

輸血傳染性病毒 (TTV): 在健康人與 C 型肝炎病毒抗體病例的陽性率

摘 要

輸血傳染性病毒 (Transfusion-transmitted virus; TTV) 於 1997 年由 Nishizawa 發現並報告。經過三年時間, 依據世界各國的眾多研究報告, 已知該 TTV 病毒與 HGV 病毒相似, 廣泛且普遍存在於人體的病毒, 主要經體液途徑傳染, 但也有不能排除經口感染的可能性。但 TTV 的感染似乎與明顯的肝疾病的致病原因無直接之關係。其盛行率也因地、因不同研究群組而異, 廣跨自 10% 至 80~90% 之範圍。在台灣亦有數位研究者的報告。本研究之目的在於求證在台灣族群之陽性率是否與以往各地的報告有否差異。利用聚合酵素連鎖反應及基因序列分析法, 分析 TTV DNA 在如後各研究對象組的感染流行情形。研究對象分三組: 1) 300 例健康檢查正常人 (ALT 正常, 平均年齡 25,8 歲); 2) 53 例 anti-HCV 陽性, ALT 正常的人 (男: 36 例, 女性: 17 例, 平均年齡: 34,5 歲)。3) 300 例 anti-HCV 陽性, ALT 檢查異常病例 (男: 148 例, 女: 152 例; 平均年齡: 36,4 歲)。以聚合酵素連鎖反應測定 TTV-DNA, 並以基因序列分析法分析 TTV-DNA 的基因型。TTV DNA 之陽性率在 anti-HCV 陰性與陽性

例各為 9%及 31% ($p < 0.05$)，提示 TTV DNA 的感染與 C 型肝炎病毒感染有相關之可能性。ALT 的正常與否與 TTV-DNA 的陽性率並無關係。本研究對象的 TTV-DNA 的主要基因型為基因型 I (約佔 73%)，其亞型則為基因型 IA (佔 53%)，基因型 IB (佔 47%)。此外，我們也發現了四種從未被報告過的亞型。本研究的健康人和 anti-HCV 陽性病例的 TTV-DNA 陽性率與以往各國和台灣的報告有些異同，表示如同已有的共識，即 TTV 的感染在不同地域或不同的群組會有不同的感染率。至於，是否與 C 型肝炎病毒感染有密切關係，則尚待證實。四種新基因型的存在，表示 TTV 病毒基因型及亞型的多樣性。

前 言

眾所皆知，經過輸血傳染肝炎的病毒，主要為 B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus; HBV) 及 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus; HCV) 兩種。G 型肝炎病毒 (Hepatitis G Virus; HGV) 於 1995 年及輸血傳染性肝炎病毒 (Transfusion-transmitted Virus; TTV) 於 1997 年，也被相繼發現。TTV 在肝功能檢查不正常的病人血液裡，常常可以偵測到。目前的研究顯示，TTV 感染，是一個在全球、各地、各種族，非常普遍的一種病毒感染^(1,2,3,4, 19,20)。

TTV 是一種 DNA 病毒。該病毒含單股的 DNA 基因體，至少含有 3.739 鹼基。病毒大小為 30-50nm，無外套膜 (non-enveloped)。有一些特性與 Parvoviruses 很類似。例如較輕的沉積密度係數 (1.26 g/cm)。該病毒在遺傳上有很大的變異。目前被歸屬於 *Circinoviridae* 病毒科。目前有兩種不同之基因型。它們在核糖核酸序列上，約有百分之三十的差別^(5,6)。

因為，在捐血人輸過凝血因子的病例、嚴重及輕微慢性肝病病例中，TTV 常常被發現，所以，該病毒被認為可能經輸血或血液製劑來傳染。在歐美，超過一半的血液製劑產品，均被證明含有該肝炎病毒的基因體^(1,2,3,4)，因此，與血液直接或間接接觸過的病人，感染該病毒的機會都很高。另外，值得注意的是該病毒，也在唾液或糞便中被發現^(9,10)，我們並不能排除口糞感染的可能

