

## Nested 중합효소연쇄반응을 이용하여 활막염 환자의 관절액으로부터 아데노바이러스와 대상포진바이러스의 이중감염과 지속감염의 검출

이화여자대학교 의과대학 미생물학교실 및 의과학연구소 분자생물학부  
박혜경 · 우소연 · 김현진

=Abstract=

### Detection of Coinfection and Persistent Infection of Adenovirus and Varicella-Zoster Virus in Synovial Fluids from Synovitis Patients by Nested-PCR

Hae-Kyung Park, So-Youn Woo and Hyun-Jin Kim

*Department of Microbiology, College of Medicine, Division of Molecular Biology  
and Medical Research Center, Ewha Womans University, 911-1, Mok-6-dong,  
Yangcheon Ku, Seoul, 158-056, Korea*

The etiology of rheumatic arthritis (RA) is associated with a number of genetic and environmental factors, but is not definitively elucidated. Recently, more attention has been paid to the possibility of microbial etiology in the pathogenesis of RA, because many different infectious agents have been reported to precede the onset or exacerbation of RA. Adenovirus (ADV) may be one cause of persistent or recurrent inflammatory arthritis. Varicella zoster virus (VZV) arthritis is detected frequently in RA patients treated with low dose methotrexate. The demonstration of simultaneous presence of both viral agents of specific viral nucleic acid in synovial fluids from synovitis patients would provide more direct evidence for arthritis etiological relationship, but there are no confirmed results. Therefore, we studied the ability of adenovirus and VZV to establish coinfection and persistent infection in synovial fluid from synovitis patients. The presence of viral agents in the synovial fluid demonstrated by isolation of cell culture, enzyme immunoassay and nested-PCR. The synovial fluids were also investigated for the presence of viral nucleic acid by nested-PCR using specific primer. ADV produced 220 bp and VZV produced 447 bp by each nested-PCR with specific primers.

We detected 4/6 cases (66.7%) with persistent infection of ADV and 5/6 cases (83.3%) of VZV with 13 synovial fluids (between 7 to 52 day intervals) from synovitis patients by monoclonal EIA and nested-PCR. 21/28 cases (75%) with coinfection of adenovirus and VZV with synovial fluids from synovitis patients by nested-PCR. ADV and VZV coinfection and persistent infection of synovial fluids may provide a chronic antigenic stimuli to the immune system therefore provoking a continuing inflammatory response and caused the possibility of synovitis and arthritis.

**Key Words:** Adenovirus, Varicella-Zoster virus, Nested-PCR, Coinfection, Persistent infection

접수 : 2000년 10월 16일, 논문게재확정 : 2000년 12월 12일

Corresponding author: 박혜경, 158-056 서울시 양천구 목6동 911-1, 이화여자대학교 의과대학 미생물학교실  
전화번호: (02) 650-5737, FAX: (02) 653-8891

## 서 론

류마티오이드 관절염 (rheumatoid arthritis, RA)의 원인은 확실히 규명되지 않았으나 유전적인 요인과 환경적 요인이 함께 관여한다고 생각되고 있다. RA는 유년기에도 발생하고, 성인의 경우 관절염의 증상을 보이는 만성질환으로써 심한 합병증을 야기한다. 최근에 류마티오이드 관절염의 병인론에서 미생물관여의 가능성이 크게 관심을 끌고 있다 (3,10).

Adenovirus (ADV)에 의한 관절염의 발생이 19세 소년에서 처음으로 보고되었고 (21), Hahal 등 (14)이 유년 류마티오이드 관절염인 16세 소년의 혈청에서 coxsackie virus B3 중화항체가 1:16에서 1:512로 coxsackie virus, A9에 대한 중화항체가 1:64에서 1:512로 증가하는 것을 관찰하여 RA와 바이러스 감염과의 연관성을 생각하였다. 같은 논문에서 또한 류마티오이드 관절염의 증세를 나타내는 9세 소녀의 pericardial fluid에서도 adenovirus type 7이 분리되어 류마티오이드 관절염에 바이러스가 관여한다는 증거를 발표하였다.

바이러스 감염과 RA와의 관계는 오랫동안 연구되어 왔는데 Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV)가 RA의 병인론에서 중요 역할을 한다는 연구들이 다수 있다 (2,6,15,18,19,25,27). Male 등 (18)과 Ford 등 (8)은 흔한 바이러스 감염체로 알려진 사람 CMV가 류마티오이드 관절염과 관계가 있다는 가능성을 제시하였다. 그 외에 RA 환자에서 CMV가 잠복감염을 일으키는 경우, 환자의 다핵백혈구에서 CMV가 발견된다는 연구들이 있다 (5,13,15). Taylor-Wiedemann 등 (28)은 RA 환자의 말초혈액 단핵구에서 CMV의 DNA를 검출하였는데, 이 경우 CMV가 다른 herpes virus 처럼 초도감염 후 (Primary infection) 어떤 조직에 남게 된다고 하였다. 바이러스의 감염이 세포분해를 일으키거나, 잠복감염이 확립된 이후에 재활성 (reactivation)에 의해 유전적으로 감수성이 있는 사람에게는 특이적으로 rheumatoid factor (RF)의 생성을 유도하거나 자가면역반응을 야기한다는 Ferraro와 Newkirk (12)의 연구가 있었다. 이 보고에서는 CMV의 경우가 EBV와 Varicella zoster virus (VZV)의 경우보다 이러한 면역반응이 강하게 나타내며 RF와 관계가 있다고 강조하였다.

