

## 만성 B형 간염 환자의 간조직내 B형 간염바이러스 유전자와 유전자 발현양상과의 상관관계

연세대학교 의과대학 내과학교실 및 소화기병연구소\*, 해부병리학교실\*\*

한광협 · 오승희\* · 전재윤 · 문영명 · 박인서 · 박영년\*\* · 박찬일\*\*

= Abstract =

### Hepatitis B Virus Genome and Genomic Expression(antigens) in the Liver Tissue of the Patients with Chronic Hepatitis B

Kwang Hyub Han, M.D., \*Seung Hee Oh, Chae Yoon Chon, M.D., Young Myung Moon, M.D.  
In Suh Park, M.D., \*\*Young Rhyun Park, M.D. and \*\*Chan Il Park, M.D.

Department of \*Internal Medicine, \*Institute of Gastroenterology and \*\*Department of Pathology,  
Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

To understand the pathogenesis of hepatitis B virus(HBV)-induced chronic liver disease, we studied the relationship between HBV DNA and antigens and subsequent correlation with pathologic findings in liver tissue.

Routine paraffin-embedded liver specimens from 52 patients with HBV related chronic liver diseases(HBV carrier 8, chronic persistent hepatitis 15, chronic active hepatitis 15, and liver cirrhosis 14) were evaluated by using in situ hybridization(ISH) and immunohistochemistry(IHC).

Using the IHC techniques, we detected intrahepatic HBcAg in all of 37 HBeAg positive patients and four of 15 HBeAg negative patients. However, regardless of the presence of HBeAg, HBsAg was detected in most of the patients. Using the ISH techniques, HBV DNA was detected in 23 of 37 HBeAg positive patients and 4 of 15 HBeAg patients. Intrahepatic distribution of HBcAg correlated well with the distribution of HBV DNA whereas HBsAg did not correlate well. According to the progression of the liver disease, the distributional pattern of intrahepatic HBV DNA and antigens was different. In addition, the simultaneous in situ detection analyses revealed that some hepatocytes containing high levels of HBV DNA were devoid of detectable HBcAg suggesting a mechanism by which restricted expression of HBV antigens on infected hepatocytes may escape host immune surveillance system resulting persistent HBV infection. (Korean J Gastroenterol 1994 ; 26 : 289-297)

**Key Words :** Hepatitis B virus, Chronic hepatitis B, Hybridization, Immunohistochemistry

### 서 론

B형 간염 바이러스는 급성 또는 만성간염을 일으키는 특이 DNA바이러스로 임상결과가 다양하며 일부

접수 : 1994년 3월 3일

본 연구는 1992년도 연세대학교 의과대학 학장연구비 지원에 의해서 이루어졌음.

환자에서는 감염 후 만성간염으로 지속되어 종국에는 간경변증이나 간암으로 진행될 수 있다. 우리나라는 B형 간염 바이러스 만연 지역으로 전인구의 약 5-10 %가 만성 B형 간염 바이러스 보균자로 이중 상당수는 수직감염을 통해 보균자가 되어 오랜 보균 기간동안에 만성간염, 간경변증으로 진행되고 있다.

아직까지 B형 간염 바이러스로 인한 만성 간질환의 병태생리 기전이 충분히 규명되지 않고 있는 상태로

이에 대한 충분한 규명이 이루어지어야 만이 만성 간질환의 효과적 치료가 가능하리라 생각된다.<sup>1-5)</sup> 근자에 분자 생물학적 방법을 이용한 B형 간염 바이러스의 연구가 활발하여 많은 연구진전을 이루었고 최근 면역조직화학적 방법을 통해 B형 간염 바이러스에 의한 항원 검출이 조직내에서 용이하여 졌고 *in situ hybridization*(이하 ISH로 약함) 방법을 통해 조직내 B형 간염 바이러스 유전자 검출이 가능하여 이를 이용한 B형 간염 바이러스 감염으로 인한 만성 간염의 병태 생리를 규명하고자 하는 시도가 있었다.<sup>6, 13)</sup>

저자들은 만성 B형간염 환자의 간조직에서 면역조직화학적 방법과 ISH방법을 이용하여 B형 간염 환자의 간조직내에서 B형 간염 바이러스 유전자와 항원의 조직내 분포양상과 이들의 상관관계 및 병리 조직학적 관계를 알아봄으로써 B형 간염 바이러스에 의한 만성 간질환의 병태생리에 대한 이해를 얻고자 하였다.

