

만성 C형 간질환에서의 혈청내 C형 간염바이러스 정량

김영아 · 김현숙 · 조동희* · 한광협**

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실, 내과학교실**, 성균관대학교 의과대학 임상병리학과교실*

Quantification of Serum Hepatitis C Virus in Patients with Chronic C Viral Liver Disease

Young Ah Kim, M.D., Hyon-Suk Kim, M.D., Dong Hee Cho, M.D.*, and Kwang Hyub Han, M.D.**

Departments of Clinical Pathology, and Internal Medicine**, Yonsei University College of Medicine;
Department of Clinical Pathology, Sungkyunkwan University College of Medicine*, Seoul, Korea

Background : The quantification of hepatitis C virus (HCV) is useful in diagnosis and monitoring of HCV infection. We evaluated clinical usefulness of HCV quantification and two quantification methods using different assay principles.

Methods : HCV RNA quantities and liver function were measured in patients with different disease severity using bDNA assay (Quantiplex™, Chiron, USA). HCV RNA loads were quantified at the time of pre/post-interferon treatment in some of them using RT-PCR hybridization assay (AMPLICOR™, Roche, USA). These two quantification methods were also compared.

Results : HCV RNA loads showed no significant difference according to disease severity (group I, 3.8 ± 5.3 MEq/mL; group II, 3.8 ± 7.4 MEq/mL; group III, 5.9 ± 13.0 MEq/mL; $P=0.181$) or interferon response (complete responders, 1.5×10^5 /mL; partial or non responders, 2.2×10^5 /mL; $P=0.670$). But HCV viral loads decreased at 6th month after interferon treatment ($P=0.063$) and correlated poorly with liver function tests. The bDNA assay correlated well with the RT-PCR hybridization method ($r^2=0.854$).

Conclusions : The quantification of HCV RNA is useful in following up treatment effect but not in predicting therapeutic failure or assessment of disease severity. HCV RNA quantities are independent of liver function. The bDNA assay showed good correlation with the RT-PCR hybridization method. (*Korean J Clin Pathol* 1998; 18: 603-7)

Key words : HCV, Quantification, Branched DNA (bDNA) assay, RT-PCR hybridization

서론

활동적인 바이러스 복제의 지표로 지금까지 널리 사용된 간효소치의 증가와 HCV PCR의 양성소견은 간세포의 파괴가 광범위하게 진행된 경우 간효소치가 정상상을 보일 수 있고, HCV PCR로는 복제의 정도를 알 수 없다는 단점이 있다. HCV RNA의 정량은 바이러스의 복제정도를 알 수 있으며 진행된 간경변이나 간암에서 간세포의 파괴가 진행되어 간기능 검사상 정상상을 보이는 환자에서도 유용하다.

저자들은 HCV RNA의 정량이 만성 C형 간질환의 진행정도, 인터페론 치료 후 경과와 추적, 치료시 반응을 예측하는 지표로서 유용한지 알아보려고 하였다. 또 현재 사용 가능한 정량법인 bDNA 법과 RT-PCR 보합법을 평가해 보고자 두 방법의 상관성 및 민감도를 검토해 보았다.

대상 및 방법

1. 대상

1996년 8월부터 1997년 8월까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에 내원한 115명의 만성 C형 간질환을 대상으로 하였다. 조직학적 진단, 영상진단 및 검사실적 소견으로 대상환자를 무증상 보균자(I군, 15명), 만성간염 환자(II군, 54명) 및 간경변이나 간암

접 수 : 1998년 3월 23일 접수번호 : KJCP1141
수정본접수 : 1998년 7월 28일
교 신 저 자 : 김 현 숙
우 135-720 서울특별시 강남구 도곡동 146-92
영동세브란스병원 임상병리과
전화 : 02-3497-3531, Fax : 02-3462-9493

