감소하여 2주째에는 5명중 4명에서 HBV DNA가 음성화 되었고 다른 1명도 4주째에 음성화 되었으나 투여 종료 2주 후에 5명 모두 다시 상승하였다 (3.1-1300 pg/ml). 혈청 ALT 수치는 4명에서는 지속적으로 감소하여 12주때에는 정상범위였고 한 환자는 투여후 ALT가 잠시 올라갔다가 정상화되었다. 변이형이 발생하여 증가함에도 불구하고 HBV DNA가 음성이며 ALT가 정상인 상태를 유지하는 이유는 대부분을 차지하고 있던 HBV 야생형이 라미부딘에 의하여 억제되어 절대적인 바이러스의 양이 감소했기 때문이며 변이형이 야생형보다 많아졌지만 그 상대적인 비율이 높아진 것이지 전체적인 바이러스의 양은 적기 때문으로 생각한다. 그러나 이들에서 라미부딘을 장기간 계속 투여하여 변이형의 양이 충분히 많아졌을 때 어떤 결과를 가져올지는 아직 단정할 수 없다. 그 이유는 변이형은 라미부딘에 저항성을 보이지만 증식능력이 야생형보다 떨어지므로 계속 라미부딘을 투여하였을 때의 효과를 알기 위해서는 장기적인 추적 관찰이 필요하기 때문이다. 따라서 라미부딘 치료에서 변이형이 갖는 의미는 라미부딘의 장기적인 치료효과와 매우 밀접한 관계를 갖고 있으며 이를 밝히기 위하여 장기간의 추적관찰이 요망된다.

요 약

목적 : Nucleoside analogue인 라미부딘은 B형 간염바이러스 역전사효소의 억제제로 B형 간염의 치료제로 사용된다. 6개월에서 1년 이상 라미부딘 치료를 받은 환자에게서 바이러스 역전사효소의 YMDD motif(A.A 549 - 552)에서 점돌연변이가 일어나 550번째 아미노산인 methionine이 isoleucine (YIDD mutant) 또는 valine (YVDD mutant)으로 치환되어 야생형에 비하여 라미부딘에 강한 저항성을 가진다고 알려져 있다. 그러나 단기간 라미부딘 투여시 HBV YMDD motif 부위에서의 변이성 출현에 대한 연구 보고는 아직 없었다. 본 연구에서는 Chayama 등의 nested PCR 방법을 이용하여 단기간의 라미부딘 투약 중 만성 B형 간염환자에서 HBV YMDD motif 부위에서의 변이형의 출현여부와 임상양상과의 연관성을 알아 보고자 하였다. **대상 및 방법 :** Glaxo-welcome사의 라미부딘(Zeffix)의 III상 임상시험자인 만성 B형 간염 환자 19명을 대상으로 하였다. 환자는 매일 라미부딘 100mg을 투약하였으며 12주 후에 2주간 투약을 중단하였다. 환자들의 혈청은 매 4주마다 12주간 채혈하여 냉동 보관하였다. 환자의 혈청에서 nested PCR 방법에 의하여 HBV 역전사효소 부위를 증폭하였다. 이때 PCR용 primer를 변조하여 점돌연변이의 경우에 야생형에는 없는 새로운 제한효소 장소를(Ssp I for YIDD mutant, ApaL I for YVDD mutant) 만들어 제한효소 분절길이 다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)의 원리로 역전사효소 부위에서의 변이형의 출현을 관찰하였다. Nested PCR결과의 신뢰도를 확인하기 위하여 PCR 결과물을 subcloning하여 자동염기서열 분석기로 유전자 배열을 검색하였다. **결과 :** 1) 라미부딘 투약 후 12주 때의 혈청에서 nested PCR 방법에 의하여 대상환자의 89.5%인 17명의 환자들에게서 야생형과 변이형(YIDD mutant)이 혼합되어 있음이 관찰되었다. 2) 1)의 결과에서 변이형이 우세하였던 환자 5명을 대상으로 2주 간격으로 변이형 출현을 nested PCR 방법으로 관찰한 결과 처음으로 변이형이 나타난 시기가 2주 때 4명, 4주 때 1명이었으며, 투약 중지 2주 후에 5명의 환자 모두에게서 야생형으로의 빠른 전환이 관찰되었다. 3) 환자 1명을 임의로 선택하여 HBV 역전사효소 부위의 유전자 배열 검색 결과가 nested PCR결과와 일치함을 확인하였다. 4) 변이형의 출현여부와 ALT 변화를 비교한 결과 라미부딘 투약 기간동안 ALT 수치의 정상화와 비례하여 야생형에 대한 변이형의 출현비율이 라미부딘 투여 중 증가되었다. **결론 :** 단기간의 라미부딘 투여중 HBV 역전사효소 변이형이 출현될 수 있음이 확인되었으며 투여초기에

HBV 역전사효소 변이형의 출현이 확인되는 점으로 보아 변이형이 라미부딘 투여전에 이미 존재할 가능성이 있어 이에 대한 연구가 필요하리라 생각한다.