## 대상 및 방법

연구대상은 연세대학교 의과대학 신촌세브란스병원에 입원하여 혈청 HBsAg양성으로 간조직생검을 시행받아 조직학적으로 확진되었던 환자중 파라핀 포매 간조직을 얻을 수 있었던 환자로 이중 간조직의 병리 소견이 정상인 Hepatitis B virus 보유자(HBV carrier)8예, 만성지속성간염 15예, 만성활동성간염 15예, 간경변증 14예, 총 52예를 대상으로 하였다. 연구방법은 파라핀 고정되어 있는 조직을 4-5 μm 두께로 절편을 만들어 0.1% poly-L-lysine(Sigma Co., USA)으로 전처치한 슬라이드에 부착하여 고정시켜 보관하였다가 염색전에 약 1시간 이상 60°C oven에서 가온한 후 xylene과 100%, 90%, 70% 알코올로 탈파라핀 및 조직탈수를 시킨다. 면역조직화학적 방법에 의한 HBV항원 검출은 "Str-AviGen Super Sensitive alkaline phosphatase" kit(Biogenex lab., USA)를 이용하여 HBsAg은 anti-HBs mouse monoclonal 항체를, HBcAg은 anti-HBc rabbit polyclonal 항체를 사용하여 enhanced biotin-streptavidin 방법으로 각각 검출하여 Fast Red로 발색하였다. *In situ hybridization*(ISH) 방법을 이용한 조직내 HBV DNA 검출은 탈파라핀 조직절편을 알코올로 탈수시킨 후 대기중에서 전조시키고 나서 0.1N HCl과 pepsin으로 각각

상온에서 15분, 37°C에서 30분, digestion 시킨 후 70%, 95%, 100% 알코올로 탈수시킨 다음, "Ultra dig kit"(Kreatech's Co., Belgium)의 digoxigenin-labeled HBV DNA probe와 hybridization mixture로 manual에 따라서 prehybridization(30분), hybridization(95°C에서 6분간 heat denaturation 시킨 후 2시간 이상 37°C에서 hybridization), posthybridization 세척(30분)의 과정을 거친후 anti-digoxigenin antibody로 hybridization된 HBV DNA를 검출하여 NBT/BCIP로 발색시킨다.

동일세포내 HBV항원과 HBV DNA와의 관계를 알아보기 위해 면역조직화학적 방법과 ISH방법을 동일 간조직 절편에 동시에 시행하였고 방법은 앞에 언급한 방법대로 먼저 면역조직화학적 염색을 한 후 한동<sup>12, 13)</sup>의 방법대로 ISH를 시행하였다.

염색이 종료된 후 광학현미경하에서 조직소견을 사전정보 없이 편견을 배제한 상태에서 염색의 정도에 따라서 Grade를 나누어 전체 간세포수 중 염색된 세포수가 10% 미만을 +1, 10%에서 50% 사이를 +2, 50% 이상을 +3, 염색된 세포가 없는 경우를 0로 분류하여 기록하였다. 면역조직화학방법에 대한 항원검색과 ISH방법에 의한 HBV DNA 검출법의 신뢰성을 높이기 위하여 염색을 할 때마다 positive 및 negative control 절편을 같이 염색하였고 ISH의 경우에는 동일 조직표본의 연속절편(sequential section)에 HBV DNA probe와 negative probe를 각각 점적한 후 모든 과정을 동일하게 진행시킨 후 최종 발색결과를 비교하였다.

## 결 과

연구대상 52예중 조직 생검당시 혈청 HBeAg이 양성은 37예로 HBV carrier 8예중 3예, 간경변증 환자 14예 중 8예였으며 만성지속성 및 활동성 간염의 경우는 대부분이 양성이었다. HBeAg 양성 37예 전례에서 간질환의 종류와 관계없이 간조직내 HBeAg이 검출되었고 HBeAg음성 15예에서는 간경변환자에서 만 6예중 4예 검출되었다(Table 1). 따라서 HBcAg의 간조직내 검출이 HBV 증식과 관련이 있음을 알 수 있었고 간경변증에서는 HBeAg음성의 경우에서도 간조직내에서 HBV증식이 국소적으로 이루어지고 있

**Table 1.** Intrahepatic Detection of HBcAg in Chronic Type B Liver Diseases

Liver diseases	(n)	Serum HBeAg(+)		Serum HBeAg(-)	
		HBcAg(+)	HBcAg(-)	HBcAg(+)	HBcAg(-)
Carrier	(8)	3	0	0	5
CPH	(15)	12	0	0	3
CAH	(15)	14	0	0	1
LC	(14)	8	0	4	2
Total	(52)	37	0	4	11

**Table 2.** Intrahepatic Expression of HBcAg in HBeAg(+) Patients with Chronic Type B Liver Diseases

Liver diseases	(n)	Nuclear HBcAg				Cytoplasmic HBcAg			
		0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+
Carrier	(3)	1	0	2	0	0	1	2	0
CPH	(12)	1	4	4	3	2	5	3	2
CAH	(14)	3	6	5	0	0	3	8	3
LC	(8)	3	3	2	0	0	3	3	2

Scale of 0 to 3+ corresponding to positivity in 0%, 1-10%, 11-50%, >50% of total hepatocytes examined.

