

정상 소아와 간염 환자에서 Transfusion-Transmitted Virus의 감염상태와 유전자형

인제대학교 의과대학 소아과학교실, *진단검사의학교실
† 서울대학교 의과대학 미생물학교실, ‡ 소아과학교실

정주영 · 한태희* · 황응수† · 고재성‡ · 서정기‡

Prevalence and Genotypes of Transfusion-Transmitted Virus in Children with Hepatitis and Normal Control

Ju Young Chung, M.D., Tae Hee Han, M.D.*, Eung Soo Hwang, M.D.†, Jae Sung Ko, M.D.‡ and Jeong Kee Seo, M.D.‡

Departments of Pediatrics and *Diagnostic Laboratory Medicine, Sanggyepaik Hospital, Inje University College of Medicine, Departments of † Microbiology and Immunology, ‡ Pediatrics, Seoul National University College of Medicine

Purpose: Transfusion transmitted virus (TTV) is a newly discovered virus and to date the contribution of TTV to liver disease remains unclear. Little is known about the frequency of TTV infection in children in Korea. The purpose of this study was to investigate the prevalence and genotypic distribution of TTV carried by healthy children and patients with hepatitis in Korea.

Methods: Eighty eight of healthy children and three groups of patients with hepatitis-14 patients with chronic hepatitis B, 12 patients with chronic hepatitis C and 25 patients with hepatitis of unknown etiology-were tested. TTV DNA was detected by semi-nested PCR using primer sets generated from N-22 region and from 5' noncoding region (NCR) of the viral genome. PCR products derived from 8 patients with hepatitis and from 11 healthy children were sequenced and a phylogenetic tree was constructed.

Results: TTV was found by PCR with N22 primer in 11.3% of healthy children, 28.5% of children with hepatitis B, 25% of children with hepatitis C, 24% of children with hepatitis of unknown etiology. TTV DNA was found by PCR with 5'NCR primer in 32.9% of healthy children, 71.4% of patients with chronic hepatitis B, in 50% of patients with hepatitis C and in 48% of patients with hepatitis of unknown etiology. TLMV DNA was found in 48.9% of healthy children, 21.4% of patients with hepatitis B, 16.6% of patients with hepatitis C, 40% of patients with hepatitis of unknown etiology. Among the sequenced isolates, 10(52%) belonged to genotype 1 (G1) and others belonged to genotype 2 (G2) or genotype 3 (G3). Among the G1 sequences, 7 were grouped as G1a.

접수 : 2005년 7월 20일, 승인 : 2005년 8월 23일

책임저자 : 황응수, 110-799, 서울시 중로구 연건동 761-1, 서울대학교 의과대학 미생물학교실

Tel: 02-740-8303, Fax: 02-743-0881, E-mail: hesss@snu.ac.kr

Conclusion: TTV infection was common in healthy children and in patients with hepatitis. But, the prevalence of TTV DNA by 5'NCR primer was relatively high in patients with hepatitis B and there may be some association between TTV and hepatitis B virus infection. G1 was the major genotype of the studied population. (Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 8: 202~212)

Key Words: Transfusion-transmitted virus, Hepatitis, Children, Genotype

서 론

Transfusion transmitted virus (TTV)는 최근 수혈 후 발생한 원인 불명의 간염 환자의 혈청에서 처음으로 분리되었으며 3개의 ORF (open reading frame)로 구성되어 있는 circular single stranded DNA 바이러스이다¹⁾. 원형의 DNA 구조를 가진 Circoviridae 바이러스는 주로 동물에 감염되는 chicken anemia virus (CAV), beak and feather disease virus (BFDV), porcine circovirus (PCV) 등이 대표적이며 TTV는 인체 감염이 처음으로 확인된 circular DNA 바이러스이다²⁾. 특히 CAV는 닭에게 주로 감염되어 재생 불량성 빈혈, 출혈, 림프구 결핍 등을 유발하는 바이러스이며 TTV와 매우 유사한 구조를 가지고 있다. TTV는 ORF1에 위치한 HVR (hypervariable region)1, HVR2와 HVR3 부위에서 codon의 삽입과 결실이 일어나므로 유전형이 다양하여 크게 TA278 (1군), PMV (2군), SENV (3군), YONBAN (4군)으로 분류되며 약 30개의 유전형이 알려졌다²⁾.

TTV는 일반 인구에서 비교적 높은 유병률을 보이지만²⁻⁴⁾ 간세포에서 증식하는 것이 확인되었으며⁵⁻⁷⁾ 일부 유전형은 간손상을 유발할 가능성이 있는 것으로 보고되었다^{8,9)}. 최근에는 원인 불명 간염 환자군의 간조직에서 in situ hybridization에 의해 TTV의 증식이 확인되기도 하여¹⁰⁾ TTV 특정 유전형이 원인 불명의 간염의 병원체로 작용할 가능성과 다른 간염 바이러스와 중복 감염되어 임상 경과에 영향을 줄 가능성에 대한 연구들이 필요한 실정이다. 하지만 TTV 초기 감염이 시작되는 소아 연령의

TTV 감염과 유전형 분석에 대한 연구는 드문 편이다. 이에 저자들은 B형 간염, C형 간염과 원인 불명의 간염을 포함한 소아 간염 환자에서 5'NCR 부위 및 N22 부위의 두 종류의 시발체를 이용하여 TTV 감염의 유병률과 TTV 유전형의 분포를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

생후 2개월부터 15세까지 간기능이 정상인 소아 88명을 먼저 대조군으로 정하여 TTV DNA 양성률을 검사하였다. B형 간염 환자군은 3~6개월 간격으로 인제대학 병원 소아과를 방문한 환자 14명의 검체를 대상으로 하였다. C형 간염 환자군은 1994년부터 1998년까지 서울대학 병원 소아과를 방문하였던 환자 12명의 검체를 대상으로 하였다. 원인 불명의 간염 환자는 2001년 6월부터 2004년 6월까지 인제대학 병원을 방문하여 HBs Ag, HAV IgM 항체, HCV 항체 검사가 음성이었으며 간기능이 비정상인 25명을 대상으로 하였다. 혈청 검체는 검사를 시행하기 전까지 영하 70도에 보관하였다. HBsAg은 EIA (Roche, Palo alto, USA)로 측정하였으며 HCV 항체는 ELISA (Abbott, Illinois, USA)로 측정하였다. 혈청 ALT는 autoanalyzer로 측정하여 40 IU/L 이상을 비정상적으로 정의하였다(Table 1).

