

C형 간염의 진단을 위한 역전사중합효소연쇄반응과 효소면역측정법의 타당성 평가

손병철¹·전진호¹·박영홍¹·신해림⁴·조규일¹
김종한²·정귀옥¹·이종태¹·이채언¹·백낙환³

인제대학교 의과대학¹, 인제대학교 보건대학원², 인제대학교³, 동아대학교 의과대학⁴

= Abstract =

Assessment of Validity of RT-PCR and EIA for The Detection of Hepatitis C Virus Infection

Byung Chul Son¹ · Jin Ho Chun¹ · Yeong Hong Park¹ · Hai Rim Shin⁴ · Kyu Il Cho¹
Jong Han Kim² · Kui Oak Jung¹ · Jong Tae Lee¹ · Chae Un Lee¹
Nak Whan Paik³

*Medical college, Inje University¹,
Graduate School of Public Health, Inje University²,
Inje University³, Medical college, Dong-A University⁴*

This study was conducted to estimate the validity of reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) compared to enzyme immunoassay(EIA) for the detection of hepatitis C virus (HCV) infection. EIA for antibody to HCV(anti-HCV) and RT-PCR for HCV was executed on the subjects from Pusan and Kyungnam area with questionnaire survey to collect some relating factors of HCV infection. As the result from 617 cases, the prevalence of HCV infection was 1.5% by EIA and 3.7% by RT-PCR($p < 0.05$), and the age standardized rate was 1.7% and 3.4% by EIA and RT-PCR, respectively. The prevalence of hepatitis B surface antigen(HBsAg) was 6.8%

• This paper was supported(in part) by NON DIRECTED RESEARCH FUND, Korean Research Foundation, 1993

by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) and the age standardized rate was 7.7%. It was the higher in male group comparing to female group($p < 0.01$). Both of the prevalence of HCV and HBsAg were higher in elevated aspartate aminotransferase(AST) and alanine aminotransferase (ALT) group than in normal AST and ALT group($p < 0.01$). There was no specific risk factor of HCV infection. Though the degree of agreement of EIA and RT-PCR by gamma statistics was 97.2%, it showed a significant difference between the two methods($p < 0.01$). For the detection of HCV infection, positive predictive value of EIA was 66.7% and negative predictive value of EIA was 97.2%.

This study suggests that negative result to anti-HCV by EIA didn't mean the free state of HCV infection, therefore it would be helpful that further monitoring for HCV infection by RT-PCR in the case of elevated AST and ALT and/or clinically suspected.

Key words : Hepatitis C virus, EIA, RT-PCR

서론

간암을 포함한 만성 간질환은 우리나라 성인에 있어 높은 유병률과 사망률을 나타내는 원인질환의 하나로 최근 통계에 의하면 우리나라 국민의 입원다빈도 상병 중 5위를 점하는 질환이며(의료보험관리공단, 1994), 이는 바이러스성 간염의 높은 이환율과 연관이 있는 것으로 지적되고 있다(Kim 등, 1983; Yoo 등, 1988; Kuo 등, 1989; Ahn 등, 1992; Shin 등, 1993).

이렇듯 바이러스성 간염의 이환이 문제시되고 있음에도 만성 간질환자의 10% 정도에서 아무런 B형 간염 표식자도 발견되지 않으며(Suh, 1982), A형 간염도 B형 간염도 아닌 제3의 간염(non-A, non-B 간염: NANB 간염)의 존재를 암시하는 여러 임상적 소견이 있어 왔고(Havens, 1956), 국내의 연구에서도 NANB 간염 환자의 많은 부분이 C형 간염에 기인한 것으로 보고되고 있으며(Chung 등, 1990) 최근의 여러 보고에서 간암의 발생과 바이러스성 간염의 관련성이 지적되고 있어(Lu 등, 1988; Kuo 등, 1989; Ahn 등, 1992; Shin 등, 1993; Kim 등, 1993) C형 간염은 만성 간질환의 관리에 중요한 의미를 지니게 되었다.

C형 간염 바이러스(HCV)의 전파는 주로 혈액을 통

하여 이루어지는 것으로 알려져 있으며, 최근 molecular cloning technique에 의해 그 실체가 규명되었다(Choo 등, 1989). 이 clone의 분석에 따르면 HCV의 genome은 positive sense single-stranded RNA로서 약 10 kb의 길이를 가진다고 한다. 또한 genome 체제, 바이러스의 크기와 지용성 용제에 대한 민감도 등을 종합해 볼 때 Flaviviridae계의 일종으로 여겨지나 이들 바이러스와의 염기서열의 동일성(sequence identity)은 적은 것으로 알려져 있다(Bradley 등, 1983; He 등 1987).

현재의 HCV 감염의 진단법은 방사면역분석법(radio immunoassay, RIA)이나 효소면역측정법(enzyme immuno assay, EIA)을 이용한 혈청학적 방법(Kuhnl 등, 1989; Kuo 등, 1989)으로, 상업적으로 판매되는 superoxide dismutase(SOD)/HCV poly-peptide에 대한 항원-항체 반응에 근거하고 있다. 이 방법은 공혈이나 임상적으로 의심되는 환자의 진단에는 적합하지만, 급성 감염이나 수혈에 의한 감염의 경우 대개 18주 내지 24주, 평균 5개월의 기간이 지나서야 혈청학적 양성으로 전환되는 잠복기간(window period)이 존재하게 되어 그 적용이 부적합한 것으로 알려져 있다(Diensag, 1983; Alter 등, 1989; Kuo 등, 1989; McHutchinson

등, 1989). 이 방법은 또한 위양성과 위음성이 존재하여 신뢰도에 문제가 제기되었다(Boudart 등, 1990; Ikeda 등, 1990; McFarlane 등, 1990; Theilman 등, 1990). 더욱이 대부분의 임상검체에는 HCV의 양이 항원-항체반응이나 RNA hybridization법에 필요한 양보다 적게 존재할 뿐 아니라(Bradley 등, 1979; Vitvitski 등, 1979; Krawczynski 등, 1991), 조직배양체계가 아직은 확립되어 있지 못하고 있어 HCV의 진단을 위하여 민감도와 특이도가 높은 검사 방법의 개발이 요구되어 왔다.

Choo 등(1989)에 의하여 이루어진 역전사효소(reverse transcriptase, RT)를 이용한 NANB형 간염 바이러스(NANBV)의 분리와 Garson 등(1990)에 의하여 개발된 중합효소연쇄반응(polymerase-chain reaction, PCR)을 이용한 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcriptase polymerase-chain reaction, RT-PCR)의 개발은 혈청 내에 존재하는 극미량의 HCV도 검출할 수 있도록 함으로써 C형 간염의 진단과 병태생리의 규명에 커다란 진전을 가져오게 하였다.

한편 현재까지의 C형 간염의 이환상태에 관한 조사는 혈청학적 방법을 이용하여 이루어지고 있으나(Kim 등, 1992) 대부분 환자를 대상으로 한 소규모의 연구이며(김상우 등, 1992), 외국의 경우에도 환자를 대상으로 한 소규모 연구와(Hosoda 등, 1992) 실험실적 연구를 제외하고는 RT-PCR을 이용한 HCV의 감염 상태 조사 연구는 없는 실정이다.

이에 연구자는 HCV 감염의 진단을 위한 기존의 EIA법과 최근 개발된 RT-PCR법의 검사 능력을 평가할 목적으로 우리나라에서도 지역적 특성에 따른 간디스토마의 높은 유병률 등 간질환이 문제시 되는 부산·경남지역의 일부 성인을 대상으로 EIA법을 이용한 C형 간염 바이러스 항체(anti-HCV) 보유 여부와 함께 RT-PCR법을 이용한 HCV의 보유 여부에 대한 검사를 시행하였으며 부수적으로 질병력 및 가능한 감염 요인에 관한 자료 수집을 통하여 C형 간염의 위험요인을 찾고자 하였다.