**Table 3.** Intrahepatic Detection of HBsAg in Chronic Type B Liver Diseases

Liver diseases	(n)	Serum HBeAg(+)		Serum HBeAg(-)	
		HBsAg(+)	HBsAg(-)	HBsAg(+)	HBsAg(-)
Carrier	(3)	1	0	2	0
CPH	(12)	8	1	2	1
CAH	(15)	14	0	1	0
LC	(14)	8	0	6	0
Total	(44)	31	1	11	1

음을 시사하였다.

HBcAg의 간세포내 분포양상은 간질환의 진행정도에 따라서 세포내 분포가 핵 core항원(nuclear HBcAg)분포 양상에서 세포질 core 항원(cytoplasmic HBcAg)분포 양상으로 이동하는 경향을 보였다(Table 2). 즉 만성지속성간염의 경우는 핵 core항원이 세포질 core항원의 분포빈도가 상대적으로 높았다(Fig. 1). 그러나 HBsAg은 혈청내 HBeAg양성여부에 관계없이 대부분의 간세포에서 검출되었고 세포내 분포는 세포질에 국한되었다(Table 3, Fig. 3, 4). HBsAg의 간조직내 분포양상은 간질환의 병기가 진행됨에 따라서 산발적 분포(diffuse scattered distribu-

tion)에서 보다 집단적 분포(grouped distribution)를 보였다(Fig. 3, 4).

ISH에 의한 간조직내 HBV DNA(*in situ* HBV DNA)의 분포는 HBeAg양성 환자 37예중 23예(62.2%)에서 검출되었고 HBeAg음성 환자중에서는 간경변증환자 6예중 4예에서만 검출되었다(Table 4). 간세포내 분포는 주로 간세포질내 분포되었다(Fig. 3). 간조직내 HBV DNA(*in situ* HBV DNA)분포는 HBcAg발현과 밀접한 상관관계가 있어 HBcAg 발현부위에서 HBcAg발현정도에 비례하여 검출되었다(Table 5). 더욱이 nuclear HBcAg보다는 cytoplasmic HBcAg발현과 보다 밀접한 상관관계를 보였다.

**Fig. 1.** Detection of HBcAg in liver tissue for the patient with CPH(A) and CAH(B) by IHC (Original magnification: A, X200, B, X400). HBcAg was predominantly localized within the nucleus(A), and detected in both nucleus and cytoplasm of infected hepatocytes(B).

**Fig. 2.** Detection of HBsAg in liver tissue from the patient with CAH(A) and liver cirrhosis(B) by IHC. (Original magnification: A and B, X400) HBsAg was localized solely within the cytoplasm of infected hepatocytes. Intrahepatic distribution of HBsAg was diffusely spreading pattern(A), and showed confluent pattern in antigen expression with a remarkably uniform pattern of staining within a nodule(B).

**Fig. 3.** Detection of HBV DNA in liver tissue by ISH(Original magnification: A and B, X400). Positive hybridization signal was detected in many hepatocytes of HBV-positive liver tissue and localized predominantly in the cytoplasm(A), and signal was not detected in any hepatocytes of HBV-negative liver tissue(B).

또한 간질환의 진행정도에 비례하여 간세포내 HBV DNA의 검출율이 높아 HBV보유자와 만성 지속성 간염에서는 23예중 5예(21.3%)에서 HBV DNA가 검출되었으나(Table 6) 만성 활동성 간염과 간경변증에서는 29예중 22예(75.9%)에서 검출되었다(Table 7). HBV carrier나 만성 지속성 간염환자 일부에서 HBcAg의 발현이 산발적으로 Grade 2-3정도로 높은 빈도로 발현된 경우에서도 *in situ* HBV DNA의 검출 정도는 HBcAg발현정도에 비해서 미약하거나 거의 검출되지 않은 경우가 많았으나 만성 활동성 간염이나 간경변증 환자에서는 *in situ* HBV DNA가 HBcAg 발현정도와 대등한 수준으로 나타나거나 보다 강하게 나타나는 경향을 보였다. 특히 간경변증에서 간세포내 HBV DNA의 검출강도가 가장 강하게 검출되었다.