최근에는 CMV 이외에 hepatitis C virus (16), par-

vovirus (20), rubella virus (29) 등의 원인체가 류마티오이드 관절염의 발생에 앞서 존재하거나, 관절염 발생 이후 관절염을 악화시킨다는 보고들이 있어 RA와 virus와의 관계를 확인하고자 하는 노력은 계속되고 있다.

그 중 ADV는 RA 환자에서 림프구와 연관관계가 잘 연구되어 있고, 잠복감염을 일으킨다고 알려져 있다. Ford와 Rosa (7)는 4명의 류마티오이드 관절염 환자에서 3년 동안의 추적검사를 시행하여 여러 가지 바이러스 항원에 대한 관절액내의 림프구의 반응을 관찰하였으며 이 중 ADV, mumps virus, CMV가 계속적인 반응을 나타내었다고 보고하였다. 또한 Ford 등 (9)은 15세 소년의 재발 관절염 환자의 관절액 림프구가 ADV 항원에 대해서 반응을 가장 강하게 나타내었다고 하여 ADV와 RA의 관계를 더욱 강조하였다. 그 외에도 Ford 등 (11)은 5명의 관절염 환자에서 ADV 항원의 경우 다른 감염원의 항원의 경우보다 <sup>3</sup>H-thymidine 흡수에 더 높은 반응을 나타내었다고 보고하였다. 또 관절의 활막 생검검체에서 ADV의 염기서열이 존재함을 밝혀서 ADV는 지속적이며 재발하는 염증성 관절염의 원인이 된다고 결론지었다. 이러한 결과는 살아 있는 미생물이나, 특이항원의 특이 핵산이 RA 환자의 관절액에서 존재하는지를 밝혀 이러한 감염원과 RA와의 관계를 설명하고자 하였다.

본 연구에서는 활막염 환자의 관절액에서 잠복 감염을 일으킨다고 알려진 ADV와 VZV를 택하여 관절액내의 이중감염과 지속감염에 대해서 연구하고자 하였다. 이유는 Straus 등 (26)이 유년시절에 VZV가 초도감염을 일으키는 경우 일시적인 관절통을 동반한다고 보고하였으며, Huppertz 등 (17)이 사람관절의 조직배양시 ADV와 VZV가 제한된 증식을 한다는 보고에 근거한 것이다. Antonelli 등 (1)은 저용량의 methotrexate의 치료를 받은 류마티오이드 관절염 환자에서 VZV에 의한 관절염이 발생하였는데 (14.5/1000명), 일반 인구군에서의 RA 발생 빈도 (1.3-4.8/1000명)보다 훨씬 높은 것이었다. 이 보고는 또한 RA 환자에서 methotrexate의 치료 이후의 VZV 관절염이 발생한 경우는 자연적으로 치유되나 통계학적으로 methotrexate의 사용 이후에 류마티오이드질환이 오랜 기간 지속하는 것과 관계가 있다고 하였다. 반면에 Ching (4)이 RA 환자에서 치료목적으로 methotrexate사용 후 나타난 치명적이며 전신적으로 퍼지는 herpes zoster 감염에 대한 한 건의 보고가 있다. 활

막염이 진행되면 관절염을 일으킬 수 있고 RA는 만성관절염으로 알려져 있다.

RA의 발생의 원인으로 바이러스가 연관되어 있다는 국외 연구와 국내의 연구로는 박과 서 (22)의 연구가 있으나 잠복감염을 일으키는 ADV와 VZV의 이중감염이 활막염 환자의 관절액에서 이중감염이 어떻게 나타나는지와 각각의 바이러스가 지속감염을 일으키는지에 대한 연구는 국내외에 없다.

활막염 환자의 관절액을 채취하여 세포배양 후 DNA를 추출하여 nested PCR 방법으로 ADV와 VZV를 검출코져 하였다. 동일한 활막염 환자가 다시 관절이 부어서 정형외과를 찾아올 때 다시 관절액을 얻어서 지속적으로 바이러스가 관찰되는지를 확인하며, ADV와 VZV가 동시에 검출시를 coinfection으로 판독코져 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 검체 수집

고려대학교 의과대학 부속 구로병원에 1996년 1월부터 1999년 12월까지 정형외과에 활막염을 주 증상으로 내원한 환자를 대상으로 관절액을 무균적으로 채취한 후 -70℃에 소분하여 보관하였다. 동일한 환자가 계속 활막염을 주 증상으로 정형외과에 다시 내원시 이들 검체를 채취하여 -70℃에 소분하여 보관하였다.