2. 검체

DNA 추출, 증폭 및 검출은 QIAamp DNA kit (Qiagen)를 이용하여 200 μ L의 혈청 검체에서 최종

Table 1. Characteristics of Patients and Controls

	Control	Hepatitis B	Hepatitis C	Unknown
Cases	88	14	12	25
Sex (M/F)	44/44	6/8	12/0	13/12

10 μ L를 추출하였다. PCR Premix (Accupower)를 사용하여 Taq DNA polymerase 1 U, dATP, dCTP, dGTP, dTTP는 각각 250 μ M, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM를 검체와 혼합하였다.

3. PCR

TTV DNA 검출을 위한 PCR 분석은 두 종류의 시발체를 이용하여 각각 시행하였다(Table 2).

1) **N22** 시발체를 이용한 PCR 분석: 1차 PCR은 DNA 10 μ L에 NG059 (5'-ACA GAC AGA GGA GAA GGC AAC ATG-3')와 NG063 (5'-CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA CGTT-3')을 0.5 μ L 넣고 94°C 10분, 94°C 40초, 60°C 40초, 72°C 50초, 72°C 10분의 조건에서 총 30회 시행하였다. 최종 산물 2 μ L에 NG061 (5' GGC AAC ATG YTG YTR TGG ATA GAC TGG-3'; Y=T or C, R=A or G)과 N063 0.5 μ L 증류수 17 μ L를 섞고 2차 PCR을 1차와 동일한 조건에서 총 30회 시행하였다.

2) **5'NCR** 시발체를 이용한 TTV DNA 분석: 먼저 1차 PCR은 DNA 10 μ L에 T801 (5' GC TAC GTC ACT AAC CAC GTG 3'), T836 (5' AKG CCT GGG TGT ATG CTA GG 3') 0.5 μ L를 넣고 94°C 10분, 94°C 40초, 60°C 40초, 72°C 3분, 72°C 10분의 조건에서 총 35회 시행하였다. 최종 산물 2 μ L에 T855 (5' GTC AAG GGG CAA TTC GGG CTC 3'), T888 (5' CGT CTG AGT GTG TGG CAT AG 3') 0.5 μ L와 증류수 17 μ L를 섞은 다음 2차 PCR을 1차 PCR과 동일한 조건에서 총 30회 시행하였다.

3) **TLMV DNA** 검출을 위한 PCR 분석: 1차 PCR은 DNA 10 μ L에 M1359 (5' GTT TAT SMC GCY

Table 2. Oligonucleotide Primers Used for Polymerase Chain Reaction

Primer	Nucleotide sequence
TTV (N22)	
NG059	5'-ACAGACAGAGGAGAAGGCAACATG-3'
NG063	5'-CTGGCATTTCACATTTCCAACGTT-3'
NG061	5'-GGCAACATGYTGY*TR [†] TGGATAGACTGG-3'
TTV (5'NCR)	
T801	5'-GCTACGTCACCTAACCACGTG-3'
T836	5'-AKGCCTGGGTGTATGCTAGG-3'
T888	5'-CGTCTGAGTGTGTGGCATAG-3'
TLMV (5'NCR)	
M1359	5'-GTTTATSMCGCYAGACGGAG-3'
M1360	5'-AGGGCSTCTAAWTCTCCKTC-3'
M1365	5'-TYTGCGAAWAGGGCSTCTAA-3'

*Y: T or C, [†]R: A or G

AGA CGG AG 3'), M1365 (5' TYT GCG AAW AGG GCS TCT AA 3')를 0.5 μ L씩 넣고 94°C 10분, 94°C 40초, 60°C 40초, 72°C 50초, 72°C 10분의 조건에서 총 55회 시행하였다. 최종 산물 2 μ L에 M1360 (5' AGG GCS TCT AAW TCT CCK TC 3') 0.5 μ L와 증류수 17 μ L를 섞은 다음 2차 PCR을 1차 반응과 동일한 조건에서 총 55회 시행하였다. 최종 산물은 1.5% agarose gel에서 ethium bromide로 염색한 후 전기 영동법으로 확인하였다.

4. 염기서열 분석

N22 primer를 이용한 PCR에 의한 산물을 ABI 3730 analyzer (Applied biosystem, USA)에 의해 양방향으로 직접 염기서열 분석을 시행하였다. Sequence analyzer 5.0을 이용하여 alignment를 시행하고 neighbor-joining 방법으로 계통 분석을 시행하였다. 염기서열은 GenBank에 저장된 DNA 서열을 추출하였다. AB008394 (TA278), AF122916 (JA1), AF261761 (PMV), AB054647 (Ki-08F), AB025946 (SANBAN), AB038621 (KC009), AB064595 (CT23F), AB016942 (G1a), AB017769과 017879 (G1b) AB017770 (G2a), AB017771 (G2b), AF 060547과 AB016937 (G2c),

AB016952 (G2d), AB018960과 AB017774 (G3), AB017775과 017887 (G4), AB018938과 AB016935 (G4), AB017776 (G5), AB017886 (G6), AB017777과 017889 (G6), AB017778 (G7), AB7779 (G8), AB017780 (G9), AB017781 (G10)을 입력하였다.

