

소아의 Transfusion Transmitted Virus-Like Minivirus 유행률

정 주 영 · 한 태 희*

인제대학교 의과대학 소아과학교실, 진단검사의학교실*

= Abstract =

Prevalence of Transfusion Transmitted Virus-Like Mini Virus in Children

Ju Young Chung, M.D. and Tae Hee Han, M.D.*

Department of Pediatrics and Diagnostic Laboratory Medicine, Sanggye-paik Hospital, Inje University College of Medicine, Seoul, Korea*

Purpose : Transfusion transmitted virus(TTV) is a circular DNA and consists of diverse genotypes and variants. The pathogenicity of TTV is still unclear. Recently another circular single stranded DNA virus, distantly related to TTV was isolated from the sera of blood donors, designated as Transfusion transmitted virus like minivirus(TLMV). TTV and TLMV show greater sequence divergence from each other than between genotypes of TTV. We planned to know the prevalence of TLMV in children.

Methods : TLMV DNA was detected by PCR primers from noncoding region of the genome in 88 children without hepatitis, aged 0~15 years. PCR products derived from 10 children were directly sequenced and phylogenetic analysis was undertaken.

Results : TLMV DNA was detected in 49% of 88 children without hepatitis. The prevalence of TLMV varied with age : <1 y, 16%(4/25); 1~3 y, 62%(18/29); 4~6 y, 43%(7/16); 7~9 y, 16%(1/6); 10~15 y, 66%(8/12). Mixed infection with TTV was confirmed in 22% of 88 children. Phylogenetic analysis of 10 TLMV sequences showed much heterogeneity compared to sequences of GenBank.

Conclusion : TLMV prevalence in children was 49% in Korean children. Our TLMV sequence did not cluster in any sequence of TLMV in the GenBank.

Key Words : Transfusion transmitted virus-like mini virus(TLMV), Children

서 론

Transfusion transmitted virus(TTV)는 1997년 Ni-shizwa 등¹⁾이 수혈 후 발생한 원인 불명의 간염 환자에서 처음으로 분리한 원형 DNA 바이러스이다. TTV는 동물에서 다양한 질환을 유발하는 chicken anemia virus(CAV)와 유사한 구조이며 사람의 간세

이 논문은 2002년 인제대학교 의과대학 학술 조성 연구비의 지원을 받았음.

책임저자 : 정주영, 인제의대 상계백병원 소아과
Tel : 02)950-1073, Fax : 02)950-1955
E-mail : pedchung@sanggyepaik.ac.kr

포와 혈액 내 단핵세포에서 증식함이 확인되었다^{2,3)}. TTV는 초기에는 원인 불명의 간염의 중요한 병원체로 여겨졌지만 정상인에서 높은 유병률이 확인되면서 간염 유발 가능성이 적은 것으로 생각되고 있다⁴⁻⁹⁾. 하지만 TTV는 매우 다양한 유전형이 존재하므로 일부 유전형은 간염을 유발할 수 있을 것으로 생각된다. 최근 Hu 등¹⁰⁾은 원인 불명 간염 환자의 간생검 조직에서 TTV의 증식을 *in situ hybridization*으로 확인하기도 하였다. Transfusion transmitted like minivirus(TLMV)는 2000년 공혈자의 혈액에서 발견된 *circovirus*이며 TTV보다 약간 작은 원형의 DNA 바이러스로 30 nm 이하의 크기와 2,860~2,910개의 염기쌍으로 이루어졌다¹¹⁻¹³⁾. TLMV는 TTV와 같이 유전형이 다양하여 복합 감염이 가능한 것으로 알려지고 있다. TLMV도 유전형에 따른 간염과의 연관성이 있는지에 대해 연구가 필요할 것으로 보인다. TLMV의 유병률은 성인에서 70% 이상으로 보고되고 있지만, 소아의 TLMV 유병률 보고는 매우 적다¹⁴⁾. 국내 소아의 TTV 유병률은 정 등¹⁵⁾이 34%로 보고하였지만 TLMV 유병률에 대한 보고는 아직 없다. 이에 저자들은 국내 소아의 TLMV 유병률을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

