

급성 전염성 단핵구증 환아에서 Epstein-Barr 바이러스의 감염형과 사람 백혈구 항원형 연구

가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실, 내과학교실*, 미생물학교실†

한승훈 · 신완식* · 한 훈† · 강진한

A Study of Epstein-Barr Virus, and Human Leukocyte Antigen Typing in Children with Acute Infectious Mononucleosis

Seung-Hoon Hahn, M.D., Wan-Shik Shin, M.D.* Hoon Han, M.D.† and Jin-Han Kang, M.D.

Department of Pediatrics, Internal Medicine* and Microbiology†, Medical College,
The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose : The Epstein-Barr virus(EBV), gamma herpesvirus, is an important pathogen that is widespread around the world. The EBV causes various diseases depending on the geographic location, and on the immunity or the premorbid condition of the person exposed to EBV. To evaluate EBV typing may be the most important step to figure out the pathogenesis of EBV associated diseases, and we need to re-evaluate the pathologic role of human leukocyte antigen(HLA) in developing Epstein-Barr virus associated acute infectious mononucleosis by using newly developed methods.

Methods : This study included 24 children(age range : 6 to 13 years), serologically confirmed with acute infectious mononucleosis. The control group for the HLA type consisted of 200 age-matched healthy children. To classify HLA I, modified ARMs-PCR was used, while modified PCR-SSOP was utilized in typing of HLA II. Also, we performed EBV typing in study patients by using a one-step PCR.

Results : The results of HLA types : In HLA class I, HLA-A24 was positive in 69 of 200 healthy children and positive in 14 of 24 patients in the study group(relative risk : 3.5724, chi-square; 5.26, $P < 0.05$). In HLA class II, HLA-DRB1*07 was detected in 18 of 200 healthy children, and eight of 24 patients in the study group(relative risk; 506173, chi-square; 9.73, $P < 0.01$). The results of EBV types : In the research group, 20(83.8%) of 24 patients were shedding type A virus, while 4(16.7%) were type B.

Conclusion : We conclude that development of infectious mononucleosis may be associated with HLA types, and these results suggest that acute infectious mononucleosis could have hereditary traits. And we confirm that type A EBV is highly prevalent in patients with acute infectious mononucleosis in Korea. Also, our results suggest that further large scale studies, including adult groups, regarding the association between pathogenesis of EBV with HLA-DP or HLA-DQ will be warranted. (J Korean Pediatr Soc 2003;46:467-473)

Key Words : Epstein-Barr virus, EBV type, HLA, Acute infectious mononucleosis

서 론

Epstein-Barr 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV)는 헤르페스 DNA 바이러스 중 감마 헤르페스 바이러스로 A형과 B형의

감염형으로 세분된다¹⁾. 이 바이러스는 전 세계적으로 확산되어 있는 중요한 감염원으로서 임상적으로 소아와 사춘기 연령에서 초감염되어 전염성 단핵구증을 일으키고 성인에서는 비인두상피 종양, 악성 림프종, 위상피종양 등과 같은 종양 질환 발생에 관여하며, 이외에 혈구탐식 증후군, 류마티스 관절염, 만성 피곤 증후군 등의 발병에도 관여한다²⁾. 한편 이와 같은 다양한 질병 발생의 병인적 역할이 있는 EBV는 지역적으로 감염형이 다르고, 또한 EBV에 의한 질환이나 EBV에 노출된 사람의 면역 또는 병적 상태에 따라 감염형이 다른 것으로 알려져 있다.

접수 : 2002년 9월 4일, 승인 : 2002년 10월 30일

책임저자 : 강진한, 가톨릭의대 성모자애병원 소아과

Tel : 032)510-5522, 5672 Fax : 032)503-9724

E-mail : kjhan@olmh.cuk.ac.kr

EBV 감염형은 세포독성 T 림프구면역(cytotoxic T lymphocyte immunity, CTL 면역)과 연관성이 있는 EBV 잠복감염 유전인자들과 EBV 활동성감염 유전인자들의 유전적 특성에 따라 분류되므로 EBV 감염형에 관한 연구는 EBV의 역학연구와 EBV 관련 질환의 병인연구에 제일 기본적이다^{3,4)}. 즉, 정상인을 대상으로 한 지역 내 EBV 감염형 연구와 EBV 관련 질환의 감염형 연구가 동시에 이루어지는 것이 EBV 관련 질환 병인 연구에 필수적이다. 사람에게 있어 주조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 물질인 사람 백혈구 항원(human lymphocyte antigen, HLA)은 인종간에 차이를 보여 종족간, 지역간 차이가 있을 수밖에 없고, HLA는 질환 발생에 연관성이 있으므로 병인 연구에서 유전적 성향의 확인 방법으로 HLA형 분류가 기본적인 것으로 인식되고 있다. 이런 측면에서 EBV에 의한 급성 전염성 단핵구증 환자의 경우 HLA-B35형을 지닌 개체에서 연관성이 있다는 유일한 보고⁵⁾가 있었고, 최근에 HLA DR, DP, DQ의 HLA II군 항원이 EBV의 인체 내 침입에 co-receptor로서 이용될 수 있어 이러한 haplotype을 지닌 개체에서 EBV 감염의 위험성이 있다는 보고들^{6,7)}이 있다. 그러나 국내의 경우 이런 EBV 감염 관련 질환과 HLA형과의 연관성에 관한 연구는 없었고, 과거에 외국에서 실시되었던 EBV에 의한 급성 전염성 단핵구증 환자에서의 HLA형 연구들은 면역 방법에 의한 제한적인 것이었고 최근에 개발된 분자생물학적 방법에 의한 연구는 없는 실정이다.

