

C형간염 진단을 위한 중합효소연쇄반응의 임상적 유용성 검토

이 창 훈·윤 갑 준·임 인 경*

연세대학교 원주의과대학 임상병리학과교실
아주대학교 의과대학 생화학교실*

Clinical Application of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection

Chang Hoon Lee, Kap Jun Yoon and In Kyoung Lim*

Department of Clinical Pathology, Yonsei University, Wonju College of Medicine, Wonju, Korea
Department of Biochemistry*, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Current serologic tests for the detection of antibody to hepatitis C virus (anti-HCV) by enzyme immunoassay (EIA) produce occasional false positive reactions and do not provide useful data about the previous status of antibody formation. So, supplementary tests are necessary. Recently, the application of Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of HCV RNA has been reported for this confirmatory purpose. The authors evaluated the clinical usefulness of this PCR assay as a routine laboratory diagnostic test for the detection of HCV infection.

In this study, HCV-PCR assays were performed for 80 samples of liver disease, 27 samples of hemodialysis, and 40 samples of healthy blood donor. These assays utilized nested reverse transcriptase-PCR(RT-PCR) with two pairs of oligonucleotide primers (40S, NTA1, 80S, 300A) based on the 5'-UTR regions. The results were compared to those of tests for anti-HCV by EIA and another two primer pairs (#32, #36, #33, #48). Clinical data including ALT level were also compared.

The results are as follows:

HCV RNA was detected by PCR in 44/80(55%) cases. The comparison of results between PCR and EIA showed concordance in 48/72(67%) cases. Discordance that is negative by PCR but positive by EIA or positive by PCR but negative by EIA, occurred in 18/72(25%) cases and 6/72(8%) cases, respectively. In 6/72(8%) cases of positive by PCR but negative by EIA, the mean value of ALT was 145.3 IU/L, whereas the mean value of ALT was 70 IU/L in 16/72(23%) cases in which both tests were negative. The 40 healthy normal blood donors were all PCR negative. 12/27(44%) cases of hemodialysis patients were positive by PCR, but 9/12(75%) cases were negative by EIA. The comparison between two different primer pair sets showed concordance in 34/40 (85%) and discordance in 6/40 (15%) cases, respectively.

In conclusion, PCR assay by simplified nested RT-PCR for the detection of HCV RNA can be a valuable diagnostic tool for the early detection of HCV infection and viremia. But further studies involving more clinical cases, in-depth analysis of possible factors causing false negative or positive reactions, and investigation of the technical aspects of specimen handling should be performed.

Key Words: Antibody to hepatitis C virus(anti-HCV), Enzyme immunoassay(EIA), Hepatitis C virus polymerase chain reaction(HCV-PCR), Nested reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)

서 론

1989년 C형 간염바이러스(hepatitis c virus, 이하 HCV로 약함)의 유전자 구조가 밝혀지고 그 감염을 진단하는 혈청학적 검사법이 개발된 이후, HCV 감염의 진단 방법에 있어서 감도 및 특이도를 높이기 위한 연구가 활발히 계속되고 있다^{7,8,19,20}. 현재 국내에서 HCV 감염에 대한 임상에서의 환자 진단 및 헌혈자 선별검사용으로 주로 이용되는 검사 방법은 혈청내 C형간염 항체를 검출하는 효소면역법(enzyme immunoassay, 이하 EIA로 약함)으로써, 1992년 이후에는 대부분의 병원에서 2세대 진단 시약을 사용하고 있다^{30,31}. 2세대 시약은 초기 비구조 항원만을 함유한 1세대 시약에서의 주요 문제점이었던 위양성 반응을 감소시키고자 구조 항원을 추가하여 특이도를 높인 것으로, 최근에는 감수성 및 특이성을 더욱 향상시키기 위한 시도로 수 개의 구조 항원들로 구성된 진단시약들이 상품화되고 있다²⁵.

그러나 현재 보편화된 2세대 EIA법으로도 종종 위양성 반응이 일어나는 것으로 보고되고, 특히 이 EIA법은 항체 검사이므로 감염력 유무를 알기 어렵다^{18,23}. 즉, 항체가 출현되기 이전이나 전혀 항체를 생성하지 못하는 경우에는 HCV 감염을 알아내지 못하는 단점이 있다. 더욱이 HCV 항체의 출현이 곧바로 감염상태에서 회복되는 것을 의미하지는 않으므로 임상적으로 보다 정확한 해석을 위해 바이러스 입자의 직접적인 검출의 필요성이 대두되었다. 이에 최근에는 EIA 법으로 양성 결과를 보일 경우 위양성 반응여부를 감별하고 바이러스 입자를 직접 검출하는 immunoblotting 법과 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR로 약함)법이 쓰이기 시작하였고 점차 그 이용도가 증가되는 추세이다^{5,10,11}.

PCR법은 혈청내에 미량으로 존재하는 HCV 바이러스 유전자를 증폭하여 그 RNA성분만을 특이적으로 검출해내는 분자생물학적 진단 검사법으로, 항체를 검출하는 immunoblotting 법에 비해 현재의 감염력 여부를 알 수 있다는 점에서 임상적 유용성이 크다^{10,11}. 국내에서 HCV 감염의 임상 진단을 위해 PCR 법을 이용한 경험은 1993년 수혈후 non-A, non-B 간염 및 혈액투석 환자군에서 일부 실시된 바 있으나^{32,34} 통상적인 임상 진단검사로 쓰인 예는 아직 기술적인 요인과 C형 간염 바이러스의 다양한 변이종에 의한 시발체(primer) 선정의 어려움으로 보고된 바 없다. 그러나 최근에 한국인에서 가장 흔한 C형간염 바이러스의 유전자 서열이 밝

혀졌고⁹ 비교적 표준화된 방법으로 RNA를 추출할 수 있는 kit가 개발되어 검사상의 많은 오류를 줄일 수 있게 되었다.

