



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

만성 B형간염에서 라미부딘 내성에 관련된
YMDD 변이형의 양상과 HBV DNA와
ALT치에 미치는 영향

아주대학교 대학원

의학과

최재명

만성 B형간염에서 라미부딘 내성에 관련된
YMDD 변이형의 양상과 HBV DNA와
ALT치에 미치는 영향

지도교수 조 성 원

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2007년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

최 재 명

최재명의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 조 성 원 인

심 사 위 원 김 진 홍 인

심 사 위 원 유 병 무 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2006년 12월 22일

만성 B형간염에서 라미부딘 내성에 관련된 YMDD 변이형의 양상과 HBV DNA와 ALT치에 미치는 영향

목 적 : 라미부딘은 강력한 항 HBV 작용이 있으나 HBV를 완전히 제거하지 못하며 충분한 항바이러스 효과를 얻기 위해서는 장기적인 유지 요법이 필수적이거나 투여 도중 상당수에서 라미부딘 내성 돌연변이 바이러스가 발생한다. 이에 저자들은 라미부딘을 9개월 이상 투여한 환자에서 라미부딘 내성을 일으키는 YMDD motif 변이종의 발현 양상 및 혈청 ALT, HBV DNA에 미치는 영향을 조사 하였다.

방 법 : 라미부딘으로 치료받은 93명의 만성 B형간염 또는 간경변증 환자를 대상으로 하였다. 이들은 모두 최소 9개월 이상 투약과 12개월 이상 혈청검사 추적이 가능하였으며, 라미부딘 100mg 투약 중 viral breakthrough를 나타낸 환자들이었다. YMDD motif 변이는 Restriction Fragment Mass Polymorphism(RFMP)법으로 측정 하였으며 혈청 HBV DNA는 Digene[®] Hybrid capture II assay로 측정 하였다.

결 과 : 대상 환자들의 평균나이는 43.1세였고 남녀 비는 75:18이었다. 라미부딘의 평균 투약 기간은 36.2±17.9 개월 이었으며, 내성을 보이는 YMDD 변이형의 발생 시기는 평균 22.8±14.9 개월이었다. Viral breakthrough시 DNA 정량은 7.65±0.09(5.23-9.09) log₁₀ copies/mL, ALT 수치는 186.3±199.7 U/L이었다. YMDD motif 변이형 발생 시 YIDD 변이형이 42/93(45.2%), YVDD 변이형이 27/93(29.0%), YIDD/YVDD 혼합 변이형이 24/93(25.8%) 였으며, 발생 시기 및 발생 시 ALT, HBV DNA 치에는 세군 간의 차이가 없었다. 이들 변이형 발생 시에 rtL528M 동반이 78/93(83.9%)에서 관찰 되었는데, YIDD 변이형에서 63.4%, YVDD 변이형에서는 전 환자에서 동반되어 발생하였다.

결 론 : YIDD 변이종이 YVDD 변이종에 비하여 흔하게 발생되었고 YIDD/YVDD 혼합 변이종이 흔하게 관찰 되었지만, 변이종간의 viral breakthrough 시 HBV DNA 치 및 최고 ALT치에 차이가 없었다.

핵심어 : 만성 B형간염, 라미부딘, YMDD motif 변이형, 제한효소분절질량다형성

차 례

국문 요약	i
차례	iii
그림 차례	iv
표 차례	v
I. 서론	1
II. 연구대상 및 방법	3
A. 연구대상	3
B. 방법	3
C. 통계	4
III. 결과	5
A. 대상 환자의 특성	5
B. 라미부딘 투여 중 혈청 ALT 및 HBV DNA치의 변화	6
C. YMDD 돌연변이주의 출현빈도	8
D. 라미부딘 투여 중 viral breakthrough의 발현 시기	9
E. Viral breakthrough에서 최대 ALT 치의 비교	9
F. Viral breakthrough에서 최대 HBV DNA치의 비교	10
IV. 고찰	11
V. 결론	14
참고문헌	15
ABSTRACT	19

그림 차례

- Fig. 1. Cumulative percentage of patients with sustained ALT response during lamivudine treatment (n=65): ALT normalization rate at 3, 6, and 12 months were 28%, 66%, and 85%, respectively 6
- Fig. 2. Cumulative HBV DNA disappearance rate during lamivudine treatment in 58 patients: The disappearance rate at 3, 6, and 12 months were 43%, 69%, and 81%, respectively 7
- Fig. 3. Distribution of YMDD motif mutation types in 93 patients 8

표 차례

Table 1. Baseline characteristics of the study patients	5
Table 2. Association of YMDD motif mutants and duration to viral breakthrough	9
Table 3. Serum ALT and HBV DNA levels in patients with YMDD motif mutants	10

