

## B형 간염 표면항원과 표면항체 공존예에서의 HBV-DNA 검출을 위한 분자생물학적 방법 비교

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실, 내과학교실\*

김문정 · 김현숙 · 권오현 · 한광협\*

= Abstract =

### Comparison of Molecular Biologic Methods for Detecting HBV-DNA in the Sera which Showed Both Hepatitis B Surface Antigen and Antibody Positivity

Mun Jeong Kim, M.D., Hyon Suk Kim, M.D., Oh Hun Kwon, M.D. and Kwang Hyub Hahn, M.D.\*

*Department of Clinical Pathology, Department of Internal Medicine\*,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background** : Serologic markers are used to screen and diagnose the hepatitis B virus infection. In endemic area of hepatitis B, the coexistence of HBsAg and anti-HBs was frequently observed. This finding is unusual and difficult to interpret. In this study, we performed three molecular biologic assays-polymerase chain reaction (PCR), chemiluminescent molecular hybridization assay (CMHA), branched DNA (bdNA) nucleic acid hybridization assay- to detect HBV-DNA in the sera which showed both HBsAg and anti-HBs positivity. To define the patients' exact clinical conditions, we analysed the characteristics of the patients according to their diagnoses, other serologic markers and clinical findings.

**Methods** : HBsAg and anti-HBs were detected by EIA (Enzygnost, Behringwerke, Germany) from clinical specimens of Yonsei University College of Medicine Severance Hospital collected in the period between January 1996 and

〈접수 : 1997년 9월 2일〉 〈접수번호 : 1066〉

〈수정본 접수 : 1997년 9월 25일〉

\*교신저자 : 김 문 정

서울특별시 서대문구 신촌동 134

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실 (TEL : 361-6495, FAX : 313-0956)

December 1996. Eighty three specimens from Severance Hospital and twenty two specimens from Health Care Center were randomly selected and were subjected to HBV PCR, HBV CMHA and HBV bDNA assay for the presence of HBV-DNA.

**Results :** The patients were arbitrarily divided into 4 groups on the basis of the optical density values of enzyme immunoassay results. Group I (high HBsAg and high anti-HBs) consisted of 6 cases; group II (high HBsAg and low anti-HBs) consisted of 70 cases; group III (low HBsAg and high anti-HBs) consisted of 1 case; group IV (low HBsAg and low anti-HBs) consisted of 6 cases. Among 83 cases, the positive rate was 51.8% (43 cases) using PCR method, 53.0% (44 cases) using CMHA, 60.2% (50 cases) using bDNA assay. HBeAg and anti-HBc IgM were helpful to predict the presence of HBV-DNA in the sera.

**Conclusions :** More than half of the patients who showed both HBsAg and anti-HBs positivity were positive for HBV-DNA by molecular biologic methods. In contrast, no one whose serologic markers with only anti-HBc positivity without HBsAg and anti-HBs positivity showed HBV-DNA positive in the sera from Health Care Center. Taken together, the management and follow-up of the patients of both HBsAg and anti-HBs positivity could be greatly aided by combined adoption of any one molecular biologic assay of HBV-DNA with other serologic markers such as HBeAg and anti-HBc IgM. (*Korean J Clin Pathol* 1997;17(6):1124~36)

**Key Words :** HBsAg, Anti-HBs, HBV-DNA, Polymerase chain reaction (PCR), Chemiluminescent molecular hybridization assay (CMHA), Branched DNA (bDNA) nucleic acid hybridization assay

## 서 론

B형 간염은 B형 간염바이러스 (hepatitis B virus, 이하 HBV로 약함) 감염에 의해 발생하는 질환으로 그 진단 및 치료에 B형 간염바이러스의 항원, 항체에 대한 혈청학적 검사가 필수적이다. 현재 흔히 사용되고 있는 B형 간염의 혈청학적 표지자로는 B형 간염바이러스 표면항원 (hepatitis B surface antigen, 이하 HBsAg라 약함), B형 간염바이러스 표면항체 (antibody to hepatitis B surface antigen, 이하 anti-HBs라 약함), B형 간염바이러스 core항체 (antibody to hepatitis B core antigen, 이하 anti-HBc라 약함), B형 간염바이러스 e항원 (hep-

atitis B e antigen, 이하 HBeAg라 약함) 및 B형 간염바이러스 e항체 (antibody to hepatitis B e antigen, 이하 anti-HBe라 약함) 등이 있다. 이 중 HBsAg과 anti-HBs는 건강검진이나 환자의 진단을 위한 선별검사로 널리 이용되고 있다. 우리나라는 B형 간염의 호발지역으로, 동일인의 혈청 내에서 HBsAg과 anti-HBs가 모두 양성인 경우가 가끔 관찰되는데, 이 경우 그 정확한 상태를 파악하여 진단 및 치료 방침을 결정하는데 어려움이 있다.

혈청학적 표지자 검사는 감염성 병원체에 대한 체내의 면역반응에 의해 생성되는 특이항체의 존재 유무를 확인하는 간접적인 방법이지만, 이를 통해 정확한 바이러스 존재 유무나 치료에 대한 직접적인 반응을 파악하기는 어렵다. 한편 HBeAg과 HBV-DNA poly-

merase 등이 바이러스의 복제력과 감염력의 지표로 추천되고 있으나(1) 이것 역시 간접적인 지표이고, 최근에는 분자생물학적 기법을 이용하여 직접 바이러스 유전자를 검출하는 방법이 선호되고 있다(2,3).

