

B형 간염 바이러스 감염과 연관된 사구체신염의 임상병리학적 특성과 신 조직내에서 HBs Ag 과 HBe Ag의 발현

인제대학교 의과대학 부산백병원 병리학교실, 소아과학교실*,
내과학교실** 및 부산대학교 의과대학 소아과학교실***
정 수진 · 김 영주 · 윤 혜경 · 정 우영* · 김 영훈** · 김 수영***

< 한 글 요 약 >

목 적 : HBV 감염과 연관된 신병증의 임상 및 검사소견과 병리학적 소견을 분석하여 그 특징을 규명하고 HBeAg과 HBsAg에 대한 면역조직화학염색을 신생검조직에서 시행하여 이들 항원의 사구체내에서의 면역학적 발현을 관찰함으로써 이 질환의 발생 기전에 대한 이해를 돕고자하였다.

방 법 : 1990년 4월부터 1997년 2월까지 사구체신염으로 신조직 생검을 시행하여 부산백병원 해부병리과에 병리조직검사가 의뢰된 중례 중 혈청 HBsAg 양성인 28례를 대상으로 임상 및 검사소견을 조사하였고, 신조직의 광학현미경적, 면역형광학적, 전자현미경적 검사와 HBsAg과 HBeAg 항원에 대한 면역조직화학검사를 시행하였다.

결 과 :

1. 연령 분포는 6세에서 73세였으며 소아 환자가 8명이었고 성인 환자는 20명 이었다. 평균 연령은 28세였고 남녀 비는 3:1 이었다. 내원당시 67.9%에서 혈뇨, 75.0%에서 단백뇨를 보였고 57.2%에서 신중후군을 나타내었다. 전 예에서 혈청 HBsAg이 양성하였고, 혈청 HBeAg은 검사가 시행된 9례 중 6례 (66.6%)에서 양성이었다.

2. 간기능검사가 시행된 11례 중 7례 (63.6%)에서 AST와 ALT치가 증가되어 있었으며, 이중 간생검이 시행된 3례 모두 만성 활동성 간염으로 진단되었다.

3. 28례 중 막성 사구체 신염 (membranous glomerulonephritis : MGN)이 10례 (35.7%)로 가장 많았으며, 메산지움증식성 사구체신염 (mesangioproliferative glomerulonephritis : MesGN)이 8례 (28.6%), 막증식성 사구체 신염 (membranoproliferative glomerulonephritis : MPGN)은 7례 (25.0%) 그리고 미세변화질환 (minimal change disease : MCD)가 3례 (10.7%) 순이었다.

4. HBV와 연관된 MGN에서는 혈관관 세포의 증식 및 혈관관 기질의 확장이 자주 관찰되었으며, 사구체간질 내와 내피하 침윤도 동반되어 MPGN을 시사하는 소견이 함께 관찰되는 예가 많았고, HBV 항원 혈중에 동반된 MPGN에서는 내피하 침윤 뿐 아니라 기저막 내 및 상피세포하 침윤도 종종 관찰되었다.

5. 신조직의 면역조직화학검사상 HBsAg은 모두 음성이었으나 HBeAg은 28례 중 8례 (28.6%)에서 사구체 모세혈관벽을 따라 양성 반응을 나타내었고, 이 중 3례는 혈청 HBeAg 검사를 받았는데 모두 양성이었다.

결 론 : HBV와 연관된 사구체신염은 다양한 병리학적 양상을 보여주며, 특히 MGN과 MPGN에서는 전자현미경소견상 두 질환의 특징이 중복되어 나타났고, 사구체내에서 HBeAg이 검출되어 HBV의 활동성 정도와 사구체신염의 발생이 연관성이 있을 것으로 사료되나 더 많은 연구보고가 있어야 하겠다.

서 론

B형 간염 바이러스 (Hepatitis B virus, 이하 HBV 이라 함)는 간 질환 외에 다발성 동맥염, 본태성 혼합 냉글로부린혈증, 사구체신염, 류마치스성 다발성 근통 등 여러 전신적 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 1971년 Coombs 등¹⁾이 수혈 후 지속적인 HBV 항원

혈증을 보인 환자에서 막성 사구체신염 (membranous glomerulonephritis, 이하 MGN이라 함)이 발생한 예를 보고한 이래 MGN, 막증식성 사구체신염 (membranoproliferative glomerulonephritis, 이하 MPGN이라 함)을 포함한 다양한 병리학적 양상의 사구체 질환과 HBV와의 관련이 보고되어 왔다²⁻¹⁶⁾. 특히 우리나라에서는 B형 간염의 이환률 및 B형 간염 표면 항원 (이하

HBsAg이라 함)의 보균률이 외국에 비해 높고 사구체 신염 환자에서도 HBV의 감염 빈도가 높아 HBV가 사구체신염의 중요한 원인으로 지목되고 있다. HBV와 연관된 신질환은 B형 간염의 지역적 분포의 차이에 따라 다른 분포를 보이며 특히 빈도가 높은 아시아 지역에서는 특히 일본, 대만, 홍콩에서 이에 대한 많은 연구보고가 있었고 우리나라에서도 소수의 보고가 있었다^{1,8)}.

HBV 감염과 연관된 사구체신염의 발병 기전은 아직 정확히 알려져있지 않지만 면역 복합체의 형성, 바이러스 유발 cytokine이나 mediator의 유리 혹은 직접적인 사구체 세포 손상 등으로 설명되고 있으며⁹⁾, 면역 복합체에 의한 손상 기전은 순환 면역 복합체의 증명과 신사구체 병변 부위에서의 HBV 항원의 침착을 증명하므로써 설명할 수 있는데 이제까지 여러 연구들에서 주로 직접 및 간접 형광 항체법을 이용하여 HBV 항원중 HBsAg, HbcAg, HBeAg을 증명하여 왔으나 관련된 항원의 종류와 침착빈도, 부위 등이 보고자마다 상이하였다.