I. 서 론

만성 B형간염은 우리나라에서는 전체 인구의 약 8%, 세계적으로는 3억 명이상이 가지고 있는 질병으로 바이러스 질병 중 10위 내에 속한다(Gutfreund 등, 2000; Lau 등, 2000). 또한, WHO 보고에 의하면, 전 세계적으로 매년 120만 명이 이와 관련된 질환 및 합병증으로 사망하는 것으로 알려져 있다. 이 질환은 간경변증 및 간세포 암으로 진행할 수 있는데, 기전은 면역 반응의 장애로 인하여 B형간염 바이러스의 증식이 계속되고 이를 제어하려는 불완전한 면역반응이 지속되기 때문으로 생각되고 있다(Chisari 등, 1995; Ogata 등, 1999; Tiollais 등, 1985). 이러한 발병 기전 때문에 만성B형 간염에 대한 치료로 면역 능력을 강화시키는 약제와 바이러스의 증식을 직접 억제할 수 있는 항바이러스제의 개발에 중점을 두어왔다(Marques 등, 1998).

B형간염 바이러스의 증식을 억제하면 조직학적 및 임상적 호전을 가져오므로 라미부딘이 B형간염의 치료로 널리 사용되고 있다. 라미부딘은 원래 HIV(human immunodeficiency virus)의 역전사 효소를 억제하는 약물로 알려져, 후천성 면역결핍증 환자들의 치료에 이용되었으나, 1991년 배양된 세포 내에 있는 B형간염 바이러스의 RNA dependent DNA polymerase에도 억제 작용이 있는 것이 보고되면서(Doong 등, 1991) B형간염 바이러스를 억제할 목적으로 연구가 시작되었다(Mason 등, 1998; Summers 등, 1982). 국내에서도 라미부딘이 만성 B형간염의 치료제로서 1999년 8월 식품의약품의 공인을 받았고, 야생형 뿐 아니라 precore 변이종에 대한 치료성적까지 보고가 되어 있다(김광희 등, 2000; 유혜승 등, 2000).

라미부딘은 핵산 유도체로서, 세포 내에서 lamivudine triphosphate로 변환된 후 B형간염 바이러스의 pregenomic RNA로부터 역전사되는 바이러스 DNA의 염기서열 내에 삽입됨으로써 바이러스의 증식을 억제한다. Lai 등(Lai 등, 1998)은 만성 B형간염 환자에서 라미부딘의 치료효과에 관한 연구에서 투여개시 12주

째 혈청 ALT치의 정상화율은 72%, 1년 치료기간 동안 HBV DNA 음전이 1회라도 관찰되었던 경우는 96%, 치료시작 후 52주 째 혈청전환율(HBeAg 음전율)은 16%라고 보고하였다.

라미부딘은 세포내 cccDNA(covalently closed circular DNA)에 영향을 미치지 못하기 때문에 충분한 항바이러스 효과를 얻기 위해서는 장기적인 유지 요법이 필수적이나 라미부딘 내성이 1년 치료에 14%, 2년, 3년, 4년 치료에 각각 38%, 49%, 66%의 빈도로 흔하게 출현한다(이종훈 등, 2001; Hadziyannis 등, 2000; Papatheodoridis 등, 2002; Torresi 등, 2002). 이러한 내성은 HBV DNA polymerase C domain의 아미노산 tyrosine, methionine, aspartate, aspartate(YMDD) motif의 변이가 원인으로 알려져 있으며(Ling 등, 1996; Tipples 등, 1996), methionine이 isoleucine로 대체되는 YIDD 변이형, methionine이 valine으로 대체되는 YVDD 변이형, HBV polymerase gene의 B domain의 leucine이 methionine으로 대체되는 rtL180M 등이 있다(Ladner 등, 1998). YMDD 변이형은 야생형에 비해 증식능이 감소하므로, HBV DNA 치가 낮다. 변이종의 증식능은 YIDD 형, YVDD 형, rtL180M 형 순으로 증가되며 HBV 유전자형에 따라 YMDD 변이종의 출현 양상이 다른 것으로 알려져 있다(Zollner 등, 2004). 국내에서는 YMDD 변이종을 예민하고 정확하게 측정할 수 있는 RFMP이 개발되어 널리 이용되고 있으나 라미부딘 내성에 관련된 YMDD 변이종의 양상에 대한 체계적인 보고는 드물다.

본 연구에서는 YMDD영역의 유전자변이를 말디토프 질량분석을 응용한 제한 효소분절질량다형성(RFMP)을 이용하여 라미부딘 치료를 받은 환자에서 라미부딘 내성을 일으키는 변이형의 분포 및 변이형의 종류에 따른 임상 양상의 차이를 규명하고자 하였다.