본 연구에서는 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성 소견을 보이는 혈청을 대상으로 중합효소연쇄반응법 (polymerase chain reaction, 이하 PCR로 약함)으로 HBV-DNA를 정성검사하고, 화학발광분자 보합결합법 (chemiluminescent molecular hybridization assay, 이하 CMHA로 약함)과 bDNA 법 (branched DNA nucleic acid hybridization assay, 이하 bDNA법으로 약함)으로 HBV-DNA를 정량하여, 혈청내 B형 간염바이러스 유전자 유무를 검사하였다. 그리고, HBV-DNA 측정 결과를 이들의 진단명과 기타 다른 혈청학적 지표 및 임상소견을 비교하여, HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성인 예의 특징을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상

1996년 1월부터 1996년 12월까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에 내원한 환자 중 HBsAg과 anti-HBs가 의뢰되어 효소면역측정법에서 모두 양성이었던 검체를 대상으로 하였다. 이를 다시 동일 방법으로 HBsAg과 anti-HBs가 동시 양성임을 확인하였고, 이 중에서 임의 선택한 83 검체를 대상으로 PCR, CMHA 및 bDNA법 등의 분자생물학적 검사를 실시하였다. 또한 대조군으로는 건강검진 대

상자 중 B형 간염 표지자 중 HBsAg과 anti-HBs가 모두 음성이고 anti-HBc만 양성인면서, 간효소치가 정상인 22예를 임의 선택하였다. 대상군의 검체는 무균적으로 정맥 채혈하여 즉시 혈청만 분리분주하여, 검사 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

공존 예들의 임상양상을 알아보기 위해 이들의 진단 및 다른 B형 간염바이러스의 혈청학적 표지자 (anti-HBc, HBeAg, anti-HBe) 와 간 기능 검사 (AST, ALT, total bilirubin) 결과를 조사하였다.

## 2. 방법

### 가. 혈청학적 검사

B형 간염 바이러스 표지자의 혈청학적 검사는 Enzygnost™ HBsAg, Enzygnost™ anti-HBs, Enzygnost™ anti-HBc, Enzygnost™ HBeAg, Enzygnost™ anti-HBe (Behringwerke, Marburg, Germany) 및 HBc IgM ELISA Plus (녹십자, 한국)를 사용하여 효소면역측정법으로 시행하였다. 이들의 결과를 임의로 흡광도치 차이에 따라 네 군으로 나누었으며, 각각의 높고 낮음의 기준은 환자 검체 결과의 흡광도치와 cut-off치의 차이가 2.0보다 큰 경우를 높다고 분류하였고 2.0보다 작은 경우를 낮다고 분류하였다(Table 1).

### 나. 중합효소연쇄반응법 (polymerase chain reaction, PCR)

#### (1) DNA 추출

DNA 추출에는 guanidine-detergent 용해액인 DNAzol™-유전자 DNA 분리시약 (Molecular

Table 1. Grouping of samples according to the optical density of HBsAg and anti-HBs by enzyme immunoassay

Group	Delta O. D. * of HBsAg	Delta O. D. * of anti-HBs	No. of cases (%)
Group I	> 2.0	> 2.0	6 ( 7.2)
Group II	> 2.0	< 2.0	70 (84.3)
Group III	< 2.0	> 2.0	1 ( 1.2)
Group IV	< 2.0	< 2.0	6 ( 7.2)
Total			83 (99.9)

\* : Delta O. D. = patient's O. D. - cutoff O. D.

**Table 2.** Synthetic oligonucleotide sequences used for amplification of HBV-DNA

Location	Nucleotide position (5'→3')	Sequence (5'→3')	Product size
X gene			
sense	1396 - 1416	AACTGGATCCTGCGCGGGACG	428 bp
antisense	1823 - 1803	AAAGCTTCATGGTGCTGGTGA	

research center Inc., OH, USA)을 이용하였다.

(2) 시발체 제조

HBV-DNA를 증폭하기 위한 oligonucleotide 시발체는 X 유전자에 특이한 것으로 380A DNA 합성기 (Applied Biosystems, CA, USA)로 합성하였다. 시발체의 위치 및 염기서열은 Table 2와 같다.

(3) PCR 증폭

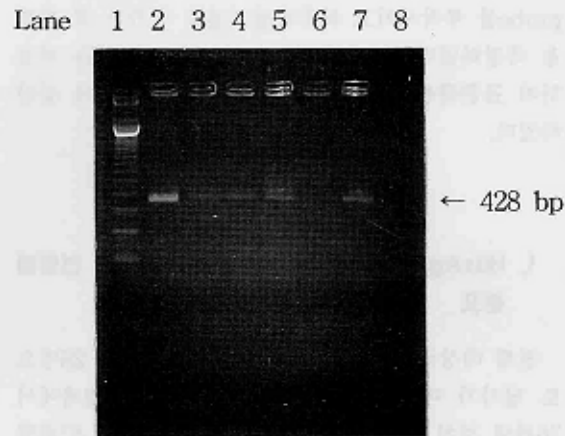
PCR을 위한 반응액은 최종 농도가 dNTP 20  $\mu$ M, TRIS/HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, DNA polymerase 0.1 U/ $\mu$ L이 되게 하였다. 검체에서 추출된 DNA 용액 2  $\mu$ L, 시발체 10 pmole씩을 반응액에 첨가한 후 증류수를 첨가하여 총 부피가 20  $\mu$ L가 되게 하였다. Thermal cycler PE9600 (Perkin Elmer Cetus, CT, USA)을 이용하여 94  $^{\circ}$ C에서 1분 45초간 pre-denaturation 후에, 94  $^{\circ}$ C에서 15초간 denaturation, 55  $^{\circ}$ C에서 15초간 annealing, 72  $^{\circ}$ C에서 30초간 extension 하는 과정을 35회 반복한 후 마지막으로 72  $^{\circ}$ C에서 10분간 post-extension시켰다.

(4) 증폭된 DNA의 분석

증폭된 PCR 산물 10  $\mu$ L를 취하여 2  $\mu$ L의 bromophenol blue loading dye에 혼합하고 1.5% agarose gel에서 molecular marker (123 bp DNA Ladder, Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)와 함께 100V 전압에서 30분 동안 전기영동하였다. 이를 ethidium bromide로 염색한 후 자외선투조기로 관찰하여 428bp 크기의 증폭산물이 관찰되면 양성으로 판독하였다 (Fig. 1).