통계 프로그램은 SPSS for window 10.0을 사용하였으며 Fisher's exact test를 이용하였으며 $p < 0.05$ 를 유의한 수준으로 정의하였다.

결 과

1. N22 시발체를 이용한 TTV DNA의 검출

유전형의 분석이 가능한 N22 primer를 이용하여 대조군과 간염 환자군의 혈청을 대상으로 PCR을 시행한 결과 예상되는 277 b.p.의 증폭을 확인하였다. TTV DNA 양성률은 대조군에서 11.3% (10/88명), 전체 간염군에서 19.6% (10/51명)였으며 유의한 차이는 없었다($p=0.21$). 간염군별로 TTV DNA 양성률은 B형 간염 환자에서 28.5% (4/14명), C형 간염 환자에서 25% (3/12명), 원인 불명의 간염 환자에서 24% (6/25명)였으며 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Table 3).

2. 5'NCR 부위 시발체를 이용한 TTV DNA의 검출

민감도가 높은 5'NCR primer를 이용하여 대조군과

간염 환자군의 혈청을 대상으로 시행한 PCR 결과 예상되는 709 b.p.의 증폭을 확인하였다. TTV DNA의 양성률은 대조군 32.9% (29/88명), 간염 환자군은 54.9% (28/51명)였다. 환자군에 따른 양성률은 B형 간염 71.4% (10/14명), C형 간염 50% (6/12명), 원인 불명 간염은 48% (12/25명)였다(Table 3). TTV DNA 양성률은 C형 간염과 원인불명의 간염에서 차이가 없었지만 B형 간염군에서 유의하게 높았다($p=0.008$).

3. TLMV DNA의 검출

TLMV의 5' NCR 부위의 primer를 이용하여 대조군과 간염 환자군의 혈청을 대상으로 PCR을 시행한 결과 예상되는 304 b.p.의 증폭을 확인하였다. 간염 환자군과 정상 대조군에서 TLMV DNA 양성률은 각각 29.4% (15/51명), 48.9% (43/88명)였다. 환자군에 따른 TLMV DNA 양성률은 B형 간염에서 21.4% (3/14), C형 간염에서 16.6% (2/12), 원인 불명의 간염에서 40% (10/25)였으며 차이는 없었다(Table 4).

4. N22 시발체를 이용한 PCR 산물의 염기서열 분석

N22 시발체를 이용한 PCR 반응에서 양성인 나온 총 19예(간염군 8예, 대조군 11예)의 염기서열을 분석하여 계통수로 표시하였다(Fig. 1). 대부분 G1 유전형이었으며 나머지는 G2형 또는 G3형이었다. G1 유전형은 10예(G1a 7예, G1b 3예)였으며, G2 유전형

Table 3. Detection of TTV DNA in Sera from Healthy Children and Patients with HBV, HCV Hepatitis, and Hepatitis of Unknown Etiology by PCR

Patients	TTV DNA	
	N22	5'NCR
Healthy control	11.3% (10/88)	32.9% (29/88)
Hepatitis patients	19.6% (10/51)	54.9% (28/51)
Hepatitis B	28.5% (4/14)*	71.4% (10/14)†
Hepatitis C	25.0% (3/12)	50.0% (6/12)
Unknown	24.0% (6/25)	48.0% (12/25)

* $p=0.105$, † $p=0.008$.

Table 4. Detection of TLMV DNA in Sera from Healthy Children and Patients with HBV, HCV Hepatitis, and Hepatitis of Unknown Etiology by PCR Using 5'NCR Primer

Patients	TLMV DNA
Healthy control	48.9% (43/88)
Hepatitis patients	29.4% (15/51)
Hepatitis B	21.4% (3/14)
Hepatitis C	16.6% (2/12)
Unknown	40.0% (10/25)

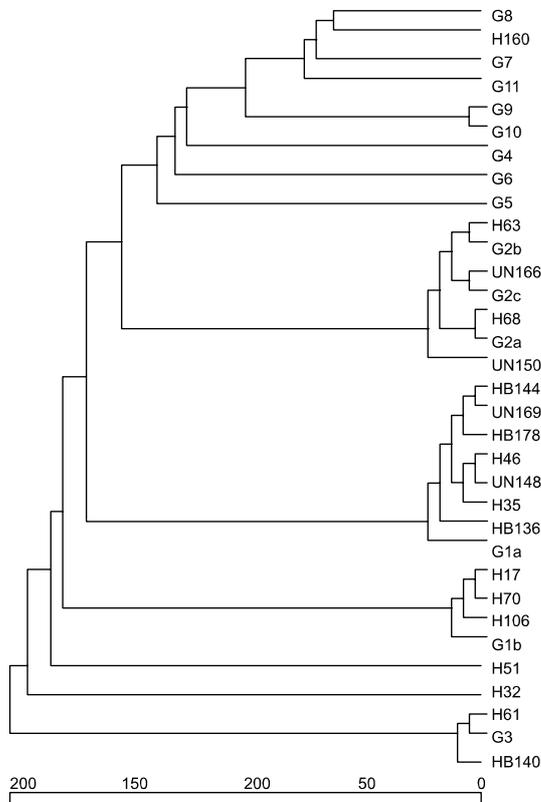


Fig. 1. Phylogenetic analysis of 19 TTV sequences by N22 primer (H: healthy, UN: hepatitis of unknown etiology, HB: hepatitis B).

은 3예(G2a 1예, G2b 1예, G2c 1예), G3 유전형 2예와 기타 유전형은 4예였다.