이에 저자는 다양한 간 질환자군과 건강한 공혈자 및 혈액투석환자를 대상으로 HCV-PCR 법과 EIA 항체 검사를 동시에 시행하여 그 결과를 비교 검토하고 임상 진단검사로써의 유용성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상군

1995년 5월부터 1995년 11월 사이에 원주기독병원을 내원한 80명의 각종 간 질환자(B형간염 환자를 제외함, 만성 간염, 간경변, 지방간, 간세포암 등)와 40명의 건강한 공혈자 및 27명의 혈액투석 환자를 대상으로 PCR을 시행하고 동일 환자에서 EIA 법에 의한 C형간염 항체검사(anti-HCV)와 ALT 검사를 동시에 검사하였다. 또한 Choo등^{7,8}과 Okamoto등²⁴에 의한 시발체간의 비교를 위해 40명의 동일검체를 대상으로 PCR을 시행하였다.

2. 검체처리

PCR 검사를 위해 EDTA K3 항응고제가 들어있는 1회용 진공튜브에 말초혈액 3~4 mL을 채취하고 2시간 이내 혈장을 원심분리하였다. 즉시 검사를 할 수 없을 때는 -20°C에 냉동보관 하였다. C형간염 항체검사와 ALT 검사를 위해서는 접수 후 2시간 내 혈청 분리하고 즉시 검사 할 수 없을 때는 4°C에 냉장 보관하여 사용하였다.

3. PCR 검사

HCV RNA를 검출하는 PCR 검사는 두 쌍의 시발체를 이용한 nested reversetranscriptase-PCR(RT-PCR)로 조 등⁹의 방법을 약간 변형하여 시행하였다.

1) **혈장으로부터 RNA 추출:** 혈장으로부터 RNA 추출은 guanidine thiocyanate 방법에 의한 총 RNA를 추출하는 것으로 상품화된 kit(Tri Reagent[®]BD, Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, USA)를 이용하였다. 즉, 혈장 250 μ L에 lysis 용액(phenol/guanidine thiocyanate 혼합액) 750 μ L을 가하고 vortex에서 혼합한 후 5분간 실온 방치하였다. 200 μ L의 chloroform을 가하여 15초간 심하게 흔들어 주고 15분간 실온 방치하였다. 4°C에서 15분간 12,000 \times g로 원심분리 후 상층액(aqueous phase)을 새 튜브에 담고 500 μ L의 isopropanol을 첨가한 후,

실온에서 5~10분간 방치 후 4°C에서 8분간 12,000×g로 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 제거하고 침전물을 1,000 μL의 75% 에탄올로 혼합한 후 다시 4°C에서 5분간 7,500×g로 원심분리하여 세척하였다. 다음 상층액을 버리고 침전물을 실온에서 말리는데 이때 완전히 말린상태가 아닌 약간의 수분이 있는 상태에서 30 μL의 RNA solubilization 용액(formamide, 0.5% SDS 혼합액)을 가하고 55~60°C에 10~15분간 두었다. 즉시 사용할 수 없을 때는 -20°C에 냉동 보관하였다가 검사하였다.

2) cDNA 합성 방법: 혈장에서 추출한 RNA 용액으로부터 cDNA의 합성은 다음과 같이 시행하였다. 효소 등의 시약은 Behringer Mannheim(Germany)사 제품을 사용하였다. Diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수 6.6 μL에 혈장에서 추출한 RNA 용액 10 μL를 넣고 5 μL의 5× RT buffer(250 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 50 mM dithioerythritol, pH 8.3)를 첨가하였다. 외측 시발체의 antisense인 NTA1(Table 1) 1.7 μL(10 pmole/μL), 0.5 μL의 dNTP(25mM), 0.5 μL의 reverse transcriptase(M-MuLV, 20 U/μL), 및 0.7 μL의 RNAase inhibitor(40 U/μL)를 첨가하여 총 부피 25 μL되게 하였다. 42°C에 90분간 반응시킨 후 5분간 끓이고 즉시 얼음속에 방치시켰다(100~120 ng/μL). 즉시 사용할 수 없을 때는 -20°C에 냉동 보관하였다.

3) 시발체 준비: HCV genome의 5'-UTR(untranslational region) 부위를 목표로 하는 Choo등^{7,8}에 의한 시발체와 동일 검체에서 시발체간의 비교를 위해 Okamoto등²⁴의 시발체를 준비하였다. 시발체의 제조는 한국생공주식회사(대전, 한국)로부터 주문 합성하였으며 최종적으로 sep-pak 정제하고 TE buffer로써 10 pmole/μL되게 분주하여 사용하였다. 시발체의 보관은 -70°C에 냉동 보관하였으며 현재 사용중인 시발체는 4°C 냉장 보관하였

다. 각 시발체의 염기서열과 목표로 하는 부위는 Table 1, Fig. 1과 같다.

4) 중합효소연쇄반응: 조등⁹의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 시약을 준비하고 농도를 맞추었다.

(1) 1차 PCR;

① PCR 용액; PCR 검사에 필요한 시약은 Behringer Mannheim(Germany)사의 제품을 사용하였다. 즉, 합성된 cDNA 용액 10 μL에 10 mM tris-HCl pH 8.3과 50 mM KCl 그리고 15 mM MgCl₂로 구성된 10× 완충용액 10 μL, Taq DNA polymerase 3.0 U, 각각의 200 μM dNTP, 및 outer primer로서 40S와 NTA1(Table 1)을 각각 3 μL(10 pmole/μL)씩 넣고 DEPC 처리된 증류수를 가하여 총 부피가 100 μL되게 한 후 mineral oil 100 μL를 첨가하여 2초간 원심분리 하였다.

② PCR 조건 및 대조군; Thermocycler ATAQ(Pharmacia LKB, Sweden)를 이용하여 predenaturation으로 94°C 2분, precycle로서 94°C 1분/54°C 1분/72°C 1분을 5회 반복하고, main cycle은 94°C 40초/58°C 1분/72°C 1분으로 30회 반복한 후 끝으로 72°C에서 10분간 연장 반응시켰다. 매 PCR 검사마다 반응의 적정성을 판정하고 주위 환경의 오염이나 혹은 튜브간 오염(carry over)에 의한 위양성의 가능성을 배제하기 위해 양성대조와 음성대조를 세웠다. 양성대조로는 PCR 양성환자의 검체를 cDNA 상태로 -20°C에 냉동 보관하였다가 사용하였고 음성대조로는 주형 DNA만 제외하고 나머지 용액은 동일한 조건으로 하였다.