**다. 화학발광분자보합결합법 (chemiluminescent molecular hybridization assay, CMHA)**

HBV-DNA 측정은 Digene Hybrid Capture™ system HBV-DNA Assay (Digene Diagnostics Inc., MD, USA) kit를 이용하여 HBV-



**Fig. 1.** Ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis of HBV-PCR products. The 428 base pair bands are main products amplified from the X gene. Lane 1, M, molecular marker with bands at 123, 246, 369, 492 and 615 base pairs; Lane 2, 3, 4, 5, 6, 7, PCR positive from both HBsAg and anti-HBs positive patient sera; Lane 8, PCR negative control without template DNA

DNA를 RNA probe가 부착된 표면에 결합시켜 RNA:DNA 접합시킨 후 alkaline phosphatase가 결합된 anti-RNA:DNA 결합항체를 반응시킨 후 화학발광기질을 첨가하여 조명기 (DCR-1™ Luminometer, Digene Diagnostics, Inc., MD, USA)로 relative light unit (RLU)를 측정하였다. 농도를 알고있는 표준물질을 이용하여 표준곡선을 산출하여 정량하였다.

**라. Branched DNA (bDNA)법**

Chiron사의 Quantiplex™ HBV-DNA Assay (Chiron Co., CA, USA) kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 검사하였다. bDNA법은 sandwich

nucleic acid hybridization법으로서 혈청으로부터 B형 간염 바이러스의 genomic DNA를 추출한 후 oligonucleotide target probe가 부착된 well에 반응시켰다. 반응을 통해 부착된 HBV-DNA에 branched DNA (bDNA) 증폭기를 부착시킨 후, 증폭기에 alkaline phosphatase-conjugated probe를 부착시키고 화학발광기질을 첨가한 후 발광을 측정하였다. 농도를 알고 있는 표준 물질을 이용하여 표준곡선을 산출하였으며, 이를 이용하여 정량하였다.

## 결 과

### 1. HBsAg과 anti-HBs 공존의 성별 및 연령별 분포

전체 대상군 83예 중 남자가 55명, 여자가 28명으로 남자가 여자의 약 2배이었다. 연령은 12세에서 76세에 걸쳐 분포되어 있었으며 평균 연령은 47세였다. 특히 40대에서 60대 사이의 연령군이 71.1%

Table 3. Distribution of the patients studied by age and gender

Age	Male(%)	Female(%)	Total(%)
10-19	2( 2.4)	1( 1.2)	3( 3.6)
20-29	7( 8.4)	1( 1.2)	8( 9.6)
30-39	7( 8.4)	3( 3.6)	10(12.0)
40-49	13(15.7)	9(10.8)	22(26.5)
50-59	16(19.3)	6( 7.2)	22(26.5)
60-69	9(10.8)	6( 8.4)	15(18.1)
70-79	1( 1.2)	2( 2.4)	3( 3.6)
Total	55(66.3)	28(34.9)	83(99.9)

Table 4. Distribution of diagnoses of the patients in the different groups

Diagnosis	Group I(%)	Group II(%)	Group III(%)	Group IV(%)	Total(%)
Asymptomatic carrier	-	12( 17.1)	1(100.0)	-	13( 15.7)
Chronic hepatitis	4( 66.7)	23( 32.9)	-	3( 50.0)	30( 36.1)
Liver cirrhosis	-	10( 14.3)	-	2( 33.3)	12( 14.5)
Hepatocellular carcinoma	2( 33.3)	25( 35.7)	-	1( 16.7)	28( 33.7)
Total	6(100.0)	70(100.0)	1(100.0)	6(100.0)	83(100.0)

로 대부분을 차지하였다(Table 3).

### 2. HBsAg과 anti-HBs 흡광도치의 고저에 따른 양상과 분포

흡광도치 2.0을 기준으로 그 차이가 높고 낮음에 따라 4개의 군으로 분류해 본 결과, I군은 6예 (7.2%), II군은 70예 (84.3%), III군은 1예 (1.2%), IV군은 6예 (7.2%)로 HBsAg의 흡광도치는 높고 anti-HBs의 흡광도치는 낮은 II군이 대부분을 차지하였다(Table 1).

### 3. 공존에서 간질환 빈도

HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성소견을 보인 환자들의 임상 진단은 무증상보유자가 13예, 만성간염 30예, 간경변 12예, 간세포암 28예였다(Table 4). 이들을 흡광도치의 고저에 따라 나눈 4개의 군과 함께 살펴보았다. I군은 만성간염 4예와 간세포암 2예를 포함하며, II군은 만성간염 23예, 간경변 10예 및 간세포암 25예이었다. III군은 무증상보유자 1예이었고, IV군은 만성간염 3예, 간경변 2예 및 간세포암 1예이 있었다.

### 4. 공존예들의 간기능 검사 결과

AST, ALT, total bilirubin이 정상인 경우가 각각 55.4%, 57.8%, 44.6%이었다(Table 5). HBsAg이 낮은 III군과 IV군의 경우, 간기능 검사 대부분이 정상 범위이었으며 정상치보다 증가한 경우도 경미한 정도의 증가만이 있었으나, HBsAg이 높은 I군과 II군의 경우는 참고치보다 심하게 증가된 경우가 반수정도로 III군과 IV군에 비해 다수에서 관찰되었다.

**Table 5.** Results of liver function tests among groups

Test	Group	No. of cases	Group I	Group II	Group III	Group IV	Total
			6(100.0%)	70(100.0%)	1(100.0%)	6(100.0%)	83(100.0%)
AST (IU/L)	0- 40		2( 33.3%)	37( 52.9%)	1(100.0%)	6(100.0%)	46( 55.4%)
	40- 99		1( 16.7%)	22( 31.4%)	-	-	23( 27.7%)
	100-199		2( 33.3%)	7( 10.0%)	-	-	9( 10.8%)
	200-299		-	1( 1.4%)	-	-	1( 1.2%)
	300≤		1( 16.7%)	3( 4.3%)	-	-	4( 4.8%)
ALT (IU/L)	0- 40		3( 50.0%)	39( 55.7%)	1(100.0%)	5( 83.3%)	48( 57.8%)
	40- 99		-	18( 25.7%)	-	1( 16.7%)	19( 22.9%)
	100-199		1( 16.7%)	10( 14.3%)	-	-	11( 13.3%)
	200-299		2( 33.3%)	1( 1.4%)	-	-	3( 3.6%)
	300≤		-	2( 2.9%)	-	-	2( 2.4%)
T. bil (mg/dL)	0.0-1.0		1( 16.7%)	34( 48.6%)	1(100.0%)	1( 16.7%)	37( 44.6%)
	1.0-2.4		5( 83.3%)	26( 37.1%)	-	4( 66.7%)	35( 42.2%)
	2.5-4.9		-	5( 7.1%)	-	1( 16.7%)	6( 7.2%)
	5.0-9.9		-	3( 4.3%)	-	-	3( 3.6%)
	10.0≤		-	2( 2.9%)	-	-	2( 2.4%)