2001년 6월부터 12월까지 인제의대 상계백병원을 방문한 간기능이 정상인 소아에서 채혈한 검체 중 TTV DNA에 대해 PCR 검사가 시행되었던 88개의 검체를 대상으로 하였다. QIAamp DNA Mini kit(Qiagen)를 사용하여 200 μL의 혈청검체에서 최종 10 μL를 추출하였다. Accupower(PCR Premix)를 이용하여 20 μL 반응에서 Taq DNA polymerase 1 U, dATP, dCTP, dGTP, dTTP는 각각 250 μM, Tris-HCl(pH9.0) 10 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM를 혼합하였다. 1라운드 PCR은 DNA 10 μL에 M1359(5'-GTT TAT SMC GCY AGAC GGA G-3', sense), M1365(5'-TYT GCG AAW AGG GCS TCT AA-3', antisense) 시발체를 0.5 μL씩 넣고 94℃ 10분, 94℃ 40초, 60℃ 40초, 72℃ 50초, 72℃ 10분의 조건으로 총 55회 시행하였다. 최종 산물 2 μL에

M1360(5'-GAA GGTGAG TGA AAC CAC CG-3', sense), M1366(5'-AGG GCS TCT AAW TCT CCK TC-3', antisense) 0.5 μL와 증류수 17 μL를 혼합하여 semi-nested PCR을 1라운드와 동일한 조건으로 총 55회 시행하였다. 최종산물(340 b.p.)은 2% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다. NCR 시발체를 이용한 PCR에 의한 산물을 ABI 3730 analyzer (Applied Biosystem, USA)에 의해 직접 염기서열 분석을 양방향으로 시행하였다. Sequencer analyzer 5.0을 이용하여 alignment를 시행하고 neighbor-joining 방법으로 계통 분석을 시행하였다. GenBank에 저장된 TLMV DNA 서열을 추출하여 비교하였다.

결 과

TTV에 대한 PCR 검사가 시행되었던 0세부터 15세까지의 소아 88명의 혈청 검체를 대상으로 semi-nested PCR을 시행하여 TLMV 양성을 확인하였다(Fig. 1). 전체 소아 연령의 TLMV 양성률은 49%(43/88명)였다. 연령에 따른 TLMV 양성률은 1세 미만 36%(9/25명), 1~3세군 62%(18/29명), 4~6세 43%(7/16명), 7~9세 16%(1/6명), 10~15세군 66%(8/12명)이었다(Table 1).

TLMV와 TTV의 혼합 감염이 전체의 22%(19/88명)에서 확인되었다. TTV는 음성이고 TLMV만 양

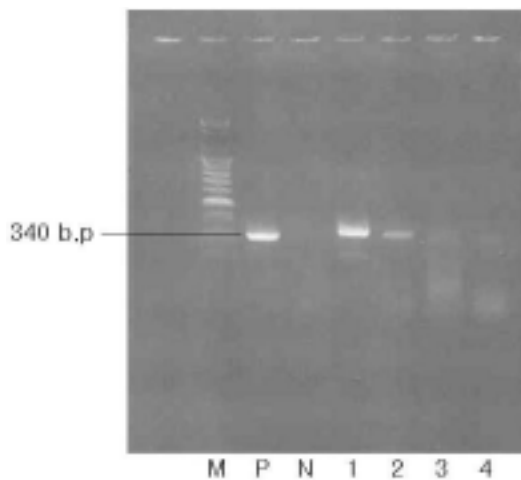


Fig. 1. TLMV gene amplification by PCR using M1359 and M1360 primers. M: molecular size marker, P: positive control, N: negative control.

성인 소아는 전체의 27%(24/88명)이었다.

PCR 산물 10례에 대한 TLMV 염기서열 분석을 시행한 결과 GenBank에 존재하는 염기 서열과 큰 차이가 있었다(Fig. 2).

고 찰

TTV는 TLMV가 발견 전에 인체 감염이 일어나는 원형 DNA 바이러스로 처음 알려지면서 *Circoviridae*로 명명되었다¹⁶⁾. 2000년 Takahashi 등¹⁷⁾이 TLMV를 분리하여 TTV와 TLMV는 single stranded, circular DNA 바이러스로 구조가 매우 유사함이 밝

혀졌다. 이후에 TTV와 TLMV는 CAV가 포함된 *Paracircoviridae*로 분류되다가, 최근에는 국제 바이러스 명명 위원회가 TorqueTenoVirus, TLMV는 TorqueTenoMiniVirus로 분류하였다³⁾.