환자인 진행된 간질환군(III군, 46명)으로 분류하였다. 모든 대상 환자에서 bDNA법으로 HCV RNA를 정량하였고, AST, ALT 및 총빌리루빈 등의 간기능 검사도 시행하였다. 이중 30명의 만성 간염 환자에서는 RT-PCR 보합법을 이용하여 인터페론(인터페론, Inatamax, LG화학, 15명; 로페론, Roferon, Roche, 15명) 치료 전 후의 HCV RNA 정량도 실시하였는데, 경과 관찰이 가능했던 27명을 완전반응군과 그 외의 군(무반응군과 부분반응군 포함)으로 분류하였다. 치료 6개월 후 간기능이 정상화되고 HCV RT-PCR 음성인 경우 완전반응군으로 분류하였다. 검체는 무균적으로 정맥채혈 후 혈청분리하여 -20°C 에서 보관하였던 혈청을 사용하였다.

2. 방법

1) bDNA법

bDNA법은 sandwich nucleic acid hybridization법으로 혈청내의 HCV RNA의 5' untranslated region (UTR)과 중심부 유전자에 목표 표식자를 보합시켜 고정을 위한 표식자를 부착시킨 후 bDNA와 alkaline phosphatase가 부착된 증폭용 표식자를 이용하여 형광정도로 HCV RNA를 정량하고 있다.

Quantiplex™ HCV RNA 2.0 Assay (Chiron Diagnostics, USA)를 사용하였다. 결과는 HCV RNA megaequivalents per mL (MEq/mL)로 나타내었다. 1 MEq/mL은 3.2 Kb HCV RNA transcript 10^6 molecule과 동일한 양이다.

2) RT-PCR 보합법

RT-PCR 보합법의 원리는 RNA 표준물질과 혈청내 RNA transcript의 5' UTR을 함께 증폭시킨 후 발색반응으로 혈청내의 HCV RNA 양을 측정하는 것이다.

AMPLICOR™ HCV MONITOR™ (Roche Diagnostics, USA)를 사용하여 제조사의 술식에 따라 검사하였다. HCV RNA copy numbers/mL는 $[\text{total HCV optical density (OD)}/\text{total quantification standard (QS) OD}] \times \text{Input QS copies} \times 200$ (회색배수)으로 계산하였다.

3) HCV RT-PCR

혈청에서 HCV RNA를 추출하여 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 5' UTR에서 선택한 2쌍의 시발체로 nested RT-PCR을 시행하여 260 bp의 증폭산물을 agarose gel 전기영동 상에서 관찰하였다[1].

3. 결과의 분석

115명의 만성 C형 간질환에서 각 군의 HCV RNA 양의 차이는 Kruskal-Wallis test를 시행 검토하였고, 완전반응군과 그 외의 군 간의 치료전 HCV RNA 양의 차이는 윌콕슨 순위합 검정으로 검토하였다. 치료 전후의 C형 간염바이러스 양의 변화는 쌍을 이룬

T 검정으로 비교하였다. Quantiplex™ HCV RNA 2.0 Assay (Chiron Diagnostics, USA)와 AMPLICOR™ HCV MONITOR™ (Roche Diagnostics, USA)의 상관성, HCV RNA 양과 간기능 검사와의 상관성은 결정계수로 비교하였다. 통계적 분석은 DOS용 SAS 프로그램(version 6.04 for MS DOS, SAS Inc., USA)을 사용하였다.

결 과

1. 간질환 진행 정도에 따른 HCV RNA 양의 차이

총 115검체에서 bDNA법으로 정량을 실시하였다. I군(무증상 보균자, $n=15$)은 3.8 ± 5.3 MEq/mL, II군(만성간염, $n=54$)은 3.8 ± 7.4 MEq/mL이었으나 III군(진행된 간질환, $n=46$)에서는 평균 5.9 ± 13.0 MEq/mL로 좀 더 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P=0.181$, Fig. 1).