### 5. 공존예에서 분자생물학적 HBV-DNA 검사법간의 결과 비교

정량법인 CMHA와 bDNA법은 10 pg/mL 이상을 양성으로 판독하였다. 세 가지 검사법에서 모두 양성인 경우는 39예이었고 모두 음성인 경우는 32예이었다. bDNA법에서만 양성인 경우는 3예이었으며, CMHA를 이용한 HBV-DNA 정량법에서는 음성이고 bDNA법과 PCR에서 양성인 경우가 3예, PCR에서만 음성이고 CMHA와 bDNA법에서 양성인 경우는 5예에서 관찰되었다(Table 6). HBV-DNA 검출법 중 PCR에서만 음성으로 나왔거나 CMHA에서만 음성으로 나온 군의 다른 혈청학적 지표들 비교한 결과 특이한 차이점은 발견하지 못하였다. HBV-DNA의 정량법인 CMHA와 bDNA법간의 상관분석을 시행한 결과 상관계수 0.923 ( $p < 0.05$ )으로 높은 상관관계를 보였다(Fig. 2).

### 6. 혈청학적 표지자의 흡광도치 고저에 따른 분자생물학적 검사 결과

대다수를 차지한 2군은 PCR, CMHA 및 bDNA

**Table 6.** Comparison of the results of HBV-DNA by PCR, CMHA and bDNA assay of 83 subjects

PCR <sup>1</sup>	CMHA <sup>2</sup>	bDNA assay <sup>3</sup>	No. of cases
+	+	+	39(47.0%)
+	-	+	3( 3.6%)
+	-	-	1( 1.2%)
-	+	+	5( 6.0%)
-	-	+	3( 3.6%)
-	-	-	32(38.6%)

<sup>1</sup> PCR : polymerase chain reaction

<sup>2</sup> CMHA : chemiluminescent molecular hybridization assay

<sup>3</sup> bDNA assay : branched DNA nucleic acid hybridization assay

법을 이용한 HBV-DNA의 양성률은 각각 57.1%, 58.6% 및 65.7%였으며, 3군과 4군의 경우 PCR과 CMHA로 HBV-DNA가 검출된 예는 관찰되지 않았다(Table 7).



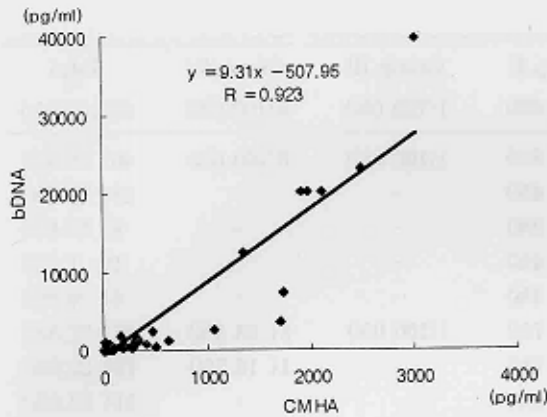


Fig. 2. Correlation of HBV quantitation between chemiluminescent molecular hybridization assay (CMHA) to branched DNA (bDNA) nucleic acid hybridization assay.

### 7. 진단명에 따른 분자생물학적 HBV-DNA 검사 양성률

질환에 따라 PCR, CMHA 및 bDNA법의 양성률을 비교한 결과 전체 양성률과 비슷한 양상이었으며 진단명에 따른 분자생물학적 HBV-DNA 결과 양성률의 차이는 관찰되지 않았다(Table 8). 대체로 bDNA법의 양성률이 높은 편이었으며 특히 무증상 보유자에서 다른 방법보다 양성률이 높았으나 통계학적 의의는 없었다( $p=0.06$ ).

### 8. 공존에 있어서 다른 B형 간염 표지자의 발현 양상

대상군 85예 중 HBeAg 양성, anti-HBe 음성인 경우는 36예 (43.4%), HBeAg 음성, anti-HBe 양성인 경우는 36예 (43.4%), 모두 음성인 예는 11

Table 7. Positive results of HBV-DNA assays

Group	HBsAg	anti-HBs	PCR <sup>1</sup>	CMHA <sup>2</sup>	bDNA assay <sup>3</sup>	Total
Group I	High	High	3(50.0%)	3(50.0%)	3(50.0%)	6
Group II	High	Low	40(57.1%)	41(58.6%)	46(65.7%)	70
Group III	Low	High	-	-	1(100.0%)	1
Group IV	Low	Low	-	-	-	6

<sup>1</sup> PCR : polymerase chain reaction

<sup>2</sup> CMHA : chemiluminescent molecular hybridization assay

<sup>3</sup> bDNA assay : branched DNA nucleic acid hybridization assay

Table 8. Positive rate of HBV-DNA assays according to the clinical diagnoses of the subjects who showed both HBsAg and anti-HBs positivity

Diagnosis	PCR <sup>1</sup>	CMHA <sup>2</sup>	bDNA assay <sup>3</sup>	Total
Asymptomatic carrier	9(69.2%)	8(61.5%)	12(92.3%)	13
Chronic hepatitis	15(50.0%)	15(50.0%)	16(53.3%)	30
Liver cirrhosis	6(50.0%)	6(50.0%)	6(50.0%)	12
Hepatocellular carcinoma	13(46.4%)	15(53.6%)	16(57.1%)	28