II. 대상과 방법

A. 연구대상

2000년 6월부터 2006년 2월까지 아주대병원에 내원하여 라미부딘으로 치료받은 만성 B형간염 또는 초기 간경변증 환자를 대상으로 하였다. 총 93명의 환자가 본 연구에 등록되었으며, 최소 9개월 이상 투약과 12개월 이상 혈청검사의 추적이 가능하였던 환자들이었다. 연구시작 시점으로부터 최소 12개월간 HBsAg 검사상 양성으로 나타났고 HBeAg 양성 여부와 상관없이 투약직전 HBV DNA 이상, 혈청 ALT치가 100 U/L 이상이면서, 매일 라미부딘 100mg으로 9개월 이상 투약 중 viral breakthrough가 발생한 환자들을 대상으로 하였다. 환자의 제외 기준은 anti-HCV, anti-HIV 항체양성, 비대상성 간경변증, 자가 면역성 간염 환자 등이었다.

B. 방법

환자들은 투약 직전과 투약 후 첫 3개월, 6개월, 12개월에 그 이후는 매 3개월 간격으로 HBeAg, anti-HBe, HBV DNA, 그리고 혈청화학검사를 받았다. 혈청 AST와 ALT의 측정은 Hitachi 7150 automated chemical analyzer를 사용하였고, HBsAg, HBeAg, anti-HBe는 Abbott Lab.(North Chicago, IL, USA)의 Kits를 사용하여 방사면역측정법으로 검사하였다. HBV DNA 측정은 정량적 hybridization capture법 (Digene[®] Hybrid Capture II assay)을 이용하였으며 cut off 치는 0.5 pg/mL 였다.

라미부딘 내성은 치료 시작 후에 HBV DNA의 감소를 보인 환자들 중 최소 2회 이상의 검사에서 혈청 HBV DNA가 음전 상태에서 재 양전 되거나, 양전 상태의 최저 값에서 1 log₁₀ copies/mL 이상 재상승 되는 viral breakthrough를 보이는 경우로 정의하였으며 투약 전 혈청과, 매 3개월마다 얻어진 환자의 혈청들 중 breakthrough가 발생할 당시부터 3개월 이내 얻어진 환자의 혈청에서

RFMP(Restriction Fragment Mass Polymorphism)를 이용한 라미부딘 내성 검사 (Gene Matrix, Seoul, Korea)로 내성 변이형의 종류를 분석하였다(Hong 등, 2004). Viral breakthrough 후 ALT, HBV 관찰기간은 12개월 이었다.

C. 통계

모든 자료의 통계분석은 window용 SPSS release 13.0 프로그램을 사용하여 Mann-Whitney 비모수검정법을, 누적반응율은 Kaplan Meier법을 이용하였다. p 값이 0.05 미만인 것을 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

A. 대상 환자의 특성

대상 환자 93예의 연령은 평균 43.1세이었으며 50세 이상은 20명으로 젊은 연령이 많았고 남녀 비는 75:18이었다. 치료 전 혈청 HBV DNA의 평균값은 $8.02 \pm 0.10 \log_{10}$ copies/mL ($5.90 - 9.23 \log_{10}$ copies/mL)였고, ALT 평균값은 219.3 ± 176.0 U/L (15-885 U/L)였다. 치료 전 HBeAg이 negative 인 환자는 3명이었으며 간경변증 환자 수는 4명 이었다. 93예 중 6예에서 라미부딘 투여 전에 인터페론 치료력이 있었으며, 인터페론 후 음전화 된 경우는 3명, 치료 실패 된 경우는 3명으로 치료 실패 군은 즉시 라미부딘을 사용하였다. 11명의 환자에서 이전 라미부딘 투여 후 음전화 병력이 있었으나 아데포비어 사용 군은 없었다. 93예의 평균 라미부딘 투여 기간은 36.2 ± 17.9 개월(9-94개월)이었다(Table 1).

Table 1. Baseline characteristics of the study patients

Number of patients	93
Age(years)	$43.1 \pm 8.6^*$ (23-67)
Sex(M/F)	75/18
HBV DNA(\log_{10} copies/mL)	$8.02 \pm 0.10^*$
ALT(U/L)	$219.3 \pm 176.0^*$
HBeAg(+/-)	71/3
Duration of lamivudine treatment(months)	$36.2 \pm 18.0^*$ (9-94)

* Mean \pm S.D.

B. 라미부딘 투여 중 혈청 ALT 및 HBV DNA치의 변화

HBV DNA의 음전은 투약 후 중앙값 4개월(범위:1-45개월)에 나타났다. 12개월 이상 ALT 추적 관찰이 가능했던 환자 76명 중 ALT 정상화는 65명에서 발생했고, 투약시작 3개월, 6개월과 12개월 시점의 ALT 정상화율은 각각 28%(65명 중 18명), 66%(65명 중 43명), 85%(65명 중 55명)이었으며, 14%(76명 중 11명)에서 ALT 정상화 없이 지속적 상승을 나타내었다(Fig. 1).

