

한국인에서 Hepatitis G Virus (HGV) 검출 및 항원분석에 관한 연구

국립보건원 바이러스질환부 소화기계바이러스과, 중앙대학교 의과대학¹, 부천 성가병원²

윤재득* · 지영미 · 이홍래 · 김기순 · 김영선 · 이윤성 · 정윤석
박정구 · 김지은 · 정상인¹ · 이원선² · 이원배²

=Abstract=

The Detection and the Antigenic Analysis of the Hepatitis G Virus in Korea

Jae-Deuk Yoon*, Young-Mee Jee, Hong-Rae Lee, Ki Soon Kim, Young-Sun Kim,
Yoon-Sung Lee, Yoon-Suk Chung, Jeong-Koo Park, Ji-Eun Kim,
Sang-In Chung¹, Won Sun Lee² and Won Bae Lee²

Laboratory of Enteroviruses, Department of Viral Diseases, National Institute of Health, Seoul 122-701, and ¹Department of Microbiology, Medical College, Chung-Ang University, Seoul 156-756, and ²Holy Family Hospital, Bucheon City, 420-717, Korea

We investigated the rate of hepatitis G virus infection among 50 patients who were not infected with the hepatitis C virus but showed symptoms of hepatitis.

Viral RNA was extracted from the patients' sera and cDNA was synthesized and amplified by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) using random hexamer and 5 primers (470-20-1-77F, 470-20-1-211R, 470-20-1-211R-biotin, GV57-4512MF, GV57-4657MR). The amplified PCR products were confirmed by electrochemiluminescence (ECL), liquid hybridization (LH) and Southern blotting (SB).

Among the 50 PCR products, by means of ECL, we found 4 samples to be positive and 5 samples to be indeterminate. The GV45-89M probe (5'-CYCGCTGRTTTGGGGTGTACTGGAAGGC-3') was end-labelled with gamma-³²P ATP and used for liquid hybridization with the PCR products. By using liquid hybridization, we detected specific bands from 4 positive sera and also from one indeterminate serum as determined by ECL. An 1.5% agarose gel electrophoresis of the 9 PCR products which were HGV positive or indeterminate as determined by ECL showed a 160bp band from 4 positive and one indeterminate serum. The 5 PCR products proved to be positive when SB was applied with the GV45-89M probe as well as when LH was applied. LH and SB were shown to have higher sensitivity and specificity than ECL. Two cases among 5 positive cases had relatively high SGOT, SGPT, ALP values when compared with other 48 cases.

In summary, we confirmed hepatitis G virus infection in 5 cases among 50 Korean patients showing symptoms of viral hepatitis.

Key Words: Hepatitis G virus (HGV), RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), Electrochemiluminescence, Liquid hybridization, Southern blotting

*Corresponding author: Jae-Deuk Yoon, Laboratory of Enteroviruses, Department of Viral Diseases, National Institute of Health, Seoul 122-701

G형 간염바이러스 (Hepatitis G virus, HGV)는 Flaviviridae family에 속하는 바이러스로 (+) sense single stranded RNA를 가지고 있는 유전학적으로 C형 간염바이러스 (Hepatitis C virus, HCV), GBV-A, -B 그리고 -C와 매우 밀접하게 연관되어 있다. 총 9,392개의 nucleotide를 가지고 있으며 2,893개의 아미노산을 encoding하고 있다. 그러나 HGV는 5' non-coding region에 HCV와는 이질적인 염기배열을 가지고 있으며, 중합단백질의 N-terminal region에 core protein을 encoding하는 부위가 결실되어 있다 [1,2].

HGV는 혈액을 통하여 감염을 일으키며 non A~E형 간염환자의 혈장에서 분리되고 감염자의 90~100%는 만성감염으로 발전된다. 또한 HGV의 acute disease spectrum은 잘 알려져 있지 않으며, 0.3% 정도가 급성 바이러스성 간염을 나타내고 있고, HGV 감염 위험군으로는 수혈자, injection drug users 등이 있다 [3,4]. 미국 국립보건원 (NIH)의 Alter 등의 보고에 의하면 수혈자의 경우 약 1~2%가 HGV 양성이며, 수혈 후 나타나는 non A-E형 급성간염의 약 20%가 G형 간염으로 밝혀 졌다 [5,6,7]. 수혈 후 발생하는 C형 간염의 경우에도 HGV와 중복감염된 경우가 적지 않게 보고되고 있으며, 미국의 경우 8%, 일본은 18%가 HGV와 중복감염된 것으로 나타났다. 국내에서도 HGV의 발생이 추정되고 있으나 이에 대한 정확한 실험적인 보고가 없는 실정이며, 이는 임상적으로 HGV가 단독으로 간질환을 유발하는지의 여부가 불확실하기 때문에 이에 대한 연구가 별로 이루어지지 않음에 기인하는 것 같다.