**Table 4.** Intrahepatic Detection of HBV DNA by *in Situ* Hybridization in Chronic Type B Liver Diseases

Liver diseases	(n)	Serum HBeAg( + )		Serum HBeAg( - )	
		HBV DNA( + )	HBV DNA( - )	HBV DNA( + )	HBV DNA( - )
Carrier	(8)	1	2	0	5
CPH	(15)	4	8	0	3
CAH	(15)	11	3	0	1
LC	(14)	7	1	4	2
Total	(52)	23	14	4	11

**Table 6.** Correlation between Intrahepatic Expression of HBcAg and *In situ* HBV DNA in 23 Patients with HBV Carrier and Chronic Persistent Hepatitis

In situ DNA(n)	HBcAg(Nu HBcAg/Cy HBcAg)				
	0	1+	2+	3+	
0	(18)	9/10	3/5	4/3	2/0
1+	(4)	1/1	1/0	1/2	1/1
2+	(1)	0/0	0/0	1/0	1/1
3+	(0)	0/0	0/0	0/0	0/0
Total	(23)	10/11	4/5	6/5	3/2

Scale of 0 to 3+ corresponding to postivity in 0%, 1–10%, 11–50%, >50% of total hepatocytes examined. Nu ; nuclear, Cy ; cytoplasmic

**Table 7.** Correlation between Intrahepatic Expression of HBcAg and *In situ* HBV DNA in 29 Patients with Chronic Active Hepatitis and Liver Cirrhosis

In situ DNA(n)	HBcAg(Nu HBcAg/Cy HBcAg)				
	0	1+	2+	3+	
0	(7)	6/4	1/2	0/1	0/0
1+	(12)	0/0	8/5	4/6	0/1
2+	(7)	3/0	2/2	2/3	0/2
3+	(3)	1/0	1/0	1/1	0/2
Total	(29)	10/4	12/9	7/11	0/5

Scale of 0 to 3+ corresponding to postivity in 0%, 1–10%, 11–50%, >50% of total hepatocytes examined. Nu ; nuclear, Cy ; cytoplasmic

**Fig. 4.** Simultaneous detection of HBV DNA and HBcAg in the same liver section by IHC and ISH(Original magnification: X400). Most hepatocytes(open arrow) containing nuclear or cytoplasmic HBcAg exhibited HBV DNA in the cytoplasm. However, HBcAg was not detected in some hepatocytes(closed arrow) which showed a strong hybridization signal.

**Table 5.** Correlation between Intrahepatic Expression of HBcAg and *In situ* HBV DNA in Chronic Type B Liver Diseases

In situ DNA(n)	HBcAg(Nu HBcAg/Cy HBcAg)				
	0	1+	2+	3+	
0	(25)	15/14	4/7	4/4	2/0
1+	(16)	1/1	9/5	5/8	1/2
2+	(8)	3/0	2/2	3/3	0/3
3+	(3)	1/0	1/0	1/1	0/2
Total	(52)	20/15	16/14	13/16	3/7

Scale of 0 to 3+ corresponding to postivity in 0%, 1–10%, 11–50%, >50% of total hepatocytes examined. Nu ; nuclear, Cy ; cytoplasmic

그리나 간조직내 HBV DNA는 HBsAg 발현정도와는 일치하지 않았다. 만성 B형 간염환자의 간조직내 HBV 유전자와 항원과의 관계를 동일 세포내에서 관찰하고자 면역조직화학적 방법과 ISH방법을 동시에 동일 간조직절편에 시행하여 관찰한 결과 HBcAg이 발현되는 세포들에서 대부분 HBV DNA가 세포질내 검출되었으나 HBV DNA가 세포내 검출됨에도 불구하고 HBcAg이 발현되지 않는 세포들이 관찰되었다 (Fig. 4). 간경변증이나 만성활동성 간염환자의 일부에서는 HBsAg이 균일한 형태로 집단적 발현이 있었으나 이 부위에서는 in situ HBV DNA는 전혀 검출되지 않았다.

## 고 찰

HBV는 증식기(replicative stage)와 비증식기(non replicative stage)로 나누며 HBV의 증식이 멈추게 될 때 임상적, 생화학적 및 병리학적 소견이 호전되는 점으로 HBV의 지속적 증식이 간염의 진행과 밀접한 관계가 있다. 이러한 HBV의 지속적 증식의 증식은 HBV의 증식능과 숙주면역반응과의 상관관계와 관련이 있다. HBV가 사람의 간세포에 감염후 증식을 하는 과정중에 HBV유전자 산물인 HBV항원이 target 항원으로 감염된 간세포에 발현될 경우 숙주내 T임파구가 이를 인지하여 파괴시킴으로써 HBV에 감염된 간세포를 효과적으로 모두 제거시킬 경우 HBV 증식이 종식될 수 있다.<sup>1, 5, 14, 15)</sup> 그러나 HBV에 감염된 상태임에도 불구하고 유전자 산물인 HBV항원의 발현이 안되는 경우에 숙주면역 감시체계를 벗어나 지속적 감염상태를 유지할 수 있다.<sup>6-8, 12, 13)</sup> 따라서 HBV가 감염되어 있는 간조직내에서 HBV유전자와 유전자 산물인 HBV항원의 발현양상과의 상관관계 및 병리조직학적 변화를 아울러 함께 관찰하는 것이 HBV의 병태생리를 이해하는데 도움이 될 수 있다.