이에 저자는 최근에 경험한 HBV 감염과 연관된 신병증의 임상적 및 검사소견, 광학현미경적, 면역형광현미경적 그리고 전자현미경적 소견을 분석하여 그 특징을 규명하고, 여러 HBV 항원중 중요 인자로 여겨지고 있는 HBeAg과 HBsAg에 대한 면역조직화학 염색을 신생검조직에서 시행하여 이들 항원의 사구체 내에서의 면역학적 발현을 관찰하므로써 이 질환의 발생 기전에 대한 이해를 돕고자하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1990년 4월부터 1997년 2월까지 6년 10개월간 사구체신염으로 신조직 생검을 시행하여 부산백병원 해부병리과에 병리조직검사가 의뢰된 중례 중 혈청 HBsAg 양성인 30례를 대상으로 하였다. 대상에서 연색상구균 감염후 사구체신염 (poststreptococcal glomerulonephritis)과 당뇨병에 이차적으로 발생한 신증 각 1례는 제외하였다.

2 방 법

A. 임상 및 검사 소견에 대한 검사

신조직 생검이 실시된 환자의 병력지를 참고하여

생검 당시의 임상증상 및 병력, 진찰소견, 소변검사, 간기능검사, 혈청학적 검사 소견을 조사하였다. 연령에 관계없이 혈뇨는 뇨침전 소견상 고배율 시야 (250배)에서 RBC가 5개 이상 나올 때로 정하였고, 단백뇨는 1주이상 간격으로 3회 이상 검사하여 뇨비중이 1.015 이하일 때 1+ (30 mg/dL) 이상이거나 뇨비중이 1.015 이상일 때 2+ (100 mg/dL) 이상인 경우로 정하였다. 신증후군은 전신 부종이 있고 혈청 알부민이 2.5 mg% 이하이면서 24시간 뇨단백이 40 mg/hr/m² 이상이고 고지질혈증이 보이는 네가지 기준을 적용하였다.

B. 병리학적 검사

1) 광학현미경적 검사

광학현미경적 검사를 위한 신 조직은 Dubosque-Brazil 용액에 2-4시간 고정하고 탈수한 후 침투 과정을 거쳐 파라핀에 포매하였고, 3-4 μm의 연속 절편을 hematoxylin & eosin, periodic acid-Schiff stain, Masson's trichrome stain, Gomori's methenamin silver stain으로 염색하여 검경하였다.

2) 면역형광현미경적 검사

면역형광현미경검사는 생검 즉시 영하 20°C로 동결시킨 후 cryostat에서 3-4 μm으로 박절하여 저온에서 1시간 건조시킨 다음 acetone에 5분간 고정하고 Tris buffered saline (TBS, DAKO)에 2회 세척한 다음 습윤 통에서 Ig G, Ig M, Ig A, C3, C4, C1q, fibrinogen에 대한 fluorescein isothiocyanate (FITC) 부착 항면역글로블린을 사용한 직접면역형광법으로 1시간 반응시킨 후 다시 TBS로 2회 세척한 뒤 수용성 봉입체로 봉입하여 면역형광현미경 (Leitz)으로 검경하였고, 형광의 정도를 강도와 양에 따라 0에서 3+ 까지 구분하였다.

3) 투과 전자현미경적 검사

전자현미경검사를 위해 2-4개의 1 mm³ 크기의 신 조직을 2.5% buffered glutaraldehyde에 넣어 4°C에서 2-4시간 1차 고정하고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2-7.4)로 세척하여 1% osmium tetroxide 용액에 4°C에서 2시간 2차 고정하고 다시 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2-7.4)로 세척한 후 계열 ethyl alcohol로 각 10-20분간 탈수하였다. Propylene oxide로 30분간 2회 치환하고 propylene oxide와 Epon 혼합물로 1-3시간 침투시킨 후 Epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48 시간 동안 방치한 뒤 열증합을 시켰다. 포매된 조직을 0.5-1 μm 두께로 박절한 후 toluidine blue로 염색하여 관찰부위를 결정한 다음 60-90 nm로 초박절한 후 200 mesh copper grid에 절편

을 부착하여 uranyl acetate & lead citrate로 이중염색한 뒤 투과 전자 현미경 (JEOL 1200EX-II)로 가속 전압 75 KV에서 검경하였다.

4) 면역 조직화학 검사

HBsAg과 HBeAg의 면역염색은 신조직 생검으로 얻어져 파라핀에 포매한 조직을 4 m 두께로 박절하여 유리 슬라이드에 부착 시키고 60°C에서 4시간 동안 방치한 후 100% xylene으로 파라핀을 제거하고 100%, 90% 및 75% 알콜로 처리하여 증류수로 함수시켰다. 파라핀 고정으로 조직내 잡추어진 항원을 노출시키기 위해 citric acid 용액에 담구어 극초단파를 이용하여 10분간 처리한 후 30분간 실온에 둔 다음 3% 과산화수소수로 20분간 처리하여 내인성 과산화효소를 억제시킨 후 증류수로 수세하였다. 이후의 과정은 DAKO사의 Labelled streptavidine biotin (LASB) kit를 이용하여 시행하였는데, 15분간 정상 양 혈청을 처리한 후 일차 항체, HBsAg 단클론항체 (DAKO, M3506, Carpinteria, USA)는 1:50으로, HBeAg 단클론항체 (BIONIKE, M01041, USA)는 1:100으로 희석하여 실온에서 60분간 반응시켰고, Tris-buffered saline (TBS, DAKO)으로 수세한 후 비오틴과 결합된 항-생쥐 면양 혈청인 이차 항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 TBS로 수세하고 peroxidase-conjugated streptavidin (DAKO)을 실온에서 10분간 반응시킨 다음 다시 TBS로 수세하고 amino-ethyl-carbazole (AEC) substrate-chromogen system으로 10~20분간 실온에서 발색시키고, Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 Crystal mount (DAKO)를 사용하여 봉입하였다. 양성 대조군으로 예비 실험에 의해 신장 질환이 없이 혈청 HBsAg 양성이고 만성 활동성 간염으로 진단받은 환자의 간생검 조직을 이용하였고, 음성 대조군은 일차 항체 대신 TBS를 사용하였다. 핵 및 세포질에 적갈색으로 염색되는 세포가 관찰되면 양성으로 판정하였다.

