

## 緒論 ( Introduction )

### 一、前言 (Introduction)

輸血普遍都有一定程度潛在的危險性，而其中又以病毒感染是最常見的。病毒感染可能是短暫性的或持續性的，有的無臨床症狀，有的會導致衰竭甚至致命。病毒在複製時可能直接破壞寄主細胞而導致免疫系統調節的功能受損，也有可能完全沒有細胞病理的出現。然而成功的病毒是沒有傷害性的、持續感染的、有高度地傳染性和在人口中時常出現 ( Simmonds et al., 2002 )。

由於輸血可能傳染病毒，因此很多開發中國家已經開始提高輸血的安全性。目前已知經由輸血而傳染的病毒有肝炎病毒 ( hepatitis viruses ) 如：A 型到 G 型肝炎病毒 ( hepatitis A~G virus ; HAV~HGV )；皰疹病毒 ( herpes viruses ) 如：巨細胞病毒 ( cytomegalovirus ; CMV )、EB 病毒 ( Epstein-Barr virus ; EBV )、人類皰疹病毒 ( human herpes virus 8 ; HHV-8 )；反轉錄病毒 ( retroviruses ) 如：人類 T-細胞白血病毒 ( human T-cell leukemia virus ; HTLV-I、HTLV-II )、人類免疫不全病毒 ( human immunodeficiency virus ; HIV-1、HIV-2 )；人類小核糖核酸病毒 B19 ( human parvovirus B19 ; B19 ) ( Simons et al., 1995 ; Jarvis et al., 1996 ; Linnen et al., 1996 )；輸血傳染病毒 ( transfusion-transmitted virus ; TTV ) ( Nishizawa et al., 1997 )；SEN virus ( SENV )；Sentinel virus ( SNTV ) ( Mushahwar et al., 2000 )。

發展 C 型肝炎的篩檢分析是預防輸血後感染非 A、非 B 型肝炎相當重要的檢查 ( Simmonds et al., 1998 )。然而在經過 B 型肝炎、C 型肝炎篩選過後仍然有輸血後肝炎的發生，另外，有一部分病人經由輸血而感染急性或慢性肝炎、肝硬化、猛暴型肝炎的病例，卻在病毒肝炎標記 ( hepatitis A to G ) 檢查上呈現陰性反應 ( Feray et al., 1993 ; Kanda et al., 2001 )，因此，此種不明原因導致嚴重的肝衰竭和慢性肝炎是否由其他未知的肝炎病毒所引起，已引起許多學者的興趣 ( Naoumov et al., 1998 )。

## 二、TT 病毒的發現與分類 (Discovery and Classification of TTV)

在 1997 年，日本人 Nishizawa 等人使用 representational difference analysis (RDA) 方法 ( Lisitsyn et al., 1993 ; Nishizawa et al., 1997 )，首先在輸血後感染非 A 到 G 型肝炎病人的血清檢體，分離出新的選殖病毒株 ( N22 ) DNA 片斷，含有 500 個 nucleotides，與先前所發表的任何病毒序列都不同，因為是輸血後才感染的病毒，所以最後命名為輸血傳染性肝炎病毒 ( Transfusion-transmitted Virus ; TTV )，此病毒 DNA 對 DNase I 敏感，而且也對 Mung Bean nuclease 相當敏感，所以此病毒應該是單股的 DNA 病毒 ( Okamoto et al., 1998a )。在 5 位非 A 到 G 型肝炎病患中曾檢測出 3 位 TT 病毒呈現陽性的病患，在這 3 位病患中 ALT 值都有升高的趨勢，而且與 TT 病毒的病毒量 ( Titers ) 多寡似乎有關聯性，這樣的結果顯示 TT 病毒可能是有能力誘發輸血後非 A 到 G 型肝炎的新型 DNA 病毒。TT 病毒在肝功能檢查不正常的病患血液檢體中時常被偵測到，在 1998 年報告中提到有 47 % 的猛暴型肝炎病患與 46 % 的不明原因的慢性肝病患者可以檢測出 TT 病毒 DNA，而在肝臟組織做 TT 病毒 DNA 檢測其病毒量比在血清中高出 10 到 100 倍。從以上的結果指出 TT 病毒可能在一些不明原因的急性和慢性肝病扮演著一個重要的角色 ( Kanda et al., 2001 )。

在流行病學研究顯示，TT 病毒感染不僅在日本盛行而且在全世界各地 ( 亞洲、歐洲、北美洲、南美洲、非洲、大洋洲 ) 和各種族都是非常普遍的一種病毒感染 ( Charlton et al., 1998 ; Naoumov et al., 1998 ; Prescott et al., 1998 ; Simmonds et al., 1998 ; Tanaka et al., 1998a ; Woodfied et al., 1998 ; Okamoto et al., 1999a ; Tanaka et al., 1999 )。