고 찰

TTV는 사람에서 처음으로 발견된 circular DNA 바이러스이지만 이후에 돼지, 소와 양 등의 동물에도 감염됨이 확인되었다²⁾. 최근에 Iwaki 등¹¹⁾이 침팬지에서 주로 발견되는 simian-TTV가 사람의 원인 감염 병원체로 작용할 가능성이 있다고 보고하기도 하였다. TTV와 CAV는 다른 종류의 Circoviridae과 VP1, VP2과 VP3 단백질과 연관된 3개의 ORF로 구성되는 차이를 보여 Circoviridae 또는 Paracircoviridae로 분류된다^{12,13)}. 최근 중요한 감염 병원체의 가

능성이 제기되었던 SEN 바이러스(SENV)는 circular single stranded DNA 바이러스로, D와 H 유전형이 수혈 후 발생하는 비A-비E형 간염을 유발할 가능성이 있다고 하였으나, SANBAN, TUSO1로 대표되는 TTV의 3군과 염기서열이 거의 동일한 것으로 밝혀졌다¹⁴⁾.

TTV의 ORF1에는 arginine이 포함된 유전자의 capsid 결합과 세포핵 내로의 이동에 관여하는 glycosylation 부위와, rolling circle 복제에 필요한 Rep 단백질이 존재한다. 유전자의 glycosylation 부위의 차이에 의해 항원의 다양성과 생물학적 기능이 달라지지만 TTV의 경우는 아직 확실하지 않다. TTV의 복제 기전은 다른 single stranded DNA 바이러스와 비슷하게 rolling circle 기전에 의해 복제되는 것으로 보이며¹⁵⁾, RNA 중간 산물이 매개된 증식은 하지 않는다¹⁾. 결과적으로 TTV의 복제는 DNA의 proof-reading이 제대로 시행되지 않아서 유전적 다양성이 큰 것으로 여겨진다.

최근 Kooistra 등¹⁶⁾은 ORF1의 유전자에 의해 발현되며, 사람 간암세포의 선택적인 apoptosis를 유발하는 TTV 세포자살 유발 단백질(TT virus-derived apoptosis inducing protein)의 분리에 성공하였다. TTV의 ORF2에는 바이러스의 증식과 관련된 비구조적 단백질에 대한 정보가 있으며, 특히 ORF2의 46~66에 해당하는 부위는 CAV와 TTV에 공통 부분으로 두 바이러스의 관련성 연구에 이용된다¹⁷⁾. TTV의 NCR (noncoding region) 부위는 특징적인 stem-loop 구조이며 GC가 풍부한 부위와 다양한 조절 염기서열(regulatory sequence)이 포함되어 있다.

TTV의 병원성에 대해 회의적인 시각이 많지만 4개의 군이 서로 다른 바이러스로 간주될 정도로 염기서열의 차이가 크기 때문에 충분한 연구가 이루어질 때까지 'orphan virus'로 분류되는 것이 합당하다¹⁸⁾. Echovirus, adenovirus, parvovirus B19, herpesvirus 6와 herpesvirus 7 등의 경우에도 임상 질환과의 관련성 증명에 많은 시간이 걸렸다. 특히 Porcine circovirus는 20년 이상 orphan virus로 여겨지다 최근 야마 번이 유전형이 돼지에서 림프절염, 신장염, 간염, 폐렴과 위염 등을 유발함이 증명되었다¹⁹⁾.

TTV는 수혈에 의해서만 감염된다고 여겨졌으나 분변과 타액에서도 TTV DNA가 검출되어 다양한 경로의 감염이 가능하여 일반 인구에서의 유병률이 비교적 높은 것으로 알려진다. 모유에서 TTV DNA의 존재가 확인되어 산모-태아간의 수직 감염이 가능한 것으로 보인다^{5,20,21}. TTV는 주로 간세포에서 증식하며 골수에서도 증식한다^{22,23}. TTV 감염의 진단은 분리 배양할 적절한 조직 체계와 혈청학적 진단 방법이 아직 없으므로 대부분 분자 생물학적 방법인 PCR에 의한다. PCR의 시발체는 예민도나 특이도가 높고 유전형 판별이 가능하도록 적절한 길이의 증폭물을 얻을 수 있는 것이 가장 바람직하다. 지금까지 TTV 유병률 연구는 대부분 5'NCR 부위나 N22 부위의 시발체가 사용되었으며 검체 처리, 시발체 및 PCR 조건 등에 의해 연구자에 따라 차이가 있었다. 표준적인 PCR 방법은 아직 없으며, 현재 주로 사용되는 시발체들로는 TTV의 모든 유전형을 검출하기 어려운 것으로 알려지고 있다. ORF1의 N22 부위를 이용한 PCR은 예민도가 낮고 일부 유전자형만 검출할 수 있지만 염기서열 분석 자료가 가장 많이 축적 되어 있기 때문에 유전형의 분석이 가능하다. 이에 비해 5'NCR을 이용한 PCR 방법은 양성률은 높지만, 염기서열이 아닌 DNA 절편이 증폭되는 등의 비특이적인 양성 반응이 일어날 수 있으므로 최종 산물의 염기서열을 확인하여야 하며 PCR 산물의 길이가 짧아서 유전형 분류에 이용하기 어렵다. 최근 TTV의 1~4군까지 각군에 특이적인 시발체를 이용한 연구에서 다양한 군의 TTV 혼합감염이 확인되기도 하였다²⁴.

TTV의 유병률은 지역과 보고자에 따라 11~98%에 이르는 다양한 차이가 있다^{3,4,25,26}. 특히 소아에서 TTV의 유병률은 영아기부터 높다는 보고와 연령에 따라 증가하여 청소년기와 성인기에 가장 높다는 서로 다른 보고들이 있었다. 최근 5'NCR 시발체를 이용한 연구들에 의해 이전에 비해 성인과 소아의 실제 TTV 유병률이 높은 것으로 확인되었다^{2,28}. 본 연구에서 정상 소아군의 TTV 감염 유병률은 N22 부위 시발체로는 11.3%, 5'NCR 부위 시발체로는 32.9%였다.