연구방법

1. 연구대상

1993년 9월 1부터 11월 30일까지 인제대학교 부속 부산 백병원 성인병센터에서 종합건강진단을 수검한 1,077명 중 임상검사와 RT-PCR 및 설문조사의 자료가 공히 분석 가능한 경우는 617명이었으며 이들의 자료를 분석대상으로 하였다.

2. 연구방법

1) 혈청학적 검사

수검자로부터 전혈을 채혈하여 혈청을 분리한 후 -70°C 에 보관하였다가 검사 직전에 녹여 시료로 사용하였다. B형 간염 표면항원(HBsAg), B형 간염 표면항체(anti-HBs)는 Roche사 제품을 사용하여 ELISA 방법으로 검사하였으며, C형 간염 항체(anti-HCV)는 제조회사(ABOTT, USA)의 지시에 따라 EIA의 방법으로 검사하였다. 이 방법은 incubation well에 환자의 혈청 $200\mu\text{l}$ 와 biotinylated recombinant antigen 및 recombinant antigen coated particle을 첨가하여 항원-항체 반응을 일으킨 다음, anti-biotin(alkaline phosphate conjugate)을 첨가하여 항원-항체 반응 복합체와 결합하게 한다. 결합되지 않은 물질의 제거를 위하여 세척과정을 거친 후, substrate(4-methyl-umbelliferyl phosphate)를 첨가하여 형광발색 산물의 발색 정도를 MEIA optical assembly를 이용하여 측정한다. 판정은 mode I calibrator rate에서 측정되는 판독기준 한계치(cut off value)와 비교하여 시료의 rate가 같거나 클 경우를 양성으로 하였다.

2) RT-PCR

조사대상자의 혈청 또는 혈장에서 RNA를 추출한 다음, 역전사 반응과 PCR을 실시하고 그 결과를 전기영동으로 관찰하였다. RT-PCR의 전체 과정을 간단히 요약하면 Fig. 1과 같다.

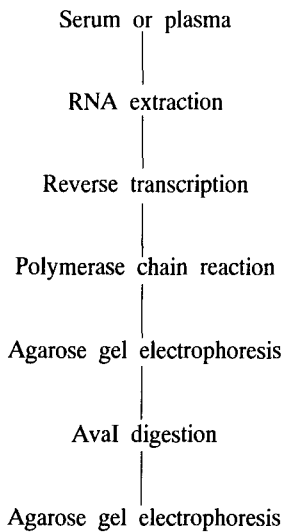


Fig. 1. RT-PCR strategy for detection of HCV-RNA

(1) RNA의 추출

시료는 대상자로부터 채혈 후 즉시 분리된 혈청을 액체질소에 보관한 것으로 실험 직전에 녹여 사용하였다. RNA의 추출에는 acid-guanidinium phenol법 (Chomczynski과 Sacchi, 1987)을 이용하였으며, 혈청 희석 효과를 방지하기 위하여 yeast t-RNA를 첨가하였다. 혈청 150 μ l에 300 μ l의 추출용액(6M guanidine thiocyanate, 37.5mM sodium citrate, 75mM 2-mercaptoethanol, 0.75% Sarkosyl, 0.75ug of yeast tRNA/ml)을 첨가한 후 잘 섞은 다음, 45 μ l의 2M sodium acetate(pH4.0), 495 μ l의 phenol 및 99 μ l의 chloroform을 가하여 15분간 세계 진탕하여 혼합한 후 소형 초고속원심분리기(Eppendorf microcentrifuge)로 10,000 g, 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리하였다. 상층액에 1 용량의 cold isopropanol을 넣어 -20 $^{\circ}$ C에서 2시간 침전시킨 다음, 다시 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 75% 냉각 ethanol로 1회 세척한 후 10 μ l의 증류수를 가하여 65 $^{\circ}$ C에서 침전물을 녹인 것을 역전사반응의 template RNA로 사용하였다.

(2) RNA의 역전사 반응과 PCR

antisense primer와 Moloney murine leukemia virus의 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 HCV-RNA와 상보적인 HCV-cDNA를 합성하였으며 HCV-RNA의 역전사와 PCR은 GeneAmp^R RNA PCR kit (Perkin-Elmer Cetus, USA)를 사용하였다. 역전사는 MgCl₂ 용액 4 μ l(25mM), 10x PCR bufferII(50mM Tris-HCl, pH8.3, 75mM KCl and 3mM MgCl₂) 2 μ l, dNTP mixture(각 100mM) 0.75 μ l, RNase inhibitor 0.75 μ l(50 unit/ μ l), random hexamer 0.75 μ l(10 μ M), reverse transcriptase 0.75 μ l(200 unit/ μ l) 및 HCV-RNA 용액 4 μ l를 가하여 총 13 μ l의 반응액을 만든 다음, 10분간 실온에 세워둔 후 42 $^{\circ}$ C에서 15분, 99 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 완료하였다.

본 실험에서는 5'-비전사 지역의 312bp를 생성시키는 20개의 염기로 구성된 sense, antisense primer를 선택하였으며, C형 간염의 cDNA 배열에서 primer의 위치 및 PCR에 의해 증폭되는 부분과 Aval restriction 위치를 Choo 등(1991)의 자료를 인용하여 Fig. 2에 나타내었다. 역전사 반응에서 얻어진 HCV의 cDNA 검체 13 μ l에 다시 10x PCR bufferII 3 μ l, 멸균된 증류수 28.75 μ l, AmpliTaq DNA polymerase 0.25 μ l(5 unit/ μ l), sense 및 antisense primer 각 2.5 μ l(10 μ M)를 가하여 총 50 μ l가 되도록 하였다. PCR 반응은 thermal cycler(Ericomp, USA)에서 40cycle을 실시하였으며, 각 단계에서의 반응 온도 및 시간은 table 1과 같다. 반응이 끝나면 PCR 반응액이 함유된 0.5ml 원심관에 20~50 μ l의 chloroform을 가하여 중층한 mineral oil을 녹여 PCR 반응액이 mineral oil의 위로 떠오르게 하여 회수하였다. 회수된 PCR 반응액 중 5 μ l를 6x 전기영동 완충액(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol and 40%(w/v) sucrose in water) 1 μ l와 섞어 2.2% agarose gel에서 50volt의 일정전압 하에 전기영동한 다음 ethidium bromide 염색을 하여 자외선 하에서 띠를 관찰하였다.