Blum 등<sup>6)</sup>은 한조직내에서 동시에 ISH과 면역조직화학 염색을 시행하여 HBcAg과 HBV DNA의 세포내 분포양상을 관찰하여 HBV DNA의 세포내 존재에도 불구하고 HBV의 제한된 발현양성이 HBV의 지속의 한 이유가 될 것으로 보고한 바 있으며 한 등<sup>13)</sup>은 간경변증 환자의 간조직 절편에 비동위원소적 ISH방법과 면역조직화학적 염색의 동시 염색방법을 사용하

여 간세포내 HBV DNA와 HBcAg의 세포내 분포가 밀접한 상관관계가 있으며 ISH에 의한 in situ HBV DNA의 염색의 강도와 Southern blot분석방법에 의해 동일 간조직내에서 검출된 HBV DNA의 양적인 관계가 잘 일치됨을 보고하였다. 또한 이들 간경변증 환자 일부에서는 HBV의 증식지표로 알려져 있는 혈청 HBeAg이나 HBV DNA가 음성임에도 불구하고 간조직내에서 HBV의 증식지표인 HBcAg이나 HBV DNA가 검출되는 점으로 HBV의 증식여부를 확인하는데 있어서 간조직내에서 직접 HBV유전자나 항원을 검출하는 것이 중요하다고 하였다. 그러나 이들의 연구는 특정 병기의 만성 B형 간질환을 대상으로 하였던 관계로 이러한 소견이 모든 만성 B형 간질환에서 관찰될 수 있는 소견인지 여부가 확인되지는 않았다. Chu 등<sup>14, 15)</sup>은 만성 B형 간염환자의 병기에 따라서 HBsAg과 HBcAg의 발현양상이 차이가 있음을 보고하였다.

본 연구에서는 만성 B형간염의 병태생리를 이해하고자 여러 병기의 만성 B형 간질환 환자를 대상으로 이들의 간조직에서 HBV DNA와 HBV항원의 발현양상을 조사함으로써 각병기에 따른 표현양상의 차이를 알아 보고 이러한 차이와 병의 진행 과정과의 관계를 알아 보았다. 본 연구결과 HBeAg 양성인 환자의 전 예에서 간조직내 HBcAg이 검출되었고 HBeAg음성에서는 간경변증 환자 6예중 4예에서만 검출된 점으로 HBcAg의 간조직내 검출은 HBV의 증식과 관련이 있음을 알 수 있었고(Table 1) 이는 다른 보고자의 보고와 일치된 소견이었다.<sup>13, 16)-19)</sup> 간경변증 환자에서는 HBeAg음성에서도 검출되었는데 이들의 혈중에서 HBV DNA 검사와 염기서열 분석을 시행하지 않았기 때문에 이들이 모두 precore부위의 돌연변이 형의 HBV였는지 확인할 수는 없었으나 한 등<sup>13)</sup>의 보고에 의하면 간경변증 환자의 경우 혈중에 HBV 증식지표가 없는 환자의 간조직내에서 HBV의 증식이 확인되어 HBV의 증식이 국소적으로 일어나고 있음을 알 수 있었다. 따라서 진행된 병기의 만성 B형 간염환자에서는 HBV의 증식여부를 확인하는데 있어서 간조직내에서 증식여부를 확인해 보는 것이 중요하다.

HBcAg의 간세포내 분포양상은 본 연구에서 간질환의 정도가 진행됨에 따라서 핵내 core항원(nuclear core antigen)분포에서 세포질 core항원 분포양상으

로 변해가는 경향을 보였는데(Table 2, Fig. 1, 2)이는 다른 연구자들의 보고와 일치하는 소견이었다.<sup>14,20)</sup> Chu 등<sup>14)</sup>은 이러한 HBcAg 발현 분포의 이동이 만성 B형간염환자의 자연경과 관찰중에 관찰되며 간세포 염증반응의 정도와 비례하는 점으로 HBcAg의 세포내 분포가 핵내 분포에서 세포질 core 항원 분포로 이동될 경우 속주의 면역세포의 target 세포가 되어 파괴된다고 보고하였다.