TTV의 간염 병원체 가능성은 초기 연구에서 전격성 간염의 47%, 원인 불명의 만성 간질환 환자의 46%가 TTV DNA 양성이었으며^{1,5}, 수혈 후 발생한 비A-비G형 간염 환자의 간염 발생과 관련이 있는 것으로 보고되었다²⁹. 이후 N22부위 시발체를 이용한 PCR에 의한 TTV DNA 양성률이 비A-비C형 간염에 의한 전격성 간염과 급성 간염군에서 높고³⁰, 비A-비E형 전격성 간염, 원인 불명의 만성 간질환과 다른 간질환 환자의 혈청에서 TTV DNA가 주로 검출되는 것으로 알려지면서 간염 병원체 가능성에 대해 집중적으로 연구되었다^{25,31}. TTV의 유전형에 따른 간염 유발 가능성에 대한 연구에서 특히 Ia 유전형이 주로 발견되는 것으로 보고되었다^{9,32}. 이밖에도 C형 간염에서 간 손상의 정도와 TTV 감염이 관련이 있고, TTV에 감염된 전격성 간염 환자의 사망률이 높으며, 원인 불명의 만성 간염 환자에서 TTV 혈중 농도가 높다고 보고되었다^{34,35}. 하지만 민감도가 높은 시발체를 이용한 연구가 이루어지면서 간염 환자와 정상인의 TTV 유병률에 별로 차이가 없는 것으로 밝혀져 간염 병원체로서의 의미가 감소하였다.

정량적 PCR에 의해 TTV에 감염된 환자의 혈청보다 간조직에서 TTV DNA 농도가 높았으며^{5,7}, 최근에는 원인 불명 간염환자의 간조직에서 *in situ* hybridization에 의해 TTV의 증식이 확인되었다¹⁰. 따라서 TTV 감염이 모두 간염을 유발하지는 않지만 enterovirus나 adenovirus처럼 특정 유전형이나 변이형이 간세포에 친화적인지, 다른 바이러스와 중복 감염되어 활성화되는지, 바이러스가 일정 수준 이상 증식하면 간염을 유발하는 지에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

대부분의 TTV 감염의 유병률과 간염과의 연관성에 대한 임상연구는 성인에서 주로 시행되었으며 소아에서의 연구는 많지 않은 편이다. 초기 연구에 의하면 TTV 감염이 건강 대조군보다 간염군에서 유병률이 높았으며 기존 간질환 환자가 중복 감염되면 간기능이 악화되는 것으로 보고되었다¹. 하지만 Iriyama 등³⁶은 TTV DNA 양성률은 소아 간염 환자에서 23%, 간기능 정상군에서 20%로 차이가 없

다고 보고하였다. Okamura 등⁸⁾은 원인불명의 소아 간염환자 20명과 대조군 35명에서 TTV 유병률이 각각 30%, 14.2%로 차이가 없지만, G1a 유전형이 간염 환자군에서 주로 분리된다고 하였다. Tanaka 등⁹⁾은 G1 유전형 12.9% (18/129), G2와 G3군 3.4% (2/59)의 환자에서 간 효소치가 증가하여 G1 유전형이 간손상과 연관될 가능성이 있다고 하여 본 연구 결과와 비슷하였다. 만성 B형 간염, 만성 C형 간염, 자가면역성 간염, 원인 불명의 간염과 급성 간염 환자들을 대상으로 민감도가 높은 5'NCR 부위 시발체를 이용한 이후의 연구들은 대부분 TTV의 유병률을 과소하였으나 유전형 분석은 시행하지 않았다.

만성 B형 간염 환자에서 TTV 감염의 유병률은 시발체의 차이에 의하여 15~100%로 다양하게 보고되었다^{37~39)}. 특히 Kao 등³⁸⁾은 만성 B형 간염 환자의 TTV 감염 유병률은 100%로 대조군에 비해 높다고 하였으며, Garcia 등³⁹⁾은 real time PCR을 이용하여 만성 B형 간염 환자의 100%에서 TTV 감염됨을 확인하고, TTV는 만성적 감염을 유발하므로 만성 B형 간염 환자에서 더 중복 감염이 자주 관찰된다고 하였다. 하지만 TTV와 C형이나 B형 간염 바이러스의 중복 감염은 간 효소치의 상승과 관련이 없다고 하는 보고도 있다⁴⁰⁾. 본 연구에 의하면 전체 간염 환자군과 대조군의 TTV 유병률은 차이가 없었지만 B형 간염 환자군에서 TTV DNA 양성률이 N22 시발체로 50%, 5'NCR 시발체로 92.8%였으며, 이는 B형 간염 환자에서 TTV의 중복 감염이 흔하다고 한 일부 보고와 일치하였다^{38,39)}. TTV 감염과 간효소치의 활성도는 관련이 없다는 보고도 있지만, 앞으로 B형 간염 환자에게 중복 감염된 TTV가 adeno-virus associated virus (AAV)처럼 helper 바이러스 기능을 할 가능성과, 델타 간염 바이러스처럼 간염의 활동도에 영향을 줄 가능성에 대한 연구가 필요하다.

TTV는 이질성이 크므로 적절한 시발체를 선택하여야 하며 염기서열의 계통 분석 시에 결과 해석에 유의하여야 한다. TTV의 N22 부위 또는 5'NCR 부위를 이용한 계통 분석의 제한점과 TTV간의 재조합 발생 가능성 때문에 정확한 유전형 분류는 어렵