(2) 2차 PCR;

① PCR 용액; 1차 PCR 산물 10 μL에 inner primer인 80S와 300A(Table 1)를 각각 3 μL(10 pmole/μL)씩 넣고 나머지 용액들은 1차 PCR 반응과 동일하게 구성하였다.

② PCR 조건 및 대조군; 1차 PCR 반응조건과 동일

Table 1. Sequences and map position of the two primers

Primers	Sequences, 5' to 3'	Position	Product size
(1) 40S(sense)	ATCACTCCCCTgTgAggAAC	- 306 - - 287	300 bp
NTA1(antisense)	CggTCTACgAgACCTCCCgg	- 26 - - 7	
(2) 380S(sense)	gTCTTCACgCAGAAAgCgTCTAgC	- 282 - - 259	253 bp
300A(antisense)	ACTCgCAAgCACCCtATCAggCAg	- 53 - - 30	
(3) #32(sense)	CTgTgAggAACTACTgTCTT	28 - 47	221 bp
#36(antisense)	AACACTACTCggCTAgCAgT	229 - 248	
(4) #33(sense)	TTCACgCAGAAAgCgTCTAg	46 - 65	145 bp
#48(antisense)	gTTgATCCAAGAAAggACCC	171 - 190	

(1) outer primer, (2) inner primer^{7,8}, (3) outer primer, (4) inner primer²⁴⁾

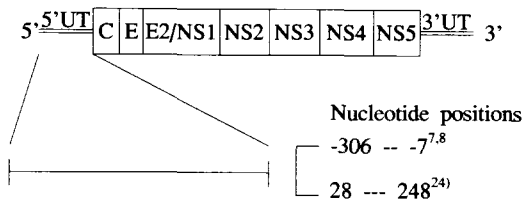


Fig. 1. Positions of the two PCR primers.

하게 시행하였다.

5) 중합효소연쇄반응 산물의 확인: 증폭된 중합효소연쇄반응물 10 μ L를 3 μ L의 loading dye와 혼합한 후 1.5% agarose gel에서 100V/40분간 전기영동 하였다. UV transilluminator 하에서 각 검체별로 1차(300 bp) 혹은 2차(253 bp) 산물을 관찰하여 어느 한쪽에서 DNA 분획이 확인되면 양성으로 판정하였고 marker로서는 Pharmacia(Sweden) 회사의 100 bp DNA ladder를 사용하였다(Fig. 2).

4. SmaI 제한효소처리

2차 PCR 산물인 253 bp의 DNA 분획을 검증하기 위해 제한효소 SmaI(Behringer Mannheim, Germany)으로 처리하여 각각 70 bp 및 183 bp의 DNA 단편을 확인하였다. 즉, PCR 산물에 존재 할 수도 있는 점상돌연변이나 mismatch된 PCR 산물로 인한 위양성의 가능성을 배제하기 위하여 CCC/GGG(nt 위치; -212~-217)로 절단되는 제한효소로 확인하였다⁸. PCR 산물 22 μ L에 완충용액 2.5 μ L, 그리고 제한효소 0.5 μ L(10 U/ μ L)를 가하여 25°C에서 2시간 반응시킨 후 2.0% agarose gel에서 전기영동하여 분획상을 확인하였다(Fig. 3).

5. Single Strand Conformation Polymorphism(SSCP)

PCR 산물이 제한효소에 절단되지 않거나 혹은 Taq polymerase enzyme의 error에 의한 mismatch된 PCR 산물을 배제하기 위해 양성검체를 대상으로 SSCP를 시행하였다. 즉, Arai등²의 방법에 준해 시행하였는데 PCR 산물 6 μ L에 12 μ L의 loading dye(950 mL/L formamide, 25 mL/L glycerol, 20 mmole/L EDTA, 5 mg/L bromphenol blue, 및 5 mg/L xylene cyanol의 혼합물)를 혼합한 후 20 μ L의 mineral oil을 첨가하여 98°C에서 5분간 denaturation 시켰다. 즉시 얼음에 넣고 안정시킨 다음 18 μ L를 취해 0.5% glycerol이 함유된 15% polyacrylamide gel plate에 전기영동 하였다. Xylene cyanol이 gel 밑바닥을 완전히 빠져 나갈 때 까지 200 V, 20 mA로

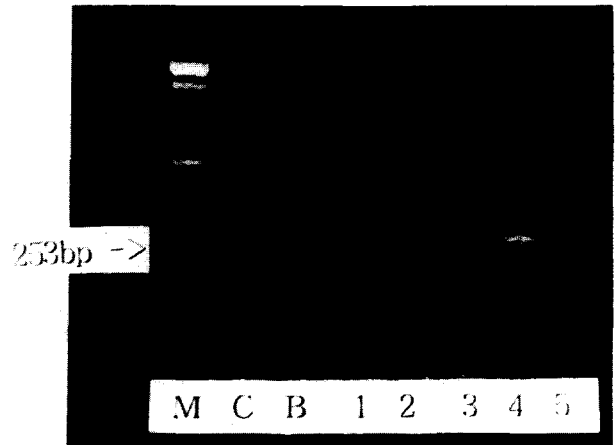


Fig. 2. Amplification of 2nd PCR. M; 100 bp DNA ladder marker, C; positive control, B; blank(negative control), Lane1-5; PCR positive results.