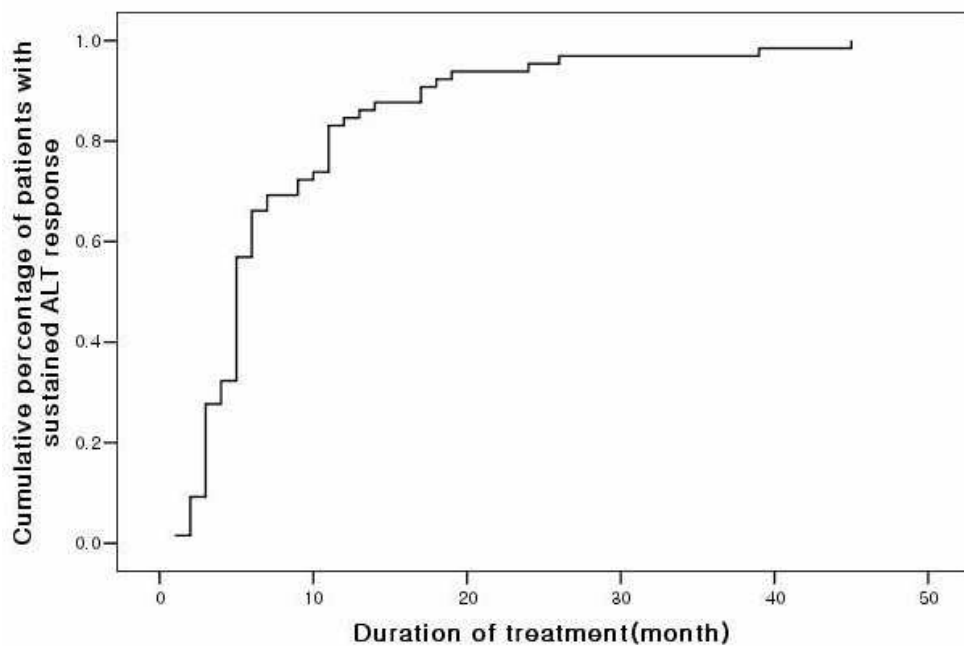


Fig. 1. Cumulative percentage of patients with sustained ALT response during lamivudine treatment (n=65) : ALT normalization rate at 3, 6, and 12 months were 28%, 66%, and 85%, respectively

12개월 이상 정기적 HBV DNA 추적 관찰 가능했던 80명 중에서 치료기간 내내 최소 1회라도 HBV DNA가 음전된 것이 관찰되었던 경우는 58명이었으며, 음전화 없이 양전화가 유지된 집단은 22명이었다. 라미부딘 투여 후 HBV DNA

음전화 반응을 보였던 58명의 분포는 투여 3개월, 6개월과 12개월 시점에서 각각 43%(58명 중 25명), 69%(58명 중 40명), 81%(58명 중 47명) 이었다(Fig. 2).

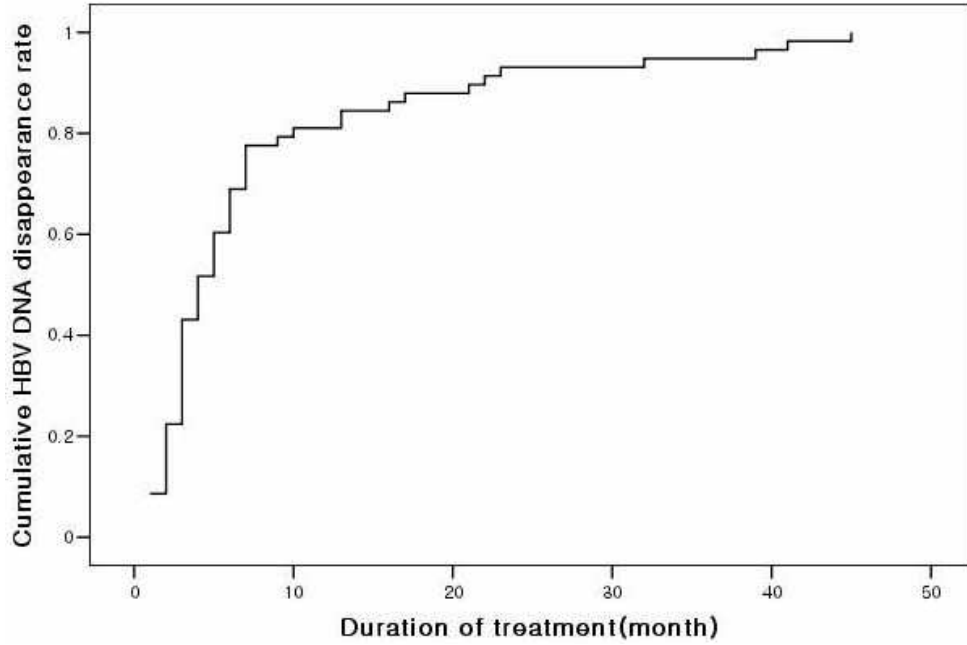


Fig. 2. Cumulative HBV DNA disappearance rate during lamivudine treatment in 58 patients : The disappearance rate at 3, 6, and 12 months were 43%, 69%, and 81%, respectively

C. YMDD 돌연변이주의 출현빈도

라미부딘 투여한 대상 환자 93명 모두에서 viral breakthrough가 발생하였다. 93명 중 42예(45.2%)에서 YIDD 변이형이 검출되었고, 27예(29.0%)에서 YVDD 변이형이 검출되었으며 YIDD 변이형과 YVDD 변이형이 같이 검출된 경우는 24예(25.8%)였다. C domain의 YMDD 돌연변이와 함께 B domain의 rtL180M 변이가 동반된 경우가 YIDD 형 환자 42예 중 27예(64.2%), YVDD 형 환자 27예 중 27예 모두, YIDD 와 YVDD 혼합형에서는 24예 모두에서 발견되었다(Table 2, Fig. 3).