TLMV는 자궁경부 분비물, 말초 혈액 단핵구, 분변 및 타액에서 검출되었다¹⁷⁾. 타액과 분변에서의 검출은 분변-경구 감염이 중요한 감염 경로일 가능성을 의미하지만 각 감염 경로의 임상적인 의미와 중요성에 대해서는 추가 연구가 필요하다. TTV 감염의 유행률은 건강한 성인에서 35~90%에 달하며 다른 유전형간의 혼합 감염이 가능한 것으로 알려져 있다^{6~8)}. TLMV 감염의 유행률에 대한 연구는 TTV에 비해 적은 편이며 브라질 72~77%, 프랑스 76~77%, 노르웨이 48%, 일본 76%로 보고되었다^{14, 18~20)}. TLMV는 TTV와 같이 세계적으로 많은 인구가 감염되어 있는 것으로 보이지만 소아 연령의 TLMV 감염에 대한 연구는 매우 드문 편이다. Vasconcelos 등¹⁴⁾은 브라질 소아의 TLMV 유행률을 78%(11세 이하는 94%)라고 하였다. Matsubara 등²⁰⁾은 신생아에서 TLMV DNA 양성률이 72%(8/11명)였으며 이는 모체-영아의 수직 감염이 일어남을

Table 1. Prevalence of TLMV DNA among Children

Age(years)	Tested(No.)	Positive(%)
<1	25	36
1~3	29	62
4~6	16	43
7~9	16	16
10~15	12	66

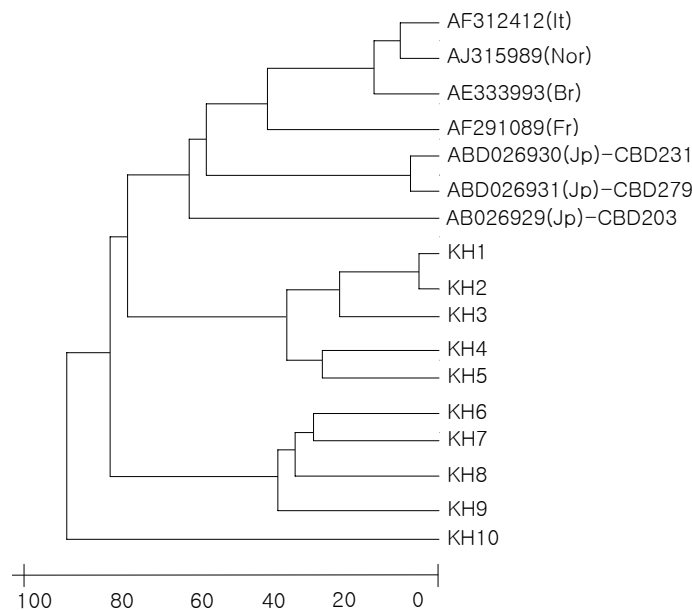


Fig. 2. Phylogenetic tree constructed with 10 nucleotide sequences in the NCR of the TLMV genome. The name of the GenBank accession numbers are given(It : Italy, Nor : Norway, Br : Brazil, Fr : France, Jp : Japan, KH : Korean healthy).

의미한다고 하였다. 본 연구는 국내 소아의 TLMV 감염 유병률에 대한 첫 보고이다. 국내 소아의 TLMV 유병률은 49%로 다른 나라에 비해 낮았다. 이는 지역에 따른 차이와 실험에 사용된 시발체의 차이에 의한 것으로 생각된다.

TTV와 TLMV는 재조합(recombination)이 잘 일어나므로 다른 유전형간의 혼합 감염이 발생할 수 있는 것으로 알려져 있다. 한 사람에서 다양한 유전형의 TTV 혼합 감염이 확인되었으며, TLMV도 면역 능력이 결핍된 환자의 혈액에서 15가지 strain이 확인되기도 하였다¹⁴⁾. 본 연구에서도 21%의 소아에서 TTV와 TLMV의 혼합 감염이 있었으며, TTV와 TLMV가 독립적으로 증식함을 확인할 수 있었다.

일부 연구에서 TLMV 염기서열이 계통도에서 특정군을 형성하지 않는 다양한 분포를 보였으며 이는 지리적 차이보다는 재조합에 의한 결과로 분석되었다^{14, 18)}. 본 연구에서 TLMV DNA 양성 산물 10건의 염기 서열을 분석한 결과 GenBank에 존재하는 다른 나라의 TLMV 염기 서열과 많은 차이를 보였다. 이는 국내에 특이한 TLMV 유전형이 존재할 가능성도 있지만, 재조합에 의한 단순한 변이를 반영한 것일 수 있으므로 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

요 약

목 적: TTV는 인체 감염이 확인된 최초의 circovirus로 간염을 유발할 가능성에 대해 연구가 이루어지고 있다. TLMV는 최근에 발견된 circovirus로 TTV보다 작지만 유사한 구조를 가진 것으로 알려져 있다. TLMV 감염의 성인 유병률은 약 70%인 것으로 알려지지만 소아의 유병률은 아직 확실하지 않다. 이에 저자들은 국내 소아의 TLMV 유병률을 알아보기 위하여 시행하였다.