본 연구에서는 국내인에서 HGV 유행을 확인하기 위하여 병·의원으로부터 수집된 혈청 중 HGV와 유전학적으로 가장 연관성이 있는 HCV에 감염되지 않고 바이러스성 간염을 보이는 환자의 혈청으로부터 viral RNA를 추출하고 RT-PCR을 이용하여 DNA를 증폭시킨 다음 [8] electrochemiluminescence (ECL), liquid hybridization (LH) 및 southern blotting (SB)로 HGV 감염을 확인하고 민감도 및 특이도를 고려하여 가장 신속하고 적합한 진단방법을 확립하고자 하였으며, HGV 감염자의 혈청면역학적 특성을 조사하고자 하였다.

1. 대상군 선정 및 혈청가검물 수집

1997년 부천 성가병원을 비롯한 국내 여러 병·의원으로부터 임상적으로 바이러스성 간염증세를 보이는 50명의 환자혈청 (Table 1)을 수집하여 혈청학적인 요인의 검색 및 HGV RNA 검출을 위한 가검물로 사용하였다.

2. 혈청에서 viral RNA 추출

대상군의 혈청으로부터 viral RNA를 추출하기 위하여 Gentra systems (15200 25th Ave.N.Suite 104, Minneapolis, MN 55447)의 PureScript 방법과 시약을 사용하였다. 1.5ml 용량의 microcentrifuge 튜브에 625 μ l의 lysis solution을 분주하고 125 μ l의 혈청을 넣은 후 혼합용액이 맑아질 때까지 강하게 혼합하여 혈청내 바이러스를 lysis하였다. 250 μ l의 protein-DNA precipitation solution을 가하고 50회 정도 혼합하여 4 $^{\circ}$ C에 5분 정도 방치한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm/10분 동안 원심하여 단백질 및 DNA를 침전시켰다. 5 μ l의 glycogen (20mg/ml)이 함유된 microcentrifuge 튜브에 원심상층액을 넣고 cold isopropanol로 채운 다음 50회 이상 강하게 흔들어 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 이상 방치 후 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm/30분 동안 원심하여 상층액을 제거하고 70% cold ethanol을 넣어 15회 정도 흔들어 세척한 다음 다시 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm/15분 동안 원심한 후 상층액을 제거하였다. 5분 정도 air dry시킨 다음 멸균된 cotton tip으로 tube의 벽면을 닦고 25 μ l의 RNase free double distilled water (DDW)를 넣어 vortex 후 rehydration되게 30분 정도 ice에 방치하였다.

3. RT-PCR을 이용한 cDNA 제작 및 증폭

본 실험에서는 Figure 1에 보이는 바와 같이 HGV를 구성하고 있는 여러가지 structural/non-structural genomic region 중 non-structural region인 NS5a의 6960~7115 및 7924~8088사이의 염기서열을 대상으로 해당 primer를 사용하여 DNA를 증폭하였다.

20 μ l의 RT mix [DDW, 4.8 μ l; 10X PCR buffer (Perkin Elmer), 3.0 μ l; 25mM MgCl₂ (Perkin Elmer), 7.0 μ l; 20mM dnTP (ACGT Promega), 1.5 μ l; 0.1M dithiothreitol (DDT, Gibco/BRL), 1.5 μ l; Random