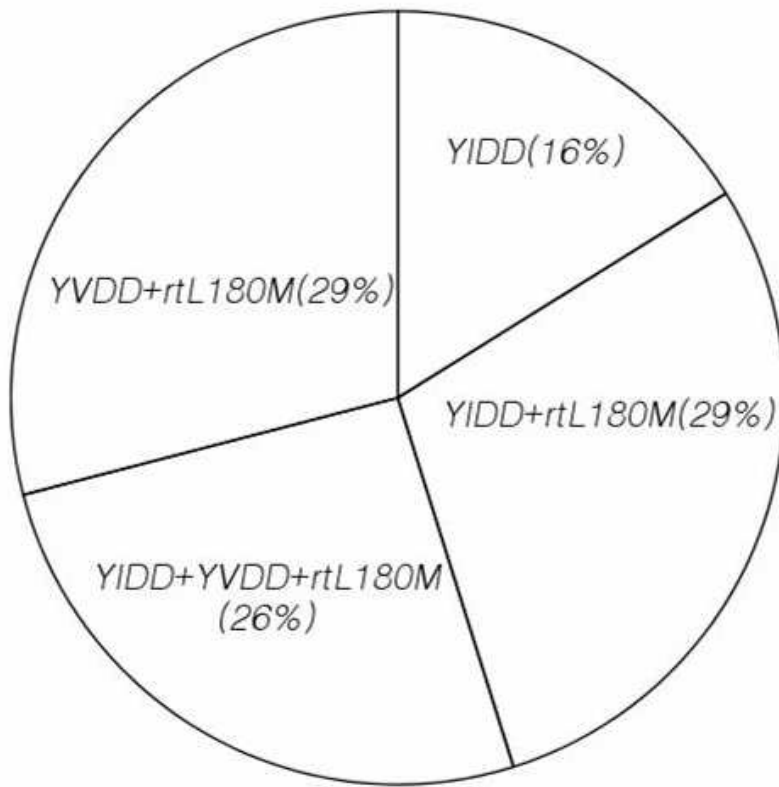


Fig. 3. Distribution of YMDD motif mutation types in 93 patients

D. 라미부딘 투여 중 viral breakthrough의 발현 시기

Viral breakthrough의 발현 시기는 평균 라미부딘 투여 후 22.8 ± 14.9 (5-79)개월에 발생하였다. YIDD 변이형의 breakthrough 발현 시기는 평균 20.1 ± 13.7 (5-79)개월이었고, YVDD 변이형에서는 평균 26.8 ± 15.4 (8-66)개월이었다. YIDD 와 YVDD 변이 혼합형에서는 평균 22.8 ± 15.8 (6-62)개월 이었다. YIDD 형이 YVDD 형에 비하여 viral breakthrough의 발현 시기가 빠른 경향이 있었으나 유의한 차이는 없었다(Table 2).

Table 2. Association of YMDD motif mutants and duration to viral breakthrough

YMDD motif mutants	n	Duration from baseline to breakthrough(months)
YIDD	42(45.2%)	20.1 ± 13.7
YVDD	27(29.0%)	26.8 ± 15.4
YIDD/YVDD	24(25.8%)	22.8 ± 15.8
Total	93	22.8 ± 14.9

E. Viral breakthrough에서 최대 ALT 치의 비교

Breakthrough가 일어난 시기에 검사된 ALT치는 186.3 ± 199.8 U/L로 라미부딘 투여 시작 당시의 ALT치 219.3 ± 176.0 U/L에 비해서는 낮았다. YIDD 변이형 군에서 breakthrough 발현 시기의 ALT치는 156.1 ± 140.4 U/L였고, YVDD 변이형 군에서는 201.0 ± 285.7 U/L, YIDD와 YVDD 변이 혼합형 군에서는 222.7 ± 169.7 U/L로 YIDD 변이형 군에서 가장 낮은 ALT치를, YIDD와 YVDD 변이 혼합형 군에서 가장 높은 ALT치를 보이는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었다 (Table 3).