5) 병리 조직학적 분류

신 생검조직의 병리조직학적 분류는 World Health Organization (WHO)¹⁷⁾의 분류 기준에 따라 나누었으며 MGN과 MPGN의 소견이 겹쳐서 나오는 경우는 우세한 소견을 보이는 쪽으로 정하였다.

결 과

1. 임상 및 검사 소견

총 28례의 대상 환자에서 연령 분포는 6세에서

73세까지 광범위하였으며 평균 연령은 28세였고 이중 8명이 소아 환자였다. 조직학적 유형별로의 평균 연령은 MGN이 25세, MPGN이 28세, 매산지움증식성 사구체신염 (mesangioproliferative glomerulonephritis, 이하 MesGN라 함)은 32세로서 주로 20대 후반에 분포되어 있었고 각 유형간의 연령 차이는 두드러지지 않았지만 MGN이 다소 젊은 연령층에서 발생되었으며, 남녀의 성별비는 3:1로 남자가 많았다. 신생검 당시 19례 (67.9%)에서 혈뇨를 보였는데 이 중 MGN이 8례 (80.0%)였으며 MPGN과 MesGN이 각각 5례 (71.4%)와 6례 (75.0%)였다. 단백뇨는 21례 (75.0%)에서 나타났는데 MGN이 9례 (90.0%), MPGN과 MesGN은 각각 5례 (71.4%)와 4례 (50.0%)였으며 미세변화질환 (minimal change disease, 이하 MCD라 함)은 3례 (100.0) 모두에서 단백뇨를 보였다. 또한 16례 (57.2%)에서 신증후군이 관찰되었다 (Table 1).

간기능 검사가 시행된 11례 중 7례 (63.6%)에서 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)치의 증가가 관찰되었으며, MGN에서 75.0%, MPGN은 40.0%, MesGN과 MCD는 검사를 시행한 각 1례 모두에서 AST와 ALT치가 상승되어 있었다 (Table 1).

신생검 당시 B형 간염 이환을 알고 있었던 예는 10례로 MGN, MPGN, MesGN 각 3례와 MCD 1례였다. 그 중 MPGN, MGN과 MCD 각 1례에서 간 생검이 시행되었으며 모두 HBV에 의한 만성 활동성 간염으로 진단되었다.

전 예에서 혈청 HBsAg이 양성이고, 혈청 HBeAg은 검사가 시행된 9례 중 6례 (66.6%)에서 양성이었는데, 이 중 MPGN이 4례 중 3례 (75.0%)에서 양성이었고 MGN, MesGN과 MCD는 각 1명이 양성을 보였다 (Table 1).

2. 병리조직학적 소견

28례의 신 생검조직의 병리조직학적 진단은 MGN이 10례 (35.7%), MesGN이 8례 (28.6%), MPGN은 7례 (25.0%), MCD가 3례 (10.7%)였으며, 각각의 광학현미경적, 면역형광학적 및 전자현미경적 소견은 다음과 같다.

1) HBV 감염과 연관된 MGN

MGN으로 진단된 10례 모두에서 광학현미경 소견상 전형적인 MGN과 달리 혈관관 세포의 증식과 혈관관 기질의 확장이 관찰되었고, 5례에서 사구체 모

Table 1. Clinical Data in HBV-associated Nephropathy at the Time of Biopsy

	MGN n=10 (%)	MPGN n=7 (%)	MesGN n=8 (%)	MCD n=3 (%)	Total n=28 (%)
Age (year)	6-57	9-45	9-73	10-28	6-73
(Mean age)	25.1	28.1	32.4	21.5	28
Sex(M:F)	7:3	7:0	4:4	3:0	3:1
Sr-HBsAg positivity	10/10 (100.0)	7/7 (100.0)	8/8 (100.0)	3/3 (100.0)	28/28 (100.0)
Sr-HBeAg positivity	1/2 (50.0)	3/4 (75.0)	1/2 (50.0)	1/1 (100.0)	6/9 (66.7)
Anti-HBsAb positivity	2/10 (20.0)	0/7 (0.0)	0/6 (0.0)	1/3 (33.3)	3/26 (11.5)
Anti-HBeAb positivity	1/2 (50.0)	2/4 (50.0)	1/2 (50.0)	0/1 (0.0)	4/9 (44.4)
Increased AST/ALT	3/4 (75.0)	2/5 (40.0)	1/1 (100.0)	1/1 (100.0)	7/11 (63.6)
Proteinuria	9/10 (90.0)	5/7 (71.4)	4/8 (50.0)	3/3 (100.0)	21/28 (75.0)
Hematuria	8/10 (80.0)	5/7 (71.4)	6/8 (75.0)	0/3 (0.0)	19/28 (67.9)

MGN: membranous glomerulonephritis, MPGN: membranoproliferative glomerulonephritis, MesGN: mesangioproliferative glomerulonephritis MCD: minimal change disease, AST/ALT: aspartate aminotransferase/ alanine aminotransferase, Sr: serum, M:F: male:female

세혈관 벽이 미만성으로 비후되어 있었다. 이 중 4례에서 기저막을 따라 돌기 (spike)가 은염색에서 잘 관찰되었으며 구상 및 분절성 경화는 2례에서 관찰되었는데 각각 생검된 사구체 수의 3%와 22%를 차지하였다. 반월형성은 한 예에서도 관찰되지 않았으며 중례에 따라 다소 차이는 있지만 국소적인 세뇨관의 위축, 간질의 섬유화 그리고 림프구 등의 염증 세포의 침윤이 경도 내지 중등도에서 관찰되었다. 면역 형광학적 검사에서 Ig G와 Ig M이 각각 5례와 4례에서 모세혈관 벽을 따라 과립상으로 침착되었고 각각 4례와

3례에서는 사구체간질에서도 함께 염색되었다. 보체는 C1q와 C3가 각 90.0%에서 염색되었다 (Table 2). 전자현미경 검사상 전 예에서 미만성의 상피 세포하 전자 고밀도 침윤이 관찰되었고 소량의 사구체간질 내 침윤이 8례 (80.0%)에서 동반되었다. 5례 (50.0%)에서 내피 세포하에 침윤이 동반되었으며 2례에서 기저막내 침윤이 함께 관찰되었다 (Fig. 1A, Table. 5).