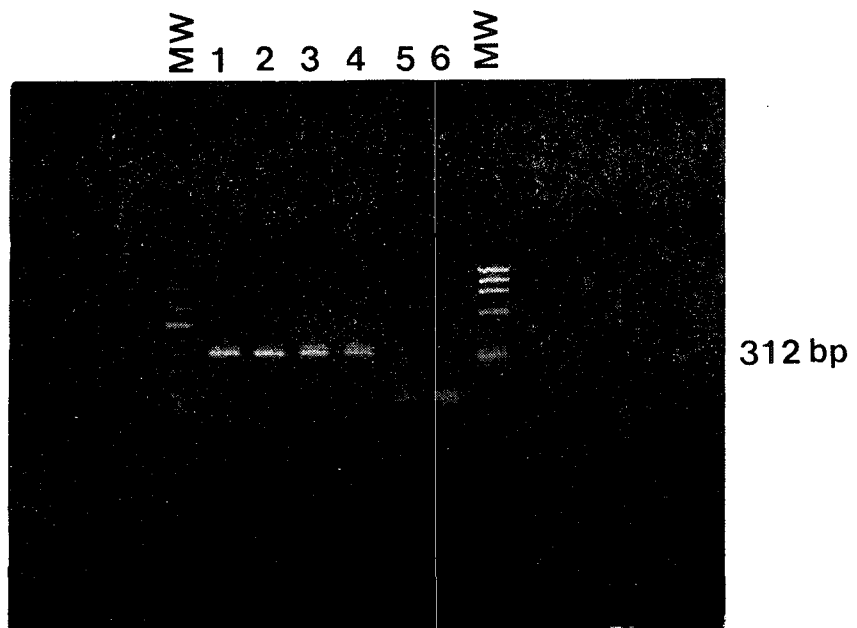


Fig 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

Lane 1-2 : Positive control

Lane 3-4 : Positive sample

Lane 5-6 : Negative

Molecular weight marker

Left GelTM marker I (from the top : 1000, 700, 525, 500, 400, 300, 200, 100, 50bP)

Right : HpaII -, DraI - and HindIII - digested pUCBM21

(from the top : 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37bP)

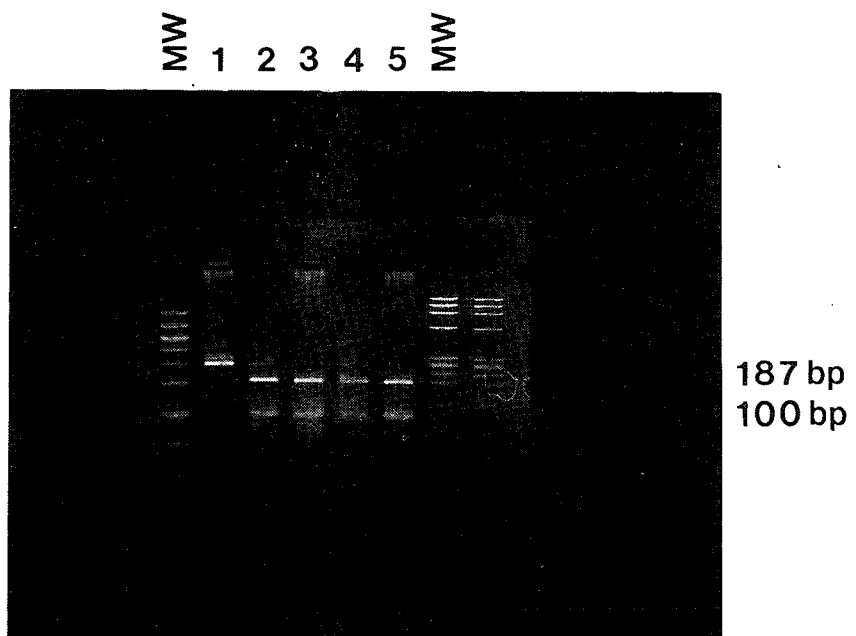


Fig 4. Restriction fragment length polymorphism of PCR products by *Ava*I
 Lane 1 : Uncut
 Lane 2-3 : Positive control
 Lane 4-5 : Positive sample
 Molecular weight marker
 Left Gel™ marker I (from the top : 1000, 700, 525, 500, 400, 300, 200, 100, 50bp)
 Right : *Hpa*II -, *Dra*I - and *Hind*III - digested pUCBM21
 (from the top : 1114, 900, 692,501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37bp)

ORIGIN

1 GCCAGCCCC TGATGGGGC GACTCTCCAC CATGAATCAC TCCCCTGT GAGGAACTACTG
 antisense primer→

61 TCTTCACGCA GAAAGCGTCT AGCCATGGCG TTAGTATGAG TGTCGTGCAG CCTCCAGGAC
 ↓

121 CCCCCTCCC GGGAGAGCCA TAGTGGTCTG CGGAACCGGT GAGTACACCG GAATTGCCAG

181 GACGACCGGG TCCTTTCTTG GATCAACCCG CTCAATGCCT GGAGATTTGG GCGTGCCCCC

241 GCAAGACTGC TAGCCGAGTA GTGTTGGGTC GCGAAAGGCC TTGTGGTACT GCCTGATAGG
 ↓

301 GTGCTTGC GA GTGCCCGG AGGTCTCGTA GACCGTGCAC CATGAGCACG AATCCTAAAC
 ←sense primer

Fig. 2. Amplified DNA fragments of the hepatitis C virus and restriction sites(↓) by *Ava*I. Sizes and nucleotide sequences of each primer are marked by underline. Sense primer(←) hybridizes to the complementary strand and antisense primer(→) to the coding strand.

Table 1. Temperature and time in each cycle to amplify HCV-cDNA

Steps	Denaturation (95°C : min)	Annealing (55°C : min)	Extension (72°C : min)	No. of cycle
First	4	1	1	1
Intermediate	0.5	0.5	1	40
Last	0.5	0.5	5	1

min : minutes

PCR 결과 양성 판정을 위하여 임상적으로 C형 간염이 의심되어 혈청학적 검사가 의뢰된 환자 중 EIA 검사에서 양성을 나타내나 아직 치료를 시작하지 않았으며, 다른 종류의 간염이 의심되지 않는 환자로부터 얻은 RNA에 대하여 RT-PCR을 시행하고 제한효소분석을 거쳐 control로 이용하였다. 즉 실험의 모든 과정에서 control RNA를 함께 실험하여 띠의 유무를 확인하였으며 그 결과는 Fig. 3과 같다. 증폭된 분절은 자외선 하에서 뚜렷한 띠로 나타났으며 *Hae*III-digested ϕ X 174 표준분자량 표지 및 Gel™ marker I (Research Genetics)와 비교한 결과 띠의 크기는 312bp였다.

(3) PCR 산물의 검증을 위한 제한효소 분석

Fig. 4는 HCV-RNA의 RT-PCR 산물을 *Ava*I 제한효소로 처리한 후 2.2% agarose에서 전기영동한 결과로 PCR에서 양성으로 나타난 시료에 대하여는 control RNA와 함께 *Ava*I에 의한 제한효소 분석을 시행하여 결과를 검증하였다. 312bp의 1차 PCR 산물은 동 효소에 의하여 특정부위가 잘려 분절되며 생성되는 분절의 크기는 187bp, 100bp 및 25bp의 3가지가 된다. 25bp의 분절은 primer 크기와 비슷하여 육안 관찰이 어려우나 187bp와 100bp 2개의 띠는 상기의 표준분자량 표지와 비교하여 확인할 수 있으며, 본 띠를 확인할 경우 1차 PCR 산물이 HCV-RNA로부터 유래되었음을 간접 확인할 수 있으므로 양성으로 판정하였다.

3) HCV 감염과 관련되는 요인에 관한 자료 수집

HCV 감염과 관련되는 요인에 관한 자료는 설문조사를 통하여 수집하였으며, 자료의 내용은 성, 연령, 직업, 흡연과 음주상태 등의 일반적 사항과 수술, 수술,

침, 문신의 과거력, B형 간염 예방접종 여부, 본인의 간염의 과거력, 직계 존비속의 간염의 과거력 등을 포함하였다. 설문은 직접면접 설문지에 대한 소정의 훈련을 거친 조사원으로 하여금 완성하게 하였다.