이에 저자들은 EBV 감염에 의한 국내 급성 전염성 단핵구증 환아에서 주된 EBV 감염형의 분포를 확인하고, 급성 전염성 단핵구증의 발생이 HLA형과 연관성이 있는 지를 분자생물학적 분류법으로 알아보려고 이 연구를 실시하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2001년 6월부터 2002년 1월까지 가톨릭대학교 성모자애병원, 강남성모병원, 여의도성모병원에 입원한 환아 중 임상적으로 5일 이상의 발열을 보이며 진찰 소견상 급성 인두염 또는 인두편도염과 림프절 종대 및 간 또는 비장 비대의 소견을 보여 EBV 감염 진단을 위한 혈청학적 검사를 실시한 결과 EBV viral capsid antigen(VCA)에 대한 IgM과 IgG 항체가 양성이고 EBV early antigen(EA)에 대한 항체가 양성이며, EBV nuclear antigen(EBNA)에 대한 항체가 음성소견을 보여 급성 전염성 단핵구증으로 확진된 24명을 대상으로 본 연구를 실시하였다. EBV 감염형의 비교 대조군은 성모자애병원에 건강검진을 위하여 방문한 건강한 정상 소아 중 면역혈청학적 검사로 EBV 노출이 확인되고(anti-EBV VCA IgG 양성, anti-EBNA antibody 양성) 연구 대상 환아와 동일한 연령의 58명을 대상으로 하였고, HLA형 분류의 비교 대조군도 연구 대상 환아와 동일한 연령의 정상 소아 200명을 대상으로 하였다.

2. 방법

1) DNA 추출

연구 대상 환아와 HLA형 분류 대조군 소아들로부터 heparin으로 처리된 혈액 6 mL를 채취하여 buffy coat를 분리하고 phenol, chloroform-isoamyl alcohol로 처리하여 DNA를 추출한 후 -70℃에서 동결상태로 실험 전까지 보관하였다. EBV 감염형의 비교 대조군은 생리 식염수를 15 mL로 5분간 구강세척을 실시한 후 회수하여 상온에서 1,000 rpm/min으로 5분간 원심분리 후 상층액은 버리고 침전물에서 phenol, chloroform-isoamyl alcohol로 처리하여 DNA를 추출하였다.

2) EBV 감염형 분류

연구 대상 환아와 대조군 소아들로부터 추출된 DNA 검체를 이용하여 일본의 Kunimoto 등⁸⁾이 고안한 한 단계(one-step) 중합효소 연쇄반응법을 일부 변형하여 EBV 감염형 분류를 실시하였다. 즉, 시발체(sense primer; 2771-2789, 5'TTTCACC-AATACATGAA-CC3', antisense primer; 3149-3130, 5'TG-GCAAAGTGGAGCAA3')를 선택하여 중합 효소 연쇄반응을 실시하였다. 중합 효소 연쇄반응 혼합액은 추출된 DNA 0.5 μL, Taq polymerase(Takara Ex Taq; Takara company, Japan) 0.25 μL, 10X Taq buffer(1.5 mM magnesium이 포함된 10X Ex Taq buffer; Takara company, Japan) 5.0 μL, 2.5 mM 농도로 각각의 핵산이 포함된 dNTP 혼합물 4.0 μL, sense 및 anti-sense 시발체를 각각 2.0 μL, 3차 증류수 36.25 μL로 구성하여 총 50 μL로 만들었다. Perkin-Elmer Cetus사(USA) 중합 효소 연쇄반응기에서 일차적으로 5분간 95℃에서 예열하고 92℃에서 5분간 변형(denaturation) 시킨 다음 52℃에서 1분간 결합(annealing), 72℃에서 1분간 신장(extension)하는 thermocycling을 30회 반복하였고, 72℃에서 최종적으로 7분간 신장시켜 중합효소 연쇄반응을 완료하였다. 중합 효소 반응에 의한 최종 생산물을 6% poly acrylamide에서 30분간 150 volt로 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선(ultraviolet light)에서 동일조건에서 실시한 molecular marker를 통하여 크기를 확인하였다. 이 전기영동 결과에서 350 bp(base pair)의 크기는 A형으로, 400 bp의 크기는 B형으로 감별하였다. EBV 감염형 분류에서 EBV A형 양성 대조는 EBV 감염 B95-8 세포를 사용하였고, EBV B형 양성 대조는 EBV 감염 Jijoye 세포를 사용하였으며 음성 대조는 K-562 세포를 사용하였다.