性。這在非洲一些特定國家一般民眾高達百分之八十以上的感染率，但卻無輸血紀錄的觀察中，得到間接的支持證明。

大部份血清裡含有TTVDNA的病例的肝功能檢查，均無顯著之異常⁽¹⁾。雖然，少數國外學者曾發現該病毒的存在與臨床症狀發生的時刻可能的相關，但這結果，仍是值得再探討。迄今，該病毒是否會在病理上扮演任何角色，仍沒有明顯的直接證據^(7,8,9)，值得專家學者繼續探討。雖然如此，追蹤該病毒的分子足跡，卻可瞭解其病毒傳染之可能機制，且具有公衛的參考價值。

本研究主要目的在瞭解該病毒在台灣一般人可能的流行情形及其可能之傳染途徑。在本研究裡，利用聚合酵素連鎖反應分析 TTV-DNA 在健康人與 C 型肝炎病例患的流行情形與其對肝功能檢查之可能的影響。最後，利用基因序列分析與比對，確立本土病毒性基因型種類。

材料與方法

研究對象

研究組族群總共分為 3 組：第一組為控制組群 (control group) 共 300 位至採檢醫院參加健康檢查的健康人。肝功能檢查正常 (平均年齡 25.8 歲；請見表一)。HBsAg 陰性，Anti-HCV 陰性。第二組為 53 例 anti-HCV 陽性 ALT 正常的人 (男性：36 例，女性：17 例；平均年齡 34.5)。第三組為 300 例 anti-HCV 陽性且 ALT 異常的人 (男性 148 位，女性 152 位；平均年齡 36.4)(請見表一)。這些檢體分別從台北捐血中心、台南捐血中心、台北市立忠孝醫院、宜蘭羅東博愛醫院、彰化基督教醫院、屏東基督教醫院、衛生署澎湖醫院等收集得來。

在本研究中，以 ALT(alanine aminotransferase)代表肝功能檢查，其正常值 (參考值) 定義為低於 45U/L。anti-HCV 則是先利用二代 Murex 試劑

做偵測，然後再利用 Abbott Assay (second generation) 試劑做確認。

TTV DNA偵測

本研究所使用之材料為取自捐血中心及醫院之血清檢體。該血袋或血清檢體經冷凍運輸至本實驗室，分裝後保存於-20°C冰箱內。使用QIAamp Blood kit (QIAGEN Ltd, Crawley, UK) 試劑直接從 100µl血漿(或血清)分離DNA。然後，再將分離出的DNA溶入 50µl緩衝液內。TTV-DNA是使用TTV專一的啟動引子，在 50µl PCR mixture混合液 (內含 5µl分離出的DNA，1 x PCR buffer，0.2mM deoxynucleoside triphosphates，2 mM magnesium chloride，0.5 U Tag polymerase)，以及使用溫度循環器Perkin Elmer (PE4800)機器的條件下複製完成的。該聚合酶反應為二輪式(semi-nested)。第一輪的複製所使用之引子為：5'-ACA GAC AGA GGA GAA GGC AAC ATG-3'(Primer A; 10pmol)

5'-CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA AGT T-3'(Primer B; 10pmol)。第二輪的複製所使用的是：5'-GGC AAC ATG TTA TGG ATA GAC TGG-3'(Primer C; 10pmol)

5'-CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA AGT T-3' (Primer B; 10pmol)。每輪在複製時的溫度循環變化如下:94°C, 30 seconds; 58°C, 30 seconds; 72°C, 30 seconds。總共 25 cycles。結果為陽性之檢體，則將有 272bp長之合成產物。經過Ethidium bromide染色後，該產物可以在 2% agarose紫外光照射下觀察出來。為求得該PCR結果的專一性，陰性的控制組被重複的利用該引子來偵測。