4) 자료분석

자료의 분석은 PC-SAS 통계프로그램(version 6.08)을 이용하여 임상검사와 위험요인에 관한 자료의 내용에 따른 chi-square test, Fisher's exact test를 실시하였으며, 한국통계연감(1992)의 해당 연령군의 전국 인구 구조에 따른 표준화율을 산출하였다. HCV 감염의 진단에 대한 EIA법과 RT-PCR법의 일치도는 gamma 통계량으로, 두 검사법의 차이는 McNemar's chi-square test를 이용하여 각각 평가하였으며, EIA법의 양성예측도 및 음성예측도를 산정하였다. 모든 분석에서 유의수준은 0.05로 하였다.

연구성적

1. 연령, 성, 간기능 소견에 따른 HCV의 감염률

대상자의 성별 분포는 Table 2에서와 같이 남자 327명(53.0%), 여자 290명(47.0%)으로 남녀 간에 차이가 없었고, 연령별 분포는 15~44세군 56.2%, 45~64세군 41.7%이었으며, 평균연령은 43세였다. EIA법의 결과 anti-HCV의 양성률은 617명 중 9명(1.5%), RT-PCR법의 결과 HCV의 양성률은 23명(3.7%)으로 각각 나타나, RT-PCR법에 의한 율이 EIA법에 의한 것보다 유의하게 높았으며($p < 0.05$), 해당 연령군의 전국 인구 구조에 의한 표준화율 역시 EIA법으로는 1.7%, RT-PCR법으로는 3.4%로 RT-PCR법에 의한 율이 높았다. 두 방법에 의한 연령군별 HCV 감염률은 15~44세군에서 1.2%와 2.3%, 45~64세 군에서 1.6%와 5.5%, 65세 이상군에서 7.7%와 7.7%로 고 연령군일수록 높았으며($p < 0.05$), 성별로는 남자 1.5%와 4.3%, 여자 1.4%와 3.1%로 남녀 간에는 차이가 없었으나 45~64세군에서와 남자에서 두 방법간에 비교적 큰 차이를 보였다. 전체

Table 2. Prevalence of HCV infections by EIA and RT-PCR according to age, sex and LFT

	No. of tested (%)	HCV infection	
		EIA + (%)	RT-PCR + (%)
Age group			
15 ~ 44	347(56.2)	4(1.2)	8(2.3)
45 ~ 64	257(41.7)	4(1.6)	14(5.5)
65 ~	13(2.1)	1(7.7)	1(7.7)*
Sex			
Male	327(53.0)	5(1.5)	14(4.3)
Female	290(47.0)	4(1.4)	9(3.1)
LFT [†]			
Normal	557(90.3)	6(1.1)	17(3.1)
Abnormal	60(9.7)	3(5.0)*	6(10.0)**
Total	617(100.0)	9(1.5)	23(3.7)*
Standardized rate [‡]		1.7%	3.4%

EIA : Enzyme immunoassay

RT-PCR : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

HCV : Hepatitis C Virus

LFT[†] : Liver function test

Normal : AST(GOT) < 35, ALT(GPT) < 50

Abnormal : AST(GOT) ≥ 35, ALT(GPT) ≥ 50

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

‡ Standardized by age with Korean population

의 9.7%에서 간기능 이상 소견을 나타내었으며, 두 방법에 의한 HCV의 감염률은 간기능 정상군 1.1%와 3.1%, 비정상군 5.0%와 10.0%로 간기능 비정상군에서의 HCV 감염률이 유의하게 높았다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

2. 연령, 성, 간기능 소견에 따른 HBsAg의 양성률

617명 중 42명(6.8%)에서 HBsAg 양성을 나타내었으며, 해당 연령군의 전국 인구에 의한 표준화율은 7.7%였다. 연령, 성, 간기능 소견에 따른 HBsAg의 양성률은 table 3에서와 같이 연령별로는 15~44세 군에서 8.7%, 45~64세 군에서 4.3%, 65세 이상군에서 7.7%로 젊은 연령층에서 양성률이 높았고, 성별로는 남자 9.8%, 여자 3.5%로 남자에서 유의하게 높았다($p < 0.01$). 간기능 소견에 따른 HBsAg의 양성률은 정상군 5.9%, 비정상군 15.0%로 비정상군에서 유의하게 높았다($p < 0.01$).

Table 3. Prevalence of HBsAg by age, sex and LFT

	No. of tested(%)	HBsAg+(%)
Age group		
15 ~ 44	347(56.2)	30(8.7)
45 ~ 64	257(41.7)	11(4.3)
65 ~	13(2.1)	1(7.7)
Sex		
Male	327(53.0)	32(9.8)**
Female	290(47.0)	10(3.5)
LFT†		
Normal	557(90.3)	33(5.9)
Abnormal	60(9.7)	9(15.0)**
Total	617(100.0)	42(6.8)
Standardized rate††		7.7%

HBsAg : Hepatitis B surface antigen

LFT† : Liver function test

Normal : AST(GOT) < 35, ALT(GPT) < 50

Abnormal : AST(GOT) ≥ 35, ALT(GPT) ≥ 50

* p < 0.01

†† : Standardized by age with Korean population

Table 4. Prevalence of HCV infection by EIA and RT-PCR according to Hepatitis B makers

HBV markers	No. of tested (%)	HCV infection	
		EIA+(%)	RT-PCR+(%)
HBsAg Anti-HBs			
- -	319(51.7)	5(1.6)	13(4.1)
- +	256(41.5)	3(1.2)	10(3.9)
+ -	41(6.6)	1(2.4)	0(0.0)
+ +	1(0.2)	0(0.0)	0(0.0)
Total	617(100.0)	9(1.5)	23(3.7)

HCV : Hepatitis C virus

HBV : Hepatitis B virus

HBsAg : Hepatitis B surface antigen

Anti-HBs : Hepatitis B surface antibody

EIA : Enzyme immunoassay

RT-PCR : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

3. B형 간염 표식자에 따른 HCV의 감염률

B형 간염 표식자에 따른 대상자의 분포는 table 4에
서와 같이 HBsAg 음성 및 anti-HBs 음성군이 319명
(51.7%), HBsAg 음성 및 anti-HBs 양성군이 256명(41.

5%), HBsAg 양성 및 anti-HBs 음성군이 41명(6.6%),
HBsAg 양성 및 anti-HBs 양성군이 1명(0.2%)이었고,
이들 표식자에 따른 anti-HCV의 양성률은 HBsAg 음
성 및 anti-HBs 음성 군에서 5명(1.6%), HBsAg 음성
및 anti-HBs 양성군에서 3명(1.2%), HBsAg 양성 및
anti-HBs 음성 군에서 1명(2.4%), HBsAg 양성 및 anti-
HBs 양성군에서 0명(0.0%)으로 나타났다. RT-PCR법
의 결과 HCV의 양성률은 HBsAg 음성 및 anti-HBs 음
성 군에서 13명(4.1%), HBsAg 음성 및 anti-HBs 양성
군에서 10명(3.9%), HBsAg 양성 및 anti-HBs 음성 군

Table 5. Prevalence of HCV infection by EIA in relation to past and medical history

Past and medical history	No. of tested	EIA+(%)
Past history		
Hepatitis B		
+	40	2(5.0)
-	577	7(1.2)
HB Vaccination		
+	300	3(1.0)
-	317	6(1.9)
Blood transfusion		
+	35	0(0.0)
-	582	9(1.6)
Operation		
+	225	4(1.8)
-	392	5(1.3)
Acupuncture		
+	409	6(1.5)
-	208	3(1.4)
Tattoo		
+	79	1(1.3)
-	538	8(1.5)
History of smoking		
Non-smoker	323	3(0.9)
Ex-smoker	75	1(1.3)
Smoker	219	5(2.3)
History of drinking		
Non-drinker	341	4(1.2)
Ex-drinker	42	2(4.8)
Drinker	234	3(1.3)
Family history		
Hepatitis B		
+	35	1(2.9)
-	582	8(1.4)
Total	617	9(1.5)

EIA : Enzyme immunoassay

HB : Hepatitis B

과 HBsAg 양성 및 anti-HBs 양성군에서는 공히 HCV 양성자가 없었다.