2. Monoclonal 항체를 사용한 효소면역측정법으로 활막염 환자의 관절액에서 adenovirus와 varicella-zoster virus 항원 확인

본 연구에서는 첫 번째로 활막염 환자의 관절액속에 ADV와 VZV 항원이 존재하는지의 유무를 단클론항체를 이용하여 효소면역측정법 (enzyme immunoassay, EIA)으로 측정하였다. 활막염 환자의 관절액에서 ADV, VZV의 DNA가 nested-PCR 방법으로 두 바이러스가 검출되는 이중감염 경우와, 한 종류의 바이러스가 일정한 기간후에도 지속적으로 검출되는 지속감염의 경우에, 이러한 감염 양상을 보이는 환자의 관절액을 동시에 ADV VZV monoclonal 항체를 사용한 EIA 방법으로 optical density (OD)를 측정하여 시간에 따른 변동을 살펴보았다.

활막염 환자의 관절액을 무균적으로 채취하여 -70℃에 소분하여 저장하였다가 녹여서 carbonate

buffer로 1:50으로 희석하여 50 µl을 EIA 평판에 도말한 다음 4℃에서 16시간 방치한 다음 평판을 3회 PBS-Tween 20으로 세척하였다. 2% bovine serum albumin이 포함된 PBS로 37℃에서 1시간 blocking 시킨 후 3회 세척하였다. Adenovirus monoclonal 항체 1:1500 (Chemicon MAB8051, USA)와 Varicella zoster virus monoclonal 항체 1:200 (Chemicon MAB8614, USA)를 각각 50 µl씩 넣은 후 37℃에서 2시간 방치한 다음 평판을 3회 PBS-Tween으로 세척하였다. Goat antimouse IgG (H+L) peroxidase conjugate 1:1000 (Chemicon, USA)을 50 µl 넣은 후 37℃에서 2시간 방치 후 3회 세척하였다. Substrate로 OPD 50 µl 첨가 후 빛을 차단한 상태에서 30분 작용시킨 후 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣어서 발색을 차단시켰다. 490 nm spectrophotometer에서 reading하여 negative mean ± 3SD로 하여 OD 0.2 이상을 양성으로 판독하였다.

3. HEp-2 cell에 Adenovirus와 Vero cell에 Varicella Zoster virus와 관절액 배양

두 번째로 효소면역측정법에 의해 ADV와 VZV에 대한 항원에 양성으로 나타난 활막염 환자의 관절액을 HEp-2 cell과 Vero cell에 각각 접종하여 이 두 바이러스에 의한 특이세포병변을 나타내는지를 관찰하였다. 이를 다시 단클론항체를 이용하여 ADV와 VZV의 표준준주에서 면역형광항체반응으로 확인하였다. 본 연구에서는 관절액 검체들을 접종한 조직배양 세포에서 DNA를 추출하여, nested polymerase chain reaction (nested-PCR) 방법으로 이들 활막염 환자의 관절액내에 ADV와 VZV가 존재하는지를 확인하였다. 이 때 활막염 환자의 관절액에서 nested-PCR 방법으로 ADV VZV가 동시에 검출되면 이중감염으로 진단하였다. 동일한 환자에서 일정기간 (평균 1주일) 이후에 증세 완화와 진단 확진을 위해 두 번째로 뽑은 관절액에서 다시 nested PCR 방법으로 검출시 반복하여 ADV와 VZV가 검출되면 지속감염으로 판독하였다.

#### 1) Adenovirus 배양

이화여자대학교 의과대학 미생물학 교실에 보관중인 HEp-2 cell을 이용하여 관절액을 배양하였다. 10분간 원침시킨 후 침전물을 PBS로 무유하여 여과시킨 후 10% 우태아 혈청이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37℃의 0.5% CO<sub>2</sub>배양기에서 5~7일간 배양하면서 특징적인 세포병변인 세

**Table 1.** Primer pairs used for nested PCR of ADV and VZV

Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Location	Length (base pairs)
Hex AA 1885 primer 1	5'-GCC GCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C-3'	18858-18882	
Hex AA 1913 primer 2	5'-CAG CAC GCC GCG GAT GTC AAA GT-3'	19136-19158	300
Hex AA 1890 primer 3	5'-GAG TAC CTG AGC CCC GGG CTG G-3'	18900-18922	
Hex AA 1909 primer 4	5'-CAA GCA CAC GGT TGT CAC CCA CAG-3'	19097-19120	220
VZ 1 primer 1	5'-CCG TAT ATG AGC CTT ACT ACC ATT C-3'	115953-115977	
VZ 2 primer 2	5'-GAG TTC ATC AAA CAG TGT GCT GGT G-3'	116605-116629	677
VZ 3 primer 3	5'-TAT GGC CAC GTA ATG ATT ATG ATG G-3'	116052-116079	
VZ 4 primer 4	5'-CCA CGT CTT GAA AGC ATG TTG TAT G-3'	116474-116498	447

포가 커지고 멍쳐서 포도송이처럼 나타나는지를 확인하였다. 이 세포병변이 보이는 배양검체를 액체 질소통에 냉동보관하여 사용하였다.