방 법: 2001년 6월부터 12월까지 인제대 상계 백병원 외래를 방문한 환자중 TTV DNA에 대한 PCR이 시행되었던 88명의 혈청 검체를 대상으로 하였다. TLMV의 5'NCR(noncoding region) 특이적 시발체를 이용하여 PCR을 시행하였다. 1라운드 PCR은 M1359, M1365 시발체를 사용하여 94℃ 10

분, 94℃에서 40초, 60℃에서 40초, 72℃에서 50초, 72℃에서 10분의 조건에서 55회 시행하였다. 최종 산물 2 μL에 M1360, M1366 시발체를 사용하여 1라운드와 동일한 조건에서 PCR을 55회 시행하였다. TLMV PCR 양성이 나온 10건에 대해 직접 염기 서열 분석과 계통 분석을 시행하였다.

결 과: 소아 전체 연령에서 TLMV 감염 유병률은 49%였다. 연령별 유병률은 생후 1세 미만은 36%, 1~3세는 62%, 4~6세는 43%, 7~9세는 16%, 10~15세는 66%였다. 전체 소아의 22%에서 TTV와 TLMV의 혼합 감염이 확인되었다. TLMV PCR 산물 10건에 대한 염기 서열 분석을 시행한 결과 다른 나라의 TLMV 염기 서열과 많은 차이가 나타났다.

결 론: 국내 소아의 TLMV 유병률은 49%로 비교적 높았으며 TLMV와 TTV와 혼합 감염이 발생할 수 있었다. 국내에서 유행하는 TLMV의 유전형이 다른 나라와 큰 차이가 있을 가능성이 있지만 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

참 고 문 헌

- 1) Nishizawa T, Okamoto H, Konish K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A Novel DNA virus(TTV) associated with elevated transaminase levels in post-transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:92-7.
- 2) Okamoto H, Nishizawa T, Kato N. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus(TTV) associated with post-transfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepato Res* 1998; 10:1-16.
- 3) Hino S. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA virus. *Rev Med Virol* 2002;12:151-8.
- 4) 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.
- 5) Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota

- M, Ma X, Hayashi, et al. Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *J Med Virol* 2000;104-8.
- 6) 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.
 - 7) Prescott LE, Simmonds P. Global distribution of transfusion transmitted virus. *N Engl J Med* 1998;339:776-7.
 - 8) Takahashi K, Hoshino H, Ohta Y, Yoshida N, Mishiro S. Very high prevalence of TT virus infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatol Res* 1998;12:233-9.
 - 9) Germer P. TT virus infection in healthy children and in children with chronic hepatitis B or C. *J Pediatr* 2000;136:606-10.
 - 10) Hu ZH, Lang ZW, Zhou YS, Yan HP, Huang DZ, Chen WR, et al. Clinico-pathological study on TTV infection in hepatitis of unknown origin. *World J Gastroenterol* 2002;8:288-93.
 - 11) Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, Mishiro S. Identification of human DNA virus(TT-like mini virus) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* 2000; 145:979-31.
 - 12) Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov E, Mishiro S. Full or near full length nucleotide sequence of TTV variants and TT virus-like mini virus. *Intervirology* 2000;43:119-23.
 - 13) Biagini P, Gallian P, Attoui H, Touissi M, Cantaloube J, Micco P, et al. Genetic analysis of full length genomes and subgenomic sequences of TTV-like mini virus human isolates. *J Gen Virol* 2001;82:379-83.
 - 14) Vasconcelos HCF, Cataldo M, Niel C. Mixed infections of adults and children with multiple TTV-like Minivirus isolates. *J Med Virol* 2002; 68:291-8.
 - 15) Chung JY, Han TH, Hwang ES. The prevalence of Transfusion-transmitted virus infection in children. *Kor J Pediatr* 2004;47:183-6.
 - 16) Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, et al. Molecular and biophysical characterization of TTV; evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:3177-82.
 - 17) Forani C, Maggi F, Vatteroni ML, Istello M, Benideli M. High prevalence of TT virus and TTV-like Mini virus in cervical swabs. *J Clin Microbiol* 2001;39:2022-4.
 - 18) 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.
 - 19) Moen EM, Huang L, Grinde B. Molecular epidemiology of TTV-like mini virus in Norway. *Arch Virol* 2002;147:181-5.
 - 20) 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.