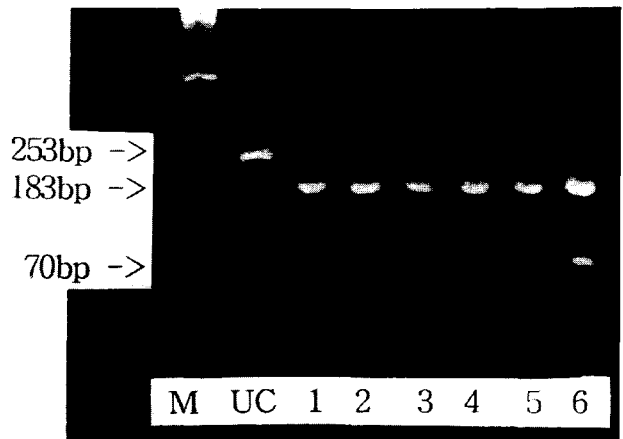


Fig. 3. Digested DNA fragments of 2nd PCR products by SmaI restriction enzyme. M; 100 bp DNA ladder marker, UC; undigested product(without SmaI, 253 bp), Lane 1-6; digested products by SmaI(70 bp and 183 bp).

16시간 전기영동한 후 silver stain(한국생공주식회사, 대전, 한국) 하였다(Fig. 4).

6. 효소면역법

대상환자에서의 C형간염 항체 검사는 Innotest(녹십자, 한국) kit로 제조사의 술식대로 시행하였다.

7. ALT 치 검사

혈청에서의 ALT 검사는 double-beam spectrophotometry에 의해 측정되는 자동화 기기 Hitachi 747(Hitachi,

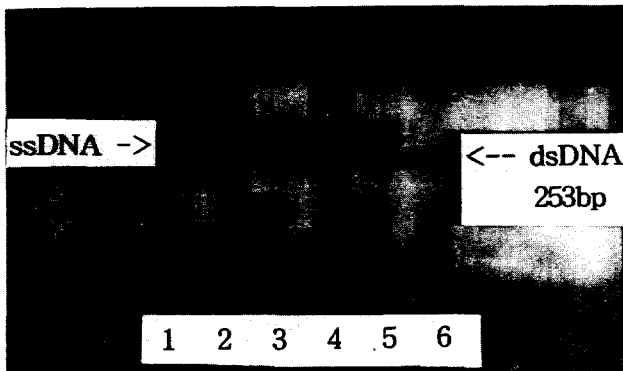


Fig. 4. PCR – SSCP electrophoresis: detection of mutant PCR product by SSCP method.

Lane 1 – 5; samples containing the single strand PCR products were separated by electrophoresis on 15% polyacrylamide gel and stained with a silver reagent, lane 6; double strand PCR product, undenatured.

Japan)를 이용하여 측정하였다.

결 과

1. 대상환자의 질환별 분포 및 PCR 양성율

B형간염이나 혈청학적 검사에서 HBsAg 양성인 경우를 제외한 대상환자 80명의 질환별 분포는 Table 2와 같다. 즉, 만성간염과 간경변 환자가 50%(40/80명)로 가장 많았으며 급성간염은 14%(11/80명)이었다. 또한 기존의 질환이 있는 상태에서 ALT 측정치가 높아 의뢰된 기타 경우도 11%(9/80명)이었다. PCR 양성율은 55%(44/80명)이었고 44명의 양성환자중 외측 시발체(out primer)와 내측 시발체(inner primer) 모두에서 양성되었던 경우가 19명(44%), 내측 시발체에만 양성되었던 경우가 25명(56%)이었다(Table 3, Table 4).

2. PCR 양성환자의 질환별 분포 및 양성율

PCR 양성환자의 질환별 분포는 Table 5와 같다. 즉, 간경변 환자에서 양성율이 가장 높았으며(75%, 12/16명), 만성간염(16/24명)과 기타 질환(6/9명)에서 모두 66.6%의 양성율을 보였다.

3. 간 질환자에서 PCR, anti-HCV 검사 및 ALT 측정치 간의 비교

80명의 대상환자 중 72명에서 anti-HCV 검사를 동시에 시행하였다. 32명(44%)에서 PCR과 anti-HCV가 양성

Table 2. Disease distribution of the 80 patients

Clinical diagnosis	Number(n=80)
Acute hepatitis	11
Chronic hepatitis	24
Alcoholic hepatitis	7
Liver cirrhosis	16
Hepatocellular carcinoma	6
Fatty liver	7
Miscellany*	9

*Two cases of lung cancer, diabetes mellitus, anemia, and one case of esophageal cancer, pulmonary tuberculosis, osteomyelitis, respectively

Table 3. PCR results of the 80 patients

Results	Number
Positive	44(55%)
Negative	36(45%)
Total	80(100%)

Table 4. PCR positive patterns of the 44 patients

	PCR result			number
	1st	2nd	final	
	+	+	+	19(44%)
	-	+	+	25(56%)
Total				44(100%)

Table 5. Disease distribution of the 44 PCR positive patients

Clinical diagnosis	Number(n=44)
Acute hepatitis	4
Chronic hepatitis	16
Alcoholic hepatitis	2
Liver cirrhosis	12
Hepatocellular carcinoma	1
Fatty liver	3
Miscellany	6

으로 일치하였고 16명(23%)에서 음성으로 일치하였다. 18명(25%)은 PCR 음성이면서 anti-HCV 양성이었다고, 6명(8%)은 PCR 양성 anti-HCV 음성으로 불일치를 보였다(Table 6). 즉, PCR과 anti-HCV 검사에서 양성 혹은 음성으로의 일치율은 48명(67%)이었고 두 가지 검사결과에 따른 질환 분포는 Table 7과 같다. 각종 환자군 일부에서 PCR 음성이면서 anti-HCV 양성을 보였고 급성간염 1명, 간경변 2명 그리고 지방간 3명에서 PCR 양성이었으나 anti-HCV는 음성이었다. 한편, 72명의 대상환자중 50명(69.4%)에서 anti-HCV 양성이었다는데 이들 50명 중 32명(64%)에서 PCR 양성을 보여 72명중 52%의 양성을 보인 전체 대상환자의 양성율 보다는 높게 나타났다. 또한 anti-HCV 양성인 50명 중 ALT 측정치가 40 IU/L 이상으로 높은 환자가 35명(70%)이었으며 이들 35명 중 24명(68.6%)에서 PCR 양성을 보였고, ALT 측정치가 40 IU/L 미만으로 낮은 환자 15명(30%) 중 8명(53%)이 PCR 양성으로 다소 낮게 나타났다. 반면에 anti-HCV 음성이면서 PCR 양성을 보인 6명(8%)의 ALT 측정치는 모두 100 IU/L 이상으로 평균 145.3 IU/L 이었으며, anti-HCV와 PCR 모두에 음성인 16명(23%)의 ALT 측정치는 3명에서 100 IU/L 이상을 보였으나 평균 70 IU/L로 낮은 수치를 보였다.