2. HCV RNA 정량과 간기능 검사와의 비교

혈청내 HCV RNA 양과 AST, ALT 및 총 빌리루빈등 간기능 검사를 비교하였으나, 결정계수(r^2)는 각각 0.001 (AST), 0.041 (ALT), 0.173 (총 빌리루빈)으로 유의한 상관성은 관찰되지 않았다. 이중 만성간염 환자에서만만의 상관성을 살펴보았으나 결정계수(r^2)는 각각 0.004 (AST), 0.014 (ALT), 0.129 (총빌리루빈)로 유의성은 역시 없었다.

3. 치료에 대한 반응 예측인자 및 경과 관찰을 위한 HCV RNA의 정량의 유용성

정량은 RT-PCR 보합법으로 하였다. 치료 전 HCV RNA 양은

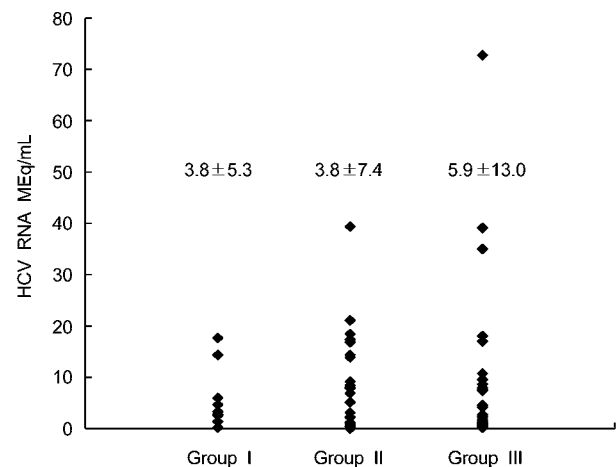


Fig. 1. HCV RNA loads measured in group I (asymptomatic carrier), group II (chronic hepatitis) and group III (advanced liver diseased patients).

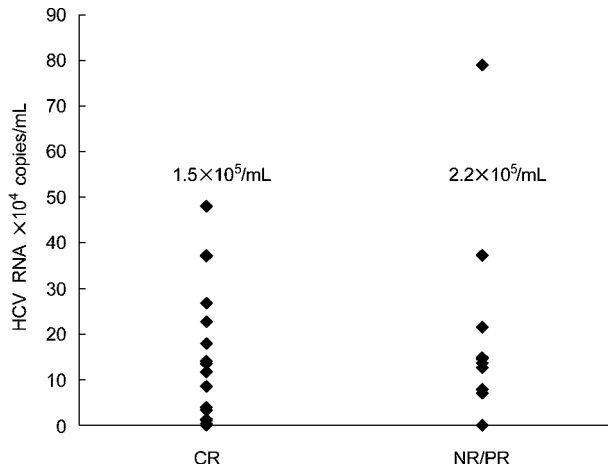


Fig. 2. HCV RNA loads measured in complete responder (CR) and non responder (NR)/partial responder (PR).

완전반응군(n=17)에서는 평균 1.5×10^5 /mL, 그 외의 군(n=10)에서 2.2×10^5 /mL로 의미있는 차이는 없었다($P=0.670$, Fig. 2). 이중 10명에서 치료 2개월 후 정량을 실시한 결과 무반응군 1명(1.8×10^5 /mL)을 제외한 9명에서 HCV RNA가 검출되지 않았다. 치료 6개월후 HCV RNA양은 치료 전에 비하여 감소하였다(n=30, $P=0.063$, Fig. 3).