3) HLA형 분류

(1) HLA-A, B, C형 분류

Tonks 등⁹⁾이 실행한 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 5 μL의 시발체 혼합물(specific primers, internal control primers)과 중합효소 연쇄반응 혼합물(pH 8.8 67 mM Tris Base, 16.6 mM ammonium sulphate, 2 mM magnesium chloride, 200 μM each dNTP, 0.01% Tween 20, Taq polymerase)을 1분간 96℃에서 예열하고 96℃에서 25초간 변형(denaturation)시킨 다

음 70℃에서 45초 동안 결합(annealing), 72℃에서 30초간 신장(extension)하는 thermocycling을 5회, 96℃에서 25초간 변형(denaturation) 시킨 다음 65℃에서 60초 동안 결합(annealing), 72℃에서 30초간 신장(extension)하는 thermocycling을 21회, 96℃에서 25초간 변형(denaturation) 시킨 다음 55℃에서 60초 동안 결합(annealing), 72℃에서 120초간 신장(extension)하는 thermocycling을 4회 실시한 다음 72℃에서 최종적으로 10분간 신장시켜 중합효소 연쇄반응을 완료하였다. 최종 생산물을 1.5% agarose gels(0.5 μg/mL ethidium bromide 포함)에서 전기영동하여 분류하였다.

(2) HLA-DRB형 분류

Jordan 등¹⁰⁾이 실행한 PCR-SSOP법을 변형하여 실시하였다. 약술하면, DRB gene locus와 연관된 특이 시발체를 중합 효소 연쇄반응 시켜 증폭시킨 후 최종산물을 nylon membrane에 변형 고정하고 digoxigenin으로 표지된 specific oligonucleotide 탐식자로 57℃에서 교잡 반응하였다. 다음에는 tetramethyl ammonium chloride(TMAC, Sigma chemical Co., USA)으로 세척 하였고 alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin 으로 교잡된 specific oligonucleotide 탐식자를 인지시킨 다음, chemiluminescent substrate인 CSPD(Behringer Mannheim, Germany)로 발광하게 하여 X-ray film에 감광시켜 분류하였다.

4) 통계

EBV 감염형의 연구 대상 환아와 비교 대조군에서 감염형의 단순 평균을 구하였고 두 군과의 연관성은 t-test로 평가하였다. HLA형 분류에서는 Woolf's formula로 Odds ratio를 구하여 이를 relative risk(RR)로 전환하였고, 연구 대상 환아와 비교 대조군의 통계적인 유의차는 chi-squared analysis로 하였다. 그러나 chi-square가 5 이상의 유의차가 있고 P<0.05인 경우에만 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 연구 대상 환아의 임상적 특성

평균 연령은 9.4±3.7세(6-13세)이었고, 성별은 남아 15명, 여아 9명으로 남녀비는 1.7:1.0이었다. 임상적으로 전례에서 평균 8일(7.8±3.7) 이상 지속되는 38℃ 이상의 간헐적 발열 증상이 관찰되었고, 이외에 복통(9례), 경한 상기도염 증상(7례), 설사(4례), 식욕부진(4례), 관절통(3례)의 순으로 임상 증상이 동반되었다. 진찰 소견상 전례에서 급성 인두염 또는 편도염 소견이 발견되었고, 이중 42%에서 회백색 막성 삼출물이 관찰되었다. 연구 대상 환아의 89%에서 급성적인 동통을 동반한 림프절 종대가 관찰되었고, 이외에도 환아의 46%(15례)에서 동통이 있는 간 또는 비장 종대, 결막 충혈(3례), 피부 건락(2례), 딸기혀 및 입술의 발적(2례) 등이 관찰되었다. 검사 소견에서는 52%에서 비정상적인 간기능(ALT, AST치 상승) 검사 소견이 있었고, 42%에서 비정형 림프구증(7%에서 43%) 소견이 관찰되었다. 그러

나, 전례에서 실시한 이종항체(heterophil antibody) 검사상 1례에서만 양성을 보였다(Table 1).

2. EBV 감염형 결과

1) 연구 대상 환아 결과(Fig. 1)

연구 대상 환아 24명 중 EBV A형은 20명(83.3%)이었고, B형은 4명(16.7%)이었다.

2) 비교 대조군 결과

대조군의 건강한 소아 58명 중 14명(24.1%)이 EBV 양성으로 검출되었고, 이들 중 A형은 11명(78.6%)이었으며, B형이 3명(21.%)이었다.

Table 1. The Clinical Characteristics of Study Group(N=24)

	Case No.(%)
Age(Mean±SD)	9.4±3.7 years
Sex(M:F)	1.7:1
Symptoms	
Fever	24(100)
Abdominal pain	9(36)
URI symptoms	7(30)
Diarrhea	4(17)
Poor feeding	4(17)
Arthralgia	3(13)
Signs	
Pharyngitis or Pharyngotonsillitis	24(100)
Lymphadenopathy	21(88)
Hepatosplenomegaly	11(46)
Conjunctival injection	3(13)
Strawberry tongue and red lip	2(8)
Laboratory finding	
Elevated AST/ALT	12(50)
Atypical lymphocytosis	10(42)
Heterophil Ab.	1(4)