<sup>1</sup> PCR : polymerase chain reaction

<sup>2</sup> CMHA : chemiluminescent molecular hybridization assay

<sup>3</sup> bDNA assay : branched DNA nucleic acid hybridization assay

**Table 9.** Results of HBV-DNA assays according to HBeAg and anti-HBe positivity at the time of coexistence of HBsAg and anti-HBs

HBeAg	anti-HBe	No. of cases that showed positive results			
		PCR <sup>1</sup>	CMHA <sup>2</sup>	bDNA assay <sup>3</sup>	Total
-	-	4(36.4%)	3(27.3%)	4(36.4%)	11( 13.3%)
-	+	11(30.6%)	10(27.8%)	14(38.9%)	36( 43.4%)
+	-	28(77.8%)	31(86.1%)	32(88.9%)	36( 43.4%)
		43(51.8%)	44(53.0%)	50(60.2%)	83(100.1%)

<sup>1</sup> PCR : polymerase chain reaction

<sup>2</sup> CMHA : chemiluminescent molecular hybridization assay

<sup>3</sup> bDNA assay : branched DNA nucleic acid hybridization assay

**Table 10.** Results of HBV-DNA assays according to anti-HBc IgG and IgM positivity at the time of coexistence of HBsAg and anti-HBs

anti-HBc IgG	anti-HBc IgM	PCR <sup>1</sup>	CMHA <sup>2</sup>	bDNA assay <sup>3</sup>	Total
+	-	25(41.7%)	26( 43.3%)	31( 51.7%)	60( 72.3%)
-	+	-	1(100.0%)	1(100.0%)	1( 1.2%)
+	+	18(81.8%)	17( 77.3%)	18( 81.8%)	22( 26.5%)
		43(51.8%)	44( 53.0%)	50( 60.2%)	83(100.0%)

<sup>1</sup> PCR : polymerase chain reaction

<sup>2</sup> CMHA : chemiluminescent molecular hybridization assay

<sup>3</sup> bDNA assay : branched DNA nucleic acid hybridization assay

예 (13.3%)이었다(Table 9). 이들의 HBV-PCR, CMHA 및 bDNA법에서의 양성률을 살펴보면, HBeAg 음성, anti-HBe 양성인 군과 HBeAg, anti-HBe가 모두 음성인 군에서는 27.3%-38.9%로 유사한 양성률을 보였고, HBeAg 양성, anti-HBe 음성인 군에서는 77.8%-88.9%로 이에 비하여 높은 양성률이 관찰되었다( $p < 0.001$ ). Anti-HBc IgM의 경우도 양성인 군은 HBV-DNA의 검출율이 77.8%-100.0%로 anti-HBc IgM이 음성인 군의 41.7%-51.7%보다 높았다( $p < 0.001$ ) (Table 10).

## 고 찰

B형 간염바이러스 감염 진단을 위한 혈청학적 표지자 검사들이 다양하게 개발되어 있고 현재 유용하게 사용되고 있다. 그렇지만 때로는 혈청학적 검사

에서 예외적인 결과를 나타내는 경우가 있는데 예를 들면 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성을 보이는 경우이다. HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성소견을 보이는 예는 보고자에 따라 다르지만 HBsAg 양성 중 10-40% 정도로 드물지 않게 관찰되고 있으며 [4,5] 이의 임상적인 의미에 대해서는 여러 가지 의견이 많이 제시되어 왔다[6-8]. 우리 나라에서도 B형 간염바이러스의 혈청학적 표지자 검사 건수의 3.9-6.6%가 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 검출된다는 보고가 있으며[9,10], 환자의 성별과 나이는 본 연구와 유사하게 간질환이 많은 중년 남자가 대다수를 차지하였다. 본 연구 대상군에서도 HBsAg과 anti-HBs의 역가를 살펴볼 때, 항원의 역가는 높고 항체의 역가는 낮은 군이 84.3%로 대다수를 차지하였으며 이는 이전의 보고와 유사하였다[11].

본 연구에서는 B형 간염바이러스를 직접 검출하는



분자생물학적 검사방법으로 중합효소연쇄반응법, 화학발광분자보합결합법과 최근에 소개된 bDNA법을 사용하였다. 이들 방법에 의한 HBsAg anti-HBs 동시 양성 혈청에서의 HBV-DNA의 양성률은 각각 51.8%, 53.0%, 60.2%이었다. HBs Ag이 양성인 군에서의 HBV-PCR 양성률은 만성간질환 환자군에서는 90%이상으로[12], 간세포암 환자군에서는 77.4%로 보고되고 있으나[13], 본 연구에서는 대상군 자체가 HBsAg이외에도 anti-HBs가 동시 양성인 군이었기 때문인지 HBV-DNA 양성률이 51.8%에서 60.2%로 상대적으로 낮게 나타났다. HBsAg와 anti-HBs가 동시에 양성인 대상군에서의 HBV-DNA 양성률은 중합효소연쇄반응법과 화학발광분자보합결합법은 51.8%, 53.0%로 비슷한 양성률을 보였으나 bDNA법의 양성률이 60.2%로 좀 높았다. 화학발광분자보합결합법과 bDNA법은 모두 정량법이었으나, 화학발광분자보합결합법은 RNA와 DNA의 보합결합한 후 화학발광법으로 검출하였으며, bDNA법은 HBV-DNA에 특이한 탐침자를 이용하는 것으로서 혈청 속에 존재하는 바이러스의 유전자를 포획한 후, 포획된 유전자에 다시 탐침자와 증폭체를 반응시켜 검사하였다. 즉, bDNA법은 DNA자체를 증폭하는 PCR과는 달리 포획된 유전자에 탐침자와 증폭체를 반응시키는 것이기 때문에 PCR에서 문제되고 있는 위양성이 적으며 민감도가 높은 장점이 있다고 알려져 있다. bDNA법의 양성판정치는 제조사의 설명서에는 2.5 pg/ml이었으나 본 연구에서는 화학발광분자보합결합법과의 비교를 위하여 bDNA법의 양성판정치를 화학발광분자보합결합법의 양성판정치와 동일한 10.0 pg/ml로 정하였다. bDNA법의 경우 cut-off치를 2.5 pg/ml로 했을 때보다 cut-off치를 10.0 pg/ml로 제조정했을 경우 양성률이 많이 낮아졌으며 (79.5%→60.2%), 2.5 pg/ml에서 10.0 pg/ml 사이의 결과치를 보인 검체가 16에 있었다. bDNA법의 cut-off치를 10.0 pg/ml로 했을 경우에도 화학발광분자보합결합법보다 bDNA법의 양성률이 10.0% 가까이 높았으며 이는 다른 보고자들과 유사하였다[14, 15]. 본 연구에서는 이런 양성률의 차이가 bDNA법이 지나치게 높은 민감도를 가지는데 따른 위양성의 결과인지 정