4. 관련요인에 따른 HCV의 감염률

B형 간염의 과거력, B형 간염 예방접종 여부, 수술 및 수술의 과거력, 침과 문신의 과거력, 흡연과 음주상태 등과 직계 존비속에서의 B형 간염의 과거력에 따른 HCV의 감염률은 table 5와 같다.

EIA법에 의한 HCV의 감염률은 B형 간염의 과거력이 있는 경우 5.0%, B형 간염 예방접종을 받은 경우 각각 1.0%로 B형 간염의 과거력 및 B형 간염의 예방접종 여부에 따른 차이는 없었으며 수술의 과거력에 따라서도 수술 경력 있는 경우 0.0%와 없는 경우 1.6%로 차이가 없었다. 수술, 침, 문신의 과거력에 따라서는 수술 경력이 있는 경우 1.8%, 침의 경력이 있는 경우 1.5%, 문신의 경력이 있는 경우 1.3%로 각각 과거력이 없는 경우와 유의한 차이가 없었다. 흡연 및 음주상태에 따른 HCV의 감염률은 흡연군 2.3%, 비흡연군 0.9%로 흡연군에서 높았으나 유의한 차이는 아니었으며, 음주군 1.3%, 음주 중단군 4.8%, 비음주군 1.2%로 음주 중단군에서 다소 높았으나 유의한 차이는 아니었다.

5. HCV 감염의 진단에 대한 EIA법과 RT-PCR법의 비교

HCV 감염의 진단에 대한 EIA법과 RT-PCR법의 비교에서 두 검사법의 일치도는 97.2%였으며, McNemar's chi-square test 결과 두 검사법은 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.01$). RT-PCR법에 의하여 HCV 항원이 확인된 경우는 617명 중 23례(3.7%)이었으며 이중 EIA법에 의한 anti-HCV의 양성 예는 6례이었고, 음성 레는 17례로 EIA법의 양성예측도는 66.7%(6/9)였다. 한편 EIA법에 의하여 음성이었던 608례 중 RT-PCR법에 의한 양성 레는 591례로 EIA법의 양성예측도는 97.2%(591/608)이었다(table 6).

Table 6. The results of EIA and RT-PCR for the detection of HCV infection

EIA	RT-PCR		Total
	Positive	Negative	
Positive	6	3	9
Negative	17	591	608
Total	23	594	617

HCV : Hepatitis C virus

EIA : Enzyme immunoassay

RT-PCR : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

• Gamma statistics = 0.972

• McNemar's chi = 8.45($p < 0.01$, $df = 1$)

고 찰

Prince 등(1974)에 의해 최초로 NANB형 간염이 보고된 이후 C형 간염에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 1988년 Chiron사에 의해 처음으로 C형 간염 바이러스 항원(C100-3)에 대한 검출법이 개발되고, 수술 후 간염 환자의 70% 이상에서 동 항체(anti-C100-3)를 보유한 것으로 밝혀짐으로써 이 방법을 이용한 C형 간염의 진단이 임상적으로 널리 이용되게 되었다(Alter 등, 1989; Arima 등, 1989; Bruix 등, 1989; Weiner 등, 1990). 그러나 이 항체 검사법은 자가면역성 질환이나 높은 수치의 감마글로불린혈증을 동반하는 질환자에서 높은 양성률을 나타내는 것(Ikeda 등, 1990; McFarlane 등, 1990)과 조기의 C형 간염 환자에서는 그 양성률이 낮다는 것이 문제점으로 지적되었다(Yahagi 등, 1991). 그리하여 C100-3 이외의 몇 가지 항원들을 사용하는 2세대 항체계 검사가 개발되었으며, 이는 5'-말단 근처의 구조유전자에 위치한 핵항원 재조합 단백질을 사용하여 1세대에 비하여 6~8주 빨리 항체를 검사할 수 있는 장점을 지녀 1세대 진단시약은 점차 2세대 진단 시약으로 바뀌는 추세이다(Kuhnl 등, 1989; Kuo 등, 1989). 하지만 2세대 진단시약을 이용한 방법 또한 조기진단의 어려움 및 바이러스의 직접 검출과는 상이한 결과를 보여 논란의 대상이 되기도 하였다.

Garson 등(1990)이 HCV-RNA 검사를 위해 시도한 역전사중합효소연쇄반응(RT-PCR)은 이러한 면역혈청

학적 방법의 단점을 보완하며, 오랜기간 동안 잘 알려져 있지 않던 NANB형 간염의 진단 및 병태생리를 규명하는데 커다란 진전을 보게 하였다. 그러나 HCV genome의 다양성 등으로 염기서열의 차이가 문제로 대두되고 있으며(Houghton 등, 1991), primer의 선택이 PCR의 성공여부 자체에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. Choo 등(1991) 및 Han 등(1991)은 NS3/NS4 부위에서 선택한 primer보다 HCV genome의 5'-비전사 부위 절편에서 선택한 primer로 PCR을 시행하는 것이 더 예민하다고 보고하였고, Inchauspe 등(1991)은 5'-비전사 또는 nucleocapsid 유래의 primer를 사용하는 것이 다른 region의 primer를 사용하는 것보다 더 높은 양성률을 보이며, acute 및 chronic phase에 대해서도 RT-PCR의 방법이 C100-3 항체검사법에 비해 민감도가 높다고 보고하였다. 그러나 김 등(1991)은 5'-비전사지역의 primer를 사용한 RT-PCR방법에서 양성률이 제 2세대 EIA시약을 사용한 양성률과 비슷하다고 보고하였다.

또한 Okamoto 등(1992)은 HCV는 4 가지 subtype를 지니며 primer의 선택에 따라 PCR의 결과가 다를 수 있음을 보고하였다. 따라서 저자는 5'-비전사 부위의 20bp 크기의 primer를 선택하였으며, 임상적으로 C형 간염이 진단된 환자로부터 얻은 RNA를 이용하여 RT-PCR과 Aval 제한효소분석 과정 모두에서 함께 실험하여 PCR 결과 판정을 위한 control로 이용함으로써 상기 결점을 보완하고자 하였다.

HCV의 감염률은 EIA법에 의한 anti-HCV 양성률은 1.5%, RT-PCR법에 의한 HCV 항원 양성률로는 3.7%를 각각 나타내어 RT-PCR법에 의한율이 EIA법에 의한율보다 높았으며($p < 0.05$), 연령 표준화를 역시 RT-PCR법에 의한율이 EIA법에 의한 것보다 높았다. 즉 HCV 감염 진단의 민감도는 RT-PCR법이 EIA법보다 높은 것으로 나타났으며, EIA법에 의한 anti-HCV 양성률은 김 등(1992)이 ELISA법을 이용하여 보고한 우리나라 건강 성인의 anti-HCV 양성률 1.7%와 헌혈인을 대상으로 한 김 등(1991)의 1.1%, 외국의 몇 예(Janot 등, 1989; Kuhnl 등, 1989; Kuo 등, 1989;

Sirchia 등, 1989; Stevens 등, 1990; Watanabe 등, 1990)의 결과와 유사하였다.