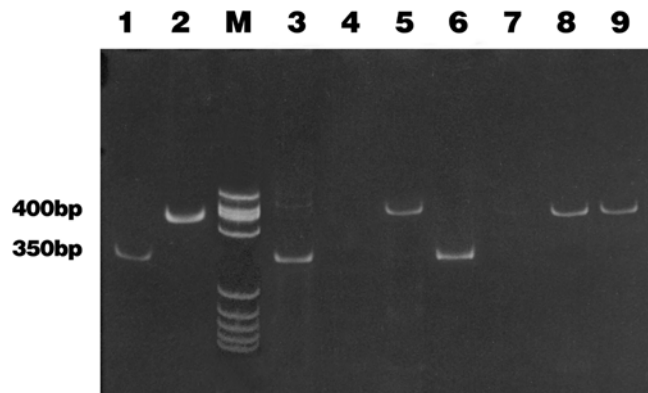


Fig. 1. The results of EBV detection and typing from extracted DNA of buffy coat in acute infectious mononucleosis children. The lanes are as follows: 1(B95-8 cell; type A positive control), 2(Jijoye cell; type B positive control), M(molecular marker), 3,6(study cases; type A positive results), 5,8,9(study cases; type B positive results), 4,7(study cases; negative results).

Table 2. The Results of HLA Typing in Study Group

	Locus	HLA	Positive No		RR	chi-square	P value
			Patients; total 24	Control; total 200			
HLA I	A	24	14	69	3.5724	5.26	0.05
HLA II	DRB1	07	8	18	5.6173	9.73	0.01

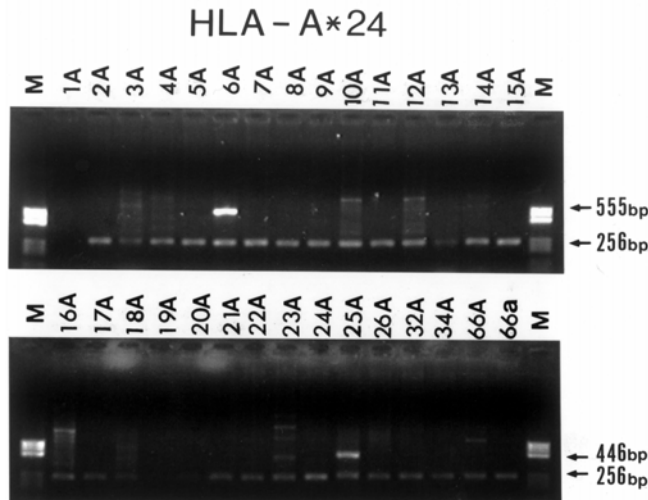


Fig. 2. This figure shows the results of HLA typing using ARMs-PCR in acute infectious mononucleosis children. The specific bands of HLA-A*24 was seen in 6A and 25 A primer sets(555 bp and 446 bp).

3. HLA형 분류 결과

1) HLA-A, B, C형 결과(Table 2)

HLA-A24형의 비교 대조군 200명 소아 중에서 양성인 69명이었고, 연구 대상 환아 24명 중 14명이 양성을 보여 RR치가 3.5724, chi-square치가 5.26, $P < 0.05$ 로 통계적 유의성을 보였다(Fig. 2). 그러나 HLA-B, C형에서는 유의한 결과가 없었다.

2) HLA DRB형 결과(Table 2)

HLA-DRB1*07형의 비교 대조군 200명 소아 중에서 양성인 18명이었고, 연구 대상 환아 24명 중에서 8명이 양성을 보여 RR치가 5.6173, chi-square치가 9.73, $P < 0.01$ 로 통계적 유의성을 보였다.

고 찰

EBV에 의한 초감염 임상형인 전염성 단핵구증은 초감염 연령에 따라 많은 임상적 차이를 보인다. 즉, 어린 소아에게 EBV 초감염이 발생될 경우에는 전반적으로 경한 임상 경과를 보이지만, 사춘기 이후 연령에서 EBV 초감염이 온 경우에는 중증의 림프구증식 질환으로 예후가 안 좋은 경과를 보인다. 역학적으로 극동 아시아에 위치한 지역에서는 EBV 초감염 연령이 낮아 전형적인 중증의 전염성 단핵구증의 임상양상을 보이는 경우가 드

물고, 이형항체가 음성인 것이 특징으로 알려져 있다^{1, 2, 8)}. 본 연구의 경우 연구 대상 환아들의 발생 연령은 6세에서 13세에 걸친 소아들이었고, 임상적으로 발열, 림프절 종대, 급성 인두편도염이 거의 모든 환아에서 발현되었지만, 일부 환아에서 검사적으로 비정형 림프구증, 비정상적인 간기능 소견이 보였으나 이종항체가 양성인 경우는 1례에서만 있었으며 모든 환아가 합병증 없이 자연 치유되는 경과를 보였다(Fig. 1).