4. bDNA법과 RT-PCR 보합법의 상관성

HCV RT-PCR 양성검체로 두 방법을 비교해 보았을 때 bDNA법으로 측정시 평균 5.6 MEq/mL며, RT-PCR 보합법으로 측정시 평균 1.3×10^5 /mL이었고, 결정계수(r^2)는 0.854이었다(n=20). 두 방법으로 측정된 값의 차이(bDNA법, MEq/mL; RT-PCR 보합법, $\times 10^5$ /mL)로 평균과 표준편차를 구하여, 평균+4× 표준편차

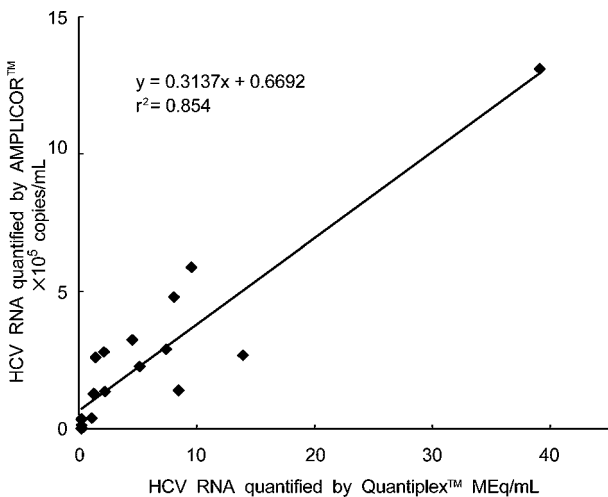


Fig. 4. Method comparison between Quantiplex™ HCV RNA 2.0 Assay (Chiron diagnostics, USA) and AMPLICOR™ HCV MONITOR™ (Roche Diagnostics, USA).

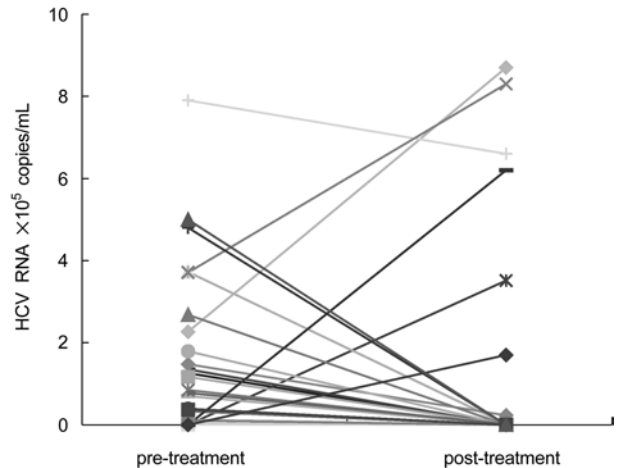


Fig. 3. HCV RNA loads measured in C viral chronic hepatitis at the time of pre and post interferon treatment.

이상의 차이를 보이는 것은 outlier로 간주하여 제외시켰다. bDNA법으로 최소검출농도 0.2 MEq/mL 이하로 측정된 4검체는 RT-PCR 보합법으로 $8.4-1.2 \times 10^4$ /mL로 측정되었다(Fig. 4).

5. HCV PCR과 bDNA법의 비교

만성 C형 간질환 84검체에서 bDNA법과 HCV PCR을 비교한 결과 HCV PCR에서 모두 양성을 보였으며, 이때 HCV RNA 양은 평균 10.0 MEq/mL이었으며, 전체 38%(32/84)에서 bDNA법으로 최소검출농도 0.2 MEq/mL이하로 검출되었다.

고 찰

Hepatitis C virus (HCV) 감염을 진단하고 경과를 관찰하기 위해서는 간효소치 등 간기능 검사뿐만아니라 항-HCV 항체 검사, recombinant immunoblot assay (RIBA), HCV PCR 및 HCV RNA 정량 등의 항체나, genome의 직접 검출법이 널리 사용되고 있다. 간효소치의 증가와 HCV PCR의 양성조건은 활동적인 바이러스 복제의 지표이나, 간세포의 파괴가 광범위하게 진행된 경우 간효소치가 정상을 보일 수 있고, HCV PCR로는 복제의 정도를 알 수 없다는 단점이 있어 HCV RNA의 정량이 필요하게 되었다.