Table 2. Immunofluorescence Microscopic Findings in HBV-associated MGN

	Capillary only	Mesangial & capillary	Mesangial only	Total(%) n=10
Ig G	5	4		9 (90.0)
Ig A	2	2		4 (40.0)
Ig M	4	3	1	8 (80.0)
C1q	6	3		9 (90.0)
C3	4	5		9 (90.0)
C4	4	1		5 (50.0)
Fibrinogen	3	1		4 (40.0)

MGN: membranous glomerulonephritis

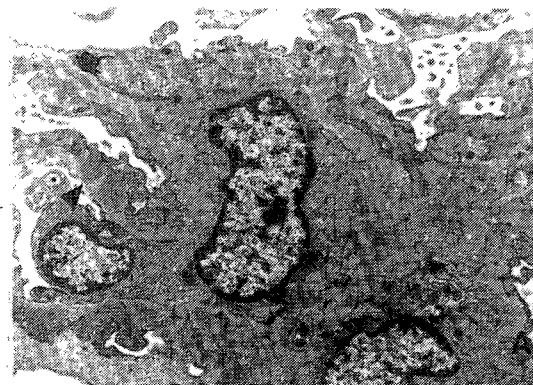


Fig. 1A. EM findings in Hepatitis B virus-associated membranous glomerulonephritis. The glomerular basement membranes are irregularly thickened with frequent subepithelial (arrowhead) and focal intramembranous (arrow) deposits (x 3,000)

Table 5. Electron Dense Deposits in HBV-associated Glomerulonephritis on Electron Microscopy

	Location of electron dense deposits (%)				Total
	Subendothelial	Intramembranous	Subepithelial	Mesangial	
MGN (n=10)	5 (50.0)	2 (20.0)	10 (100.0)	8 (80.0)	10/10(100.0)
MPGN (n= 7)	6 (85.7)	1 (14.2)	2 (28.5)	6 (85.7)	6/7 (85.7)
MesGN(n= 8)	2 (25.0)	1 (12.5)	1 (12.5)	5 (62.5)	5/8 (62.5)
MCD (n= 3)	0 (0.0)	1 (33.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	1/3 (33.3)
Total (n=28)	13 (46.4)	5 (17.8)	13 (46.4)	19 (67.8)	22/28(78.6)

MGN: membranous glomerulonephritis, MPGN: membranoproliferative glomerulonephritis, MesGN: mesangioproliferative glomerulonephritis, MCD: minimal change disease

Table 3. Immunofluorescence Microscopic Findings in HBV-associated MPGN

	Capillary only	Mesangial & capillary	Mesangial only	Total (%) n=7
Ig G	3	2	1	6 (85.7)
Ig A	2	1	1	4 (57.1)
Ig M	4	1	1	6 (85.7)
C1q	4	1	1	6 (85.7)
C3	4	1	1	6 (85.7)
C4	3	1		4 (57.1)
Fibrinogen	2	1	2	5 (71.4)

MPGN: membranoproliferative glomerulonephritis

Table 4. Immunofluorescence Microscopic Findings in HBV-associated MesGN

	Capillary only	Mesangial & capillary	Mesangial only	Total (%) n=8
Ig G	1		2	3 (37.5)
Ig A			4	4 (50.0)
Ig M		1	6	7 (87.5)
C1q		1	3	4 (50.0)
C3			7	7 (87.5)
C4	1		4	5 (62.5)
Fibrinogen			4	4 (50.0)

MesGN : mesangioproliferative glomerulonephritis

Ehrenreich 와 Churg의 분류 기준¹⁸⁾에 따르면 9례가 II기였고, 1례는 III기였다.

2) HBV 감염과 연관된 MPGN

7례 모두 MPGN I형으로서 모든 예에서 경도에서

중등도의 혈관간 세포의 증식과 혈관간 기질의 확장이 관찰되었고 2례에서 분엽상이 잘 나타났다. 모세혈관 벽은 6례에서 두꺼워져 있었고, 3례는 혈관간 세포와 내피 세포의 증식으로 내강이 부분적으로 폐쇄되거나 좁아져 있었으며 5례에서는 은염색에서 모세혈관의 이중상이 잘 나타났다 (Fig. 2A). 구상 및 분절상 경화는 3례에서 관찰되었으며 생검된 사구체 수의 14.2-52.0%를 차지하였다. 전형적인 MPGN과 달리 2례에서는 은염색에서 사구체 모세혈관벽을 따라 돌기가 관찰되었다. 면역형광학적 검사상 사구체 모세혈관벽과 사구체간질 부위를 따라 주로 Ig G 와 Ig M, C1q 와 C3가 과립상으로 침착되었다 (Table 3). 전자현미경검사상 전 예에서 혈관간 기질과 세포의 증식이 관찰되었고 6례에서 내피 세포하와 사구체간질에 전자 고밀도 침윤이 관찰되고 상피 세포하에 침윤은 2례에서 그리고 1례에서 기저막 내에 침윤이 동반되어 MGN

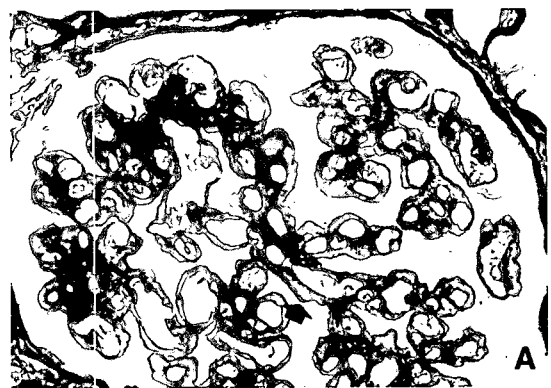


Fig. 2A. LM findings in Hepatitis B virus-associated membranoproliferative glomerulonephritis. The glomerular capillary wall shows characteristic double contour and occasional spike formation (arrow) on Gomori's methenamine silver stain (x 400)

의 형태학적 소견을 동시에 보였다 (Table 5). 그 외 6례에서 죽돌기의 융합이 관찰되었고 맥관 삼입 (mesangial interposition)이 4례에서 국소 또는 광범위하게 동반되었다 (Fig. 1B).