EBV는 인체 내에 침투하여 구강 점막 상피세포와 타액선 점막 상피세포에서 증식하고, 이차적으로 B-림프구에 침투하여 증식한 후 발병에 관여하며, 이런 증식 감염이 종결된 다음에는 잠복감염 상태로 영구히 인체 내에서 상주한다. 그러나 정상인에서 잠복감염 상태의 EBV는 구강, 타액선, 생식기 점막상피에서 간헐적인 활동으로 인하여 소량의 EBV가 구강인두 분비물, 타액, 질 분비물로 배출된다¹¹⁾. 특히 EBV는 구강 및 비인강 분비물로 건강한 성인에서 간헐적으로 약 20-30% 정도로 배출되고¹²⁻¹⁴⁾, 소아에서는 이보다 낮은 비율로 배출되는^{14, 15)} 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 비교 대조군의 정상 소아 58명 중 14명의 비인강 분비물에서 EBV DNA가 확인되어 24.1%에서 배출되는 것으로 확인되었다. 한편 정상인에서 이와 같이 배출되는 EBV의 감염형은 지역적으로 많은 차이를 보여 EBV A형은 유럽, 아메리카, 중국 및 일본을 포함한 동아시아 지역에서 주된 감염형으로 알려져 있고, EBV B형은 아프리카, 파푸아 뉴기니아 지역에서 많이 분리되는 것으로 알려져 있다^{16, 17)}. EBV 감염의 역학적 특성이 매우 유사한 일본과 한국의 경우에는 정상 성인과 소아 모두에서 EBV A형이 약 90% 정도로 우세하고 혼합 감염형도 없는 것이 특징이다^{8, 14)}. 본 연구에서 비교 대조군의 정상 소아에서 A형은 11명(78.6%), B형이 3명(21.%)으로 유사한 결과를 보였다. 그리고, EBV에 의한 급성 전염성 단핵구증 환자들의 EBV 감염형도 지역적 또는 사회경제적 역학특성에 따라 많은 차이를 보이니¹⁸⁾, 그 지역의 정상인에서 우세한 EBV 감염형과 거의 동일한 양상을 보이는 것으로 알려져 있다. 일본의 경우 정상인에서 EBV A형이 제일 흔한 감염형이고 전염성 단핵구증의 경우에도 A형이 주된 감염형이 확인된 바 있다^{19, 20)}. 본 연구의 대상 환아에서도 EBV 감염형이 24명 중 EBV A형이 20명(83.3%)으로 비교 대조군의 정상 소아와 거의 동일한 결과를 보여 일본의 연구 결과와 유사하였다.

인종간의 차이를 보이는 HLA는 I군 항원(class I HLA)으로 HLA-A가 69가지 형, HLA-B가 149가지 형, HLA-C가 39가지 형으로 분류되고, II군 항원(class II HLA)은 alpha, beta chain이 결합된 heterodimer로서 HLA-DRB가 179가지 형,

HLA-DQA가 18가지 형, HLA-DQB가 29가지 형, HLA-DPA가 8가지 형, HLA-DPB가 69가지 형으로 분류된다. 그리고 HLA형 분류 방법은 cellular typing법이 1975년 Kissmeyer-Nielsen²¹⁾에 의해 개발되었고, 이후 serological typing법²²⁾, biochemical typing법²³⁾, DNA cloning technique법²⁴⁾ 등이 개발되어 많은 새로운 HLA형이 확인되고 지역간 또는 종족간의 차이가 정립되고 있다. 국내에서는 HLA형 분류 연구가 1980년대 초부터 시행되어 현재까지 지속되고 있으며 장기이식과 유전성향을 확인하는 병인 연구에 활용되고 있다^{25, 26)}. 최근에는 일반적으로 HLA-A, B형 분류에는 혈청학적 방법이 주로 사용되고, HLA-C형 분류에는 시발체 3'말단의 염기가 틀릴 경우 목표 유전자가 증폭되지 않는 점을 이용한 PCR 형별법인 ARMs-PCR법이 사용되며 HLA II형 분류에는 allele specific oligonucleotide probe와 교잡을 이용한 PCR-SSOP법, PCR 결과 산물을 전기영동하고 방사선 현상을 통한 형별법인 PCR-SSCP법, PCR 결과 산물을 restriction enzyme을 이용한 형 분류법인 PCR-RFLP법이 주로 사용되고 있다. 본 연구에서 연구 대상 환아와 비교 대조군의 HLA-A, B, C형 분류는 ARMs-PCR법을 사용하였고, HLA-DRB형 분류는 PCR-SSOP법을 사용하여 연구를 시행하였다.

EBV는 B-림프구와 상피세포에 주로 침투하는 특성이 있고 이 침투 세포와 연관하여 다양한 질환을 발생하는 것으로 알려져 있어^{1, 27)} EBV의 인체 내 침투에 관한 기전은 EBV 감염의 병인을 이해하는 데에 매우 중요하다. 그리고 이런 EBV의 개체별 인체 내 침투의 정도와 침투 후 다양한 발병 양상의 발현 기전을 밝히는 것이 EBV 감염과 감염 연관 질환의 병인 연구의 방향이다. 이런 관점에서 EBV 감염이나 EBV와 연관된 질환에서 HLA형에 의한 유전적 성향을 밝히는 연구는 1970년대부터 시작되었다. 즉, EBV의 초감염에 의한 급성 전염성 단핵구증의 유전적 성향의 여부를 확인하기 위한 연구방법으로 HLA형 분류와 ABO 혈액형과의 연관성에 관한 연구들이 있었다^{5, 28-30)}. 그러나 급성 전염성 단핵구증에 있어 HLA가 병인에 관여하는 것을 추정하였으나 Morris와 Forbes⁵⁾에 의한 연구결과에서만 HLA-B35형을 지닌 개체에서 통계적으로 유의하게 EBV에 의한 전염성 단핵구증의 유전적 성향이 있음을 보고하였고, 이후 전염성 단핵구증 환자에서 HLA-A3형, HLA-B7형을 지닌 개체에서는 EBV 감염 후 VCA에 대한 항체가 상승하고, HLA-B15, HLA-B27형을 지닌 개체에서는 EBV 감염 후 VCA에 대한 항체가 감소하는 양상을 확인함으로써, HLA-A, B형에 따라 개체별 감염 양상이 다를 수 근거로 HLA형에 의한 전염성 단핵구증의 유전적 성향이 있음을 보고³¹⁾하였을 뿐이다. 본 연구에서는 급성 전염성 단핵구증 환자에서 비교 대조군의 정상아와 비교한 결과 HLA-A24형에서 RR치가 3.5724, chi-square치가 5.26, $P < 0.05$ 으로 통계적 유의성을 보였고, HLA-DRB1*07형에서 RR치가 5.6173, chi-square치가 9.73, $P < 0.01$ 로 통계적 유의성을 보였다. 이런 연구 결과는 종족간의 차이에 의한 것으로