그러나 간조직내 HBsAg은 혈청 HBeAg 양성여부에 관계없이 대부분 검출되었고 간세포질내 국한되어 분포되었다(Table 3). 또한 간질환의 병기가 진행됨에 따라서 산발적 분포에서 집단적 분포양상을 보였는데 (Fig. 2) 간조직내 HBsAg은 HBV의 증식지표와 반드시 일치하지 않으며 병기의 진행정도에 따라서 집단적 분포양상을 보이는 것은 HBV가 증식이 종료된 이후 간세포 유전자의 DNA에 integration되어 발현되는 경우가 있기 때문으로 생각되며 HBcAg에 비해서 target 항원성이 약하기 때문에 염증반응과의 상관관계가 별로 관찰되지 않은 것으로 여겨진다.<sup>21)</sup>

조직내에서 virus유전자를 검출하는 방법은 간조직을 갈아서 DNA를 검출하는 Southern blot 분석법과 간조직 절편에서 in situ DNA를 검출하는 ISH방법이 있는데 ISH방법은 병리조직학적 변화와 virus유전자와 관계를 동시에 관찰할 수 있는 장점이 있어 virus 감염으로 인한 병태생리를 이해하는데 유리하다. 이 방법을 이용하여 B형 간염환자의 간조직내 in situ HBV DNA를 검출하여 보았을 때 본 연구에서 간조직내 HBV DNA(in situ HBV DNA)는 HBeAg 양성 37예 중 23예에서 음성에서는 간경변증 환자 6예 중 4예에서만 검출되었고 간세포질내에 주로 분포하였다 (Table 4). 간세포내에서 검출되는 in situ HBV DNA는 대부분이 single strand DNA로 HBV가 증식기에 있다고 볼 수 있다. 따라서 간경변증 환자에서 HBeAg 음성인 경우에도 국소적으로 HBV의 증식이 있음을 확인할 수 있었다.

간조직내 HBV DNA 분포는 HBcAg 발현과 밀접한 상관관계가 있어 HBcAg 발현부위에서 발현정도에 비례하였고 HBsAg 발현정도와는 일치하지 않았으며 이는 다른 보고자의 보고와 일치하는 소견이었다.<sup>12,13,16)</sup> 흥미로운 점은 간조직내 HBV DNA 분포가 간질환의 병기가 진행될수록 간조직내 HBcAg 발현 정도보다

상대적으로 검출빈도가 높으며 강하였다.(Table 5, 6, 7). 이처럼 병기가 진행됨에 따라서 HBV DNA의 검출빈도가 높은 이유는 명확히 설명된 바가 없으나, B형간염 바이러스 감염초기에 해당되는 HBV보유자나 만성 지속성 감염 시기에서는 혈중 HBV 증식지표가 높아 활발한 HBV증식기에 해당됨에도 불구하고 간세포내에서 HBV DNA의 검출빈도가 상대적으로 매우 낮은 점으로 미루어 이 시기에는 HBV가 완전형태의 virion으로 형성되어 세포밖으로 활발히 배출되어 세포내 축적되지 않기 때문으로 추측된다.<sup>13,22~24)</sup> 따라서 이 시기에는 상대적으로 바이러스항원의 세포 발현 양상도 target 항원으로 알려진 HBcAg이 핵내에 주로 분포하여 속주면역세포에 의해서 인지되지 않아서 염증반응이 별로 일어나지 않고 있을 것으로 생각된다. Lau 등은<sup>22)</sup> HBV가 활발히 증식하고 있을 때 HBsAg이 세포밖으로 활발하게 이동함을 관찰하여 보고하였는데 본 연구결과에서도 HBV 보유자나 만성 지속성 감염에서 HBcAg 발현양상과 in situ HBV DNA나 HBsAg의 발현양상이 일치하지 않는 점이 앞의 가설을 뒷받침한다고 생각된다. 역으로 병기가 진행된 만성 활동성 간염이나 간경변증에서는 간세포내 HBV DNA가 상대적으로 많이 검출되었고 HBcAg의 발현(특히 세포질내 HBcAg)과 관련이 있었는데 이는 어떠한 이유로 인해서인지는 모르나 HBV의 세포밖 배출의 감소로 인한 세포내 축적에 기인한 것으로 생각되며 virus particle의 세포내 축적이 결과적으로 면역세포를 자극하게 되었는지 아니면 면역세포에 의해서 결과적으로 virus의 배출이 지장을 받게 되었는지는 좀더 연구해 보아야 할 과제라고 생각된다.