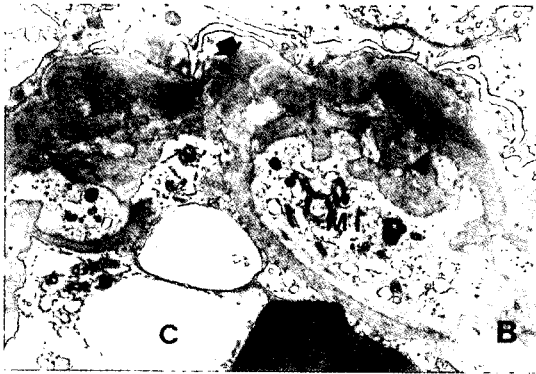


Fig. 1B. EM findings in Hepatitis B virus-associated membranoproliferative glomerulonephritis. The glomerular basement membranes are irregularly thickened with large numbers of subepithelial (arrow) and focal subendothelial (arrowhead) deposits, and mesangial interposition (MI) is noted. C: capillary lumen (x 5,000).

3) HBV 감염과 연관된 MesGN

MesGN으로 진단된 8례 모두 혈관간 기질의 확장과 혈관간 세포의 증식이 관찰되었는데 모세혈관 벽은 비교적 잘 유지되어 있었다. 6례에서 사구체간질에 섬유화와 림프구의 침윤이 관찰되었고 세뇨관의 위축이 동반되었다. 면역형광학적 검사는 7례에서 시행되었는데 Ig M과 C3는 전 예에서 혈관간 기질에 침착되었고 C4는 5례에서 Ig A, Clq, C4와 fibrinogen은 각 4례에서 혈관간 기질에 침착된 소견이 관찰되었다 (Table 4). 전자현미경 검사상 모든 예에서 혈관간 세포의 증식과 사구체간질의 확장이 관찰되었고 5례에서 사구체간질에 전자 고밀도 침윤이 나타났으며, 내피 세포하에 2례, 상피 세포하와 기저막 내에 각 1례에서 침윤이 동반되었다. 또한 5례에서 죽돌기의 융합이 관찰되었다 (Table 5).

4) HBV 감염과 연관된 MCD

1례에서 경도의 혈관간 기질의 확장이 있는 것 이외에 사구체의 변화는 관찰되지 않았고 2례에서 사구체 주변의 섬유화 소견만이 관찰되었다. 면역형광학적 검사상 3례 모두 사구체간질 부위에 Ig M의 침착이 있었으며, Ig G와 fibrinogen이 각 1례에서 침착되었다. 전자현미경검사상 3례 모두 죽돌기의 융합이 관찰

되었고 1례에서 기저막내에 경도의 전자 고밀도 침윤이 관찰되었다 (Table 5).

3. 면역조직화학검사 소견

HBsAg에 대한 면역조직화학염색은 전 예에서 음성 소견을 나타내었다.

HBeAg은 28례 중 8례 (28.6%)에서 사구체 모세혈관벽을 따라 적갈색으로 양성 반응을 나타내었고 (Fig. 2B), 1례에서는 사구체간질 내에도 양성 소견을 보였다. 면역조직화학염색에서 양성을 보인 8례 중 혈청에서 HBeAg 검사를 시행받았던 3례 모두에서 양성이었다. HBeAg 양성인 8례의 조직학적 유형을 살펴보면 MPGN이 3례 (42.9%)이었고, MesGN와 MGN이 각 2례 (각각 25.0%, 20.0%)이었으며, 1례 (33.3%)의 MCD도 양성 반응을 보여 조직학적 유형별 HBeAg 양성 반응의 차이는 없었다.

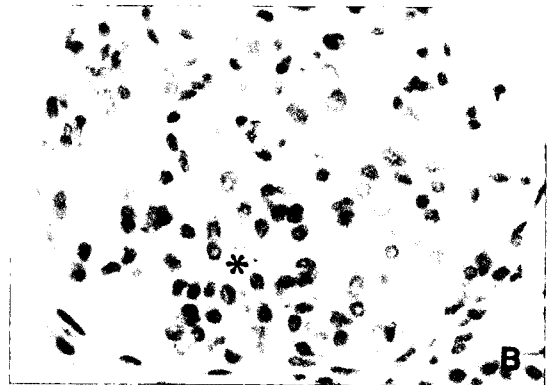


Fig. 2B. Immunohistochemical staining for HBeAg shows weakly positive reaction (*) along the glomerular capillary wall (LSAB method, x400).

고 찰

HBV와 관련된 사구체신염은 Combes 등¹⁾이 수혈 후 간염을 앓았던 성인에서 16개월 뒤 Australia Ag-Ab complex가 사구체 기저막에 침착된 MGN의 발생을 처음으로 보고한 이래 다양한 병리학적 유형의 사구체신염이 보고되어^{2,16)} 왔으며 그 중 MGN과 MPGN이 가장 많은 빈도를 차지하고 있다. 우리나라는 HBV의 유병률이 구미 지역보다 월등히 높으므로 HBV와 관련된 질환들이 드물지 않을 것으로 생각되어지며, 국내 문헌을 살펴보면 우 등³⁾은 성인 신질환 환자에서 혈청 HBsAg의 발현 빈도가 17.1%로서, 정

상 대조군의 12.3% 보다 유의있게 높다고 하였으며, 각종 신사구체 질환의 발생 요인으로서 HBV 항원의 중요성을 강조하였다. 그러나 Lee 등⁹⁾은 신사구체 질환 환자들의 11.9%가 HBsAg 보균자로서 대조군의 10-15%와 차이가 없다고 하였다.