Table 3. Serum ALT and HBV DNA levels in patients with YMDD motif mutants

	ALT(U/L)		HBV DNA (log ₁₀ copies/mL)	
	Baseline	Breakthrough	Baseline	Breakthrough
YIDD	258.5±217.2	156.1±140.4	8.04±0.15	7.75±0.15
YVDD	171.2±101.2	201.0±285.7	8.12±0.18	7.64±0.15
YIDD/YVDD	193.6±134.2	222.7±169.7	7.92±0.22	7.50±0.18
Total	219.3±176.0	186.3±199.7	8.02±0.10	7.65±0.09

F. Viral breakthrough에서 최대 HBV DNA치의 비교

Breakthrough시의 HBV DNA치는 평균 7.65±0.09 log₁₀ copies/mL로, 5.23 log₁₀ copies/mL에서 9.09 log₁₀ copies/mL 까지 다양한 분포를 나타내었고, 이는 8.02±0.10 log₁₀ copies/mL를 나타낸 라미부딘 투여 개시 때의 HBV DNA치에 비해 낮은 수치였다. YIDD군에서 breakthrough시기의 HBV DNA치는 7.75±0.15 log₁₀ copies/mL였고, 라미부딘 투여 시작시의 HBV DNA치는 8.04±0.15 log₁₀ copies/mL였다. YVDD군에서의 breakthrough시기의 HBV DNA치는 7.64±0.15 log₁₀ copies/mL였으며, 라미부딘 투여 시작시의 HBV DNA치는 8.12±0.18log₁₀ copies/mL였다. YIDD와 YVDD혼합군에서 breakthrough시기의 HBV DNA치는 7.50±0.18 log₁₀ copies/mL였으며, 라미부딘 투여 시작시의 HBV DNA치는 7.92±0.22 log₁₀ copies/mL였다. Breakthrough시의 HBV DNA치는 YIDD군, YVDD군과 YIDD 와 YVDD혼합군 사이에 유의한 차이가 없었다(Table 3).

IV.고 찰

라미부딘은 역전사 과정을 억제하므로 간세포 내에 있는 covalently closed circular (ccc) HBV DNA는 파괴할 수 없고, ccc DNA로부터 전사되는 mRNA의 전사과정도 억제(Doong 등, 1991) 할 수 없으므로 HBV를 완전히 소멸시키는 데는 한계가 있어 치료 시작 6개월 이후부터는 변이형 바이러스가 생기게 되고 시간이 지남에 따라 점차 증가하게 되어 HBV DNA의 음전율은 감소하게 된다. HIV 환자에서는 HIV 역전사효소가 guanine을 adenine으로 더 쉽게 치환하여 YIDD 변이형이 YVDD 변이형에 비하여 조기에 출현하는 경향이 있다고 하며 (Schuurman 등, 1995), 라미부딘을 투여한 만성 B형간염 환자에서도 내성이 발생되면 YIDD 형이 먼저 나타나고 이후에 YVDD 형으로 대체되며 동시에 rtL180M 변이형이 출현한다. 그러므로 rtL180M 변이가 동반된 YVDD 형은 안정적으로 라미부딘 투여기간에 존재하게 된다(Gutfreund 등, 2000). 본 연구에서 YIDD 변이형의 발생 시기는 라미부딘 투여 후 20.1 ± 13.7 개월, YVDD 변이형은 26.8 ± 15.4 개월로 YVDD 변이형에 비해 YIDD 형의 발생이 빠른 경향이 있었으나 유의한 차이는 없었다.

HBV 유전자형에 따라 라미부딘 내성 시 발생하는 YMDD 변이형이 다르다는 연구가 보고 되었다(Zollner 등, 2004). D 유전자형에서는 YIDD 형이 빈번하게 발생되며 A 유전자형에서는 D 유전자형에 비하여 YVDD 형의 발생이 흔하다고 한다. HBV A형에 감염된 환자는 짧은 기간에 YIDD 형이 YVDD 형으로 대체되어 rtL180M이 동반된 YVDD 형이 가장 안정된 변이형으로 보고되었다. 반면에 D형에서는 YIDD가 오랜 기간 안정적으로 존재한다고 한다. 본 연구에서 YMDD 변이형태의 분포는 YIDD 단독 변이형이 45.2%, YVDD 단독 변이형이 29.0%로 YIDD 변이형이 YVDD 변이형에 비하여 흔하게 발생되었으며 HBV 유전자 D형 보유자에서는 YIDD 변이형의 발생율이 73%(Papatheodoridis 등, 2002), 67%(Zollner 등, 2004)로 보고 되어 있지만 HBV 유전자 C형에서 발생되

는 주된 YMDD 변이형의 종류에 대하여 알려진 바는 없다. 우리나라에서는 C형이 대부분을 차지하므로(조일현 등, 2001) HBV C형에서는 YVDD 변이형에 비하여 YIDD 변이형이 흔하게 발생될 것으로 추정된다.