2) Varicella-Zoster virus 배양

Vero cell을 10% 우태아 혈청이 함유된 RPMI 1640에 배양하여 80%의 세포가 자라면 표준균주인 VZV (ATCC VR-588)를 배양하였다. 관절액을 원심침전 후 침전물을 PBS로 부유하여 여과한 후 1 ml을 vero cell에 접종하였다. 특징적인 세포병변이 관찰되는 3~4일 후에 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 배양접시에서 떼어낸 후 일부는 액체 질소통에 냉장보관하여 사용하였다.

3) 관절액 배양

활막염 환자의 관절액 검체를 HEp-2 cell에 배양하여 3~5일 후 세포병변이 나타나면 수집하여 PBS로 씻어서 pellet을 만들었다. 이를 Qiagen (Germany) kit (USA)로 DNA를 추출하여 nested-PCR에 사용하였다.

4. DNA 추출

활막염 환자의 관절액 500 µl을 2,000 g 10분간 원심분리로 침전시킨 후 nucleus lysis 용액을 넣었다. RNase 용액 2 µl을 넣고 37°C에서 20분간 방치시킨 후 실온에 5분간 정치하였다. Protein 침전 용액 300 µl을 넣은 후 2,000 g에서 5분간 원심침전시켰다. 새 tube에 DNA가 함유된 상층액과 iso-propanol을 넣은 후 혼합하였다. 4°C 16,000 rpm에서 30분간 원심침전 후 상층액을 버리고 70% cold ethanol을 넣어서 DNA를 씻고 건조시켰다. DNA를 재 부유시키고 spectrophotometer에서 DNA

양을 측정하였다.

5. Nested-PCR에 의한 ADV와 VZV 확인

1) ADV

Park 등 (23)의 ADV에 대한 PCR 방법을 변형하여 nested-PCR 방법을 사용하였다. 관절액 검체를 세포배양하여 추출한 DNA를 1~2 µl을 사용하였다. PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, primer 1과 primer 2를 각각 20 pM, dNTP 200 µM, Taq 1.5 u에 증류수를 넣어서 50 µl의 volume으로 만들고 94°C 1분 처리 후, 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 1분으로 35 cycle을 반응시키고 72°C에서 5분간 연장시켰다. 다시 PCR product 2 µl에 primer 3과 primer 4를 각각 25 pM씩 넣고 PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 200 µM, Taq 1.5 u을 넣어서 위와 같은 조건으로 nested-PCR을 시행하였다 (Table 1).

2) VZV

Park과 Seoh (24)의 VZV nested-PCR 방법을 변형하여 사용하였다. 관절액 검체를 세포배양하여 추출한 DNA를 1~2 µl을 사용하였다. MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, primer 1과 primer 2를 각각 50 pM, dNTP 200 µM, Taq 1.5 u, 증류수와 PCR buffer를 넣어서 50 µl의 volume으로 하여 94°C 1분 처리 후, 90°C 30초, 62°C 1분, 72°C 2분으로 35 cycle을 반응시킨 후 72°C에서 3분간 연장시켰다. 다시 PCR product 2 µl을 primer 3과 primer 4를 각각 50 pM 되게 넣고 dNTP 200 µM, Taq 1.5 u을 넣어서 위와 같은 조건으로 nested-PCR을 시행하였다 (Table 2).

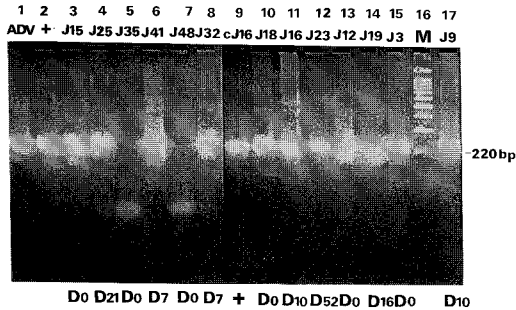
6. PCR product 전기영동

Adenovirus의 경우는 2.9% NuSieve agarose gel 에 PCR product 10 μL을 sample buffer와 함께 넣어서 80분간 전기영동하여 220 base pair band를, varicella-zoster virus의 경우는 447 base pair band를 각각 polaroid film으로 사진을 찍어 확인하였다

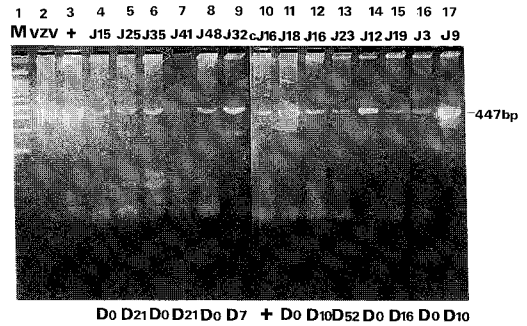
(Figure 1, 2, 3).