在每一個實驗裡，一個含有TTV-DNA的血清檢體(原檢體經基因分析確認後，編號為W101)及另外一個未含TTV-DNA的血清檢體(原檢體經重覆PCR確認後為陰性，編號為W102)被分別利用來當成陽性及陰性對照(請見圖一)。利用以前作者開發的方法估計，該檢體含TTV-DNA量約為 10^7 - 10^8 分子/毫升⁽¹⁵⁾。本實驗所使用之偵測TTV-DNA方法之敏感度大約為

10-100 TTV-DNA分子/毫升。

基因序列分析

複製後之 TTV-DNA 經過純化 (QIA quick PCR purification kit; Qiagen LTD, Germany)後直接進行基因序列分析。所使用自動序列分析儀為 ABI 310 automated DNA sequencer; Applied Biosystems, Foster City, CA 並利用螢光染料終結循環方法(fluorescent dye terminator cycle method) 執行。

遺傳族譜分析

將本研究得到的本土 TTV-DNA 基因序列與目前已經在基因銀行 (GenBank database; release 110)公告之 10 組基因序列比對分析 (包括了從日本與歐洲分離出來之 TTV-DNA 序列)。DNA 序列是利用 Clustal W 方法來進行比對⁽¹⁶⁾。DNA 序列相互之間基因譜關係則是利用 neighbour-joining 方法來估計⁽¹⁷⁾。

統計方法

統計方法使用 Sigma Plot 之 t-test。P 值低於 0,05 在統計上有意義。

結 果

流行情況

TTV 型肝炎病毒 DNA 經由聚合酶反應後，所得片斷長度為 272bp，如圖一。根據這項實驗，在一般參加健康檢查的國人中，TTVDNA 在血清中的陽性率為 9% (27/300)。(請見圖一)

與C型肝炎患者之關係

從表一可知 Anti-HCV 及 TTV DNA 的陽性率。TTV DNA 在 anti-HCV 陰性與 anti-HCV 陽性身上之陽性率分別為 9%及 31% ($p<0.05$) (請見表一)。

此項結果顯示，TTV DNA 的感染，在統計學上，似乎與 C 型肝炎病毒感染極為相關。

本土性TTV基因型與其分佈

為瞭解該病毒傳染源與傳染途徑，我們特別利用分子生物的工具將該病毒的基因序列定出，與國外病毒株的基因序列比對、分析本土 TTV 株的變異情形。台灣 TTV 感染者之個案資料及其基因型分佈，如表二。研究結果顯示，台灣的主要 TTV 株仍為基因型 I（約佔 73%）。倘若再細分為亞型，所得之基因亞型分佈為基因型 IA（佔 53%）、基因型 IB（佔 47%）。在本研究中，我們發現了四種與目前已經分離之其他 TTV 株不同的新亞型株。

討 論

TTV 是一高變異性的病毒，自從於 1997 年被發現後，陸續有很多 TTV 變異型與地理分佈的關係之報告。根據基因序列分析結果，該病毒在 ORF1 基因序列範圍間有極大之變異。依據 Okamoto 等人的報告，該區約 200 鹼基的基因序列，其變異程度可達 30% 以上⁽¹⁰⁾。

不同之引子，對病毒之偵測具有不同之專一性與敏感度。以本實驗所用之引子(ORF1)在健康控制組血清中的 TTV DNA 的陽性率為 9% (27/300)。TTV DNA 在 anti-HCV 陰性與 anti-HCV 陽性身上之陽性率分別為 9% 及 31% ($p < 0.05$)，此結果可能表示，TTV DNA 的感染似乎與 C 型肝炎病毒感染有些相關。有關在臺灣之 anti-HCV 陽性族群中之 TTV DNA 之陽性率，Kao 等⁽¹⁶⁾及 Ho 等⁽¹⁷⁾的報告分別為 37% 及 15%。雖然，與本研究結果之 31% 有差異，但因材料取樣與地區之不同使然。肝功能檢查的正常與否並不與 TTV 感染與否而有差異 (31% VS 37% ; $p > 0.05$)。