연령별 HCV 감염률은 고연령군이 저연령군에 비하여 높게 나타나, 외국의 보고(Stevens 등, 1990, Wong 등, 1990)와 유사하였으며 이는 연령이 높을수록 감염원에 폭로되는 기간이 길어 위험도가 가중된다는 것으로 설명될 수 있겠다. 성별로는 HCV 감염률에 차이가 없었으며 간기능 소견에 따라서는 간기능 비정상군에서의 HCV 감염률이 정상군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 간기능 이상 소견이 HCV 감염의 위험요인의 하나인지 또는 HCV 감염의 결과로 나타나는 현상인지에 대하여는 향후 보다 상세한 연구가 필요하리라 생각되나 임상검사상 특이항원의 발견이 없다 하더라도 간기능에 이상 소견을 보이는 경우 간질환에 대한 monitoring이 필요할 것이다. 또한 두 가지 방법에 의한 결과 비교에서 45~64세군과 남자에서 비교적 큰 차이를 보인 점은 추후 세밀한 분석을 통하여 설명되어야 할 부분이다.

ELISA법에 의한 HBsAg의 양성률은 6.8%이었으며, 연령 표준화율은 7.7%로 김 등(1992)이 RIA법을 적용하여 보고한 우리나라 건강 성인 남자의 HBsAg 양성률 6.5%와 유사하였다. 연령군으로는 젊은 연령층이, 성별로는 남자가 유의하게 높아($p < 0.05$) 사회적 활동이 왕성하여 음주 및 외식의 기회가 많은 군에서 경구적인 전파 경로를 통한 B형 간염의 위험이 높음을 시사하였다.

B형 간염 표식자에 따른 anti-HCV의 양성률은 HBsAg 음성 및 anti-HBs 음성 군에서 1.6%, HBsAg 음성 및 anti-HBs 양성군에서 1.2%이었으며, RT-PCR법에 의한 HCV의 양성률은 HBsAg 음성 및 anti-HBs 음성 군에서 4.1%, HBsAg 음성 및 anti-HBs 양성군에서 3.9%로 나타난 반면, EIA법에 의한 HBsAg 양성 및 anti-HBs 음성 군의 1명을 제외하고는 두 방법 모두에서 HBsAg 양성 및 anti-HBs 음성 군과 HBsAg 양성 및 anti-HBs 양성군에서는 HCV 양성자가 없어 HCV 감염과 HBV 감염은 직접적인 관련은 없는 것으로 생각된다.

수집된 관련 요인에 따른 HCV의 감염률은 음주 중단군에서 다소 높게 나타났으나 역시 음주가 HCV 감염의 위험요인의 하나인지 또는 HCV 감염을 인지한 후 인위적으로 음주를 중단하였는지에 대한 상세한 규명이 필요하리라 생각되며, 음주와 관련한 위험요인 분석에는 음주량의 파악이 동반되어야 할 것이다. 수혈의 과거력에 따라서는 수혈 경력이 없는 군이 있는 군에 비하여 높았으나 유의한 차이는 아니었다. 즉 C형 간염의 전파는 혈액을 통한 경로가 가장 중요하다고 알려져 있으나(Alter 등, 1990; Nishioka 등, 1991) 결과가 일치하지 않았던 것은 본 연구의 대상자에서 수혈자의 비율이 낮았던 때문으로 생각되며, 성적 접촉(Alter 등, 1989; Hess 등, 1989), 가족 내의 집적성(Kamitsukasa 등, 1989; Ideo 등, 1990), 정맥용 주사 약물의 이용(Esteban 등, 1989) 등에 의한 정보가 없었음은 아쉬움으로 남는다.

HCV 감염의 진단에 대한 EIA법과 RT-PCR법의 비교에서 두 검사법의 일치도는 97.2%였으며, McNemar's chi-square test 결과 두 검사법은 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.01$). RT-PCR법에 의하여 HCV 항원이 확인된 23례 중 EIA법에 의한 anti-HCV의 양성 예는 6례로 EIA법의 양성예측도는 66.7%이었으며 EIA법에 의하여 음성이었던 608례 중 RT-PCR법에 의한 음성 레는 591례로 EIA법의 음성예측도는 97.2%이었다.

이러한 차이를 보이는 근거로 Ortho, Abott 및 Chiron test의 EIA법은 모두 HCV의 동일 region 으로부터의 항원을 사용하므로 flavivirus and/or pestivirus에 대한 교차반응(cross-reactivity)이 있을 수 있으나 그 정도가 아직은 임상적으로 시행되지 않고 있는 점(Wong 등, 1990)과, C100-3 항원의 문제점 중 자가면역성 질환 및 높은 수치의 감마글로불린혈증을 나타내는 질환자에서의 높은 위양성률(Ikeda 등, 1990; McFarlane 등, 1990) 등을 들 수 있다. 또한 위음성의 가장 중요한 원인으로 지적되는 HCV 감염 후의 window period의 존재(Alter 등, 1989; Kuo 등, 1989; Diensag, 1983; McHutchinson 등, 1989; Yahagi 등,

1991)와, 검사 방법 자체의 위음성(Boudart 등, 1990; Ikeda 등, 1990; McFarlane 등, 1990; Theilman 등, 1990), 그리고 혈액 중의 극미량 HCV로 인한 검사 누락(Bradley 등, 1979; Vitvitski 등, 1979; Krawczynski 등, 1991) 등을 고려할 수 있을 것이다. 특히 window period에 대하여는 빠르면 감염 후 4~15주부터 항체가 나타나기 시작하지만, 보통 4개월 이후에야 항체가 형성되며 때로는 감염 후 1년이 지나서야 항체가 검출된 경우도 있다는 보고도 있다(Inchauspe 등, 1991). 또한 혈청학적 검사법의 타당성을 검토한 대부분의 연구는 임상적으로 진단된 환자를 대상으로 여러 방법을 적용하여 이루어지나, 본 연구에서는 다수의 정상인을 대상으로 두 가지 방법을 실시하였으므로 정상인의 경우 환자에 비하여 혈액 중의 미량 HCV로 인한 검사 누락 등에 기인하여 EIA법에 의한 양성률이 실제보다 낮았을 수도 있을 것이다.

이상의 결과로 볼 때 anti-HCV 음성이 HCV 감염을 완전히 배제하지 못한다는 이 등(1991)의 지적은 근거가 있으며, 본 연구결과 EIA법의 양성예측도는 66.7%에 불과하므로 임상 검사에서 특이한 소견이 없다 하더라도 증상이나 간기능 검사 등에서 간질환의 의심이 되는 경우 PCR 등의 실시를 통한 monitoring이 필요하리라 하겠다.

본 연구는 몇 가지의 제한점을 지니고 있다.

첫째, 한 대학병원의 종합건강진단 수검자를 대상으로 하여 연구를 수행하였으므로 선택편견이 있었을 가능성이 있다. 종합건강진단 수검자는 건강에 문제가 있거나 문제가 있을 가능성이 높은 집단이라 볼 수 있으며, 경우에 따라서는 환자가 포함되어 있을 수도 있으므로 본 연구의 결과를 일반 주민집단에 그대로 적용하기에는 제약이 있겠다. 또한 대부분의 위험도에 관한 연구는 환자-대조군의 형태로 이루어지나 건강인으로 분류될 수 있는 집단을 대상으로 하여 부수적으로 특정질환에 대한 위험요인을 파악하였다. 따라서 위험요인의 파악은 향후 일정지역의 모집단을 대상으로 단면연구와 환자-대조군연구를 시행하여 보완하고자 한다.