참고문헌

1. Doong SL, Tsai CH, Schinazi RF, Liotta DC, Cheng YC. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. Proc Natl Acad Sci USA 1991;19:8495-8499.
2. Chang CN, Doong SL, Zhou JH, Cheng YC. Biochemical pharmacology of (+)-and (-)-2',3'-dideoxy-3'thiacytidine as a anti-hepatitis B virus agents. J Biol Chem 1992;31:22414-22420.
3. Mansour TS, Jin H, Wang W, et al. Anti-human immunodeficiency virus and anti-hepatitis B virus activities and toxicities of the enantiomers of 2'-deoxy-oxa-4'-thiocytidine and their 5-fluoro analogues in vitro. J Med Chem 1995;1:1-4.
4. Xie H, Voronkov M, Liotta DC, et al. Phosphatidyl-2',3'-dideoxy-3'thiacytidine: synthesis and activity in hepatitis B and HIV-1 infected cells. Antiviral Res 1995;28:113-120.
5. Ling R, Mutimer D, Ahmed M, et al. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recepients with lamivudine. Hepatology 1996;3:711-713.
6. Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. Hepatology 1996;3:714-717.
7. Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, et al. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. Lancet 1997;9044:20-22.
8. Honkoop P, Niesters HG, de Man RA, Osterhaus AD, Schalm SW. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. J Hepatol 1997;26:1393-1395.
9. Lai Cl, Liaw YF, Leung NWY, et al. Genotypic resistance to lamivudine in a prospective, placebo-controlled multicenter study in Asia of lamivudine therapy for chronic hepatitis B infection: incidence, kinetics of emergence, and correlation with disease parameters. Hepatology 1997;26:259A.
10. Ladner SK, Miller TJ, King RW. The M539V polymerase variant of human hepatitis B virus demonstrates resistance to 2'-deoxy-3'-thiacytidine and a reduced ability to synthesize viral DNA. Antimicrob Agents Chemother 1998:42(8):2128-2131.
11. Allen MI, Deslauriers M, Andrews W, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Hepatology 1998;27:1670-1677.
12. Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and retakeover by wild type after cessation of therapy. Hepatology 1998;27:1711-1716.
13. 천병렬, 이미경, 노윤경. 문헌분석에 의한 한국인의 B형 간염 바이러스 표면항원 양성률. 한국역학회지 1992;14(1):54-62.
14. Hoofnagel JH, Peters M, Mullen KD, et al. Randomized controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic hepatitis B. Gasroenterology 1988;95:1318-1325.
15. Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J. Effects of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B: A meta-analysis. Ann Intern Med

1993;119:312-323.
16. 한남익, 이창돈, 최상욱 등. B형 만성 활동성 간염에 대한 천연형 interferon alpha의 안전성 및 효과. 대한소화기병학회지 1989;21:358-368.
17. 박재용, 탁원영, 김성륵 등. B형 간염 바이러스에 의한 만성활동성 간염 환자에서 알파 인터페론의 치료효과. 대한소화기병학회지 1990;22:310-3l6.
18. 최예원, 박승욱, 김규태 등. 만성 B형 간염환자에서 인터페론의 용량에 따른 치료효과. 대한내과학회지 1991;41:37-42.
19. Zoulim F, Trepo C. Nucleoside analogs in the treatment of chronic viral hepatitis. Efficiency and complications. J Hepatol 1994;21:142-144.
20. Schalm SW, de Man RA, Heijtink RA, Niesters HGM. New nucleoside analogues for chronic hepatitis B. J Hepatol 1995;22(suppl 1):52-56.
21. Tyrrell DLJ, Mitchell MC, de Man RA, et al. Phase II trial of lamivudine for chronic hepatitis B [Abstract]. Hepatology 1993;18:112A.
22. Dienstag JL, Perillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, Rubin M. A preliminary trial of lamivudine for chronic viral hepatitis B infection. N Engl J Med 1995;333:1657-1661.
23. Lai CL, Chein RN, Leung WY, et al. A one year trial of lamivudine for chronic hepatitisB. N Engl J Med 1998;339(2):61-68.
24. 김진석, 한광협, 정효영 등. 만성 B형 간질환 환자에서 lamivudine 투여의 장기적인 치료효과. 대한간학회지 1999;5(1):S9.
25. Poch O, Sauvaget I, Delarue m, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase dependent polymerase encoding elements. EMBO J 1989;8:3867-3874.
26. Tisdale M, Kemp SD, Parry NR, Larder BS. Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:5653-5656.
27. Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, et al. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Hepatology 1999;29:889-896.
28. Schuurman R, Nijhuis M, Leeuwen RV, et al. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine(3TC). JID 1995;171:1411-1419.
29. Ji J, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying a hypervariable region of the HIV-1 *env* gene. Virology 1994;199:323-330.
30. Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. Hepatology 1998;27:628-633.