Table 1. Clinical and biochemical histories of HGV suspected patients

Applied No.	Sex	Age	Date of onset	Jaundice	Nausea	Vomiting	Abdm. Pain	GOT	GPT	ALP, μ L	f-GTP, μ L	TP(A)	TB(D/ID)	HAV-Ab	HBs-Ag	HBs-Ab	HCV-Ab	Diagnosis as
1	M	40	12/03/96	-	-	-	-	84	189	77	144	6.7(3.8)	1.0(0.2/0.8)	NA	+	-	-	Hepatitis
2	M	66	11/28/96	-	-	-	-	33	52	68	17	5.2(3.0)	1.0(0.2/0.8)	NA	+	+	-	Gastric ulcer, iron deficiency anemia
3	M	34	10/25/96	-	-	-	-	86	219	82	NA	7.7(4.5)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	Nasal polyposis
4	F	60	12/03/96	-	-	+	+	24	28	80	24	6.0(3.2)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	Irritable bowel syndrome, Diverticulum in duodenum
5	F	27	11/21/96	-	-	-	-	79	81	78	NA	7.5(4.2)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	-	-	Preg-induced fatty liver
6	M	43	11/26/96	-	-	-	-	102	89	45	NA	5.8(3.3)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	-	-	Duodenal ulcer perforation
7	F	33	NA	-	-	-	-	24	18	115	NA	5.6(2.8)	1.0(0.2/0.8)	NA	+	-	-	Preg. Known Hepatitis
8	M	70	11/26/96	-	-	+	+	87	45	52	NA	6.5(3.4)	1.8(0.6/1.2)	NA	+	-	-	Esophageal Diverticulum
9	F	32	10/07/94	+	-	-	+	26	30	62	16	6.7(3.4)	3.0(0.5/2.5)	NA	NA	NA	NA	Evan's Syndrome
10	M	2	12/05/96	-	-	-	-	2474	2123	NA	NA	4.9(2.7)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	Cerebral palsy, Fulminant hepatitis, Sepsis
11	M	42	12/08/96	+	-	-	+	147	138	104	NA	5.0(2.5)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	Acute pancreatitis, Chronic liver parenchymal Dis.
12	M	45	12/03/96	-	-	-	-	18	13	83	36	6.9(4.0)	1.9(0.3/1.6)	NA	+	+	-	DM
13	M	54	07/20/96	-	-	-	-	45	54	56	NA	6.7(3.1)	NA	NA	+	-	-	ICH & IVH, Hydrocephalus
14	M	33	11/12/96	-	-	-	+	31	33	45	21	7.0(3.9)	0.9(0.2/0.7)	NA	+	-	-	Rectal Ca.
15	F	14	10/15/96	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	F	14	10/15/96	NA	NA	NA	NA	21	63	90	NA	7.1(4.0)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	GB stone, R/o Hepatitis
17(A)	M	24	11/06/96	-	-	-	-	62	191	68	50	7.8(4.4)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	Hepatitis
18	M	43	11/02/96	-	-	-	-	47	32	39	NA	6.2(3.3)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	Fx Open shaft femur
19	M	37	11/13/96	-	-	-	-	26	38	51	NA	7.7(4.1)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	Hepatitis, Known
20	F	34	11/12/96	-	-	-	-	15	25	61	NA	7.3(3.8)	NA	NA	-	+	-	Spouse HCV Ab+
21	M	39	11/04/96	-	-	-	-	75	45	79	25	6.7(3.8)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	3 rd contact burn, High R+
22	F	66	11/06/96	+	-	-	+	42	126	99	236	4.1(1.6)	1.8(1.3/0.5)	NA	-	+	-	Drug-induced Hepatitis, Multiple Gastric ulcer
23	M	77	11/09/96	+	-	-	+	362	194	371	494	4.8(1.8)	20.9(16.7/4.2)	NA	-	+	-	Liver cirrhosis, Klaskin Tumor,
24	M	41	08/06/96	-	-	-	+	61	135	64	NA	6.3(3.8)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	Hepatitis
25	F	65	11/02/96	-	-	-	-	27	31	66	NA	7.3(4.0)	1.0(0.2/0.8)	NA	+	-	-	Hypertension
26	M	24	11/05/96	-	-	-	-	58	42	53	NA	7.3(3.9)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	K3 bursting Fx
27	F	33	11/29/96	-	-	-	-	124	184	115	NA	6.4(2.3)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	-	-	Preg. Myoma uterin.
28	M	67	06/05/95	-	-	-	-	63	43	124	NA	5.1(2.7)	1.7(0.4/1.3)	NA	-	-	-	Liver cirrhosis, DM. E. banx. Glastriitis
29	M	7	11/30/96	-	-	-	+	26	107	223	NA	6.9(3.5)	1.0(0.2/0.8)	NA	-	+	-	Mesenteric adenitis, Drug induced hepatitis
30(B)	M	63	10/05/90	-	-	-	-	30	50	44	NA	6.7(4.0)	NA	NA	-	+	-	RU inguinal hernia
31(C)	M	49	11/09/96	-	-	-	-	56	108	110	385	7.0(3.4)	NA	NA	-	+	-	Colon cancer
32(D)	M	65	11/20/96	+	+	-	+	45	71	489	NA	6.4(3.0)	NA	NA	-	+	-	Cholangio carcinomas
33	M	45	11/22/96	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	+	-	Hepatitis and Liver cirrhosis
34	M	32	11/18/96	-	-	-	+	24	39	60	NA	7.2(4.2)	NA	NA	-	+	-	Fatty liver or hepatitis
35(E)	M	38	11/18/96	-	-	-	+	32	28	53	NA	6.3	NA	NA	-	+	-	Gastric ulcer or duodenal ulcer
36(F)	F	1	11/13/96	+	-	-	-	253	149	359	933	6.4(2.2)	NA	NA	-	+	-	Biliary atresia and L/C
37	M	66	11/06/96	+	+	-	+	215	162	104	438	5.7(1.9)	NA	NA	-	+	-	L/C, alcoholic
38	M	1	11/01/96	+	+	+	+	179	232	286	NA	7.2(4.3)	NA	NA	NA	NA	NA	AGE, Hepatitis
39(G)	F	75	11/08/96	+	-	-	-	319	213	295	NA	5.9(3.3)	NA	NA	-	+	-	Acute hepatitis
40(H)	F	49	10/31/96	-	-	-	-	69	105	126	73	7.7(3.8)	NA	NA	-	+	-	HBP, Fatty liver
41	M	42	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	HA
42	M	55	02/21/96	-	+	+	+	22	28	93	NA	7.5(4.1)	NA	NA	-	+	-	Gastriitis
43(I)	F	75	11/21/96	-	+	+	+	34	29	68	35	6.0(3.1)	NA	NA	-	+	-	CHF, MR, Atrial fibrillation
44	M	49	12/03/96	-	-	-	-	46	76	71	NA	8.0(4.7)	NA	NA	-	+	-	Fatty liver
45	M	37	11/21/96	-	-	-	+	28	33	123	NA	4.5(1.2)	NA	NA	-	+	-	RPGN, duodenal ulcer
46	M	61	11/26/96	-	-	-	-	126	159	122	111	6.0(2.3)	NA	NA	-	+	-	NIDDM, TB destroyed lung
47	F	30	NA	-	-	-	-	18	15	138	NA	5.8(2.5)	NA	NA	-	+	-	Hepatitis
48	M	45	11/01/96	+	+	+	+	29	53	55	275	6.9(4.1)	NA	NA	-	+	-	Hepatopathy
49	M	40	11/01/96	-	+	+	+	45	19	68	96	6.5(3.0)	NA	NA	-	+	-	alcoholic liver disease
50	M	47	11/01/96	-	-	-	+	59	89	70	89	7.0(4.1)	NA	NA	-	+	-	Liver parenchymal dis.