HBV DNA와 항원과의 관계를 동일 세포내에서 면역조직화학적 방법과 ISH방법을 동일 조직표본에 동시에 시행하여 관찰하여 보았을 때 HBV DNA가 검출되는 세포중 HBcAg이 발현되지 않는 세포들이 관찰되었는데(Fig. 4) 세포독성 T임파구의 target 항원으로 여겨지는 HBcAg의 제한된 발현(restricted antigen expression)이 HBV의 지속성의 한 이유가 될 수 있으리라 생각된다.<sup>3,6,8,13)</sup>

이상의 결과로 만성 B형 간질환의 병기가 진행됨에 따라서 간조직내 HBV유전자와 유전자 산물인 HBV 항원의 발현양상이 차이가 있음을 알 수 있었고 HBV

에 감염된 세포에서 HBV항원의 제한된 발현이 HBV의 지속성과 관련이 있을 것으로 추정되며 각종 병기의 만성 B형 간질환 환자의 간조직에서 면역조직화학적 방법과 ISH방법으로 HBV DNA와 항원을 검출하여 비교관찰하는 것이 만성 B형 간질환의 병태생리를 이해하는데 유용한 방법이라고 생각된다. 또한 HBV의 증식여부를 확인하는데 있어서 간조직내에서 HBV 증식지표를 직접 확인하는 것이 혈청에서만 확인하는 것보다 중요하리라 생각된다.

## 요 약

저자들은 만성 B형 간염의 병태생리를 이해하고자 연세대학교 의과대학 신촌세브란스병원에 입원하여 간 조직생검을 시행받아 조직학적으로 확진되었던 환자중 파라핀 포매 간조직을 얻을 수 있었던 각종 병기의 만성 B형 간질환 환자를 대상으로 간조직내에서 HBV 유전자인 HBV DNA와 유전자 산물인 HBV항원을 검출하여 상관관계를 알아보았다. 대상은 만성 HBV 보유자 8예, 만성 지속성 간염(CPH) 15예, 만성 활동성 간염(CAH) 15예 및 간경변증(LC) 14예로 총 52예였으며 이들의 간조직 생검에 면역조직화학적 방법과 비동위원소적 *in situ hybridization*(ISH) 방법을 사용하여 간조직내 HBV항원과 HBV DNA를 각각 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

HBeAg양성 37예 전예의 간조직내에서 HBcAg이 검출되었고 HBeAg음성 15예에서는 간경변증 환자에서만 6예중 4예 검출되었다. HBcAg의 간세포내 분포양상은 간질환의 진행정도에 따라서 핵내분포(nuclear HBcAg)양상에서 세포질내 분포(cytoplasmic HBcAg)양상으로 이동하는 경향을 보였다. 또한 간조직내 HBsAg은 혈청 HBeAg양성 여부에 관계없이 대부분 검출되었고 세포내 분포는 간세포질내에 국한되었으며 HBsAg의 조직내 분포양상은 간질환의 병기가 진행됨에 따라서 산발적분포에서 집단적 분포양상을 보였다.

간조직내 HBV DNA(*in situ* HBV DNA)는 HBeAg양성 37예중 23예(63.3%)에서, 음성에서는 간경변증환자 6예중 4예에서만 검출되었고 간세포내 분포는 주로 간세포질내 분포되었다. 간조직내 HBV DNA분포는 HBcAg발현과 밀접한 상관관계가 있어

HBcAg발현정도에 비례하였고 간질환의 병기가 진행될수록 간세포내 검출빈도가 높았고 검출강도가 강하였다. 그러나 간조직내 HBsAg발현 정도와는 상관관계가 없었다. 면역조직화학적방법과 ISH방법을 동일 간조직 절편에 동시에 시행하여 HBV DNA와 항원과의 관계를 동일 세포내에서 관찰해 본 결과 HBV DNA양성인 세포중 HBcAg이 발현되지 않는 세포들이 관찰되었다.

이상의 결과로 만성 B형 간질환의 병기가 진행됨에 따라서 간조직내 HBV 유전자와 유전자 산물인 HBV 항원의 발현양성이 차이가 있음을 알 수 있었고 HBV에 감염된 세포에서 HBV항원의 제한된 발현이 HBV 감염의 지속성과 관련이 있을 것으로 추정된다. 또한 HBV의 증식여부를 확인하는데 있어서 간조직내에서 HBV의 증식지표를 직접 확인하는 것이 중요하리라 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Alberti A, Trevisan A, Fattovich G, Realdi G: *The role of hepatitis B virus replication and hepatocyte membrane expression in the pathogenesis of HBV-related hepatic damage*. In: Chisari FV, eds. *Advances in hepatitis research*, p134, New York: Masson Publishing USA, 1984
- Eddleston ALWF: *Overviews of HBV pathogenesis*. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral hepatitis and liver disease*. p234 Baltimore, William & Wilkins, 1991
- Milich RD: *Immune response to Hepatitis B virus proteins: Relevance of the murine model*. *Semin Liver Dis* 11:93, 1993
- Yoffe B, Noonan Ca: *Progress and perspectives in human hepatitis B virus research*. *Prog Med Virol* 40:107, 1993
- Peters M, Vierling J, Gershwin WE, Milich D, Chisari FV, Hoofnagle JH: *Immunology and the liver*. *Hepatology* 13:977, 1991
- Blum H, Hasse AT, Vyas G: *Molecular pathogenesis of hepatitis B virus infection: simultaneous detection of viral DNA and antigens in paraffin-embedded liver section*. *Lancet* 2:771, 1991
- Hasse AT: *Analysis of viral infections by in situ*