본 연구에서 환자의 연령 분포는 6세에서 73세까지 광범위하였으며, 조직학적 유형별 발생 연령의 차이는 없었지만 박 등¹⁰⁾의 보고와 유사하게 MGN이 비교적 젊은 연령층에서 발생하였고 남녀의 성별비는 3:1로서 이 등⁹⁾의 보고와 같았고 이는 우리나라 HBsAg 보균자에서의 성별비 4:1과 유사하였다. 신생검 당시의 임상 증상에 대해 Lee 등⁹⁾의 연구에서는 24시간당 3.5 gm 이상의 단백뇨를 보이는 경우가 MPGN의 54.0% 였으며 MGN에서는 44.4%에서 나타났고, 혈뇨는 MPGN과 MGN에서 각각 75.8%와 66.6%라고 보고하였다. 또한 박 등¹⁰⁾의 보고에서는 신생검당시 신중후군으로 진단된 경우가 52.0%라고 하였다. 본 연구에서는 신생검 당시 19례 (67.9%)에서 혈뇨를 보였고 단백뇨가 21례 (75.0%)에서 나타났으며, 16례 (57.2%)에서 신중후군을 주소로 하여 다른 연구자들의 보고와 유사하였다.

HBV와 연관된 신사구체 질환의 빈도를 살펴보면 우 등¹¹⁾은 MPGN 42.6%, MGN 35.5%, MesGN 20.0%, MCD 18.8%로서 MGN과 MPGN이 유의있게 높은 빈도를 보였고, Lee 등⁹⁾은 MPGN, MGN, Ig A 신병중순으로 많았다고 보고하였다. 본 연구에서는 28례 중 MGN이 10례 (35.7%)로 가장 많았으며, MesGN이 8례 (28.6%), MPGN은 7례 (25.0%), 그리고 MCD가 3례 (10.7%)로 이전 보고들과 유사하게 MGN과 MPGN이 많았으나 MesGN의 예가 다소 많은 차이를 보였다.

본 연구대상 예의 신생검의 병리조직소견 중 면역형광학적 검사에서는 대부분의 보고와 유사하게 Ig G와 Ig M이 강하게 나타났고, 보체는 주로 C3과 C1q가 침착되었는데 MGN에서는 각각 90.0%에서 침착이 관찰되었다. Yoshikawa 등¹²⁾에 의하면 HBV와 연관된 MGN은 특발성 MGN에 비해 혈청의 C3치의 감소가 있다고 하였으나 본 연구에서는 보체 검사를 시행한 5례 모두에서 C3의 감소는 관찰되지 않았다.

Yoshikawa 등¹²⁾은 HBV와 연관된 MGN의 전자현미경소견상 전형적인 MGN의 소견과 함께 사구체간질 혹은 내피하에 전자 고밀도 침윤이 동반된다고 보고하였고 Wrzolkowa 등¹⁰⁾은 98명의 HBsAg 혈증을 가지는 사구체신염 환자 중 77명에서 즉 사구체 기저

막 특히 치밀판(lamina densa)과 치밀판의 상피하층에 풍부한 전자 고밀도 침윤을 보이면서 혈관간 세포의 증식이 관찰되어 MPGN III형으로 진단할 수 있는 소견과 MGN으로 생각되는 소견이 함께 나타나 이를 전형적인 MGN이 아니라 HBV와 연관된 MGN으로 따로 분류할 것을 제안하였다. 본 연구에서도 MGN으로 진단된 10례 모두에서 사구체간질의 확장고밀도 침윤이 동반되었고, 전자현미경소견상 전예에서 미만성의 상피세포하 전자 고밀도 침윤이 관찰되었으며 내피 세포하와 사구체간질에는 각각 50.0%, 80.0%에서 소량의 전자고밀도 침윤을 함께 보였다. 또한 MPGN의 7례중 6례 (85.7)에서 내피하 침윤이 관찰되었고 14.2%, 28.5%에서 각각 기저막내 및 상피 세포하에 침윤이 함께 관찰되어 MGN을 시사하는 소견을 동시에 보여주었다. 이와같이 HBV와 연관된 MGN이나 MPGN은 전형적인 MGN이나 MPGN과는 달리 두 질환의 미세구조적인 변화가 중복되는 양상이 관찰되어 HBV와 연관된 신병증의 특징으로 사료된다.

HBV와 연관된 사구체신염은 신조직 내에 면역글로불린, 보체 및 HBV 항원의 침착이 관찰되며 혈중에 혈청 보체의 감소와 면역 복합체가 존재하는 점으로 면역 복합체에 의한 체액성 면역이 관여한다고 알려져 있으며, 표적 항원에 감작된 T 림프구에 의해 매개되는 세포성 면역 반응도 관여한다고 생각되어지고 있으나¹³⁾ HBV의 어떤 항원이 주원인으로 작용하는지에 대해서는 계속 논란이 되어져 왔다. 1980년 Slusarczyk 등¹²⁾은 23명의 소아 환자 중 14명에서 HBcAg의 사구체 침착을 발견하고 HBcAg의 중요성을 강조하였고, Iida 등¹³⁾은 2명의 HBV와 연관된 MPGN type III 환자에서 HBsAg의 침착은 확인되었으나 HBeAg의 침착은 확인하지 못하여 HBeAg보다 HBsAg의 관련이 더 깊을 것으로 보고한 바도 있다. 또한 Amemiya 등¹⁴⁾은 사구체 모세혈관에서 HBeAg과 HBsAg의 침착을, 사구체간질에서 HBsAg의 침착을 관찰하여 MGN은 HBeAg이, MPGN은 HBeAg과 HBsAg이 모두 중요한 역할을 할 것이라고 하였다.