4. 건강한 공혈자에서의 HCV-PCR 양성율

헌혈을 위한 사전 5개 항목 선별검사(HBsAg, anti-HCV, ALT 40 IU/L 이하, VDRL, anti-HIV)에서 이상이 없었던 40명의 건강한 공혈자에서 PCR 검사는 모두 음성이었다.

5. 혈액투석 환자에서의 PCR 양성율

현재 혈액투석을 받고 있는 27명을 대상으로 PCR을 시행한 결과 12명(44%)에서 양성을 보였고 5명(18.5%)이 anti-HCV 양성이었다. 12명의 PCR 양성환자중 anti-HCV 양성은 3명(25%)이었다. 즉, PCR 검사가 의뢰된 80명의 각종 간 질환자의 양성율(55%) 보다는 다소 낮게 나타났으나(Table 3), PCR 양성이면서 anti-HCV 음성을 보인 경우가 12명 중 9명(75%)으로 상기 대상환자군의 72명 중 6명(8%)보다 훨씬 높게 나타났다(Table 6).

6. 동일 검체에서의 시발체간 비교

40명의 검체를 임의로 선택하여 Choo등^{7,8}과 Okamoto 등²⁴의 시발체를 이용한 PCR 검사 결과는 각각 40명 중 23명(57.5%)과 20명(50%)에서 양성을 보였다(Table

Table 6. Comparison of PCR and anti-HCV results of the 72 patients

PCR	Anti-HCV	Number(no=72)
+	+	32(44%)
-	-	16(23%)
-	+	18(25%)
+	-	6(8%)

Table 7. Disease distribution of the 72 patients according to PCR/anti-HCV results

Clinical diagnosis	+/+ (n=32)	-/- (n=16)	-/+ (n=18)	+/- (n=6)
Acute hepatitis	2	4	2	1
Chronic hepatitis	15	2	5	0
Alcoholic hepatitis	1	1	3	0
Liver cirrhosis	10	3	1	2
Hepatocellular Carcinoma	1	2	3	0
Fatty liver	0	1	3	3
Miscellany	3	3	1	0

Table 8. Comparison of the two primers in the 40 same samples

	Choo	Okamoto
positive	23	20
negative	17	20
Total	40	40

8). Choo등^{7,8}에 양성이면서 Okamoto등²⁴의 시발체에 음성인 경우가 3명, 그리고 Okamoto등에 양성이면서 Choo등에 음성인 경우도 3명 있었다.

7. PCR 양성검체의 SmaI 제한효소 처리 및 SSCP 결과

PCR 양성으로 판정된 PCR 산물을 -20°C에 냉동 보관하였다가 SmaI 제한효소로 처리한 결과 양성검체 모두에서 70 bp, 183 bp로 절단되었다. 또한 양성 PCR 산물로 SSCP를 시행한 결과 모두 두 개의 band로 관찰되어 PCR 산물이 동형체(homogeneous)임을 알 수 있었고

접상돌연변이나 mismatch에 의한 이형체(heterogeneous)는 관찰되지 않았다(Fig. 2~4).

고 찰

HCV 감염의 진단을 위해 초기에 사용된 1세대 EIA 시약은 위양성 반응이 비교적 흔한 빈도로 관찰되고 실제로 C형 간염항체 양성 예 중 17~25%만이 HCV를 전파 시키는 이미 잘 알려진 사실이다^{11,12,16,26}. 반면 현재 국내에 보편화된 2세대 EIA 시약은 비구조 항원에 핵(core) 항원인 구조항원을 첨가하여 1세대에서의 높은 위양성 반응을 감소시킬 수 있었고 일부에서는 재조합 대신 합성 펩타이드항원을 사용하여 좀 더 비특이적인 반응을 감소시키기 위한 노력을 기울이고 있다¹⁶. 그러나 현재의 2세대 시약으로도 아직 비특이적 반응에 의한 위양성을 현저하게 감소시키지 못하였다는 견해가 많다^{18,23}. Caldwell등⁵은 알코올성 간 질환자에서 2세대 EIA 시약으로 검사하였을 때 29%에서 양성이었으나 PCR 검사로는 18%만이 양성 결과를 보여 EIA법에 의한 위양성율이 38%이었고 위음성반응은 관찰되지 않음을 보고하였다. Mitchel등²²도 자가면역성 만성 활동성 간 질환자의 19%에서 EIA법으로 양성이었으나 immunoblotting 및 PCR 검사로는 1.6%만이 양성으로 나타났고, Mendenhall등²¹도 immunoblotting을 참고법으로 하였을 때 EIA법에 의한 결과의 79%가 위양성 반응임을 보고한 바 있다. 국내 연구로는 김 등^{29,30}이 헌혈자를 대상으로 하여 세 제조사의 2세대 EIA 시약에 의한 C형간염 항체 양성율이 0.42~1.25%이었으나 확인검사로 시행한 immunoblotting 법으로는 0.21%의 양성율을 보고하였고, 박등³¹도 EIA법으로는 양성 결과이나 immunoblotting에 의해 음성으로 확인된 예들을 보고한 바 있다. Leon등²⁰은 재조합 항원을 사용한 EIA법으로는 주로 위양성반응이, 합성 펩타이드에 의한 경우에는 주로 위음성반응이 관찰된다고 하였는 바, 국내 병원에서는 대개 재조합 항원의 시약을 사용하므로 주로 위양성 반응이 문제되는 실정이다. 따라서 EIA에서 양성 결과를 보일 경우 비특이 반응을 배제하기 위해 추가적인 확인검사가 필요하고, 또한 이 EIA법은 C형간염 항체가 형성되기 이전에는 검출할 수 없으며 HCV에 의한 급성 간염의 약 40%에서는 항체가 형성되지 않는다는 점 등의 단점이 있다¹.