결과 및 고찰

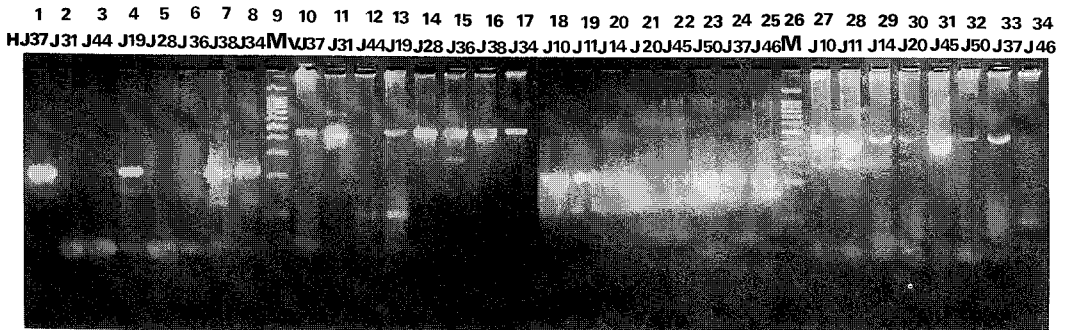
활막염 환자의 관절액에서 monoclonal 항체 이 용한 EIA와 nested-PCR 방법으로 ADV와 VZV의



**Figure 1.** Adenovirus (ADV) persistent infection with serial collected synovial fluids from same synovitis patients by nested-PCR showed 220 bp on 2.9% NuSieve agarose. Lane 1, ADV cultured known adenovirus on HEp-2 cells; lanes 5 and 7 were ADV PCR negative, lane 9, cJ16 cultured joint fluid (J16) on HEp-2 cells; lane 16, M 100 bp molecular marker. Lane 4, J25 sample from J15 patients 21 days later; lane 6, J41 sample from J35 patients 7 days later, which were ADV positive. Lane 11, J16 sample from J18 patients 10 days later; lane 12, J23 sample from J18 patients 52 days later, which were ADV persistent infection.



**Figure 2.** Varicella-zoster virus (VZV) persistent infection with serial collected synovial fluids from same synovitis patients by nested-PCR showed 447 bp on 2.9% NuSieve agarose. Lane 1, M 100 bp molecular marker; lane 2, VZV cultured VZV on Vero cells and VZV PCR positive; lane 7, (J41) was VZV PCR weak positive. Lane 10, cJ16 cultured J16 on Vero cells and VZV PCR positive. Lane 5, J25 sample from J15 patients 21 days later; lane 7 J41 sample from J35 patients 7 days later, lane 12, J16 sample from J18 patients 10 days later; lane 13, J23 sample from J18 patients 52 days later, which were VZV persistent infection.



**Figure 3.** Coinfection of adenovirus (ADV) and varicella-zoster virus (VZV) on 2.9% NuSieve agarose from synovitis patients by PCR and nested-PCR showed 220 bp and 447 bp in same synovial fluid. Lane 1, H-J37 cultured J37 on HEp-2 cells and confirmed ADV immunofluorescent staining and ADV PCR strong positive; lane 10, V-J37 cultured J37 on Vero cells confirmed VZV immunofluorescent staining and VZV nested PCR positive. J37 sample was ADV and VZV coinfection positive. Lane 3, J44 was ADV negative; lane 12, J44 was VZV negative. J44 sample was coinfection negative. Lane 6, J36 was ADV positive; lane 15, J36 was VZV strong positive. J36 sample was coinfection positive.

Table 2. Results of persistent infection of adenovirus (ADV) and varicella-zoster virus (VZV) in 13 synovial fluids from 6 synovitis patients by enzyme immunoassay (EIA) with monoclonal antibody and nested-PCR