- hybridization. *J Histochem Cytochem* 34:27, 1986
- 8) Gowans EJ, Burrel AR, Jilbert BP, Marmion BP: *Cytoplasmic (but not nuclear) hepatitis B virus core antigen reflects HBV DNA synthesis at the level of the infected hepatocyte.* *Intervirology* 24:220, 1985
- 9) Burrel CH, Gowan EK, Rowland R, Hall P, Jilber AR, Marmion BP: *Correlation between liver histology and markers of hepatitis B virus replication in infected patients: A study by in situ hybridization.* *Hepatology* 4:20, 1984
- 10) Rijntjes PJM, Van Ditzhuijsen TJM, Van Loon Am, Van Haelst UJGM, Bronkhorst FB, Yap SH: *Hepatitis B virus DNA detected in formalin-fixed liver specimens and its correlation to serologic markers and histopathologic features in chronic liver disease.* *Am J Pathol* 120:411, 1985
- 12) Han KH, Hollinger FB, Noonan CA, Yoffe B: *Simultaneous detection of HBV-specific antigen and DNA in paraffin-embedded liver tissue by IHC and ISH using a digoxigenin-labeled probe.* *J Virol Methods* 37:89, 1992
- 13) Han KH, Hollinger FB, Noonan CA, et al.: *Southern-blot analysis and simultaneous in situ detection of hepatitis B virus-associated DNA and antigens in patients with end-stage liver disease.* *Hepatology* 18:1032, 1993
- 14) Chu CM, Liaw YF: *Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection.* *Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis.* *Gastroenterology* 92:220, 1987
- 15) Chu CM, Shyu WC, Kuo RW, Liaw YF: *HLA class I antigen display on hepatocyte membrane in chronic hepatitis B virus infection. Its role in the pathogenesis of chronic type B hepatitis.* *Hepatology* 8:712, 1988
- 16) Arakaki Y, Toyoda H, Watanabe S, Seki S, Oda T: *Detection of hepatitis B virus-DNA in liver tissues in chronic type B liver diseases and its relevancy to viral antigens. A study by in situ hybridization using a biotinylated probe and streptavidin-alkaline phosphatase.* *Acta Histochem Cytochem* 21:489, 1988
- 17) 김상표, 김찬환, 이상숙, 정재환 : 간조직내 B형 간염표지자의 검색. 대한병리학회지 22:404, 1988
- 18) 이혜경, 김상호 : 만성 B형 간염에서 간세포내 HBcAg에 대한 면역조직화학적 연구. 대한병리학회지 23:287, 1989
- 19) 안희정, 김경호, 박영년, 김호근, 박찬일 : 비활동성 HBsAg보유자의 간조직내 HBcAg보유자의 간조직내 HBcAg 및 HBsAg발현양상. 대한병리학회지 24:120, 1990
- 20) Okuno T, Shindo M, Arai K et al.: *Changes of intrahepatic localization of hepatitis B core antigen in HBeAg positive patients with chronic active hepatitis B treated with interferon.* *Am J Gastroenterol* 85(6):660, 1990
- 21) 한지영, 정우희, 전재윤, 박찬일 : 간세포암종에서 종괴와 종괴주변 간조직의 HBsAg 및 HBcAg 발현. 대한병리학회지 27:371, 1993
- 22) Lau JYN, Bain VG, Davies SE, Alexander GJM, Williams R: *Export of intracellular HBsAg in chronic hepatitis B virus infection is related to viral replication.* *Hepatology* 14:416, 1991
- 23) Chu CM, Liaw YF: *Intrahepatic expression of HBcAg in chronic HBV hepatitis: Lessons from molecular biology(letter).* *Hepatology* 12:1443, 1990
- 24) Ou J-H, Yeh C-T, Yen TSB: *Transport of hepatitis B virus precore protein into the nucleus after cleavage of its signal peptide.* *J Virol* 63: 5238, 1989