이에 반해 HCV 감염을 진단하는 대표적인 확인검사인 PCR 검사는 HCV 유전자를 직접 검출함으로써 viremia에 의한 감염력을 알아낼 수 있는 검사법으로 국내

에서도 수년 전부터 여러 바이러스 진단 분야에 점차 활발히 이용되고 있다. PCR 법을 이용한 HCV RNA의 검출 방법은 처음으로 Garson등^{10,12}이 시도한 이후, 여러 연구자들의 실험 결과 점차 개선된 술식이 고안되어 통상적인 임상진단용 검사로도 비교적 간편하게 실시할 수 있게 되었다^{13,15,26}. PCR 검사의 가장 큰 장점은 HCV 바이러스를 직접 검출해 내므로 특이도가 높다는 점과 검출 한계 이하의 농도로부터 수백만 배로 증폭시켜 감도 또한 우수하다는 점을 들 수 있다^{6,12}. 그러나 PCR 검사 또한 몇 가지 해결되어야 할 문제점이 있다. 즉, 대량 선별검사나 통상 진단검사로 쓰이기에는 아직 기술 및 시간적인 요인과 시약, 장비 등 비교적 고가의 검사비가 든다는 제한점이 있고, 감염의 어느 시기에는 항원이 검출되지 않거나 간헐적으로 viremia를 보이는 경우, 또는 조직내에만 HCV RNA가 존재 할 경우에는 위음성 결과를 보일 수 있다. 또한 HCV 항원이 검출 한계 이하의 낮은 역가로 존재하거나 여러 변이종의 유전자형이 있어 검사에 사용된 시발체로는 검출되지 않는 다른 핵산 구조의 HCV에 의한 감염일 경우에는 검출되지 않는다는 점 등을 들 수 있다. 그리고 바이러스 복제능력이나 계절적인 변수, 혹은 검체 보관방법 등에 따라 결과에 영향을 줄 수 있고 일부 오염 등에 의한 위양성 반응도 일어날 수 있는 단점이 있다^{6,17}. Busch등⁴은 검체를 채혈 후 즉시 냉동 보관하였을 때와 실온에 방치하거나 1회 이상 냉동 및 해동을 하였을 때를 비교해 본 결과, 전자에서보다 후자에서 양성율이 감소됨을 관찰하였다. 특히 HCV-PCR에서는 HCV가 DNA가 아닌 RNA 바이러스로서 역전사 효소(reverse transcriptase, RT)를 이용하여 우선 cDNA를 합성한 다음 이를 증폭하는 RT-PCR을 시행해야 하므로 더욱 까다로운 검사 단계를 거쳐야 하는 어려운점이 있다. 실제로 HCV-PCR 검사에 관한 유럽의 외부 정도관리 결과에 의하면 참여하였던 검사실의 약 3분의 1에서 잘못된 검사 결과를 보였고 반수에서는 검체 회석에 의한 검사 과정에서의 잘못된 결과를 보고하였다²⁸. 이에 차 등⁶을 비롯한 여러 연구자들은 HCV-PCR 검사의 감수성을 높이기 위한 연구 결과, 2단계의 PCR을 실시하는 nested PCR 법과 함께, 시발체의 선택시 HCV 유전자에서 가장 핵산배열의 변화가 적은 5' untranslated region(5'-UTR)에 대한 것을 사용하도록 제안하였다⁵. 실제 이러한 술식으로 PCR법을 시행한 경험에 의하면 증상이 동반되고 C형간염 항체가 양성인 non-A, non-B 간염 환자 및 ALT가 증가되고 C형간염 항체 양성인 헌혈자의 거의 100%에서 HCV RNA가 검출되었고 C형

간염항체 만이 양성인 일반 헌혈자에서는 약 50~70%에서 HCV RNA가 검출됨을 알 수 있었다⁴. 또한 검사 이전의 검체 보관 과정에서 불안정한 RNA virus가 주위 환경에 널리 분포되어 있는 RNase에 의해 파괴되지 않도록 주의한다면, immublotting법 등의 확인검사에서 양성 결과를 보였던 검체는 거의 100%에서 PCR 검사 결과 양성이었음을 보고한 예도 있다⁶.

본 연구에서는 처음부터 두 단계의 nested PCR 검사를 실시하였고 초기의 1차 PCR 산물에 대한 전기영동 결과로 볼 때 44명의 양성환자중 19명(44%)만이 1차 PCR에서 양성 결과를 보여 반드시 nested PCR을 시행해야 함을 알 수 있었다. 전체 간 질환 대상환자에서의 PCR 검사 양성율은 55%였으며 이중 간경변 환자가 75%로 가장 높았고 PCR과 anti-HCV 결과간의 일치율은 전체의 67%를 차지하였다. 이는 Gretch등¹⁵과 이등³³의 결과와 유사하였다. PCR은 음성이나 anti-HCV는 양성 결과를 보인 경우는 25%였으며, PCR 양성 anti-HCV 음성은 8%였다.

저자는 이러한 PCR 검사와 anti-HCV 간 불일치의 원인으로서는 우선적으로 PCR법은 HCV RNA를 검출하는 검사인 반면 anti-HCV는 그에 대한 항체를 검출한다는 점에서 항체 전환시기에 대한 논란이 많지만 대상군의 감염 시기에 따른 차이를 고려하였고, 그 다음으로는 일부 환자군에서 EIA법인 anti-HCV의 위양성 결과를 생각하였다. 즉, anti-HCV 양성 환자중 PCR 음성이면서 ALT 측정치가 정상인 7명의 환자중 일부는 위양성의 가능성이 클 것으로 생각되었다. 또한 일부에서는 PCR 검사에 의한 위음성 반응을 고려하였다. PCR 위음성의 원인으로서는 시발체의 선정에 따른 양성율의 차이가 Garson등^{12,13}에 의해 보고된 바 있고 또한 검체보관 상태에 따라 양성율의 차이가 있음이 알려져 있다⁴. 따라서 본 연구에서는 비교적 안정된 구조를 가지고 있는 5'-UTR 부위를 목표로 하는 시발체를 사용하였고 체혈 즉시 원심분리하여 혈장을 -70°C에 냉동 보관하고 가급적 냉동 및 해동을 반복하지 않도록 함으로써 위음성의 가능성을 최소화 하였다.