둘째, 위험요인에 관한 자료 수집에서 특정 항목에 관하여는 미응답하거나, 불분명한 부분이 있었던 바, 정보편견의 가능성이 있다. 본 연구의 주된 설문변수인 과거 간질환력은 다른 연구를 통하여 그 신뢰도가 높은 것으로 보고되고 있으나(Kelly 등, 1990), 직접면접 설문작성법에 대한 소정의 훈련을 거친 조사원으로 하여금 설문을 완성하게 함으로써 정보편견을 될 수 있는 한 줄이려고 시도하였음에도 불구하고 질환의 가족력이나 의료에 관한 과거력에는 미흡한 점이 있으므로 향후 보다 접근과 응답이 용이한 설문을 개발·적용함으로써 정보편견의 최소화에 노력하여야 하겠다.

셋째, 혈청학적 방법에 대하여 위양성의 결과를 보일 수 있는 자가면역성 또는 대사성 질환의 배제와 RT-PCR법의 primer의 선택에 따른 민감도(Choo 등, 1991; Han 등, 1991; Inchauspe 등, 1991; Hosoda 등, 1992)와 HCV의 subtype에 관한 검증이 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 임상적으로 C형 간염이 확진된 환자로부터 얻은 RNA를 control로 삼아 전 과정에서 함께 실험하고 Aval 제한효소분석을 통하여 이러한 결점을 보완하고자 하였지만 완전한 것은 아닐 것이다. 그러므로 EIA와 RT-PCR의 결과 양상으로 나타난 9례 및 23례에 대한 추적조사와 더불어 혈청학적 위양성 가능 질환의 조사, HCV의 subtype 결정, 1차 PCR 산물에 대한 nested PCR, 직접 염기서열 결정 등이 이루어져야 할 것이다.

이상의 제한점에도 불구하고 본 연구는 우리나라에서는 최초로 다수를 대상으로 하여 HCV 감염의 확인을 위한 RT-PCR법을 적용하였다는 점에서 의의가 크다 하겠으며, RT-PCR법을 이용한 HCV RNA 검출의 민감도가 EIA법을 이용한 혈청학적 방법보다 높게 나타나는 바, 이 방법이 임상적으로 용이하게 적용된다면 급성감염 후 임상 및 검사소견상 이상이 발현되기 전 시기의 HCV 감염 여부 확인과 혈청학적으로 anti-HCV가 양성일 때 이것이 현재의 활동적인 감염상태를 의미하는 것인지 단순한 과거의 감염상태를 의미하는 것인지를 구분, 그리고 anti-HCV 음성인 만성 HCV 보유자를 선별할 수 있는 수단이 될 수 있을 것

이다. 우리나라에서는 만성 간질환의 유병률과 사망률이 높고 더욱이 원발성 간암의 발생에도 C형 간염이 깊은 관련을 보이므로(Kuo 등, 1989; Kim 등, 1993) RT-PCR법을 이용한 HCV 감염의 정확한 조기진단이 가능하다면 이는 간질환 대책에 큰 의의를 지닌다 하겠다.

결론

HCV 감염의 진단을 위한 EIA법과 RT-PCR법의 검사 능력을 평가할 목적으로 부산·경남지역의 일부 성인 617명을 대상으로 EIA법을 이용한 anti-HCV 보유 여부와 함께 RT-PCR법을 이용한 HCV의 보유 여부에 대한 검사를 시행하였으며 부수적으로 질병력 및 가능한 감염 요인에 관한 자료 수집을 통하여 HCV의 감염과 관련된 요인을 찾고자 하였다. HCV의 감염률은 EIA법에 의한 anti-HCV 양성률로는 1.5%(9/617), RT-PCR법에 의한 HCV 항원 양성률로는 3.7%(23/617)이었으며, 연령 표준화율은 각각 1.7%, 3.4%로 RT-PCR법에 의한 율이 EIA법에 의한 율보다 높았다($p < 0.05$). HBsAg의 양성률은 6.8%(42/617), 연령 표준화율은 7.7%이었으며, 남자에서 여자에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.01$). HCV의 감염률과 HBsAg의 양성률은 공히 간기능 이상 군에서 정상군보다 높았으며($p < 0.01$), C형 간염의 뚜렷한 위험요인은 없었다. HCV 감염의 진단에 대한 EIA법과 RT-PCR법의 비교에서 두 검사법의 일치도는 97.2%였으나, 두 검사법의 결과는 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.01$). HCV 감염의 확인에 대한 EIA법의 양성예측도는 66.7%(6/9), 음성예측도는 97.2%(591/608)이었다.

이상의 결과에서 EIA법에 의한 anti-HCV 음성이 HCV 감염을 완전히 배제하지 못하는 듯하며, EIA법의 양성예측도가 낮으므로 혈청학적 검사에서 특이한 소견이 없다 하더라도 임상 증상이나 간기능 검사 등에서 간질환의 의심이 되는 경우 PCR의 실시를 통한 HCV 감염의 monitoring이 요구된다.

참고문헌

- 김상우, 백승운, 김해엽, 김은주, 문인걸, 한인권. 중합효소 연쇄반응을 이용한 급성 C형 간염 환자 혈청에서의 HCV RNA의 검출. *대한내과학회지*. 1992;43(2): 155-160
- 김상인, 한규섭, 박명희, 오영철, 김기홍: 한국인 공혈자에서의 C형 간염항체 양성율. *대한수혈학회지* 1991;1: 1-5
- 김현숙, 김현옥, 권오현: C형간염 항체 검출용 EIA 진단 시약의 비교. *대한임상병리학회지* 1991;11:667-674
- 이효석, 임경옥: 중합효소연쇄반응을 이용한 간염바이러스 검출. *감염* 1991;4:229-233
- Ahn YO, Kim YS, Lee MS, et al. *Hepatitis B virus infection rate among Koreans*. *Seoul J Med* 1992; 33(2):105-114
- Alter MJ, Purcell RH, Shin JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G: *Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A non-B hepatitis*. *N Eng J Med* 1989;321:1494-1500
- Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ, et al. *Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A non-B hepatitis*. *JAMA* 1989; 262(9):1201-1205
- Alter MJ: *The hepatitis C virus and its relationship to the clinical spectrum of NANB hepatitis*. *Journal of Gastroenterology and hepatology(Suppl)* 1990;78
- Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. *Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the united states and association with hepatitis C virus infection*JAMA 1990;264(17):2231-2235
- Arima T: *Cloning of serum RNA associated with hepatitis C infection suggesting heterogeneity of the agent(s) responsible for the infection*. *Gastroenterol Jpn* 1989;24:685
- Boudart D, Lucas J-C, Muller J-Y, Lecauer D, Planchon Harrousseau J-L: *False-positive hepatitis C virus antibody tests in paraproteinemia*. *Lancet* 1990;336: 63
- Bradley DW, Cook EH, maynard JE, et al.: *Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: Recovery of virus-like particles associated with non-A,non-B hepatitis*. *J Med Virol* 1979;3:253
- Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Cook EH, Ebert JW, McCaustland KA, Schable CA, et al.: *Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: Physicochemical properties of two distinct agents*. *J Infect Dis* 1983;148:254-265
- Bruix J, Barrera JM, Calvet X, Ercilla G, Costa J, Sanchez-Tapias JM, Ventura M: *Prevalance of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis*. *Lancet* 1989;311:1004-1006
- Chomczynski P, Sacchi N. *Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Annal Biochem* 1987;162: 156-159
- Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. *Science* 1989; 244:359-362
- Choo Q-L, Richman RK, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, et al.: *General organization and diversity of the hepatitis C virus*. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:2451-2455
- Chung KW, Sun HS, Churg WK, Shin HK, Park CK, Yoo JY, Di Bisceglie AM, Waggoner JJ, Hoofnagle JH: *A preliminary report on the prevalence of type C hepatitis in Korea*. *Kor J Int Med* 1990;38(7):750
- Diensag JL: *NonA,non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. II. Experimental transmission; putative virus agents and markers, and prevention*. *Gastroenterology* 1983;85:439,749-768
- Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, et al. *Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain*, *Lancet* 1989;2(8658):294-296
- Garson JA, Tedder RS, et al.: *Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity*. *Lancet* 1990;335:1419-22
- Garson JA, Tuke PW, et al.: *Demonstration of viremia patterns in hemophiliacs treated with hepatitis C-*