HBeAg의 존재는 간 손상의 간접적 지표로서 HBeAg에 의한 망상 내피계의 기능 저하에 따라 혈중 면역 복합체가 증가되며 따라서 신 사구체 내에 면역 복합체가 침착될 가능성이 높아지게 되는데 1979년 Takekoshi 등¹⁵⁾은 2명의 MGN을 가진 소아 환자의 신 조직에서 모세혈관 벽을 따라 HBeAg 만이 침착된 예를 보고하고 HBeAg의 분자량이 3×10^5

dalton 으로 HBV 관련 항원 중 가장 적어서 쉽게 사구체 기저막을 통과하여 상피 세포 하부의 면역 침착을 형성할 수 있는 반면 분자량이 3x106dalton 이상인 HBsAg이나 8x106 dalton 이상인 HBeAg은 사구체 기저막을 통과하지 못하고 주로 사구체간질 내에 침착된다고 설명한 바 있다. 또한 Ito 등¹⁶⁾은 HBeAg이 혈청 내에서 음전된 뒤에 신생점 소전상 상피 세포 하부의 면역 침착물들이 빠져나간 것으로 보이는 electron lucent area가 있음을 보고하여 HBeAg의 중요성을 강조하기도 하였다. 본 연구에서는 HBsAg의 침착은 관찰되지 않았으나 HBeAg이 28례 중 8례 (28.6%)에서 사구체 모세혈관벽을 따라 침착되었다.

본 연구에서 HBeAg 면역조직화학염색에 양성을 보인 8례 중 혈청 HBeAg검사를 실시한 3례 모두에서 양성을 나타내어 HBV 간염의 활동성과 HBV와 연관된 사구체신염이 관련이 있을 것으로 사료되었으나, 역으로 혈청 HBeAg검사에서 양성을 보인 6례 중 신조직의 HBeAg에 대한 면역조직화학염색에서 양성을 보인 예는 3례로 50.0%의 양성률을 보였다. 이의 원인으로 면역조직화학염색의 과정 중에 있을 수 있는 항원성의 소실을 생각해 볼 수 있는데 일반적으로 항원은 세포질내에 고농도로 존재하여 조직을 고정하는 동안에도 대체로 보존이 잘 되는 편이지만 용해성 항원이나 세포 표면항원은 변성되거나 소실될 수 있어 염색시에 위음성을 보일 수 있다. 따라서 통상적으로 사용하는 포르말린보다는 수은이나 picric acid가 포함된 고정액이 항원성 보존에 더 우수한 것으로 알려져 있고, 고정 시간은 길수록 조직 구조의 유지에는 좋으나 항원의 소실이 커지므로 4-6시간 정도로 짧게 하는 것이 좋다. 특히 미량의 항원을 검출할 때에는 파라핀에 포매된 조직을 이용하는 것보다 생검 즉시 동결 절편을 만들어 면역조직화학염색을 실시하는 것이 중요하다. 또한 조직내에 잠수어인 항원을 노출시키기 위해 citric acid 용액에 담구어 극초단파 처리를 하거나 압력이 가해진 통에 담아 습윤 가열을 하는 등의 노력이 위음성을 줄이는 데 필요하다. 본 연구에서는 조직절편이 부착된 슬라이드를 밀폐용기에 담아 10분간 극초단파 처리를 하여 항원성을 높여주었으며 예비 실험에서 일차 항체의 희석 농도를 다양하게 하거나 3% 과산화수소수를 이용한 내인성 과산화 효소를 억제하는 과정도 시간을 다양하게 변화시켜 최대한 위양성 반응이 적은 실험 환경을 선택하였다.

최근에는 In situ hybridization 과 RT (reverse transcriptase) PCR을 이용하여 HBV의 DNA를 신장의

세뇨관 세포의 핵에서 인지하였다는 보고¹⁷⁾가 있고 또한 southern blot방법으로 23명의 환자중 3명에서 non replicated free form, 그리고 14명 (82%)에서 integrated form의 HBV DNA를 검출하여 HBV에 감염된 신장 조직임을 입증함으로써 사구체 내의 HBV 항원의 기원은 순환계를 통한 것 뿐 아니라 HBV에 감염된 사구체 세포에서 유래한 것이라는 보고도 있다¹⁸⁾. Lai 등의 연구에서도 In situ hybridization으로 HBeAg RNA가 사구체와 세뇨관 세포의 핵과 세포질에서 각각 56%, 20%로 존재함을 보고함으로써 바이러스의 전사가 신장내에서도 일어나고 있음을 밝혀 사구체 신염을 가진 만성 HBsAg보균자에서 HBV가 원인적인 역할을 함을 증명하였다¹⁹⁾.

이상과 같이 HBV와 연관된 사구체신염의 병리조직학적 소견을 분석한 결과 HBV와 연관된 사구체신염은 다양한 병리학적 양상을 보여주며, 특히 MGN과 MPGN에서는 전자현미경소전상 두 질환의 특징이 중복되어 나타났다. 사구체내에서 HBeAg의 동정으로 HBV의 활동성 정도와 사구체신염의 발생이 무관하지 않음을 추정해볼 수 있으나 HBeAg 양성인 중례수가 적어 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각되어진다.

참고 문헌

- 1) Combes B, Stastny P, Shorey J, Eigenbrodt EH, Barrera A, Hull AR, Cater NW. Glomerulonephritis with deposition of Australia antigen-antibody complexes in glomerular basement membrane. *Lancet* 2: 234-237, 1971
- 2) Ronco P, Verroust P, Morel-maroger L. Viruses and glomerulonephritis. *Nephron* 31: 97-101, 1982
- 3) 우은균, 신성태, 이호영, 한대석, 정성호. 각종 신질환에서 혈청 B형 간염표면 항원 (HBsAg)의 발현 빈도. *대한신장학회지* 3(2): 121-127, 1984
- 4) Lee HS, Choi T, Yu SH, Koh HI, Kin MF, Ko KW. A renal biopsy study of hepatitis B virus-associated nephropathy in Korea. *Kidney Int* 34: 537-543, 1988
- 5) 박문향, 안혜선. B형 간염 바이러스에 동반된 신병증의 임상 및 병리학적 연구. *대한병리학회지* 26: 215-228, 1992
- 6) 이상구, 안규리, 한진석, 김성권, 이정삼, 고창순, 김용일. 혈중 HBsAg 양성인 사구체 신염에서 혈중 HBeAg 발현의 의의. *대한신장학회지* 10: 8-16, 1991
- 7) 김기현. B형 간염 바이러스 감염에 동반한 사구체