TTV 在全球最主要的基因型為基因型 I (Genotype I)。在本研究中，台灣的主要 TTV 株為基因型 I（約佔 73%），其中基因型 IA、基因型 IB 則分別佔 53%、47%。此外，我們也發現了數種新的亞型。該新的亞型與目前已經分離之其他 TTV 病毒株顯然不同。

從本實驗結果得知，在選定研究族群裡，TTV 感染似乎與 C 型肝炎病毒

感染有些相關。另外，數種新基因型之發現，佐證各國所報告基因型之多樣化。是否有特殊意義，則尚待研究。

撰稿者

王傳亨¹、林明賢²、楊增慧³、羅勝雄³、邱展賢²、蘇正川²、盧錫祺⁴、蘇維文⁴、施木青⁴、李洮俊⁵、陳聰安⁶、黎蕾⁷、盧世乾⁸、陳光爐¹、陳淑媛¹、Sabine Schleicher⁹、Bertram Flehmig⁹、盧志對¹、許須美¹

1 行政院衛生署疾病管制局

2 台北市立忠孝醫院

3 羅東博愛醫院

4 彰化基督教醫院

5 屏東基督教醫院

6 衛生署澎湖醫院、

7 台北捐血中心

8 台南捐血中心、

9 德國杜賓根大學醫學院衛生研究所醫用病毒及病毒性疾病流行病學系

*聯絡住址： 115 台北市南港區昆陽街 161 號

電話： 02 27850513 ext 437

電子郵件： chwang01@cdc.gov.tw

參考文獻

1. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997 ; 241: 92-97.
2. Simmonds P, Davidson F, Lycett C, et al. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998 ; 352: 191-195.

- 3.Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, et al. Molecular cloning and characterisation of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* 1998 ; 10: 1-16.
- 4.Naoumov N., Petrova EP, Thomas MG, et al. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 1998 ; 352: 195-197.
- 5.Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TTV virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 1999; 260:17-22.
- 6.Abe K, Inami T, Asano K, et al. TTV virus infection is widespread in the general population from different geographic regions. *J.Clin.Microbiol.*1999;37:2703-5.
- 7.Charlton M, Adjei P, Poterucha J, et al. TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 1998 ; 28: 839-842.
- 8.Ikeda J, Takasu M, Inoue K, et al.Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J. Hepatol.* 1999 ; 30: 202-121.
- 9.Naoumov NV. TT virus- highly prevalent but still in search of a disease. *J. Hepatol.* 2000 ; 33: 157-159.
- 10.Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M. A novel unenveloped DNA virus TTV virus

- associated with acute and chronic non-A to G hepatitis *Intervirology* 1999;42:196-204.
- 11.Okamoto H, Akahane Y, Ukida M, et al. Fecal excretion of a non-enveloped DNA virus (TTV) associated with post-transfusion non A-G hepatitis. *J.Med.Virol.* 1998; 56:128-132.
- 12.Ross RS, Viazov S, Runde V, et al. Roggendorf M, Detection of TTV virus DNA in specimens other than blood. *J.Clin.Virol.* 1999; 13:181-184.
- 13.Wang CH, Tschen SY. Affinity capture-polymerase chain reaction for quantitation of hepatitis B virus DNA. *Nucl.Acids Res.*1994;22:4837-4839.
- 14.Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl.Acids Res.* 1994; 22:4673-4680.
- 15.Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing evolutionary trees. *Molecular Biology and Evolution.* 1987; 4:406-425.
- 16.Kao JH, Chen W, Chen PJ, et al. TT virus infection in patients with chronic hepatitis B or C: influence on clinical, histological and virological features. *J.Med.Virol.* 2000; 60:387-92.
- 17.Dai CY, Yu ML, Chuang WL et al. The epidemiology of TT virus (TTV) infection in a hepatitis C and B virus hyper-endemic area of southern Taiwan.