Joint fluid No.	Name of Pt	Sex	Age (Year)	Sampling Date	Intervals of Sampling	OD of ADV EIA	ADV nested PCR	OD of VZV-EIA	VZV nested PCR	Coinfection
J <sub>A</sub> 15	I.D.K	M	11	1996-02-21	0	1.259++	++	0.196-	+	C <sup>e</sup>
J <sub>A</sub> 25	I.D.K	M	11	1996-03-14	21 days	1.402++ ↑ <sup>a</sup>	++	0.193-	+	C+
J <sub>A</sub> 35	P.H.H	M	44	1996-03-15	0	1.169++	-	0.204+	+	C <sup>f</sup>
J <sub>A</sub> 41	P.H.H	M	44	1996-03-22	7 days	1.078++ ↑	++	0.209+	+	C+
J <sub>A</sub> 48	C.H.W	M	11	1996-02-16	0	0.520++	-	0.347+	+	C-
J <sub>A</sub> 32	C.H.W	M	11	1996-02-23	7 days	0.550++	++	0.130- ↓	++ <sup>c</sup>	C+
J <sub>A</sub> 18	L.I.C	M	27	1996-04-28	0	0.841++	++	0.211+	++	C+
J <sub>A</sub> 16	L.I.C	M	27	1996-05-08	10 days	0.930++ ↑	++	0.229+	+ <sup>d</sup>	C+
J <sub>A</sub> 23	L.I.C	M	27	1996-06-30	52 days	0.943++ ↑	++	0.245+	+	C+
J <sub>A</sub> 12	P.M.C	M	23	1996-02-07	0	0.896++	++	0.256+	++	C+
J <sub>A</sub> 19	P.M.C	M	23	1996-02-23	16 days	1.302++ ↑	++	0.254+	+	C+
J <sub>A</sub> 3	L.Y.S	F	37	1996-12-27	0	1.311++	++	0.144-	+	C+
J <sub>A</sub> 9	L.Y.S	F	37	1996-01-07	10 day	0.075- ↓ <sup>b</sup>	++	0.095-	++	C+

M, male; F, female; a, OD++ (OD high increase); b, OD- (OD negative); c, nested PCR++ (strong positive); d, nested PCR+ (positive); e, C+ (coinfection positive); f, C- (coinfection negative)

**Table 3.** Results of coinfection of adenovirus (ADV) and varicella-zoster virus (VZV) in synovial fluids from 15 synovitis patients by nested-PCR

Joint fluid No	Name of Pt	Sex	Age (Year)	Sampling Date	ADV nested PCR	VZV nested PCR	Coinfection
J <sub>A</sub> 31	K.S.J	M	26	1996-01-05	-	++ <sup>c</sup>	C-
J <sub>A</sub> 44	K.T.J	M	42	1996-04-16	-	- <sup>d</sup>	C-
J <sub>A</sub> 19	P.M.C	M	22	1996-02-23	++ <sup>a</sup>	+	C+ <sup>e</sup>
J <sub>A</sub> 28	H.C.Y	M	60	1996-05-16	- <sup>b</sup>	++	C- <sup>f</sup>
J <sub>A</sub> 36	H.S.T	M	50	1996-07-02	+	++	C+
J <sub>A</sub> 38	P.C.H	F	43	1996-11-23	++	++	C+
J <sub>A</sub> 34	C.W.L	M	26	1996-04-02	++	+	C+
J <sub>A</sub> 10	P.Y.S	M	53	1996-02-03	++	++	C+
J <sub>A</sub> 11	C.J.H	F	55	1996-02-06	++	++	C+
J <sub>A</sub> 14	K.S.C	M	22	1996-02-21	++	+	C+
J <sub>A</sub> 20	K.H.J	F	15	1996-04-17	++	+	C+
J <sub>A</sub> 45	S.J.B	M	44	1996-04-16	++	++	C+
J <sub>A</sub> 50	K.E.S	M	16	1996-08-16	++	+	C+
J <sub>A</sub> 37	K.G.J	F	31	1996-11-21	++	+	C+
J <sub>A</sub> 46	C.Y.B	M	44	1996-04-16	++	+	C+

a, ++ ADV nested PCR strong positive; b, - ADV nested PCR negative; c, ++ VZV nested PCR strong positive; d, - VZV nested PCR negative; e, C+ coinfection positive; f, C- coinfection negative

지속감염을 검출하였다.

활막염 환자에서 2회 이상의 관절액을 얻을 수 있었던 6예에서 얻은 13검체에서 nested-PCR 방법으로 ADV는 11/13 (84.6%) 예에서 발견되었다 (Table 2). 활막염 환자 관절액 monoclonal 항체를 이용한 EIA 방법으로 ADV 항원은 12/13 (92.3%) 예에서 발견되었고 OD가 상당히 높았다. 활막염 환자 관절액에서 13/13 (100%) 예에서 VZV가 nested-PCR 방법으로 발견되었다 (Table 2). Nested-PCR 방법으로는 활막염 환자의 관절액 7~52일 간격의 관절액 13검체에서 ADV 220 bp와 VZV 447 bp가 발견되었다 (Figure 1, 2). Monoclonal 항체를 이용한 EIA 방법으로 VZV 항원은 8/13 (61.5%) 예에서 발견되었으나 OD는 ADV처럼 높지는 않았다.

활막염 환자의 관절염에서 nested-PCR 방법에 의한 ADV와 VZV의 이중감염을 검출하였는데 2회 이상의 관절액을 얻을 수 있었던 활막염 환자 6예의 13검체에서 (Table 2) 11/13예에서 ADV와 VZV

가 동시에 양성으로 관찰되었다. 지속감염의 연구를 수행할 수 없었고 단 1회만 검체를 얻을 수 있었던 다른 15예에서 (Table 3)에서 ADV와 VZV가 nested-PCR 방법으로 동시에 검출되어 12/15 (80%) 예에서 이중감염 양성으로 관찰되었다 (Figure 3). 활막염 환자의 관절액 도합 28예에서 이중감염이 검출된 예는 23예로 (11/13예와, 12/15예) 82.1%이었다 (Table 2, 3).