도 추정할 수 있었으나 이전의 연구 방법이 모두 cellular typing 또는 serological typing이고 본 연구의 방법은 분자생물학적 방법을 이용한 것이어서 연구 방법에 의한 차이일 수도 있을 것으로 사료된다. 그리고 본 연구 결과에서 HLA-DRB1*07형이 통계적으로 가장 유의한 차이를 보였으나, Ythier 등³²⁾의 연구 결과에서는 HLA-DR이 전염성 단핵구증의 급성기에는 전혀 확인되지 않다가 회복기에만 확인되어 HLA-DR 항원은 B-림프구에 EBV가 침투하여 감염 경과 중에 일시적인 변화를 초래하는 것으로 보고되어, 이 결과와는 매우 다른 결과임을 알 수 있었다.

최근 여러 연구에서 EBV의 인체 내 침투에 HLA-II군의 DR, DP, DQ형 항원 중 어떤 특이 allele이 특별한 역할에 관여하는 지는 아직 정확히 규명된 바는 없으나 이들 항원이 co-receptor의 역할을 갖고 있어 만약 HLA-II군에 이러한 역할이 있는 allele를 지닌 haplotype의 개체는 EBV 감염이 특별히 문제가 될 수 있을 것으로 추정된다^{6, 33, 34)}. 그러므로 본 연구에서 HLA-DRB1*07의 유의한 결과는 연속적으로 HLA-DP, HLA-DQ와의 관련성을 확인하는 연구가 필요할 것이다. 특히 최근에 알려지고 있는 EBV의 인체 내 침투에 관한 새로운 연구 결과들을 볼 때에 이런 연구의 필요성은 매우 근거가 있을 것으로 사료된다. 과거에는 EBV의 인체 내 침투 기전에 있어 B-림프구 내의 침투는 B-림프구 표면의 CD21 수용체가 EBV virion을 포획하는 것이며 CD21의 농도와 EBV의 침투와 연관성은 없는 것이고³⁵⁾, 상피세포 내 침투는 cell to cell transmission 기전에 의한 것으로만 알려져 있었다³⁶⁾. 그러나, 최근에 EBV의 glycoprotein 항원인 gH(BXLF2 EBV gene encoded antigen, gp85), gL(BKRF2 EBV gene encoded antigen, gp25), gp42(BZLF2 EBV gene encoded antigen)의 세 가지 항원이 복합적으로 세포 내 침투에 관여하는 것으로 알려졌다. 즉, gH와 gL은 EBV의 cell fusion에 역할이 있고 gp42는 cell penetration에 관여하며, HLA-DR이 B-림프구 침투에 있어 gp42의 co-receptor 역할이 있는 것이 확인되었다³⁷⁾. Haan 등³⁴⁾도 HLA-DQ의 mature beta chain 46번째 amino-acid에 glutamic acid residue를 encoding하여 EBV의 세포 내 침투가 가능함을 보고함으로써, II군의 HLA 항원이 EBV의 세포 내 침투에 매개체 역할이 있음을 추정하였고, HLA 분자의 β -1, β -2 domain에서 gp42의 EBV binding capacity에 중요한 영향을 주어 EBV related sequelae와 HLA haplotype과의 연관성이 있는 것으로 추정하고 있으며, 상피세포 내 EBV의 침투는 gH와 연관성이 있는 것으로 밝혀졌다³⁸⁾. 또한 실제 임상에서 HLA-DQ beta*0201의 haplotype을 지닌 개체에서는 DQ beta*0201가 EBV의 침투에 필요한 기능성 수용체로서 작용하여 EBV 감염의 위험성이 높아 EBV 감염 후 병의 경과가 다른 개체와 다른 것이 확인되었고, EBV가 췌장의 islet cell을 침투하여 insulin-dependent diabetes mellitus(IDDM)을 발생시킬 수 있어 EBV의 인체 내 침투에 있어 II군의 HLA 항원이 관여함이 증명되었

다^{39, 40)}. 이런 연구 결과를 볼 때에 성인을 포함한 더 많은 연구 대상수를 통하여 국내 급성 전염성 단핵구증 환자에서 연속적으로 HLA-DP, HLA-DQ와의 연관성에 관한 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