지금까지 간질환의 진행 정도와 HCV RNA 양과의 상관성에 대해 알려진 바로는 만성 지속성간염군, 만성 활동성간염군, 간경변을 동반한 군에서 바이러스 양을 측정해 보았을 때 만성 지속성간염군과 다른 군 사이에 의미있는 차이가 있었다고 하며[2,3], anti-liver-kidney microsomal (anti-LKM1) 자가항체가 있는 만성간염 환자의 경우 다른 만성간염 환자에 비해 바이러스 양이 낮았다는 보고가 있다[4]. 저자들이 만성 C형 간질환에서 무증상 보균자(I군), 만성간염(II군) 및 진행된 간질환군(III군)으로 간질환 진행 정도에 따라 HCV RNA 양을 비교해본 결과 I군 3.8 ± 5.3 MEq/

mL, II군 3.8±7.4 MEq/mL, III군 5.9±13.0 MEq/mL로 통계적으로 유의한 차이는 없었지만, 간경변이나 간암같이 진행된 간질환의 경우 좀 더 HCV RNA 양이 많았다.

전체 대상군에서 AST, ALT 및 총빌리루빈 등 간기능 검사와 HCV RNA 양을 비교한 결과 유의한 상관성은 관찰되지 않았으며, 만성간염 환자에서도 상관성은 낮았다. 이는 간기능이 정상인 사람에서도 바이러스의 양이 높은 경우가 있으며[5], 혈청 ALT가 높은 군과 낮은 군간에 혈청 C형 간염바이러스의 양의 차이가 없었다는 보고와 일치하며[6], 간기능 검사와는 별도로 HCV RNA 정량을 실시하는 것이 유용하겠다. 치료 6개월 후 HCV RNA 양은 치료 전에 비하여 감소하여 HCV RNA 정량이 인터페론 치료 후 경과 관찰에 사용될 수 있겠다.

또 인터페론 치료결과를 예측할 수 있는 인자로 치료 전 HCV RNA 양이 고려되고 있다. 흔히 알려진 나이, 감염경로, 간경변 유무, 질병지속정도 등의 예측인자뿐 아니라, 최근에는 유전자형 및 치료 전 HCV RNA 양이 중요한 역할을 하리라 생각되고 있다. 치료 전 HCV RNA 양이 적은 경우 많은 환자에서 완전반응 또는 지속적인 반응을 보인다는 보고들이 있다[7-13]. 하지만 본 연구에서는 만성 C형 간염 환자에서 치료 전 HCV RNA 양을 측정해본 결과 완전 반응군에서는 평균 1.5×10^5 /mL, 그 외의 군에서 2.2×10^5 /mL ($P=0.670$, Wilcoxon rank sum test)로 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. 아마도 완전반응군의 대조군이 대부분 부분반응군이었기 때문에 보고된 바와 같은 유의한 차이는 보이지 않은 것으로 생각된다.

또 치료 초기(치료후 1주, 4주)의 HCV RNA의 양의 감소가 치료효과를 예측하는 지표로 유용하다는 보고가 있지만[7], 저자들이 10명에서 치료 2개월 후 정량을 실시한 결과는 무반응군 1명 (1.8×10^5 /mL)을 제외한 9명에서 HCV RNA가 검출되지 않아 유의한 차이는 없어 보였다. 지금까지 알려진 바로는 반응군과 무반응군 모두 치료후 HCV RNA가 감소하다가 무반응군에서는 간조직이나 단핵구 등에 격리되어 있던 HCV RNA가 재활성화되어 치료후 다시 증가한다고 한다. 대부분의 완전반응 후 지속적인 반응을 보인군에서는 혈청뿐 아니라 간조직에서도 HCV RNA가 음성이나 그렇지 않은 군에서는 혈청과 간조직 모두에서 HCV PCR이 양성이었다는 보고가 있다[12].