말로 낮은 농도의 바이러스까지 검출하는데 따른 것인지에 대해서는 정확히 확인할 수 없었으나, 화학발광분자보합결합법과 bDNA법간의 상관계수가 0.923으로 매우 높으며, 원리자체가 HBV DNA에 특이한 probe를 사용하는 검사법이므로 이는 높은 민감도에 의한 것이라고 생각되었다. 여러 보고에서 가장 민감도가 높다고 알려져 있는 중합효소연쇄반응법의 양성률이 낮았는데, 아마도 이 원인은 시발체를 X유전자에 대한 것만을 사용했기 때문이거나 이중(nested) 중합효소연쇄반응이 아닌 일회 중합효소연쇄반응을 사용한 때문이라고 생각되었다. 대부분의 다른 보고자들은 pre-C 유전자나 C 유전자에 대한 시발체를 사용하거나, nested PCR을 이용하였으나, 간질환이 있는 환자의 간조직에서 추출된 HBV-DNA에서는 X유전자를 가장 많이 검출할 수 있었으며[16], 이는 혈청내 DNA 검출에 가장 예민하리라 생각되었기 때문에 본 연구에서는 X유전자에 대한 시발체를 사용하였다. 그러나, 혈청의 경우는 C유전자에 대한 시발체가 다른 유전자 부분에 대한 시발체에 비하여 민감하며 이외의 시발체는 민감도에 큰 영향을 주지 않는다는 보고도 있다[17]. 또한 본 연구에서는 대부분의 다른 보고자들이 사용한 DNA 추출방법[18]과 달리 상품화된 추출용액(DNAzol™, Molecular research center Inc., OH, USA)을 사용하였으나 이 차이가 민감도의 차이를 나타내지는 않았을 것으로 생각되었다. 또 다른 가능성으로는 중합효소연쇄반응법의 경우 반응액을 직접 만들어서 사용하였는데, 완전히 상품화된 화학발광분자보합결합법이나 bDNA법에 비해 민감도가 낮아지는 원인이 될 수도 있을 것으로 생각되었다.

세 가지의 HBV-DNA 검출법의 일치율을 살펴보면, PCR과 화학발광분자보합결합법은 89.2%이었고, PCR과 bDNA법은 89.2%이었으며, 화학발광분자보합결합법과 bDNA법은 92.5%로 대체로 우수하였다(Table 6).

HBsAg과 anti-HBs의 흡광도치를 기준으로 나눈 경우, 1군과 2군에서 3군과 4군에 비해 HBV-DNA 검사의 양성률이 다소 높은 듯 보이나 2군 이외에는 표본수가 너무 적기 때문에 이의 정확한 비

교는 어려울 것으로 생각되었다(Table 7).

진단에 따른 분류에 있어서는 bDNA법에서 대부분 다른 방법에 비해 상대적으로 높은 양성률을 보였지만, 수가 적어서 비교하기 어려웠다. 무증상보유자군과 만성간염, 간경변, 간세포암을 포함하는 만성간질환자군 두 개의 군으로 나누어 생각해 볼 때, 무증상보유자군의 HBV-DNA 검출율이 61.5%~92.3%로 만성간질환자군의 HBV-DNA 검출율 48.6%~54.3%에 비해 더 높은 듯하였으나 통계적 의의는 없었다( $p=0.06$ ) (Table 8).

HBeAg과 anti-HBs가 동시에 양성을 보이는 예의 임상적 해석을 위해 다른 혈청학적 표지자들과 분자생물학적 결과를 비교하여 보았을 때, 예상했던대로 바이러스 감염력의 지표로 생각되어지는 HBeAg이 양성인 군이 음성인 군에 비해 분자생물학적 HBV-DNA 검사법으로 높은 양성률을 보였으며 ( $p<0.001$ ), 급성 간염의 지표인 anti-HBc IgM도 양성인 군이 음성인 군에 비해 HBV-DNA의 검출률이 높았다( $p<0.05$ ). 이러한 이유는 HBeAg이 바이러스 복제시에 생성되며(19), anti-HBc IgM은 급성 간염이나 최근에 재발된 경우에 검출되기 때문으로 생각해 볼 수 있겠다(20,21). PCR, CMHA 및 bDNA법으로 실험한 결과 HBeAg 양성군에서는 각각 77.8%, 86.1%, 88.9%의 양성률을 보이고 (Table 9), anti-HBc IgM이 양성인 군에서는 81.8%, 77.3%, 81.8%의 양성률을 보이는 것으로 보아 (Table 10), HBeAg이나 anti-HBc IgM이 비교적 바이러스 존재를 예측할 수 있는 것으로 생각되었지만 바이러스 복제의 정확한 상황을 파악하기는 부족한 것으로 생각되었다.