Lee 등(이중훈 등, 2001)은 라미부딘 내성 환자에서 YIDD와 YVDD 변이형이 혼합된 경우가 29.8% 이라고 보고 하였는데 본 연구에서도 YIDD와 YVDD 변이형이 혼합된 경우가 25.8% 이었다. 이러한 결과는 HBV 유전자 C형에서 YIDD 형이 YVDD형으로 전환될 수 있음을 시사한다. YMDD 변이형에서 rtL180M이 흔하게 동반되며 HBV 증식능이 향상되는 것으로 알려져 왔다. 본 연구에서 rtL180M은 YIDD 형의 64.2%에서 동반 되었으며 YVDD 형에서는 전 예에서 동반되어 있음을 확인하였다.

HBV 유전자형에 따라서 YMDD 변이 형태의 발생이 다른 기전은 알려져 있지 않다. 생체 외 실험에서 YIDD 형은 YVDD 형에 비하여 HBV 증식능이 감소됨이 확인 되었으므로 YIDD 형에서 YVDD 형으로 전환은 라미부딘 내성 HBV의 생존을 위해 필요할 것으로 생각된다. HBV 표면 유전자는 polymerase 유전자와 중복되어 위치하므로 polymerase 유전자의 변이는 HBV 유전자형에 따라 다른 방법으로 표면 항원의 항원성을 변화 시킬 수 있을 가능성이 있으므로 YMDD 변이의 전환에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 라미부딘 내성 바이러스는 anti-HBs가 HBsAg에 부착하는 능력이 감소되도록 HBsAg의 항원을 변화 시킬 수 있는 변이를 선택한다고 한다(Torresi 등, 2002). 따라서 숙주의 면역 반응이 YMDD 변이형의 전환에 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

만성 B형간염에서 라미부딘 내성이 발생된 후 ALT치가 상승되는 시점은 3-24개월로 매우 다양하다(Hadziyannis 등, 2000). ALT치의 상승 시점이 다양한 것은 HBV DNA치와 숙주의 면역 반응에 의하여 결정될 것으로 생각되나 원인은 정확히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 YMDD 변이의 양상이 ALT치와 HBV DNA치에 미치는 영향을 관찰 하였고 라미부딘 투여 전과 비교 관찰 하였다. 라미부딘 내성 시 ALT치가 YIDD 변이형에서는 156 ± 140.4 U/L, YVDD 변이형에서는 201.0 ± 285.7 U/L, YIDD와 YVDD 변이형이 혼합된 경우는

222.7±169.7 U/L로 변이형의 양상에 따른 차이는 없었다. 라미부딘 내성 발현 시 ALT치는 투여 전 ALT치에 비하여 낮은 것으로 알려져 있으나 본 연구에서는 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. HBV DNA치는 YIDD 변이형에서 7.75±0.15 log₁₀ copies/mL, YVDD 변이형에서는 7.64±0.15 log₁₀ copies/mL, YIDD와 YVDD 변이형이 혼합된 경우는 7.50±0.18 log₁₀ copies/mL으로 유의한 차이가 없었으며 치료 전에 비하여 라미부딘 내성 발현 시 HBV DNA치가 낮은 경향을 보였다. 라미부딘 내성에서 ALT치와 HBV DNA치의 경과를 알기 위해서 장기적인 관찰이 필요하나 본 연구에서는 아데포비어 치료를 시작한 예가 많으므로 경과 관찰 기간이 짧은 것이 제한점이 될 것으로 생각된다.

결론적으로 우리 나라에서 라미부딘 내성에 관련된 YMDD 변이형의 양상은 YVDD 형에 비하여 YIDD 형이 흔하며 YIDD와 YVDD형이 혼합된 예가 흔하였으나, 라미부딘 내성 시 혈청 ALT치, HBV DNA치는 YMDD 변이형의 종류와 상관 관계가 없었다.

V.결 론

만성 B형 간염 및 간경변증 환자에서 라미부딘을 장기간 사용하던 중 발생한 내성과 관련하여 YIDD 변이형이 YVDD 변이형 보다 흔하게 관찰 되었고, YIDD와 YVDD 변이 혼합형이 흔하게 관찰 되었다. 그러나, 라미부딘 내성 시 혈청 ALT치, HBV DNA치는 YMDD 변이형의 종류와 상관 관계가 없었다.

참 고 문 헌

1. 김광희, 엄순호, 류호상. 만성 B형 바이러스성 간 질환에서 라미부딘의 효과. *대한간학회지* 6:172-186, 2000
2. 유혜승, 이한주, 정영화, 이영상, 서동진. HBeAg 음성, HBV DNA 양성인 만성 B형 간질환 환자에서 Lamivudine의 효과. *대한간학회지* 6:488-494, 2000
3. 이종훈, 신우원, 안현숙, 성명식, 조정환, 정동엽, 강기태, 김병희, 노명환, 한상영, 최석렬. 라미부딘 장기투여 중 발생한 B형 간염 바이러스 YMDD 영역의 유전자변이. *대한내과학회지* 61:374-384, 2001
4. 조일현, 송정엽, 김덕기, 임홍석, 신승수, 김원석, 이기명, 함기백, 김진홍, 조성원. 만성 B형간염 환자에서 B형간염 바이러스 유전자형의 빈도. *대한간학회지* 7:381-386, 2001
5. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 17:261-281, 1995
6. Doong SL, Tsai CH, Schinazi RF, Liotta DC, Cheng YC. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8495-8499, 1991
7. Gutfreund KS, Williams M, George R, Bain VG, Ma MM, Yoshida EM, Villeneuve JP, Fischer KP, Tyrrel DL. Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance. *J Hepatol* 33:469-475, 2000

8. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaioannou C. Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 32:847-851, 2000
9. Hong SP, Kim NK, Hwang SG, Chung HJ, Kim S, Han JH, Kim HT, Rim KS, Kang MS, Yoo W, Kim SO. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol* 40:837-844, 2004
10. Ladner SK, Miller TJ, King RW. The M539V polymerase variant of human hepatitis B virus demonstrates resistance to 2'-deoxy-3'-thiacytidine and a reduced ability to synthesize viral DNA. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2128-2131, 1998
11. Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 339:61-68, 1998
12. Lau DT, Khokhar MF, Doo E, Ghany MG, Herion D, Park Y, Kleiner DE, Schmid P, Condey LD, Gauthier J, Kuhns MC, Liang TJ, Hoofnagle JH. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 32:828-834, 2000
13. Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase

- during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 24:711-713, 1996
14. Marques AR, Straus SE. Advances in the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Rev Med Virol* 8:223-234, 1998
 15. Mason WS, Cullen J, Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Tennant B, Frick L, Averett D, Condreay LD, Jilbert AR. Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks. *Virology* 245:18-32, 1998
 16. Ogata N, Fujii K, Takigawa S, Nomoto M, Ichida T, Asakura H. Novel patterns of amino acid mutations in the hepatitis B virus polymerase in association with resistance to lamivudine therapy in Japanese patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 59:270-276. 1999
 17. Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papadimitropoulos V, Hadziyannis SJ. Course of virologic breakthroughs under long-term lamivudine in HBeAg-negative precore mutant HBV liver disease. *Hepatology* 36:219-226, 2002
 18. Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R, Schipper P, de Jong D, Collis P, Danner SA, Mulder J, Loveday C, Christopherson C. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J Infect Dis* 171:1411-1419, 1995
 19. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like

- virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29:403-415, 1982
20. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-495, 1985
 21. Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 24:714-717. 1996
 22. Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgtton K, Zhuang H, Locarnini SA, Fyfe J, Sozzi T, Jackson DC. Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* 293:305-313, 2002
 23. Zollner B, Petersen J, Puchhammer-Stockl E, Kletzmayr J, Sterneck M, Fischer L, Schroter M, Laufs R, Feucht HH. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 39:42-50, 2004

Association of HBV DNA and ALT Level with YMDD motif Mutation Type in Lamivudine Resistance for Chronic Hepatitis B

Jae Myoung Choi

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Sung Won Cho, M.D.)

Background : The emergence of lamivudine resistant hepatitis B virus(HBV), with point mutation in the YMDD motif of DNA polymerase gene, has been reported in chronic hepatitis B patients with lamivudine treatment. The aim of this study was to investigate the distribution patterns and clinical aspects of lamivudine resistant HBV mutant during long-term lamivudine therapy.

Method : We retrospectively analyzed 93 consecutive patients with chronic hepatitis B or liver cirrhosis who were lamivudine resistant. Patients received 100 mg of lamivudine per day orally for at least 9 months. The duration of lamivudine therapy was from 9 to 94 months(mean 36.2 months). YMDD motif mutants and serum HBV DNA were investigated by using restriction fragment mass polymorphism(RFMP) and Digene[®] Hybrid capture II assay, respectively.

Results : The HBV DNA breakthrough was occurred at $22.8 \pm 14.9(5-79)$

months after starting lamivudine therapy. At the point of breakthrough, the level of ALT was 186.3 ± 199.7 (15-1469) U/L and HBV DNA was 7.65 ± 0.09 (5.23-9.09) \log_{10} copies/mL. They were lower than the level of ALT and HBV DNA before the therapy. Among 93 patients, 42 patients (45.2%) and 27 patients (29.0%) had YIDD and YVDD mutant, respectively. 24 patients (25.8%) had YIDD/YVDD mixed mutant. There was not significant to the level of ALT, HBV DNA at the point of viral breakthrough between three groups. Additional mutation, 'L-to-M' in 528th amino acid was found at 78 patients (83.9%) (64.2% with YIDD mutant and 100% with YVDD mutant).

Conclusion : During the long-term therapy of lamivudine in patients with chronic hepatitis B or liver cirrhosis, YIDD mutant was more frequent than YVDD mutant, YIDD/YVDD mutant was found frequently. Between mutant groups, the level of ALT and HBV DNA at the point of viral breakthrough was not significant.

Key Words : YMDD motif mutant, Hepatitis B virus, Lamivudine, Chronic hepatitis B, Restriction fragment mass polymorphism