C형 간염바이러스는 다양한 유전적 구조를 가지고 있어 적어도 6개 이상의 유전자아형이 보고되어있다[14]. 따라서 정량방법을 선택할 때에는 유전자아형에 영향을 받지 않는 방법이 고려되어야 할 것이다. 여기서 사용한 bDNA법인 HCV RNA 2.0을 이용한 검사에서는 유전자아형에 따라 측정에 영향을 받던 HCV RNA 1.0을 보완한 방법으로, 사용하는 목표 표식자가 6종의 유전자아형의 염기서열에 기초하여 합성되어 이에 영향을 받지않는 검사법으로 알려져 있다[15]. 하지만 competitive RT-PCR (Roche monitor, USA)를 사용한 HCV RNA 정량법은 유전자아형간에 민감성 차이가 큰 것으로 알려져 있다[16].

RT-PCR 보합법과 bDNA법을 비교해 본 결과 서로 다른 검사 원리를 사용하고 있지만 좋은 상관성을 보인다는 보고가 있으며

[17, 18], 저자들도 두 방법의 비교한 결과 결정계수(r^2)는 0.854 ($n=20$, outlier제외)로 비교적 상관성이 좋았다. 지금까지 알려진 바로는 RT-PCR 보합법이 bDNA법보다 민감한 것으로 알려져 있는데[17, 19], 여기서도 bDNA 법으로 최소검출농도 0.2 MEq/mL이하로 측정된 4 검체가 RT-PCR 보합법으로 $8.4-1.2 \times 10^4$ /mL로 측정되었다. bDNA법은 HCV RNA의 증폭없이 신호의 증폭으로 측정하는 방법이므로 민감도는 떨어진다고 생각된다. HCV RT-PCR와 bDNA법을 비교시 전체의 38%(32/84)에서 HCV RT-PCR로는 양성이었으나 bDNA법으로 최소검출농도 이하이므로, HCV RT-PCR이 bDNA법보다 좀더 민감한것으로 생각되었다.

결론적으로 HCV RNA 정량을 질병의 진행정도나 치료반응을 예측하는데 사용시 명백한 임상적인 유용성은 없었지만, 치료경과의 추적시 간기능 검사나 HCV RT-PCR과는 별도의 유용한 지표로 생각되었다.

요 약

배경: HCV RNA 정량법으로 branched DNA (bDNA)법과 RT-PCR 보합법이 주로 사용된다. 저자들은 만성 C형 간질환에서 질환의 진행정도, 인터페론 치료경과의 예측 및 경과관찰에 HCV RNA 정량검사가 유용한지 알아보았다.

방법: 전체 대상환자에서 혈청내 HCV RNA를 bDNA법(Quantiplex™, Chiron, USA)으로 정량하고, 간기능 검사를 실시하였다. 인터페론 치료 전 후의 HCV RNA 정량은 RT-PCR 보합법(AMPLICOR™, Roche, USA)으로 측정하였다. bDNA법을 RT-PCR 보합법과 비교하였다.

결과: 총 115예에서 HCV RNA 정량을 실시하였고 간질환의 진행정도에 따라 혈청내 HCV RNA 양을 비교한 결과 유의한 차이는 없었다($P=0.181$). HCV RNA 정량과 간기능 검사간에 유의한 상관성은 관찰되지 않았다. 인터페론 치료 전 HCV RNA의 양은 완전 반응군과 그 외의 군간에 차이가 없었으나($P=0.670$), 치료 6개월 후 HCV RNA양은 치료 전에 비하여 감소하였다($P=0.063$). RT-PCR 보합법과 bDNA법을 비교한 결과 비교적 상관성이 좋았다($r^2=0.854$).

결론: HCV RNA 정량은 치료경과를 추적하는데 유용한 지표로 생각되었으며, 간기능 검사와는 별도의 유용한 지표라 생각된다. bDNA법과 RT-PCR 보합법은 서로 다른 검사원리를 사용하고 있지만 상관성은 비교적 좋았다.