목적 : EBV는 전 세계적으로 다양한 질환을 일으키고, EBV는 지역과 EBV에 노출된 사람의 면역 또는 병적 상태에 따라 감염형이 달라 EBV 감염형에 관한 연구는 EBV의 역학연구와 EBV 관련 질환의 병인연구에 제일 기본적이다. EBV의 잠복감염 유전인자들에 의한 세포독성 T 림프구 면역상태는 EBV에 의한 다양한 질환의 병인적 역할이 있으며 HLA에 의하여 유발되어지는 것으로 알려져 있다. 과거에 시행한 많은 연구에서 EBV 감염과 HLA형과의 연관성은 객관적으로 입증되지 않았으나, HLA II형에 속한 항원이 EBV의 인체 내 침투에 관여한다는 사실이 최근에 보고됨으로써 이에 대한 관심이 재조명되고 있다. 이에 저자들은 EBV 감염에 의한 국내 급성 전염성 단핵구증 환자에서 주된 EBV 감염형의 분포를 확인하고, 급성 전염성 단핵구증의 발생이 HLA형과 연관성이 있는 지를 분자생물학적 분류법으로 알아보고자 이 연구를 실시하였다.

방법 : 연구 대상은 6세에서 13세 사이의 급성 전염성 단핵구증으로 확진된 24명의 환자 이었다. 감염형의 비교 대조군은 건강한 정상 소아 중 면역혈청학적 검사로 EBV 노출이 확인된 동일한 연령의 58명이었고, HLA형 분류의 비교 대조군은 연구 대상 환자와 동일한 연령의 정상 소아 200명을 대상으로 실시하였다. EBV에 의한 급성 전염성단핵구증 환자에서 중합 효소 연쇄반응법으로 EBV 감염형을 분류하여 주된 감염형을 확인하고, ARMs PCR법으로 HLA-A, B, C 항원형을, PCR-SSOP법으로 HLA-DRB 항원형을 분류하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

결 과 :

1) EBV 감염형 결과 : 연구 대상 환자 24명에서 EBV A형이 20명(83.3%)이었고, B형은 4명(16.7%)이었다. 비교 대조군의 경우에는 58명 중 14명(24.1%)이 EBV가 검출되고 이들 중 A형은 11명(78.6%)이었고, B형이 3명(21.%)이었다.

2) HLA 형 분류 결과 : HLA I형 결과는 HLA-A24형에서 비교 대조군 200명 소아 중 69명이 양성이었고, 연구 대상 환자 24명 중 14명이 양성을 보여 RR치가 3.5724, chi-square치가 5.26, $P < 0.05$ 으로 통계적 유의성을 보였다. 그러나 HLA-B, C 항원형에서는 통계적으로 유의한 결과가 없었다. HLA II형 결과는 HLA-DRB1*07형에서 비교 대조군 200명 소아 중 18명이 양성이었고, 연구 대상 환자 24명 중 8명이 양성을 보여 RR치가 5.6173, chi-square치가 9.73, $P < 0.01$ 로 통계적 유의성을 보였다.

결론 : 위의 연구 결과를 통하여 국내 급성 전염성 단핵구증 환자의 EBV 감염형은 정상 비교 대조군의 소아에서 주된 감염

형인 A형과 동일한 감염형임을 확인하였다. 그리고 HLA형 연구에서 HLA-A24형과 HLA-DRB1*07형이 정상 대조군과 비교하여 통계적 유의성을 보여 EBV에 의한 급성 전염성단핵구증 발생이 HLA형과 연관성이 있음을 추정하였다.

참 고 문 헌

- 1) Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In : Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology, 4th ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996:2397-46.
- 2) Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans. Int J Hematol 2000;71:108-17.
- 3) Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte response to Epstein-Barr virus infection. Annu Rev Immunol 1997;15:405-31.
- 4) Mette Munch. Epstein-Barr virus strain characterization APMIS 1998;106:425-33.
- 5) Morris PJ, Forbes JF. HLA in follicular lymphoma, reticulum cell sarcoma, lymphosarcoma and infectious mononucleosis. Transplant Proc 1971;3:1315-6.
- 6) Spriggs MK, Armitage RJ, Comeau MR, Strockbine L, Farrah T, Macduf B, et al. The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF 2 protein binds the HLA-DR beta chain and inhibits antigen presentation. J Virol 1996;70:5557-63.
- 7) Haan KM, Kwok WW, Longnecker R, Speck P. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a co-receptor. J Virol 2000;74:2451-4.
- 8) Kunimoto M, Tamura S, Tabata T, Yosei O. One-step typing of Epstein-Barr virus by PCR: predominance of type 1 virus in Japan. J Gen Virol 1992;73:455-61.
- 9) Tonks S, Marsh SEG, Bunce M, Bodmer JG. Molecular typing for HLA class I using ARMS-PCR: Further developments following the 12th international histocompatibility workshop. Tissue Antigens 1999;53:175-83.
- 10) Jordan F, McWhinnie AJ, Turner S, Gavira N, Calvert AA, Cleaver SA, et al. Comparison of HLA-DRB1 typing by DNA-RFLP, PCR-SSO and PCR-SSP methods and their application in providing matched unrelated donors for bone marrow transplantation. Tissue Antigens 1995;45:103-10.
- 11) Jenson HB, Miller G. Polymorphism of the region of the Epstein-Barr virus which disrupts latency. Virology 1988;165:549-64.
- 12) Sixbey JW, Shirley P, Chesney PJ, Buntin DM, Resnick L. Detection of widespread strain of Epstein-Barr virus. Lancet 1989;30:761-5.
- 13) Gopal MR, Thomson BJ, Fox J, Tedder RS, Honess RW. Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositives. Lancet 1990;335:1598-9.
- 14) 강진한, 허재균, 김종현, 이안희. 국내의 건강한 소아 및 성인에서 Epstein-Barr 바이러스의 감염형 분류. 소아과 2000;43:644-9.
- 15) Costa RK, Drapper TK, Wagner E. An unusual HSV-1 transcript with sequence homology to EBV DNA. J Virol 1985;62:1416-22.
- 16) Gratama JW, Oasterveer MAP, Weimar W, Sintnicolas K,