한편, 5개 항목(HBsAg, anti-HCV, ALT 40 IU/L 이하, VDRL, anti-HIV) 선별검사에서 모두 적합한 판정을 받은 건강한 공혈자 40명을 대상으로 PCR 검사를 하였으나 모두 음성이었다. Garson등¹³은 건강한 공혈자 1,100명 중 anti-HCV 양성인 6명(0.55%)으로 이들 중 1명에서 PCR 양성이었으며 이 혈액을 수혈받은 환자에서 실제로 수혈 후 C 바이러스에 의한 감염이 발생한 경우를 보고하였다. 따라서 앞으로 많은 연구를 통하여

anti-HCV 양성인 공혈자의 혈액을 PCR 검사를 통한 검증 과정과 anti-HCV 음성인 경우라도 PCR 양성일 경우 수혈후 추적조사가 필요할 것으로 생각되었다.

혈액투석 환자의 경우 anti-HCV 양성율은 27명 중 5명(18.5%)으로 홍등³⁴의 12.5% 보다는 다소 높게 나타났다. PCR은 12명(44%)에서 양성을 보였다. 이들 12명 중 9명(75%)에서 anti-HCV 음성을 보여 같은 양상을 보인 상기 간 질환군 72명에서의 6명(8%)보다 훨씬 높은 양성율을 나타내어 HCV 감염의 고 위험군임을 알 수 있었다. 이러한 원인으로서는 혈액투석환자의 경우 빈번한 수혈과 투석기계를 통한 전파, 그리고 환자의 면역결핍 상태를 생각할 수 있다¹⁴.

동일 검체를 대상으로 Choo등^{7,8}과 Okamoto등²⁴에 의한 두 종류의 시발체를 비교한 결과 각각 40명 중 23명(57.5%)과 20명(50%)에서 양성을 보였는데 Choo등^{7,8}에 양성이면서 Okamoto등²⁴에서 음성인 경우가 3명, Okamoto 양성이면서 Choo에는 음성인 경우 3명이 포함되었다. 즉, 양성율에서는 Choo의 경우가 약간 높게 나타났다. 그러나 6명(15%)에서 불일치를 보였다. 이는 시발체의 위치선정에 따른 차이와 검체를 -70°C 보관 하던중 한 번 해동된 적이 있었던 일부 검체가 포함되어 있어 그에 따른 문제점으로 생각되었다.

PCR 양성 산물을 대상으로 점상돌연변이나 Taq polymerase의 error rate(약 0.01%)에 의한 mismatch된 산물의 가능성을 screening하기 위해 CCC/GGG로 절단되는 SmaI 제한효소를 처리한 결과 모든 검체에서 70 bp 및 183 bp의 절단된 DNA 분획을 보였다. 또한 SSCP에서도 동형체(homogeneous)의 산물인 두 가닥의 single strand를 보여 Choo등⁸에 의한 genomic sequence와 일치할 것으로 생각되었다. 그러나 조등⁹은 한국인에서 흔히 분리되는 HCV-K isolate는 Choo등⁸이 분리한 HCV-1과 비교하여 5'-UTR 부위에서 94.4%의 동일한 염기서열(homology)을 보인다고 하였다. 따라서 상기의 SSCP 검사에서 이형체(heterogeneous)의 산물이 나타날 경우 mismatch에 의한 것인지 혹은 C형간염 바이러스의 아형에 따른 DNA variants에 의한 것인지를 구별은 어려울 것으로 생각되었다.

이상의 결과로 본 연구에서 실험한 PCR은 C형간염 및 각종 간 질환을 진단함에 있어 기존의 anti-HCV와 병행하여 검사하면 EIA법에서 일부 문제되는 위양성의 가능성을 어느 정도 배제할 수 있고 특히 viremia 상태를 직접 검출하므로써 환자상태를 보다 명확하게 파악할 수 있는 진단법으로 생각되어 임상적 유용성이 클 것으로 기대된다.

결 론

1995년 5월부터 1995년 11월까지 원주기독병원을 내원한 80명의 각종 간 질환자와 40명의 건강공혈자 및 27명의 혈액투석환자를 대상으로 HCV-PCR 검사의 임상진단 검사로서의 유용성을 평가하고자, EIA 법에 의한 anti-HCV 검사를 시행하였으며 동일검체 40건에서 두 종류의 시발체를 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

각종 간 질환자 80명 중 44명(55%)에서 PCR 양성이었다. 동시에 anti-HCV 검사를 시행한 72명중 48명(67%)에서 두 검사는 일치된 결과를 보였고, anti-HCV 양성인 50명의 환자에서 32명(64%)이 PCR 양성을 보였다. 한편, anti-HCV 양성환자 50명 중 ALT 측정치가 40 IU/L 이상인 35명 중 24명(68.6%)이 PCR 양성을 보였고 40 IU/L 이하에서는 15명 중 8명(53%)이 양성이었다. 반면, anti-HCV 음성이면서 PCR 양성인 경우는 72명 중 6명(8%)이었으며, ALT 측정치는 평균값이 145.3 IU/L 이었다. Anti-HCV 음성, PCR도 음성인 경우는 72명 중 16명(23%)이었고 ALT 평균값이 70 IU/L 이었다.

건강한 공혈자 40명은 모두 PCR 음성이었으며 27명의 혈액투석환자의 경우 12명(44%)에서 양성을 보였다. 이들 12명 중 3명(25%)만이 anti-HCV 양성을 보여 anti-HCV 음성이면서 PCR 양성을 보인 경우가 9명(75%)로서 간 질환자의 72명 중 6명(8%)보다 훨씬 높게 나타났다.

Choo등과 Okamoto등에 의한 두 종류의 시발체간 비교에서 각각 40명 중 23명(57.5%)과 20명(50%)이 양성을 보였으나 6명(15%)에서는 서로 상반된 결과를 보였다.