- virus contaminated factor VIII concentrates. *Lancet* 1990;336:1022-25
- Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer Mj, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson D. et al.: *Characteristics of terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5'-untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. Proc Natl Acad Sci* 1991;88:1711-15
- Havens WP Jr. *Viral hepatitis multiple attacks in a narcotic addicts. Ann Int Med* 1956 ;44:199
- He L-F, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter MJ, Purcell RH. *Determinating the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. J Infect Dis* 1987;156: 636-640
- Hess G, Massing A, Rossol S, et al. *Hepatitis C virus and sexual transmission. Lancet* 1989;2(8669):987
- Hosoda K, Omata M, Yokosuka O, et al. *Non-A, non-B chronic hepatitis is chronic hepatitis C: A sensitive assay for detection of hepatitis C virus RNA in the liver. Hepatology* 1992;15(5):777-781
- Houghton M, Weiner A, Han JK, Kuo G, Choo QL: *Molecular biology of the hepatitis C virus: Implication for diagnosis, development and control of viral disease. Hepatology* 1991;14:381
- Ideo G, Bellati G, Pedraglio E, et al. *Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. Lancet* 1990; 335(8685):353
- Ikeda Y, Toda G, Hashimoto N, Kwokawa K: *Antibody to superoxide dismutase autoimmune hepatitis and antibody tests for hepatitis C. Lancet* 1990;335: 1345-1346
- Inchauspe G, Abe K, Zebede S, Nasoff M and Prince AM: *Use of conserved sequences from hepatitis C virus for the detection of viral RNA in infected sera by polymerase chain reaction. Hepatology* 1991;14: 595-600
- Janot C, Courouce AM, Maniez M. *Antibodies to hepatitis C virus in French blood donors. Lancet* 1989;2(8666):796
- Kamitsukasa H, Harada H, Yakura M, et al. *Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. Lancet* 1989; 2(8669):987
- Kelly JP, Rosenberg L, Kaufman DW, et al. *Reliability of personal interview data in a hospital-base case-control study. Am J Epidemiol* 1990;131:79-90
- Kim CY, Lee HS, Han CJ. *Relative etiologic role of hepatitis B and hepatitis C in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma among age-specific groups in Korea. Seoul J Med* 1993;34(1):27-33
- Kim YS, Park KS, Lee SI, Moon YM, Kang JK, Park IS, Choi HJ: *Clinical distribution profiles of hepatitis B virus markers in patients with liver diseases. Kor J Gastroenterol* 1983;15(2):169
- Kim YS, Pai CH, Chi HS, Kim DW, Min YI, Ahn YO: *Prevalence of Hepatitis C Virus Antibody Among Korean Adults, Journal of Korean Medical Science* 1992;7:333-336
- Korea Medical Insurance Corporation. *'89 Medical Insurance Statistical Yearbook No.11, 1990*
- Krawczynski K, Beach M, Di Bisceglie, et al. *Hepatocellular HCV associated antigen and antibody: Viral specificity and relation to natural history to infection. Hepatology* 1991;12:905
- Kuhnl P, Sheidl S, Stangel W, Beyer J, Sibrowski W, Flik J: *Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. Lancet* 1989;ii:29497
- Kuo G, Choo Q-L, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtmeier GE, Blonino F, Colombo M, Lee W-S, Kuo C, Berger K, Shuster JR, Overby LR, Bradeley DW, Houghton M: *An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A,non-B hepatitis. Science* 1989;244:362
- Lu SN, Lin TM, Chen CJ, et al. *A case-control study of primary hepatocellular carcinoma in Taiwan. Cancer* 1988;62:2051-2055
- McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Williams R. *Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: Pathogenic factor or false-positive results. Lancet* 1990;335:754-757
- McHutchison JG, Kuo G, Houghton M, Choo QL, Redeker AG: *Circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV): A study of 160 cases of acute and chronic NANB hepatitis. Hepatology* 1989;10:645
- Nishioka K, Watanabe J, Furuta S, et al. *A high prevalence of antibody to the hepatitis C virus in*

- patients with hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer* 1991;67(2):429-33
- Poterucha JJ, Rakela J, Lumeng L, Lee-CH, Taswill HF and Wiesner RH.: *Diagnosis of chronic hepatitis C after liver transplantation by the detection of viral sequences with Polymerase chain reaction. Hepatology* 1992;15:42-45
- Prince AM, Brotman B, Grady GF, et al. *Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. Lancet* 1974;2:241-246
- Saiki RK, Scharf, et al.: *Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science* 1985;230: 1350-1354
- Shimizu YK, Weiner AJ, Rosenblatt J: *Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. Proc Natl Acad Sci* 1990
- Shin HR, Lee CU, Park HJ, et al. *Risk factors for hepatocellular carcinoma among Koreans-A case control study in Pusan, Korea.-Summary report of Japan-Korea joint study on liver cancer 1987-1992, Fukuoka, Japan* 1993
- Sirchia G, Bellobuono A, Giovanetti A, et al. *Antibodies to hepatitis C virus in Italian blood donors. Lancet* 1989;2(8666):797
- Stevens CE, Taylor PE, Pindyc J, et al. *Epidemiology of hepatitis C virus. A preliminary study in volunteer blood donors. JAMA* 1990;263(1):49-53
- Suh DJ: *Serological profiles of hepatitis B virus infection in acute and chronic liver disease. Kor J Int Med* 1982;25(6):599
- Theilman L, Blaek M, Goeser T, Gmelin K, Kommerell B, Fiehm W: *False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. Lancet* 1990;335:1346
- Vitvitski L, Treppo C, Prince AM, Brotman B: *Detection of virus-associated antigen in serum and liver of patients with non-A,non-B hepatitis.Lancet* 1979;ii: 1263
- Watanabe J, Minegishi K, Mitsumori T, et al. *Prevalence of anti-HCV antibody in blood donors in the Tokyo area. Vox Sang* 1990;59(2):86-8
- Weiner AJ, Juo G, Bardley DW, Bomino F, Saracco G, Lee CM, Rosenblatt J, Choo QL, Houghton M: *Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. Lancet* 1990;335:1-3
- Wong DC, Diwan AR, Rosen L, Gerin JL, Johnson RG, Polito A, Purcel RH: *Non-specificity of anti-HCV test for seroepidemiological analysis. Lancet* 1990;336:750
- Yahagi N, Kitsugi K: *Interpretation of Ortho Ab ELISA test results by Chiron HCV recombinant immunoblotting assay. Jpn J Clin Pathol.* 1991;39:26-33 Zanetti AR,Tanzi E, et al: *Hepatitis C virus RNA in symptomless donors implicated in post transfusion non-A non-B hepatitis. Lancet* 1990;336:448
- Yoo KY, Park BJ, Ahn YO: *Seroepidemiology of Hepatitis B virus infection in healthy Korean adults in Seoul. Korean J Prev Med* 1988;21(1):89