NA: Not available
 Parenthesized characters of applied numbers match positive specimens described in the text

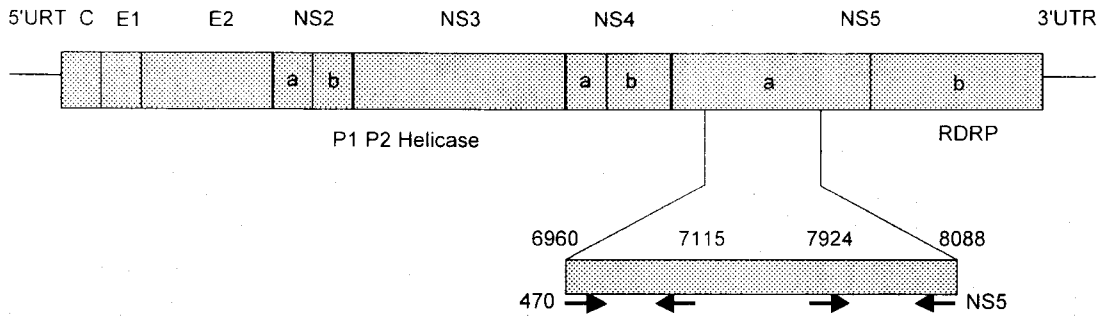


Figure 1. Genomic structure of the Hepatitis G virus. P1, zinc protease motif in NS2b; P2, chymotrypsin-like serine protease motif. The polyprotein is about 3,000 amino acid long. Primer sets used in this study are indicated.

hexamers (100µg/ml, Promega), 1.5µl; rRNAsin (40U/µl, Promega), 0.5µl; MMLV-RT (200U/µl, Gibco/BRL), 0.2µl → Total volume per reaction: 20µl]가 들어 있는 microcentrifuge tube에 혈청에서 추출된 10µl의 viral RNA를 넣고 50µl의 mineral oil을 첨가하였다. 음성대조로는 H₂O를 사용하였으며, RNA transcription 여부를 확인하기 위하여 470-20-1 RNA transcript를 사용하였고, DNA control로는 NS5를 사용하였다. 상기 mixture를 random primers가 binding할 수 있도록 10분 정도 실온에 방치한 다음 thermocycler를 이용하여 42°C에서 15분, 99°C에서 5분간 반응시켰으며 4°C에서 급속냉각하여 cDNA를 제작하였다.