Kaohsiung J Med. Sci. 2000 ; 16:500-9.

- 18.Ho TF, Yang SC, Huang YT et al. TT virus infection in screened Taiwanese blood donors. Vox Sang 2000; 79:198-200.
- 19.Simons JN, Leary TP, Dawson GJ et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis Nat.Med.1995;1:564-9.
- 20.Linnen J, Wages JJ, Zhang-Keck ZY et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus; a transfusion transmissible agent. Science 1996; 271:505-8.

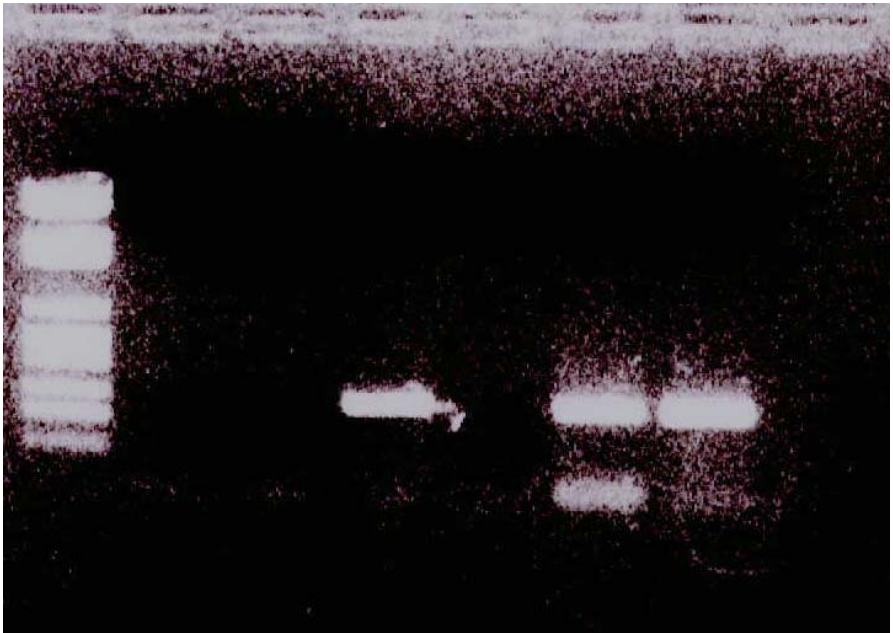
表一 TTV DNA 在 C 型肝炎陽性與陰性個案的陽性率

病人族群分類	TTV DNA 陽性(%)	TTV DNA 陰性(%)	病人總數	平均年齡
第一組： anti-HCV 抗體陰性；HbsAg 陰性/ALT<45U/L（代表一般健康國人）	27(9)	273(91)	300	25.8
第二組： Anti-HCV 抗體陽性；ALT<45U/L（代表健康國人雖曾感染 C 型肝炎病毒但肝功能正常無明顯症狀）	15(31)	38(69)	53	34.5
第三組： Anti-HCV 抗體陽性；ALT>45U/L（代表 C 型肝炎病毒感染病患且肝功能異常）	111(37)	189(63)	300	36.4