참고문헌

1. 김현숙, 정석훈, 권오현, 홍석현, 예병일, 한광협 등. 제3세대 효소면역법 C형 간염 진단용 국산시약 HCV 3.0과 RIBA 및 HCV-PCR 결과. 임상병리와 정도관리 1994; 16: 307-16.
2. Kato N, Yokosuka O, Hosoda K, Ito Y, Ohto M, Omata M. Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcrip-

- tion-polymerase chain reaction: increased of the virus in advanced liver disease. *Hepatology* 1993; 18: 16-20.
3. Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, Naito M, Kasahara A, Fusamoto H, et al. Quantification of hepatitis C virus RNA in serum of asymptomatic blood donors and patients with type C chronic liver disease. *Hepatology* 1993; 17: 545-50.
 4. Manzin A, Solfrosi L, Bianchi D, Gabrielli A, Giostra F, Bruno S, et al. Viral load in samples from hepatitis C virus (HCV)-infected patients with various clinical conditions. *Res Virol* 1995; 146: 279-84.
 5. Alberti A, Morsica G, Chemello L, Gavalletto D, Noventa F, Pontisso P, et al. Hepatitis C viremia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* 1992; 340: 697-8.
 6. Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Gournay J, Gabriel F, Courtois F, Branger M, et al. Detection and quantification of serum HCV-RNA by branched DNA amplification in anti-HCV positive blood donors. *J Hepatol* 1994; 20: 676-8.
 7. Lau JYN, Davis GL, Kniffen J, Qian KP, Urdea MS, Chan CS, et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993; 341: 1501-4.
 8. Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, et al. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 22: 1050-6.
 9. Yuki N, Hayashi N, Kasahara A, Hagiwara H, Takehara T, Oshita M, et al. Pretreatment viral load and response to prolonged interferon-alfa course for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1995; 22: 457-63.
 10. Yamada G, Takatani M, Kishi F, Takahashi M, Doi T, Tsuji T, et al. Efficacy of interferon alfa therapy in chronic hepatitis C patients primarily on virus RNA level. *Hepatology* 1995; 22: 1351-4.
 11. Karino Y, Toyota J, Sugawara M, Higashino K, Sato T, Ohmura T, et al. Early loss of serum hepatitis C virus RNA can predict a sustained response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 61-5.
 12. Davis GL and Lau JYN. Choice of appropriate end points of response to interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1995; 22: 110-4.
 13. Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, Takehara T, Kasahara A, Fusamoto H, et al. Quantification analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alfa therapy. *Gastroenterology* 1993; 104: 877-83.
 14. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-9.
 15. Detmer J, Lagier R, Flynn J, Zayati C, Kolberg J, Collins M, et al. Accurate quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA from all HCV genotypes by using branched-DNA technology. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 901-7.
 16. Hawkins A, Davidson F, Simmonds P. Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1, 2, and 3 by Quantiplex HCV RNA assay version 1 and 2, Roche Monitor assay, and in-house limiting dilution method. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 187-92.
 17. Bresters D, Cuypers HTM, Reesink HW, Mauser-Bunschoten EP, van den Berg HM, Schaasberg WP, et al. Comparison of quantitative cDNA-PCR with the branched DNA hybridization assay for monitoring plasma hepatitis C virus RNA levels in hemophilia patients participating in a controlled interferon trial. *J Med Virol* 1994; 43: 262-8.
 18. Toyoda H, Nakano S, Kumada T, Takeda I, Sugiyama K, Osada T, et al. Comparison of serum hepatitis C virus RNA concentration by branched DNA probe assay with competitive reverse transcription polymerase chain reaction as a predictor of response to interferon-alfa therapy in chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 1996; 48: 354-9.
 19. Mayerat C, Burgisser P, Lavanchy D, Mantegani A, Frei PC. Comparison of a competitive combined reverse transcription-PCR assay with a branched-DNA assay for hepatitis C virus RNA quantification. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2702-6.