제작된 cDNA의 증폭은 80°C에서 70µl의 PCR Master Mix (DDW 58µl; 10X PCR buffer 7.0µl; 100µM 5 primers [470-20-1-77F 1µl, 470-20-1-211R 0.5µl, 470-20-1-211R-biotin 0.5µl, GV57-4512MF 1µl, GV57-4657MR 1µl]; Taq DNA polymerase 1.0µl)에 30µl의 RT 산물을 넣어 최종 volume이 100µl가 되도록 하여 thermocycler로 94°C/60sec, 55°C/75sec, 72°C/60sec의 cycle을 45회 시행하였다.

470-20-1-77F: 5'-CTCTTTGTGGTAGCCG-AGAGAT-3'

470-20-1-211R: 5'-CGAATGAGTCAGAGGACG-GGGTAT-3'

470-20-1-211R-BIOTIN: 5'-CGAATGAGTCAG-AGGACGGGGTAT-3'

GV57-4512MF: 5'-GGACTTCCGGATAGCTGA-RAAGCT-3'

GV57-4657MR: 5'-GCRTCCACACAGATGGC-GCA-3'

4. Electrochemiluminescence (ECL) assay

25µl의 5'-TBR [Tris (2,2'-bipyridine) ruthenium (II) chelate, electrochemiluminescent label]-470-20-1-152F probe와 5µl의 희석된 PCR 산물 (diluted 1:2 in 1X PCR buffer)을 혼합하여 thermocycler에서 95°C/5min동안 denature시키고, 37°C/20min 동안 hybridization 후 4°C 상태로 유지하였다. 12x75mm 시험관에 320µl의 quantitative (Q) PCR assay buffer (Perkin Elmer)를 분주하고 10µl의 2µg/µl streptavidin-coated bead (Perkin Elmer or Dynal)를 혼합한 다음 TBR probe와 섞은 PCR product를 duplicate로 transfer하였으며, 실온에서 30분 이상 정치시키고 QPCR 5000 (Perkin Elmer)으로 판독하여 HGV 감염여부를 screening하였다 (Cut-off: 5x mean negative control value).

5. Liquid hybridization (LH)

HGV 확인을 위하여 ECL에서 양성 또는 의양성 (indeterminate)으로 판독된 PCR 산물에 대해 LH assay를 하였다. Radiolabelled probe (³²P-GV57-89M)를 만들기 위하여 0.6ml 용량의 reaction tube에 2µl kinase buffer, 1µl probe, 7.5µl H₂O, 7.5µl γ-ATP ³²P (75µCi) 및 T4 polynucleotide kinase를 혼합하고 37°C에서 30분간 hybridization시킨 다음 2.5µl EDTA (0.5M)와 27.5µl H₂O를 가하여 반응을 정지시킨 후 G25 spin column (2,000rpm/4min pre-centrifuge)에 loading하고 2,000rpm/2min 원심하였다. Scintillation counter로 probe의 radioactivity를 측정하였으며, dye와 섞은 total volume이 10µl가 되도록 만들었다 (500,000cpm/reaction). 10µl의 probe mixture와 10µl의 PCR 산물을 혼합하고 thermocycler에서 95°C/1min denature시키고, 55°C/

15min hybridization 하였으며 4℃ 상태로 5분 정도 방치하였다. 준비한 10% polyacrylamide gel에 loading하고 150V로 전기영동 하였으며, gel front가 8~9cm 정도 이동하였을 때 running을 정지하였다. Gel을 유리판에서 조심스럽게 분리한 후 4℃에서 X-ray film에 overnight 동안 노출시켰다. 다음날 film을 fixing 및 developing한 후 형성된 band를 판독하였다.

6. Southern blotting (SB)

ECL 및 LH에서 양성 또는 의양성으로 판독된 PCR products에 대해 SB assay를 실시하였다. 9μl의 PCR product를 1μl의 10x loading buffer와 혼합한 후 ethidium/bromide (EtBr)가 함유된 2.0% agarose gel에 loading하였다. Dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol in water)가 well에서 나오기 전까지는 25mA로 running하고 그 다음 50~60mA로 증가시켰으며, dye front가 gel의 2/3 정도 이동하면 running을 중지하고 UV light로 band의 형성을 관찰하였다.