HBeAg과 anti-HBs가 동시에 양성으로 나오는 원인에 대해서는 학자들에 따라 여러 가지 가설이 있는데(5, 22), 이를 항원과 항체가 실제로 동시에 존재하는 경우와 한 가지 혹은 두 가지 모두가 위양성인 경우로 나누어 생각해 볼 수 있다. 먼저 항원과 항체가 실제로 동시에 존재하는 경우, 과거에는 항원과 항체의 아형이 다른 중복감염의 경우로 생각했지만(4, 23-25), 최근에는 숙주의 면역체계의 이상이나 바이러스의 공통항원을 coding하는 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 생각되고 있다. 숙주의 면역

체계에 이상이 있는 경우, 공통항원인 "a"결정기에 대한 특이항체를 생성하지 못하고 anti-HBs와 유사한 항체를 만들게 되고, 이 항체는 면역학적 검사에서 HBeAg과 교차반응을 일으키며 바이러스에 대해서는 방어기능을 완전히 갖추지 못한 항체를 만들어 낸다. 이 때 검출된 낮은 역가의 항체에 대해서는 이들이 B형 간염바이러스에 대한 방어능력이 없으므로 음성으로 보고하도록 권장되고 있다. 바이러스 유전자에 돌연변이가 생기는 경우는, 특히 공통항원인 "a"결정기에 대한 항원을 coding하는 유전자에 변이가 있는 바이러스에 감염되었을 경우 이런 현상이 생긴다고 알려져 있다. 위양성의 가능성을 생각해 보면, 항원의 경우 대부분 높은 역가를 나타내었고 (91.5%), 항체의 경우 상대적으로 소수에서 높은 역가를 나타내었으므로(8.4%), 항원보다는 항체의 위양성이 더욱 의심된다 하겠으나 본 연구에 사용된 효소면역측정법은 민감도와 특이도가 높은 검사법으로서 공인된 것이었다. 그러나 이의 정확한 확인을 위해 다른 검사법, 즉 방사성동위원소면역측정법이나 다른 효소면역법의 시약을 가지고 확인하지는 못하였다.

또한 건강검진 선별검사에서 anti-HBc만이 양성인 검체를 대상으로 같은 분자생물학적 검사를 시행하여 항원이 항체에 의해 제거되는 기간동안 낮은 역가의 항원이나 면역복합체가 존재하기 때문에 민감도가 높은 검사에서 항원과 항체가 동시에 양성소견을 보일 것이라는 가설을 검증해 보고자 하였으나, 단 한 예에서도 바이러스를 증명하지 못하였다. 간질환 환자군을 대상으로 한 연구에서는 anti-HBc IgG만 양성인 만성간질환자 32명 중 6명에서 (19%) PCR을 이용하여 HBV-DNA를 검출하였고 보고되었으나(26), 본 연구에서는 대상군 22예 중 단 한 예에서도 PCR과 화학발광분자보합결합법으로 HBV-DNA가 검출되지 않았는데 이런 HBV-DNA 양성률의 차이는 대상군 차이에 기인할 것으로 생각되었다. 즉, 앞의 보고는 모두 만성간질환 환자를 대상으로 한 것이었지만, 본 연구에서는 무증상의 건강검진 대상군으로서 대상군 자체가 달랐으며, 또한 이때 HBV-DNA 양성이 하나도 없었던 것은 이들이 window period의 검체와는 다른 군이

라는 점을 시사한다 하겠다.

본 연구에서 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성을 보이게 되는 정확한 기전까지 밝힐 수는 없었지만, 이러한 예외 반수 이상에서 분자생물학적 HBV-DNA 검사 결과 혈청에 바이러스가 존재함을 알 수 있었고, 따라서 이러한 예를 해석할 때 항체 양성보다는 항원 양성에 더 관심을 가져야 할 것으로 생각되었다. 또한 이의 정확한 원인을 규명하고 예후와의 관계를 밝히기 위해서는 이들의 염기서열의 분석을 통해 유전자의 돌연변이를 검출하는 등의 연구가 더 필요하리라 생각되었다.

## 요 약

**배경** : B형 간염의 예방, 진단 및 치료에는 혈청학적 표지자 검사가 필수적이다. 드물지만 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 검출되는 경우가 있는데 이 경우 그 해석에 어려움이 있다. 본 연구에서는 HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성 소견을 보이는 혈청을 대상으로 분자생물학적인 HBV-DNA 검사 방법으로 혈청내 B형 간염바이러스 유전자를 검사하고, 이들의 진단명과 기타 다른 혈청학적 지표 및 임상소견을 비교하여, HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성인 예외 특징을 알아보고자 하였다.

**방법** : HBsAg과 anti-HBs가 동시에 검출되는 83예와 건강검진 대상자 중 anti-HBc만 양성인 22예를 임의 선택하여 혈청내의 HBV-DNA 검출을 위해 중합효소연쇄반응법 (polymerase chain reaction, PCR), 화학발광분자보합결합법 (chemiluminescent molecular hybridization assay, CMHA) 및 branched DNA (bDNA) 핵산보합결합법을 시행하였으며 병력과 혈청학적 표지자를 조사하였다.

**결과** : 83명의 대상군은 효소면역법으로 실시한 HBsAg과 anti-HBs 결과의 흡광도치에 따라 임의로 4군으로 나누었다. HBsAg와 anti-HBs의 흡광도치가 모두 높은 I군은 6예, HBsAg의 흡광도치는 높고 anti-HBs의 흡광도치는 낮은 II군은 70예, HBsAg의 흡광도치는 낮고 anti-HBs의 흡광도치는 높은 III군은 1예, HBsAg과 anti-HBs의 흡광도치가 모두

낮은 IV군은 6예이었다. PCR은 43예 (51.8%)에서, CMHA는 44예 (53.0%)에서, bDNA법을 이용한 경우에는 50예 (60.2%)에서 HBV-DNA 양성 결과를 보여, PCR과 CMHA는 비슷한 민감도를 보였으며, bDNA법은 이에 비하여 상대적으로 높은 민감도를 보였으나 통계학적 의의는 없었다 ( $p=0.06$ ). 세 가지 방법의 결과일치율은 각각 89.2%, 89.2%, 92.5%로 우수하였으며, 정량법인 CMHA와 bDNA법의 상관성도 우수하였다 ( $r=0.923$ ,  $p<0.05$ ). 혈청학적 표지자 결과는 흡광도치에 따라, 또는 진단명에 따라 HBV-DNA 검사의 양성률이 차이가 없었으나 HBeAg과 anti-HBc IgM의 양성군에서 음성군에 비해 분자생물학적 검사의 양성률이 높았다 ( $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ). 건강검진 대상자 중 선별검사서 anti-HBc만 양성이고 HBsAg과 anti-HBs는 음성이었던 22예에서는 모두 HBV-DNA가 검출되지 않았다.