Rheumatoid Arthritis (RA)의 발생에 바이러스 항원의 지속적인 자극과 정상면역기능의 조절기능 (dysregulation)의 복합적인 효과는 관절강내의 염증반응을 일으킬 수 있다는 가능성이 있다. RA의 발생과 연관된다는 바이러스의 종류는 외국에서 매우 다양하게 연구되어 있다. 그러나 국내의 경우는 관절염에 대한 박과 서 (22)의 rubella virus와 mumps virus에 대한 연구가 있을 뿐이다. 또한 RA에서 바이러스의 잠복감염에 대한 연구는 있으나 동시감염과 지속감염을 연구한 경우는 국내 외에 보고가 없다.

본 연구에서는 잠복감염의 가능성이 있고 특히 재발되는 관절염 환자의 관절액에서 가장 높은 검출율을 나타내며 관절조직에서의 배양 가능성이 있다고 알려진 ADV를 택하였다. 잠복감염을 일으킨다고 처음으로 알려졌고, 관절염의 치료 목적으로 methotrexate를 사용한 후에 관절액에서 VZV를 발견하여 관절염을 일으킨다고 알려진 VZV를 택하여, 이중감염과 지속감염을 nested-PCR 방법으로 두 바이러스의 DNA를 검출하였다. 활막염 환자의 관절액에서 직접 DNA의 검출한 경우에도 ADV와 VZV의 존재를 nested-PCR 방법으로 확인할 수 있었다. 두가지 바이러스의 항원성의 강도는 단클론항체를 이용한 EIA으로 측정하였다. 강한 바이러스 항원성을 보이는 활막염 환자의 관절액에는 바이러스의 단백질의 농도가 EIA 방법으로 측정시 높을 것으로 생각되었다.

HEp-2 cell에서 ADV와 VZV가 잘 자라는 것으로 알려져 있어 사용하였다. 그러나 ADV와 VZV에 monoclonal 항체를 이용한 EIA의 연구보고가 없기에 본 논문의 결과와 비교는 할 수 없었다. 보통 EIA에서 negative mean OD  $\pm$  3SD를 양성으로 판독하며 OD 0.2 이상이면 양성으로 판독하였다. 또한 활막염 환자의 관절액을 직접 회석하여 (1:50) ADV와 VZV monoclonal 항체를 이용한 EIA에서도 지속감염과 이중감염을 나타내는 경우에서도 EIA OD의 수치가 높았다. EIA의 OD는 수치는 nested-PCR에서 양성을 나타낸 band의 강도와 비례하여 높았다. 그러나 본 연구처럼 monoclonal 항체를 이용한 EIA 방법과 nested PCR의 방법으로 동시에 관절액에서 ADV, VZV DNA를 측정하는 다른 연구결과가 없기에 비교할 수 없었다.

본 연구에서 활막염 환자에서 2회의 관절액을 얻을 수 있었던 6예의 13검체에서 ADV 지속감염 11/13예와 VZV 지속감염 12/13예를 관찰하였다. 관절액을 2회 얻은 13예와 1회 얻은 15예 도합 28예에서 ADV와 VZV의 이중감염 (21/28예)를 관찰하여 비록 검체수는 적으나 높은 빈도의 지속감염과 이중감염을 nested-PCR 방법으로 확인하였다. 본 연구에서 활막염 환자의 관절액에서 ADV와 VZV의 이중감염 검출을 처음으로 EIA와 nested PCR 방법으로 동시에 확인하였다. 또 같은 관절염 환자에서 관절액을 두 번 얻을 수 있는 경우에 EIA와 nested-PCR로 ADV와 VZV의 존재를 처음 검출하여 이중감염의 확인하였으므로 가치가 있다고 생각된다.

활막염 환자의 관절액에서 ADV와 VZV의 이중감염과 ADV 또는 VZV의 지속감염으로 만성적으로 바이러스 항원의 자극은, 염증반응을 지속적으로 일으킬 수 있다고 생각되며 활막염이 진행되어서 관절염의 발생을 일으킬 수 있다고 추정하였다.