DNA gel을 denaturation시키기 위하여 denaturing buffer (3M NaCl, 0.4M NaOH)에 30분씩 2회 세척하고 transfer buffer (3M NaCl, 8mM NaOH)에서 다시 15분간 세척하였다. Transfer membrane을 DDW에 15분간 soaking하고 capillary action에 의해 agarose gel을 membrane에 transfer하였다. Transfer membrane을 1x neutralizing buffer (0.2M sodium phosphate, pH6.8)로 5분간 neutralization시키고 UV

crosslinker를 이용하여 DNA molecule을 nylon membrane에 covalent binding하였다. 30% formamide를 함유한 hybridization buffer를 넣고 42℃에서 2시간 동안 prehybridization한 후, radiolabelled probe (³²P-GV57-89M)를 넣어 42℃에서 overnight hybridization을 실시하였다. 2x SSPE/0.5% SDS 용액으로 실온에서 30분간 세척한 후, 0.1x SSPE/0.5% SDS 용액으로 42℃에서 30분간 처리하였다. -70℃에서 2시간 정도 film에 노출시킨 후 결과를 판독하였다.

결과 및 성적

1. HGV screening

50명의 대상환자의 혈청에 대해 ECL로 HGV 감염 여부를 duplicate로 검색한 결과 4건은 cut-off value (=50)보다 훨씬 높은 수치 (>1,000)를 보여 HGV 양성으로 판명되었으며 5건은 indeterminate (100~200)였다. 나머지 41명의 혈청가검물 대부분은 10 이하의 낮은 값을 나타내었다.

2. HGV confirmation

1) Liquid hybridization

ECL에서와 동일한 50건의 혈청에 대하여 duplicate로 LH시험을 수행한 결과, ECL로 양성인 4건은 LH에서도 양성인 typical band가 관찰되었으나 5건의 indeterminate 중에서는 1건이 희미한 band를 보여 (Figure 2) HGV 양성자는 50명 중 5명

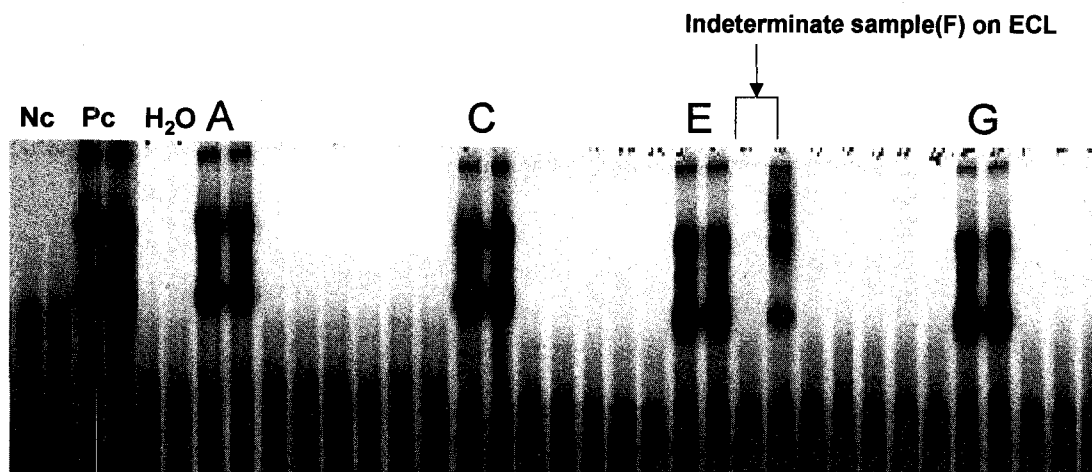


Figure 2. Liquid hybridization (LH) of RT-PCR products for HGV detection. Duplicate samples of A, C, E, G and one indeterminate sample F on ECL were hybridized.

(10%)으로 판명되었다. 나머지 4건의 indeterminate와 41건의 ECL 음성혈청에서는 band가 전혀 관찰되지 않았다.

2) Southern blotting

ECL에 의해 HGV 양성인 4명 및 indeterminate인 5명의 PCR 산물을 전기영동한 후 band를 관찰한 결과 ECL 양성인 4건은 명확하게 band가

확인되었으나 ECL indeterminate 중 1명에서 희미한 band가 관찰되었다 (Figure 3). Band가 확인된 agarose gel을 Nylon membrane에 transfer하고 radiolabelled probe ($^{32}\text{P-GV57-89M}$)를 이용하여 확인시험을 실시한 결과 ECL에서 양성인 4건과 5건의 indeterminate 중 1건이 양성으로 판명되어 LH와 동일한 결과를 보였다 (Figure 4). 나머지 4건의 ECL indeterminate에서는 양성 spot이 관찰되지 않았다.

3. ECL, LH, SB간의 sensitivity 비교

대상환자 50명의 혈청 PCR 산물에 대하여 ECL, LH, SB 방법에 의해 HGV를 검색한 결과, ECL로 4건의 양성 및 5건의 indeterminate, LH 및 SB로 5건 (4건의 ECL 양성 및 1건의 ECL indeterminate)이 양성으로 판명되어 ECL보다는 LH와 SB가 더 높은 민감도 (sensitivity) 및 특이도 (specificity)를 나타냈으며, LH와 SB는 동일한 결과를 보였다 (Table 2).