이상의 결과로 HCV-PCR 검사는 각종 간 질환자에서 C형간염을 진단하는데 anti-HCV 검사와 병행하여 시행하므로써 환자의 상태를 보다 정확하게 판단하고 또한 추적조사에 유용하여 임상적인 진단법으로서의 유용성이 클 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Alter HJ, Purcell RH and Shih JW: Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 321: 1494-1500, 1989
2. Arai T, Tsukada T and Nakayama T: Simple and rapid detection of cholesteryl ester transfer protein deficiency by using

- nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Clin Chem* 40: 2227-2229, 1994
3. Bresters D, et al: Recombinant immunoblot assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA in blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. *Transfusion* 33: 634-638, 1993
4. Busch MP, Wilber JC, Johnson P, Tobler L and Evans CS: Impact of specimen handling and storage on detection of hepatitis C virus RNA. *Transfusion* 32: 420-425, 1992
5. Caldwell SH: Hepatitis C infection by polymerase chain reaction in alcoholics: False-positive ELISA results and the influence of infection on a clinical prognostic score. *Am J Gastroenterol* 88: 1016-1021, 1993
6. Cha TA, Kolberg J and Irvine B: Use of a signature nucleotide sequence of hepatitis C virus for detection of viral RNA in human serum and plasma. *J Clin Microbiol* 29: 2528-2534, 1991
7. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW and Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-born non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362, 1989
8. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C and Dong C: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Biochemistry* 88: 2451-2455, 1991
9. Cho YG, Yoon JW, Jang KL, Kim CM and Sung YC: Full genomic cloning and nucleotide analysis of hepatitis C virus from sera of chronic hepatitis patients in Korea. *Mol. Cells* 3: 195-202, 1993
10. Garson JA: Demonstration of viraemia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis-C-virus-contaminated factor VIII concentrates. *Transfusion* 336: 1022-1025, 1990
11. Garson JA, Ring CJA and Tuke PW: Improvement of HCV genome detection with "short" PCR products. *Lancet* 338: 1466-1467, 1991
12. Garson JA, Ring C, Tuke P and Tedder RS: Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet* 336: 878-879, 1990
13. Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glasebrook JA and Trute A: Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 335: 1419-1422, 1990
14. Giammaria U, De Meo F and Acitelli S: HCV infection in hemodialyzed patients; incidence and correlation with dialytic age. *Nephron* 61: 335-336, 1992
15. Gretch DR, Wilson JJ, Carithers RL, Rosa C, Han JH and Corey L: Detection of hepatitis C virus RNA: Comparison of one-stage polymerase chain reaction(PCR) with nested-set PCR. *J Clin Microbiol* 31: 289-291, 1991
16. Hosein B, Fang CT, Popovsky MA, Ye J and Zhang M: Improved serodiagnosis of hepatitis C virus infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. *Proc Natl Acad*

- Sci USA 88: 3647-3451, 1991
17. Irving WL, Day S and Eglin RP: HCV and PCR negativity. *Lancet* 339: 1425, 1992
 18. Kolho E: Specificity and sensitivity of first and second generation anti-HCV ELISA in a low prevalence population. *Transfusion* 2: 239-242, 1992
 19. Kuo G, et al: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364, 1989
 20. Leon P, Lopez JA, Domingo C and Echevarria JM: Evaluation of laboratory assays for screening antibody to hepatitis C virus. *Transfusion* 33: 268-270, 1993
 21. Mendenhall CL, Seef L and Diehl AM: Antibodies to hepatitis B virus and hepatitis C virus in alcoholic hepatitis and cirrhosis: Their prevalence and clinical relevance. *Hepatology* 14: 581-589, 1991
 22. Mitchel LS, et al: Detection of hepatitis C virus antibody by first and second generation assays and polymerase chain reaction in patients with autoimmune chronic active hepatitis type I, II, and III. *Am J Gastroenterol* 88: 1027-1034, 1993
 23. Nakatani Y, Matsumoto A, Tanaka E, Ogata H and Kiyosawa K: Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: first-generation and second-generation enzyme-linked immunosorbent assay, second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. *Hepatology* 16: 300-305, 1992
 24. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Tanaka T, Sugai Y and Akahane Y: Detection of hepatitis virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-Noncoding Region. *Japan. J Exp* 60: 215- 222, 1990
 25. Sayers MH and Gretch DR: Recombinant immunoblot and polymerase chain reaction testing in volunteer whole blood donors screened by a multi-antigen assay for hepatitis C virus antibodies. *Transfusion* 33: 809-813, 1993
 26. Tsujii H, Yoshikawa M and Nakano H: HCV. *Jpn J Clin Pathol* 41: 1232-1239, 1993
 27. Van der Poel CL, Reesink HW and Schaasberg W: Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet* 335: 558-560, 1990
 28. Zaaijer HL, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G and Lelie PN: Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 341: 722-724, 1993
 29. 김대원 및 지현숙: C형간염항체 검출을 위한 효소면역측정법 진단시약의 비교평가. *대한수혈학회지* 4: 75-81, 1993
 30. 김대원, 한태진, 지현숙 및 김영식: EIA 진단시약에 따른 한국인 공혈자의 C형 간염항체 양성을 EIA 결과와 확인 검사의 비교. *대한수혈학회지* 4: 223-229, 1993
 31. 박명희 및 김병철: C형 간염 바이러스항체 검출용 "Lucky HCD" 효소면역측정 시약의 평가. *임상병리와 정도관리* 15: 237-245, 1993
 32. 이남용, 김상인, 박명희, 한규섭, 이동순, 오영철 및 김기홍: 항-c100-3 항체 양성혈액 수혈후의 C형 간염바이러스 감염. *대한수혈학회지* 4: 83-88, 1993
 33. 이태수 및 이재훈: 유리 모세관을 이용한 HCV 역전사 중합 효소연쇄반응. *임상병리와 정도관리* 1: 205-211, 1995
 34. 홍기숙: 2세대 효소면역검사법과 중합효소연쇄반응에 의한 혈액투석 환자군에서의 C형 간염 감염율에 대한 연구. *대한임상병리학회지* 13: 503-509, 1993
-