**결론** : HBsAg과 anti-HBs가 동시에 양성인 경우 PCR은 51.8%, CMHA는 53.0%, bDNA법은 60.2%의 검체에서 HBV-DNA 양성이었다. 특히 예상했던대로 HBeAg과 anti-HBc IgM이 양성인 경우 음성인 경우에 비해 분자생물학적 HBV-DNA 검사의 양성률이 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). 특히 동일 혈청에서 항원과 항체가 동시에 양성이며, 항원의 흡광도치가 높을 경우 추후 임상적으로 깊은 관찰이 요망될 것으로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

1. Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 1973;12:995-1005.
2. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 324:1705-9.
3. Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patient-

- ts with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med* 1991;324:1699-1704.
4. Tsang TK, Blei AT, O'Reilly DJ, Decker R. Clinical significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody positivity. *Dig Dis Sci* 1986;31:620-4.
  5. Shiels MT, Taswell HF, Czaja AL, Nelson C, Swenke P. Frequency and significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody in acute and chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1987; 93:675-80.
  6. Trepo CG, Robert D, Matin J, Trepo M, Sepetjian J, Prince AM. Hepatitis B antigen (HBsAg) and /or antibodies (anti-HBs and anti-HBc) in fulminant hepatitis: pathogenic and prognostic significance. *Gut* 1976;17:10-3.
  7. Heijtkink RA, van Hattum J, Schalm SW, Masurel N. Co-occurrence of HBsAg and anti-HBs: two consecutive infections or a sign of advanced chronic liver disease? *J Med Virol* 1982;10:83-90.
  8. Fourch PG, Carey WD, Tabor E, Cianflocco AJ, Nakamoto S, Smallwood LA et al. Concomitant hepatitis B surface antigen and antibody in thirteen patients. *Ann Intern Med* 1983;99:460-3.
  9. 박찬정, 박영의, 조영숙, 이덕윤, 박갑만. B형 간염 표면 항원과 표면 항체 공존에와 그 의의. *대한임상병리학회지* 1987;7:321-34.
  10. 박규은, 박광수, 김현숙, 권오현, 정윤섭. 동일 검체내 B형 간염 표지자 검사 결과 항원 항체 동시 양성률 변화 분석. *임상병리와 정도관리* 1992;14:319-24.
  11. 김각현, 어영, 이경자, 윤갑준, 이경원. HBs항원 및 HBs항체의 공존에의 그 임상적 의의. *임상병리와 정도관리* 1989;11:139-44.
  12. 한기수, 이효량, 박중원, 유병철, 박실무. 만성 간질환을 가진 환자에서 중합효소연쇄반응법 (polymerase chain reaction: PCR)을 이용한 HBV DNA의 검출. *대한내과학회지* 1996; 51:367-72.
  13. 김영수, 이광재, 문영수, 함기백, 김진홍, 조성원 등. 간세포암에서 B형 간염바이러스와 C형 간염바이러스의 감염 양상. *대한간학회지* 1996; 2:61-7.
  14. Hendricks DA, Stowe BJ, Hoo BS, Kolberg J, Irvine BD, Neuwald PD, et al. Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. *Am J Clin Pathol* 1995;104:537-46.
  15. Butterworth LA, Prior SL, Buda PJ, Faoagali JL, Cooksley WGE. Comparison of four methods for quantitative measurement of hepatitis B viral DNA. *J Hepatol* 1996;24:686-91.
  16. 예병일, 황성규, 오상환. 인체 간세포암 조직 염색체 DNA에 삽입된 B형 간염 바이러스 DNA의 검출과 삽입 부위 구조의 결정. *대한소화기병학회지* 1994;26:529-40.
  18. 이창훈, 정종신, 송경순. HBV 중합효소연쇄반응에서의 시발체간 비교. *임상병리와 정도관리* 1995;17:305-12.
  18. 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
  19. Alter HF, Seef LB, Kaplan PM, McAuliffe VJ, Wright EC, Gerin JL et al. Type B hepatitis: the infectivity of blood positive for e antigen and DNA polymerase after accidental needle stick exposure. *N Engl J Med* 1976;295:909-13.
  20. Gerlich GH, Uy A, Lambrecht F, Thomssen R. Cut-off levels of IgM antibody against viral core antigen for differentia-

- tion of acute, chronic and past hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol* 1986; 24:288-93.
21. Koike K, Iino K, Kurai K, Mitamura K, Endo Y, Oka H. IgM anti-HBc in anti-HBe positive chronic type B hepatitis with acute exacerbations. *Hepatology* 1987;7:573-6.
22. Dienstag J. Concurrent hepatitis B surface antigen and antibody and the clonal selection theory of antibody diversity. *Gastroenterology* 1987;93:899-902.
23. Tabor E, Gerety RJ, Smallwood LA, Barker LF. Coincident hepatitis B surface antigen and antibodies of different subtypes in human serum. *J Immunol* 1977;118:369-70.
24. Courouce-Pauty A, Drouet J, Kleinknecht D. Simultaneous occurrence in the same serum of hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen of different subtypes. *J Infect Dis* 1979;140:975-8.
25. 박효진, 이은경, 김경희, 이상인, 문영명, 강진경 등. HBsAg과 anti-HBs가 모두 양성인 바이러스성 간질환 환자의 아형에 관한 연구. *대한내과학회잡지* 1988;34:452-9.
26. 윤정환, 이효석, 김정룡. 혈청 IgG anti-HBc만 양성인 만성간질환 환자에서의 HBV S영역 유전자 염기서열 분석. *대한간학회지* 1995;1:S1.