4. 시험대상군의 임상적 및 혈청학적 소견

50명의 HGV 시험대상자에 대한 임상적이고 혈청면역학적으로 진단한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 임상적으로는 황달, 오심, 구토 및 복통증상을 조사하였고, 이 중 한가지 증상이라도 보인 사람은 25명이었으며, 1명은 4가지 증상을 모두 보였다. 혈청학적으로는 모두 anti-HCV 음성인 사람을 선택하였으며, HBsAg 양성인 사람은 6명, anti-HBs 양성은 26명이었고, 기타 SGOT, SGPT, ALP 등의 수치는 다양하였으며 특이성은 관찰되지 않았다. 5명의 HGV 양성자 중 2명은 임상적으로 간염으로 진단됨과 동시에 anti-HBs 양성이었다고, 이 중 1명은 황달과 복통의 동반과 더불어 높은 SGOT, SGPT 및 ALP 수치를 보였다. 나머지 3명은 임상적으로 각각 장암, 위궤양, 담낭폐쇄를 보였으며, 특히 담낭폐쇄를 나타낸 사람은 anti-HBs 양성이었다고 상대적으로 높은 SGOT, SGPT 및 ALP를 보였다.

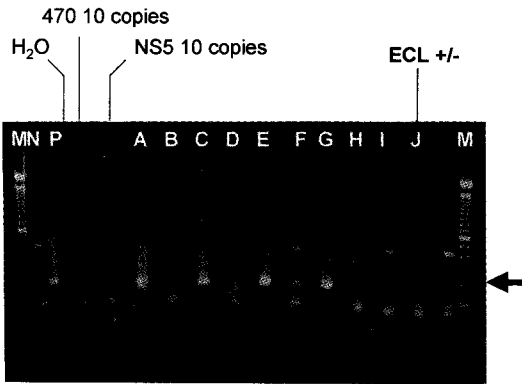


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products. Expected size of NS5 and 470 regions are indicated with arrow (164bp, 155bp, respectively). M; molecular marker, N; negative control, P; positive control, A to J; specimens.

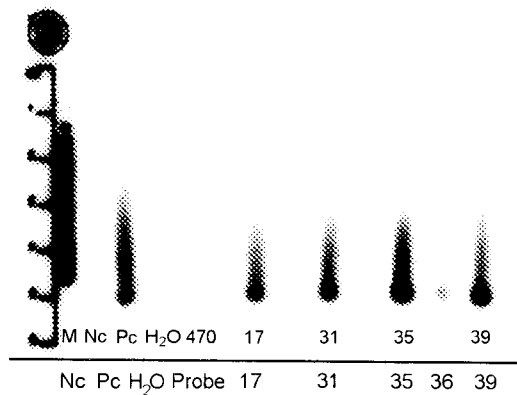


Figure 4. Southern blot hybridization of the positive and indeterminate RT-PCR products with GV57-89M probe.

Table 2. Comparison of sensitivity between ECL, LH, and SB

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Positive	Indeterminate	Total
ECL	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	4	5	9
LH	+	-	+	-	+	+	+	-	-	5	-	5
SB	+	-	+	-	+	+	+	-	-	5	-	5

**Fifty HGV-suspected sera specimens were used

고 찰

지금까지 간염을 유발시키는 바이러스는 주로 hepatitis A~E virus이며, 이들 바이러스에 의한 감염여부는 혈청학적으로 진단할 수 있다. 그러나 임상적으로 바이러스성 간염으로 의심된 경우에도 A에서 E까지의 혈청학적 marker가 없어 Non-A~E형 간염으로 진단되는 경우도 존재한다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 Non-A~E형 간염 바이러스를 찾아내기 위한 노력이 계속되었고 그 결과 최근 GB형 간염 바이러스 (hepatitis GB virus; GBV)와 G형 간염 바이러스 (hepatitis G virus; HGV)라는 새로운 바이러스의 유전자서열이 각각 다른 연구그룹에 의하여 cloning되었다. HGV와 GBV-C는 각각 다른 연구진에 의해서 발견되었지만 유전자 배열의 상동성이 90% 이상이므로 동일한 바이러스의 다른 isolate라고 생각되고 있다.

다른 간염 바이러스와 중복감염시 HGV 감염의 임상적 의미에 대해서는 현재 명확하게 밝혀지지 않고 있다. 다만 HGV 감염사례에서는 HGV 단독감염과 중복감염을 합하여 약 50%가 수혈경험이 있는 환자인 사실로 미루어 HGV감염과 수혈간에는 특별한 연관관계가 있음을 알 수 있다. 자가면역성 간염이나 원발성 담즙성 간경변의 경우에는 HGV RNA가 검출되지 않고, 이들과 HGV와의 연관관계는 아직 밝혀지지 않았다.