圖一 TVDNA 專一之聚合酵素反應電泳圖

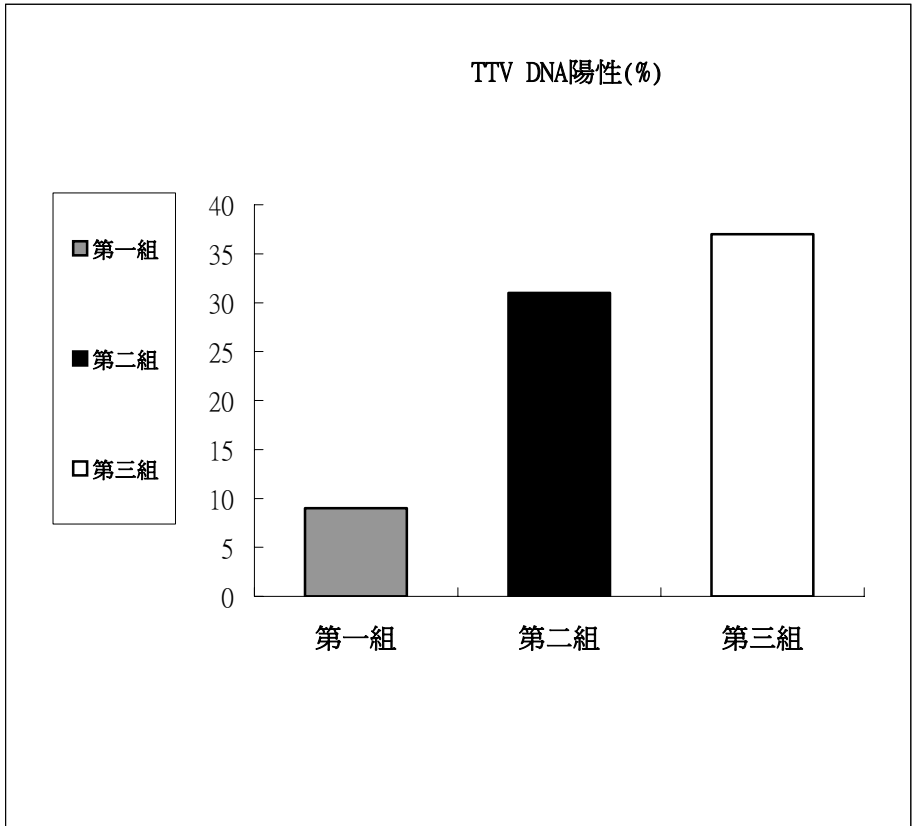
第一排至第五排為檢測之檢體（其中 1，2，4 為陰性；3，5 為陽性）；第六排為陽性對照（No.W101）；第七排為陰性對照（No.W102）；第 M 排為 DNA 長度標記片斷（DNA Standard VI Marker, Boehringer Mannheim，Germany）

M 1 2 3 4 5 6 7



圖二 TTV 在 C 型肝炎陽性與陰性族群的散佈情形

第一組: Anti-HCV 抗體陰性; HbsAg 陰性/ALT<45U/L (代表一般健康國人);
第二組: Anti-HCV 抗體陽性; ALT<45U/L (代表健康國人雖曾感染 C 型肝炎
病但肝功能正常無明顯症狀); 第三組: Anti-HCV 抗體陽性; ALT>45U/L (代
表 C 型肝炎感染病患且肝功能異常)



表二 台灣 TTV 感染者之個案資料及其基因型分佈

附註：F：女性；M：男性；Ia/Ib：介於基因型 Ia 及基因型 Ib 之間；None：在基因銀行尚無相似之病毒基因型資料

病人代號	年齡	性別	肝指數 (ALT)	病毒株代號	TTV 基因型	與基因銀行 (Genebank)相似 之基因型
TTV89-001	22	M	35	TW16	Ib	AF07273820
TTV89-002	21	M	27	TW17	Ib	AB011494
TTV89-003	21	F	20	TW27	IId	None
TTV89-004	23	M	10	TW29	IId	None
TTV89-005	37	M	11	TW28	IId	None
TTV89-006	22	M	39	TW30	IId	None
TTV89-007	29	F	26	TW21	Ia	AF055897
TTV89-008	21	F	22	TW22	Ia	AB011487
TTV89-009	18	M	26	TW19	Ia/Ib	AB008394
TTV89-010	39	F	11	TW20	Ia/Ib	AB008394
TTV89-011	18	M	15	TW25	Ia/Ib	AB008394
TTV89-012	23	F	13	TW26	Ia/Ib	AB008394
TTV89-013	28	F	10	TW24	Ia/Ib	AB008394
TTV89-014	22	M	17	TW23	Ia/Ib	AB008394
TTV89-015	26	F	7	TW18	Ib	AB011491