감사의 글

본 연구는 1999년 연경재단 연구지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

- 1) Antonelli MS, Moreland LW, Brick JE: Herpes zoster virus in patients with rheumatoid arthritis treated with weekly, low dose methotrexate. *Am J Med* **90**: 295-298, 1991.
- 2) Alspaugh MA, Henle G, Lennette ET, Henle W: Elevated levels of antibody to Epstein-Barr virus antigen in sera and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **67**: 1134-1140, 1981.
- 3) Burmester GR: Hit and run or permanent hit? Is there evidence or a microbiological cause of rheumatoid arthritis? (editorial). *J Rheumatol* **18**: 1443-1447, 1991.
- 4) Ching DWT: Severe, disseminated, life threatening herpes zoster infection in a patient with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. *Ann Rheumatol Dis* **54**: 155-156, 1995.
- 5) Dankner WM, McCuthan JA, Richman DD, Hirata K, Spector SA: Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes in situ hybridization. *J Infect Dis* **161**: 31-36, 1990.
- 6) Depper JM, Bluestein H, Zvaifler NJ: Impaired regulation of Epstein-Barr virus induced lymphocyte proliferation in rheumatoid arthritis due to a T cell defect. *J Immunol* **127**: 1899-1902, 1981.
- 7) Ford DK, da Rosa DM: Further observations on the response of synovial lymphocytes to viral antigens in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **13**: 113-117, 1986.
- 8) Ford DK, da Rosa DM, Schultzer M, Reid GD, Denegri JF: Persistent synovial lymphocyte responses to cytomegalovirus antigen in some



- patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **30**: 700-704, 1987.
- 9) **Ford DK, Stein HB, Schulzer M**: Persistent synovial lymphocyte responses to mumps and adenovirus antigens. *J Rheumatol* **15**: 1717-1719, 1988.
  - 10) **Ford DK**: The microbiological causes of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **18**: 1441-1442, 1991.
  - 11) **Ford DK, Stein HB, Schulzer M, Bateman ED, Hogg JC, Hayashi S**: Lymphocytes from the site of disease suggest adenovirus is one cause of persistent or recurrent inflammatory arthritis. *J Rheumatol* **20**: 310-313, 1993.
  - 12) **Ferraro AS, Newkirk MM**: Correlative studies of rheumatoid factors and anti-viral antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* **92**: 425-431, 1993.
  - 13) **Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, Parea M, Battaglia M**: Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral protein. *J Clin Microbiol* **28**: 2681-2688, 1990.
  - 14) **Hahal JJ, Millian SJ, Noriega ER**: Coxsackievirus and adenovirus infection. *JAMA* **235**: 2496-2501, 1976.
  - 15) **Hamerman D, Gresser I, Smith C**: Isolation of cytomegalovirus from synovial cells of a patient with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **9**: 658-664, 1982.
  - 16) **Hirohata S, Inoue T, Ito K**: Development of rheumatoid arthritis after chronic hepatitis caused by hepatitis C virus infection. *Intern Med* **31**: 493-495, 1992.
  - 17) **Huppertz HI, Niki NPH, Chantler JK**: Susceptibility of normal human joint tissue to viruses. *J Rheumatol* **18**: 699-704, 1991.
  - 18) **Male D, Young A, Pilkington C, Sutherland S, Roitt IM**: Antibodies to EB virus and cytomegalovirus induced antigens in early rheumatoid disease. *Clin Exp Immunol* **50**: 341-346, 1982.
  - 19) **Murayama T, Jisaki F, Ayata M**: Cytomegalovirus genomes demonstrated by PCR in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* **51**: 553-555, 1992.
  - 20) **Nocton JJ, Miller LC, Tucker LB, Schaller JG**: Human parvovirus B19-associated arthritis in children. *J Pediatr* **122**: 874-890, 1993.
  - 21) **Panush RS**: Adenovirus arthritis. *Arthritis and Rheuma* **17**: 534-535, 1975.
  - 22) **Park HK, Seoh JY**: Immunoblot analysis of synovial fluid from arthritis patients for IgG, IgM and IgA antibodies reacting with rubella or mumps viruses. *J Kor Soc Microbiol* **30**: 665-670, 1995.
  - 23) **Park HK, Seoh JY, Chong YH, Kim KH**: Identification of adenovirus 40, 41 in feces from young children with diarrhea by polymerase chain reaction. *J Kor Soc Microbiol* **31**: 591-597, 1996.
  - 24) **Park HK, Seoh JY**: Antigen analysis and restriction fragment length polymorphism of the polymerase chain reaction products of varicella-zoster virus wild strains isolated in Korea. *J Kor Soc Microbiol* **32**: 265-274, 1997.
  - 25) **Ray CG, Gall EP, Minnich LL**: Acute polyarthritis associated with active Epstein-Barr virus infection. *J Am Med Assoc* **22**: 2990-2993, 1982.
  - 26) **Straus SE, Ostrove JMI, Inchausp G, Felser JM, Friefeld A, Croen KD, Sawyer MH**: Varicella-zoster virus infections. *Ann Intern Med* **108**: 221-237, 1988.
  - 27) **Tamm A, Ziegler T, Lautenschlager I**: Detection of cytomegalovirus DNA in cells from synovial fluid and peripheral blood of patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **20**: 1489-1493, 1993.
  - 28) **Taylor-Wiedeman J, Sissons JGP, Borysiewicz LK, Sinclair JH**: Monocytes are major site of persistent of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* **72**: 2059-2064, 1991.
  - 29) **Ueno Y**: Rubella arthritis an outbreak in Kyoto. *J Rheumatol* **21**: 874-876, 1994.