HGV는 항체측정방법이 개발되지 않은 관계로 이 바이러스에 대한 진단을 위해 PCR법에 의한 HGV RNA 검색이 실시되고 있으며, 현재 PCR에는 NS5부분, NS3 부분, 5' UTR의 primer가 주로 사용되고 있다. 본 실험에서는 NS5 region에 대한 primer가 사용되었으나 다른 부분에 대한 primer를 이용한 실험결과와 비교분석도 필요할 것으로 판단된다.

본 연구에서 HGV 검색 및 진단에 사용한 electrochemiluminescence (ECL), liquid hybridization (LH) 및 southern blotting (SB)은 민감도 및 특이도에서 차이를 보였다. 50건의 대상혈청에 대해 ECL은 4건의 양성과 5건의 의양성 (indeterminate)을 나타내었으나, LH와 SB는 확실하게 5건의 양성 (ECL에서 4건의 양성과 1건의 의양성)을 보여 LH와 SB가 민감도 및 특이도에서 서로 동일하였으며, ECL보다는 높았다 (Table 2). 따라서

HGV 진단에는 ECL보다는 LH나 SB를 수행하는 것이 적합할 것으로 보인다. 또한 PCR 산물에 대한 ECL 및 LH를 duplicate로 수행하는 것이 실험의 정확성을 위해 필요할 것으로 생각된다.

HGV 연구를 위한 대상군 선정에는 HCV와 유전학적 동질성이 많은 관계로 HCV 양성자, HCV 음성이면서 간염증세를 보이는 사람, 혈청학적으로 HBV 및 HCV 등에 감염되지 않은 사람 등 다양한 역학군에 대해 실시하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

결 론

HCV 음성이면서 바이러스성 간염증세를 보이는 50명의 혈청에서 viral RNA를 추출하여 HGV 검색을 하였으며, 임상적, 혈청학적 및 생화학적 시험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수가 있었다.

1. 50명의 C형 간염 음성이면서 바이러스성 간염증세를 보이는 국내인 중 5명에서 HGV RNA가 검출되어 이들 중 약 10% 정도의 감염율을 나타내었다.

2. LH와 SB가 ECL보다 높은 민감도 및 특이도를 보였으며, LH와 SB는 동등하여 HGV 진단에 적합하였다.

3. ECL로 indeterminate이었지만 LH나 SB상에서 약한 양성으로 확인된 환자가 임상적으로 황달을 비롯한 심한 간이상 소견을 보여 임상소견과 바이러스양과는 상호연관성을 보이지 않아 HGV가 단독으로 임상증상을 유발하지 않는다는 사실에 대한 간접적인 근거를 제공하였다.

4. 5명의 HGV 양성자 중 2명은 anti-HBs 양성이며 간염으로 진단된 경우였고, 이 중 1명은 임상적으로 황달과 복통을 동반하였으며, 생화학적 실험에서 상대적으로 높은 SGOT, SGPT 및 ALP 수치를 보였다. 나머지 3명은 임상적으로 각각 장암, 위궤양, 담낭폐쇄를 보였으며, 이들 중 특히 담낭폐쇄를 나타낸 사람은 anti-HBs 양성이고 상대적으로 높은 SGOT, SGPT 및 ALP 수치를 보였다.

5. 이들 국내 분리주의 DNA full sequencing, phylogenetic analysis 및 나아가 진단을 위한 항원성 분석을 수행하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Kim JP: Molecular cloning and Disease Association of Hepatitis G Virus: A Transfusion-Transmissible Agent. *Science* 271: 505-508, 1996.
2. Koonin EV, et al: Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 28(5): 375-430, 1993
3. Alkawa T, Sugai Y, Okamoto H: Hepatitis G infection in drug abusers with chronic hepatitis C. *N Eng J Med* 334: 195-196, 1996.
4. Okamoto H et al: The entire nucleotide sequences of two GB virus C/hepatitis G virus isolates of distinct genotypes from Japan. *Journal of General Virology* 78: 737-745, 1997.
5. Alter HJ et al: 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(22): 1494-1500, 1989.
6. Alter MJ et al: Hepatitis C: and miles to go before we sleep. *ibid*, 321(22): 1538-1540, 1989.
7. Alter MJ et al: Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 264(17): 2231-2235, 1990.
8. Han JH et al: Characterization of the 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 USA* 88(5): 1711-1715, 1991.