- Sizoo W, Bollnui RLH, et al. Detection of multiple Ebnot types in individual Epstein-Barr carriers following lymphocyte transformation by virus derived from peripheral blood and oropharynx. *J Gen Virol* 1994;75:85-94.
- 17) Gratama JW, Ernberg I. Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus infection. In: Woude GFV, Klein G, editors. *Advances in cancer research*. 67th ed. San Diego: Academic Press, 1995:197-255.
 - 18) Al-Homsi AS, Berger C, van Baarle D, Kersten MJ, Klein MR, McQuain C, et al. Molecular analysis of critical sequence within the EBNA-2 type 1 gene from Epstein-Barr virus isolates from patients with infectious mononucleosis, tonsillar hyperplasia, and HIV infection. *Int J Mol Med* 1998;1:983-7.
 - 19) Kanegane H, Kanegane C, Yachie A, Miyawaki T, Tosato G. Infectious mononucleosis as a disease of early childhood in Japan caused by primary Epstein-Barr virus infection. *Acta Paediatr Jpn* 1997;39:166-71.
 - 20) Oshima M, Azuma H, Okuno A. High prevalence of Epstein-Barr virus type A strain with the 30 b.p. deletion of the latent membrane protein-1 gene in a Japanese population. *Pediatr Int* 1999;41:490-5.
 - 21) Kissmeyer-Nielsen F. *Histocompatibility Testing*. Munksgaard: Copenhagen, 1975.
 - 22) Bodmer WF, Batchelor JR, Bodmer JG, Festenstein H, Morris PJ. *Histocompatibility Testing*. Munksgaard: Copenhagen, 1977.
 - 23) Crumpton MJ, Bodner JG, Bodner WF, Heyes JM, Lindsay J, Rudd C: Biochemistry of class II antigens. In: Albert ED, Baur MP, Mayer WR, editors. *Histocompatibility Testing*. Heidelberg. Berlin: Springer-Verlag, 1984:29-34.
 - 24) Korman AJ, Boss JM, Spies T, Sorrentino R, Okada K, Strominger JL. Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens. *Immunol Rev* 1985;85:45-86.
 - 25) Kim SJ, Choi IH, Kim JD. HLA-DR antigens and HLA-B:DR haplotypes in Koreans. *Yonsei Med J* 1983;24:33-7.
 - 26) Han H, Chung T. Development of HLA typing methods. *Korean J BRM* 1997;7:1-5.
 - 27) Bonnet M, Guinebretiere J, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1376-81.
 - 28) Ting A, MacKay IR, Morris PJ. HLA in autoimmune disease and infectious mononucleosis. *Symp Ser Immunobiol Stand* 1973;18:276-81.
 - 29) Shiller J, Davey FR. Human leukocyte locus A(HLA-A) antigens and infectious mononucleosis. *Am J Clin Pathol* 1974;62:325-8.
 - 30) Rosdahl N, Svejgaard A. HLA types and ABO blood groups in patients with infectious mononucleosis. *Tissue Antigens* 1979;13:223-7.
 - 31) Boyer KM, Sumaya CV, Cherry JD, Spencer MJ, Mickey MR, Terasaki PI. Histocompatibility antigens and humoral immunity to EBV. *Tissue Antigens* 1980;15:105-11.
 - 32) Ythier A, Moreau JF, Peyrat MA, Bignon JD, Soullilou JP. HLA-AB, DR types in patients with IM. *Tissue Antigens* 1983;21:329-32.
 - 33) Li Q, Spriggs MK, Kovats S, Turk SM, Cameau MR, Nepom B, et al. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 1997;71: 4657-62.
 - 34) Haan KM, Longnecker R. Co-receptor restriction within the HLA-DQ locus for Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:9252-7.
 - 35) Speck P, Haan KM, Longnecker R. Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology* 2000;227:1-5.
 - 36) Chodosh J, Gan YJ, Holder VP, Sixbey JW. Patterned entry and egress by Epstein-Barr virus in polarized CR2-positive epithelial cells. *Virology* 2000;266:387-96.
 - 37) Wang X, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *J Virol* 1998;72:158-63.
 - 38) Moleworth S, Lake C, Borza C, Turk S, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol* 2000;14:6324-32.
 - 39) She JX. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revised. *Immunol Today* 1996;17:323-9.
 - 40) Park YS, Wang CY, Ko KW, Yang SW, Park M, Yang MC, et al. Combinations of HLA DR and DQ molecules determine the susceptibility to insulin-dependant diabetes mellitus in Koreans. *Hum Immunol* 1998;59:794-801.