지만 아직까지 유전형 분석은 주로 N22 부위 시발체가 이용되고 있다^{41,42)}. 향후 ORF의 정확한 기전에 대한 연구가 이루어지면 효과적인 유전형 분류가 가능할 것이다. TTV 원형(TA278, G1 유전형)을 Nishizawa가 처음 분리한 이후 대부분의 유전형은 아시아에서 발견되었으며³⁾, TTV 2군인 PMV와 KAV는 유럽, TTV 1군인 JA1과 TTV 3군인 TUS01은 미국에서 처음으로 분리되었다. TTV의 유전형은 지역에 따라 분포에 차이가 있으며, 아시아에서는 G1 유전형이 주로 발견되며 유럽에서는 G2 유전형이 흔한 것으로 알려진다^{26,43~45)}. 본 연구에서 국내 소아에서는 TTV G1 유전형이 68.4% (13/19예)였으며, 아유전형 중 G1a형이 많았다(7/13예). N22 시발체에 의한 PCR 산물의 염기서열을 분석 및 정렬을 시행한 결과 정상군과 B형 간염군의 염기서열 차이는 확실하지 않았다. 따라서 향후 B형 간염군에 감염되는 TTV의 G1a 유전형에 공통되는 서열이 파악되어야 한다. TTV는 다른 유전형간의 복합 감염이 잘 발생한다^{6,45)}. 소아에서 TTV 혼합 감염에 대해서 Peng 등⁴⁶⁾은 일본 소아 17명 중 1명, 중국 소아 6명 중 3명에서 다른 군에 속하는 TTV에 혼합 감염되었다고 하였으며, Maggi 등⁴⁷⁾도 소아에서 TTV의 1군과 2군, 1군과 3군, 3군과 4군 간에 혼합 감염이 발생한다고 하였다. 본 연구에서는 혼합 감염은 확인할 수 없었지만, 앞으로 각 군에 특이적 시발체를 이용하여 혼합 감염과 임상 경과의 관련성을 밝히는 것이 필요하다.

TTV와 다른 간염 바이러스가 중복 감염되는 경우에 간조직 변화에 대해서 상반된 보고들이 있다. 침팬지를 TTV에 감염시킨 실험에서 미세한 간세포의 변화가 보고되었으며, Rodriguez 등⁷⁾은 감염된 간세포의 2~30%에서 조직의 DNA 농도와 비례하여 TTV가 검출되었지만 혈청의 TTV 농도와 관계가 없다고 하였다. 비B 비C형 간염 환자에서 간세포암 발생의 TTV 감염과의 연관성은 증명되지 않았다. 일부 심한 C형 바이러스성 간염 환자에서 TTV 중복 감염이 간세포암의 발생과 연관이 있는 것으로 보고되었으나⁴⁸⁾, TTV에 감염된 만성 C형 간염 환자의 간생검 조직 소견은 TTV에 감염되지 않은 환자

의 조직과 차이가 큰 차이가 없었다^{49,50}. 최근 Leszek 등⁵¹은 B형 간염 환자에서 TTV 중복 감염은 환자의 임상 경과와 연관성이 적다고 하였다.

TTV 감염은 간염 외에 지금까지 다른 임상 질환과의 관련은 확실하지 않았다. 하지만 최근 TTV의 ORF-1 유전자를 쥐에게 주입하면 protamine과 유사한 유전자 중간 산물에 의해 정상 신장 상피세포의 분화가 영향을 받아 신증후군이 유발됨이 확인되었고⁵², 심한 소아 호흡기 감염 환자와 *Helicobacter pylori* 위염 환자에서 특정 TTV의 유전형이 증상의 정도와 관련이 있는 것으로 보고되었다. 따라서 TTV가 다른 장기에도 질병을 유발할 가능성에 대한 추가 연구가 필요하다^{38,53}.

TTV-like mini virus(TLMV)는 TTV와 구조가 비슷한 DNA 바이러스로 30 nm 이하의 크기이며 2,860~2,910의 염기쌍으로 구성되어 있다¹³. TLMV는 TTV보다 크기가 작지만 구조가 매우 비슷하며 감염경로도 유사한 것으로 생각되고 있다. TLMV의 유병률은 브라질에서 72~77%, 프랑스에서 76~77%, 노르웨이에서 48%, 일본에서 76%인 것으로 보고되어, TTV처럼 일반 인구도 많이 감염되어 있는 것으로 보인다^{13,54~57}. 소아에서 TLMV의 유병률에 대한 연구는 매우 드문 편이며, Vasconcelos 등⁵⁴은 브라질 소아의 TLMV 유병률은 78%라고 하였으며, Matsubara 등⁵⁷은 신생아에서 TLMV 유병률이 72%(8/11명)이므로 모체-영아의 수직 감염이 가능한 것으로 보였다. 본 연구에 의하면 국내 소아의 TLMV 유병률은 간염 환자군과 대조군에서 각각 36.6%, 48.9%로 차이가 없었으며, 간염 환자군 간에도 차이가 없었다. TLMV 양성률이 간염군에서 낮은 것은 대상 환자의 수가 충분하지 않은 것도 작용한 것으로 보인다. TLMV도 유전자 재조합이 흔하게 발생하므로 TTV처럼 유전형이 다양하지만, 본 연구에서 이용된 5'NCR 부위 시발체로는 민감도는 높으나 유전형을 분석할 수 없으므로 간염과의 연관성은 확실하지 않다.

결론적으로 본 연구에서는 국내 소아에 감염된 TTV 중 가장 흔한 유전형은 G1형임을 알 수 있었다. 또한 대조군과 원인 불명 간염군간의 TTV DNA

양성률은 차이가 없었으며, TTV가 원인불명 간염의 병원체일 가능성은 적어 보인다. TTV의 유병률이 B형 간염군에서 대조군에 비해 높았지만, 더 많은 수를 대상으로 한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

요 약

목적: Transfusion-transmitted virus는 간염과의 연관성이 아직 명확하지 않지만 특정 유전형이 원인 불명의 간염 병원체로 작용하거나 다른 간염 바이러스와 중복 감염되어 임상 경과에 영향을 줄 가능성에 대한 연구가 필요하다. 본 연구는 국내 소아 B형 간염, C형 간염 및 원인 불명의 간염 환자의 TTV DNA 양성률과 유전형의 분포를 알아보기 위해 시행하였다.