- 신장염 환자의 신장 면역조직화학적 연구. Dong-A J Med 5: 55-64, 1993
- 8) 정해일, 진동규, 최용, 고광옥, 이현순, 김용일. 소아에서 B형 간염 Virus 관련 신사구체 병증. 대한신장학회지 8: 290-299, 1989
- 9) Yoshikawa N, Ito H, Yamada Y, Hashimoto H, Katayama Y, Matsuyama S, Hasegawa O, Hajikono H, Yoshizawa H, Mayumi M, Matsuo T. Membranous glomerulonephritis associated with hepatitis B antigen in children: a comparison with idiopathic membranous glomerulonephritis. Clin nephrol 23: 28-34, 1985
- 10) Wrzolkowa T, Zurowska A, Picken M. Hepatitis B Virus-Associated Glomerulonephritis: Electron Microscopic Studies in 98 Children. Am J Kid 18: 306-312, 1991
- 11) Zhang Y, Fang L, Ma X. Hepatitis B virus infection and pathogenesis of glomerulonephritis. Chang-Hua-Ping-Li-Hsueh-Tsa-Chin 24: 341-344, 1995
- 12) Slusarczyk J, Michalak T, Mezer TN, Krawczynski K, Nowoslowski A. Membranous glomerulopathy associated with hepatitis B core antigen immune complexes in children. Am J Pathol 98: 29-44, 1980
- 13) Iida H, Izumino K, Asaka M, Kameyama T, Taketa M, Mizumura Y, Sasuyama S. Membrano-proliferative glomerulonephritis-associated with chronic hepatitis B in adult: pathogenetic role of HBs Ag. Am J Nephrol 7: 319-325, 1987
- 14) Amemiya S, Ito H, Kato K, Sakaguchi H, Hasegawa O, Hajikano H. A case of membranous proliferative glomerulonephritis type (Burholder) with the deposition of both HBeAg and HBsAg. Int J Pediatr Nephrol 4: 267-270, 1983
- 15) Takekoshi Y, Tanaka M, Miyakawa Y, Yoshizawa H, Takahashi K, Mayumi M. Free "small" and Ig G associated "large" hepatitis B e antigen in the serum and glomerular capillary walls of two patients with membranous glomerulonephritis. N Engl J Med 300: 814-819, 1979
- 16) Ito H, Hattori S, Matusda I, Amemiya S, Hajikano H, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B e antigen mediated membranous glomerulonephritis. Lab Invest 44: 214-218, 1981
- 17) Churg J, Sobin LH. Renal disease. Classification and atlas of glomerular disease New York, 1982, Igaku-Shoin
- 18) Ehrenreich T, Churg J. Pathology of membranous nephropathy. Pathol Ann 3: 145-186, 1968
- 19) Lai KN, Ho TH, Tam JS. Detection of hepatitis B virus DNA and RNA in kidneys of HBV-related glomerulonephritis. Kid international 50: 1965-1977, 1996

= Abstract =

Clinicopathologic Features and HBsAg and HBeAg Expressions in Hepatitis B Virus-associated Glomerulopathy

Soo Jin Jung, Hye Kyoung Yoon, Woo Yeong Chung*, Young Hoon Kim**, Su Yung Kim***

Department of Pathology, Department of Pediatrics and Department of Internal medicine**,
Inje University, College of Medicine, Pusan Paik Hospital,
Department of Pediatrics***, Pusan University, College of Medicine+, Pusan, Korea*

Purpose : Hepatitis B virus (HBV) infection has been involved in several forms of immune-related glomerulopathy but the pathogenic role of HBV infection is not clear. To evaluate the clinicopathological features of HBV-associated glomerulopathy, a clinicopathological analysis and immunohistochemical stain for HBs Ag and HBe Ag were done.

Methodes : Clinicopathological features of HBV-associated glomerulopathy were analyzed with renal biopsies in 28 HBsAg seropositive patients from April 1990 to February 1997 at Pusan Paik Hospital, and immunohistochemical evaluation for HBsAg and HBeAg was done in renal tissues. Light microscopic, immunofluorescent and electron microscopic examination and immunohistochemical staining for HBsAg (DAKO) and HBeAg (BIONIKE) of renal tissue were performed.

Result :

1. The age distribution was 6 to 73 years old, and eight were children and 20 were adults.

Male : female ratio was 3:1. Nineteen (67.9%) and 21 (75.0%) of 28 cases showed hematuria and proteinuria, respectively at the time of biopsy. Sixteen (57.2 %) of them had nephrotic syndrome.

2. Liver function test was performed in 11 patients and seven (63.6%) of them showed increased AST and ALT levels. Liver biopsy was done in three patients and revealed findings of chronic active hepatitis.

3. HBV-associated glomerulopathy was membranous glomerulonephritis (MGN) in 10 (35.7%), mesangiopathy in 8 (28.6%), membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) in 7 (25.0%) and minimal change disease in 3 (10.7%) out of 28 cases.

4. Ultrastructurally HBV-associated MGN showed conspicuous subepithelial deposits with intramembranous, mesangial and subendothelial deposits and proliferation of mesangial cells and matrix, which were suggestive of MPGN. In HBV-associated MPGN, intramembranous and subepithelial deposits were scattered.

5. Immunohistochemical staining revealed no expression for HBsAg, but positive reaction for HBeAg along capillary wall in 8 cases (28.6%), of which 3 cases were checked for serum HBeAg, all showed positivity.

Conclusion : HBV-associated glomerulopathy showed a wide morphologic spectrum and overlapping ultrastructural features in MGN and MPGN, and the activity of hepatitis B virus may be related to the development of HBV-associated glomerulopathy but further studies are recommended to confirm this relationship. (**J Korean Soc of Pediatr Nephrol 2:50-59, 1998**)

Key Words : Hepatitis B Virus-associated Glomerulopathy, Clinicopathological features, HBs Ag, HBe Ag, Renal biopsy