방법: 간 기능이 정상인 소아 88명을 대조군으로 하였으며 B형 간염 환자 14명, C형 간염 환자 12명, 2001년 6월부터 2004년 6월까지 인체의대 상계백병원을 방문한 원인 불명의 간염 환자 25명을 대상으로 하였다. 환자의 혈청 검체를 대상으로 N22 시발체를 이용한 PCR과 5'NCR 시발체를 이용한 PCR을 시행하였다. 또한 TLMV DNA 검출을 위한 semi-nested PCR을 시행 하였다. N22 primer를 이용한 PCR 양성 산물을 대상으로 염기서열의 직접 분석이 시행되었다.

결과: 1) N22 시발체를 이용한 TTV DNA 양성률은 대조군에서 11.3%, 간염군에서 19.6%였다($p=0.105$). B형 간염의 28.5%, C형 간염의 25%, 원인 불명의 간염 24%에서 TTV DNA가 양성이었으며 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다.

2) 5'NCR 부위 시발체를 이용한 TTV DNA 양성률은 대조군에서 32.9%, 간염군에서 54.9%였다. B형 간염의 71.4%, C형 간염의 50%, 원인 불명의 간염 48%에서 TTV DNA가 양성이었다. B형 간염 환자군에서 양성률이 대조군에 비해 높았다($p=0.008$).

3) 5'NCR 부위 시발체를 이용한 TLMV DNA 양성률은 간염 환자군과 정상 대조군에서 각각 29.4% (15/51명), 48.9% (43/88명)였다. B형 간염 21.4% (3/14), C형 간염 16.6% (2/12), 원인 불명의 간염 환

자에서 40% (10/25)였다.

4) 염기 서열 분석: N22 시발체를 이용해서 PCR 반응 산물 중 총 29예(간염 환자 8명, 대조군 11명)의 염기서열을 분석한 결과 G1 유전형은 10예(52%)였고 이 중 G1a형이 7예였다. G2 유전형은 3예, G3 유전형은 2예였으며 나머지는 정확한 분류가 되지 않았다.

결론: 국내 소아에 감염된 TTV 유전형 중 가장 흔한 것은 G1형이었다. TTV DNA 양성률은 대조군과 원인 불명의 간염군 간에 차이는 없었으며, B형 간염군에서 대조군에 비해 높았다.

참 고 문 헌

- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel virus TTV associated with elevated transaminase levels in post-transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;241:92-7.
- Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornal C, Freer G, Vatteroni ML. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:98-113.
- Abe K, Inami T, Asano K, Miyoshi C, Masaki N, Hayashi S, et al. TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions. *J Clin Microbiol* 1999;37:2703-5.
- Prescott LE, Simmonds P. Global distribution of trans-fusion transmitted virus. *N Engl J Med* 1998;339:776-7.
- Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iszuka H, et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus associated with post-transfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology* 1998;10:1-16.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tusda F, et al. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infections of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 1999;259:428-36.
- Rodriguez-Inigo E, Casquerio M, Bartolome M. Detection of TTV DNA in liver biopsies in situ hybridization. *Am J Pathol* 2000;156:1227-34.
- Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota M, Ma X, Hayashi A, et al. Detection of TT virus sequences in children with liver diseases of unknown etiology. *J Med Virol* 2000;62:104-8.
- Tanaka Y, Hayashi J, Ariyama I, Furusyo N, Etoh Y, Kashiwagi S. Seroepidemiology of TT virus infection and relationship between genotype and liver damage. *Digest Dis Sci* 2000;45:2214-20.
- Hu ZH, Lang ZW, Zhou YS, Yan HP, Huang DZ, Chen WR, et al. Clinicopathological study on TTV infection in hepatitis of unknown etiology. *W J Gastroenterol* 2002;8:288-93.
- Iwaki Y, Aiba N, Tran HT, Ding X, Hayashi S, Arakawa Y, et al. Simian TTV (s-TTV) infection in patients with liver diseases. *Hepatology* 2003;25:135-42.
- Mushawar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, et al. Molecular and biophysical characterization of TTV virus; evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3177-82.
- Takahashi K, Hijikata M, Mishihiro S. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* 2000;145:979-93.
- Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Shao R, Wang Y, Shiina S, et al. Weak association between SEN virus viremia and liver disease. *J Clin Microbiol* 2002;40:3140-45.
- Gilbert W, Dressler D. DNA replication: the rolling circle model. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1968;33:473-84.
- Kooistra K, Zhang YH, Henriquez NV, Weiss B, Munmerg D, Noteborn HM. TT virus-derived apoptosis-inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *J Gen Virol* 2004;85:1445-50.
- Hijikata M, Takahashi K, Moshihiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variants and 44 apartial ORF-2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 1999;260:17-22.
- Griffiths P. Time to consider the concept of a commensal virus? *Rev Med Virol* 1999;9:73-4.
- Morozov L, Sirinarmitur T, Sorden SD, Halbur PG, Morgan MK, Yoon KJ, et al. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning

- multisystemic wasting syndromes. 1998;36:2535-41.
- 20) Ross RS, Viazov S, Runde V, Schaefer UW, Roggen-dorf M. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol* 1999;13:181-4.
- 21) Kazi A, Miyata H, Kurokawa K, Khan MA, Kamahora T, Katamine S, et al. High frequency of postnatal transmission of TT virus in infancy. *Arch Virol* 2000;145:535-40.
- 22) Suzuki F, Cheyama K, Tsubota A. Pathogenic significance and organic virus levels in patients infected with TT virus. *Intervirology* 2001;44:291-7.
- 23) Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kakko M, Katayama K, Fukushi S, et al. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patients. *J Med Virol* 2000;61:165-70.
- 24) Devalle S, Niel C. Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV infected patients. *J Med Virol* 2004;72:166-73.
- 25) Charlton M, Adjei P, Poterucha J, Zein N, Morre B, Therneau T, et al. TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatitis failure and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 1998;28:839-42.
- 26) Erensoy A, Saymer AA, Turkgloou S, Canatan D, Akarca US, Sertoz R, et al. TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey. *Infection* 2002;30:299-302.
- 27) Gallian P, Biagini P, Zhong S, Touissi M, Yeo W, Cantaloube JF, et al. TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *J Clin Virol* 2000;17:43-9.
- 28) Ohto H, Ujiie N, Takeuchi C, Sato A, Hayashi A, Ishiko H, et al. TTV infection during childhood. *Transfusion* 2002;42:892-8.
- 29) Tuveri R, Jaffredo F, Lunel F, Nalpa B, Pol S, Feray C, et al. Impact of TT virus infection in acute and chronic viral and nonviral related liver disease. *J Hepatol* 2000;33:121-7.
- 30) Shibata M, Morizane T, Baba T, Inoue K, Sekiyama K, Yoshihara M, et al. TT virus infection in patient with fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3602-6.
- 31) Ikeda H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Infection with undeveloped DNA virus in patients with acute or chronic disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J Hepatol* 1999;30:205-12.
- 32) Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Yokoyama T, et al. TT virus infection in Japanese children: isolates from genotype 1 are overrepresented in patients with hepatic dysfunction of unknown etiology. *Tohoku J Exp Med* 2000;191:233-39.
- 34) Tanaka M, Nishiguchi S, Tanaka T, Enomoto M, Takeda T, Shiomi S, et al. Prevalence of TT virus in patients with fulminant hepatic failure in Japan. *J Gastroenterol* 1999;34:589-93.
- 35) Pistello M, Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, Freer G, Fornai C, et al. TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extra-hepatic pathology. 2001;63:1890-95.
- 36) Iriyama M, Kimura H, Nishikawa K, Yoshioka K, Wakita T, Nishimura N, et al. The prevalence of TT virus infection and its relationship to hepatitis in children. *Med Microbiol Immunol* 1999;188:83-9.
- 37) Lai YC, Hu RT, Yang SS, Wu CH. Coinfection of TT virus and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis B or C. *World J Gastroenterol* 2002;8:567-70.
- 38) Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. TT virus infection with chronic hepatitis B or C: influence on clinical, histological and virological features. *J Med Virol* 2000;60:387-92.
- 39) Garcia JM, Marugan RB, Garcia GM, Lindeman ML, Abete JF, Terron SD. TTV infection in patients with chronic hepatitis B and response of TT virus to lamivudine. *World J Gastroenterol* 2003;9:1261-2.
- 40) Hsu HY, Ni YH, Chen HL, Kao JH, Chang MH. TT virus infection in children, children after blood transfusion, children with non A to non E hepatitis or other liver disease in Taiwan. *J Med Virol* 2003;69:66-71.
- 41) Simmonds P, Davison F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald M, Ellender J, et al. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South East Asia: comparison with classification based upon sequence similarity. *J Gen Virol* 1996;77:3013-24.
- 42) Yun Z, Lara C, Johansson B, Rivera IL, Sonnerborg A. Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *J Med Virol* 1996;49:155-60.

- 43) Manni F, Rotola A, Caselli E, Betorelle G, Luca D. Detecting recombination in TT virus: a phylogenetic approach. *J Mol Evol* 2002;55:563-72.
- 44) Gallian P, Biagini P, Attou H, Cantaloube JF, Dussol B, Berland Y, et al. High genetic diversity revealed by the study of TLMV in French hemodialysis patients. *J Med Virol* 2002;67:630-5.
- 45) Takacs M, Balogh K, Toth G, Balogh Z, Szomor K, Brojnas E, et al. TT virus in Hungary: sequence heterogeneity and mixed infections. *FEMS* 2003; 35:153-7.
- 46) Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. Analysis of the complete genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol* 2002;147:21-41.
- 47) Maggi F, Pifferei M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, et al. TT virus in the nasal secretion of children with acute respiratory disease: relation to viremia and disease severity. *J Virol* 2003;77:2418-25.
- 48) Tokita H, Murai S, Kumitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, et al. High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus related chronic liver disease. *J Med Virol* 2002;67:501-9.
- 49) Watanabe H, Saito T, Kawamata O. Clinical implications of TT virus super-infection in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2000;95: 1776-80.
- 50) Moriyama M, Matsumura H, Shimizu T. Histopathologic impact of TT virus infection on the liver of type C chronic hepatitis and liver cirrhosis in Japan. *J Med Virol* 2001;64:74-81.
- 51) Leszek S, Marina H, Izabela Z, Jaroslaw G, Irma K, Eckart. Detection of TT virus in children and youth with chronic viral hepatitis B and C. *Med Sci Monit* 2003;9:29-33.
- 52) Hiroshi Y, Jiro Y, Hiroaki O, Yoichiro I. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the transgenic ORF-1 gene. *J Gen Virol* 2002;83: 141-50.
- 53) Maggi F, Marchi S, Fornai C, Tempestini E, Andreoli E, Lanini L, et al. Relationship of TT virus and *Helicobacter pylori* infections in gastric tissues of patients with gastritis. *J Med Virol* 2003;71:160-5.
- 54) Vasconcelos CF, Cataldo M, Niel C. Mixed infections of adults and children with multiple TTV like mini virus isolates. *J Med virol* 2002;68:291-8.
- 55) Biagini P, Gallian P, Attoui H, Touinssi M, Cantaloube JF, Micco P, et al. Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus like mini virus human isolates. *J Gen Virol* 2001;82:379-83.
- 56) Moen EM, Huang L, Grinde B. Molecular epidemiology of TTV-like mini virus in Norway. *Arch Virol* 2002;147:181-5.
- 57) Mastubara H, Michikata K, Horiike N, Kihana T, Yano M, Mori T, et al. Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatol Res* 2001; 21:280-7.