TT 病毒的基因體 ( genome ) 是由具有環狀結構 ( Miyata et al., 1999 ; Mushahwar et al., 1999 ) 的單股 DNA ( Okamoto et al., 1998a ) 所組成，雖然單股環狀 DNA 的病毒已經存在，例如：細菌性病毒 *Microviridae* 科、植物性病毒 *Geminiviridae* 科以及 *Circoviridae* 科，而 TT 病毒是第一個具有單股環狀 DNA 的人類病毒。*Geminiviridae* 科的成員擁有一個以上的環狀 DNA，*Circoviridae* 科包含有植物和動物病毒。TT 病毒跟 *Circoviridae* 科成員之一的 chicken anemia virus

(CAV) 病毒同樣具有單股環狀 DNA。因此，TT 病毒暫時被視為 *Circoviridae* 科成員之一 (Miyata et al., 1999)，但另一方面也有人建議 TT 病毒應歸於另一個新的 *Circinoviridae* 科 (Mushahwar et al., 1999)。 *Circovirus* 屬的病毒基因體是 ambisense，這是由於最大的 Rep 蛋白是由 sense 股所解碼而其他兩個較小的蛋白質由 antisense 股解碼 (Niagro et al., 1998)。 *Circovirus* 屬包含有動物和植物病毒，例如：porcine circovirus (PCV) 病毒、psittacine beak and feather disease virus (PBFDV) 病毒和 banana bunchy top virus (BBTV) 病毒。 *Circovirus* 屬的病毒在複製起源處 (replication origin) 具有共同的由九個 nucleotides 所形成的 stem-loop 結構。

TT 病毒根據其基因體大小差異可分為兩種，一個是 3.9 kb 最初的 TT 病毒，一個是 2.9 kb 縮小的 TTV (TTV-like mini virus; TLMV) 病毒 (Takahasi et al., 2000a; Takahasi et al., 2000b)。雖然這兩個病毒的基因體大小是相當不同，但它們彼此卻具有一些共同的特徵，不但在非解碼區域 (non-coding regions) 附近的 GC-rich stretch 和佔據大約三分之一的基因體而且推測的複製起源處 (replication origin) 的結構彼此都十分相似，而這兩種病毒在解碼區域 (coding regions) 的結構彼此也是相似的。因為 TT 病毒是環狀的病毒所以屬於 *Circoviridae* 科，而有團體提出 TT 病毒及其相關的病毒 (如 TLMV 病毒) 分類到新的 *Anellovirus* 屬 (ring)，TT 病毒新的全名為 Torque-Teno Virus (TTV) 病毒，TLM 病毒新的全名為 Torque-Teno Mini Virus (TTMV) 病毒。頭字語選擇 torque (necklace) 和 tenusi/teno (thin)，因此仍保有廣泛使用的名稱 TTV (Takahasi et al., 2000a; Takahasi et al., 2000b; Hino et al., 2002)。

TTVs 由超過 30% nucleotide 變異的病毒所組成，在分類上至少有 16 種 subgroups (Okamoto et al., 2000a)，而單一的寄主可以被不同進化分支 (clades) 的 TTVs 所感染 (Okamoto et al., 1999b; Takayama et al., 1999a; Niel et al., 2000; Hino et al., 2002)。

### 三、TT 病毒的分子特性 (Molecular Properties of TTV)

#### (一) 病毒學的特徵 (Virological Characteristics)

TT 病毒全長約 3.7~3.9 kb，無外套膜( non-enveloped )( Naoumov et al., 1998 )，為單股環狀 DNA 病毒。病毒形狀為小的球形顆粒，直徑大小為 30-32 nm ( Itoh et al., 2000 )。在血清中的 TT 病毒，其在氯化銫 ( cesium chloride ; CsCl ) 上的沉積密度係數 ( buoyant density ) 約 1.31-1.33 g/cm<sup>3</sup>，而在糞便中的 TT 病毒則為 1.33-1.35 g/cm<sup>3</sup>( Linnen et al., 1996 ; Okamoto et al., 1998b )。在血液循環系統裡 TT 病毒顆粒會與免疫球蛋白 G ( immunoglobulin G ; IgG ) 鍵結，形成免疫複合體 ( immune complexes )( Nishizawa et al., 1999 ; Itoh et al., 2000 )。因此，利用電子顯微鏡可以觀察到受 TT 病毒感染的人類血清有聚集在一起的現象(Fig. 1)。使用 gold-labeled goat anti-human IgG 並利用 immunogold 電子顯微鏡可以確認 TT 病毒鍵結到人類的 IgG 並且聚集在一起。相形之下，在糞便中的 TT 病毒顆粒是以自由態病毒顆粒存在 ( Tsuda et al., 1999 ; Itoh et al., 2000 ; Okamoto et al., 2001 )。

#### (二) 基因體結構 (Genomic Structure)

在 1998 年時，Okamoto 等人指出 TT 病毒 ( TA278 病毒株 ) 完整的基因體為 3,739 nt 的直線型序列( Okamoto et al., 1998a )，然而其並不具有明顯的末端重覆的結構。之後，找到 113 或 114 的 GC-rich 的序列，使 TT 病毒具有完整的 3,852 或 3,853 nt 環狀結構( Miyata et al., 1999 ; Mushahwar et al., 1999 )。TT 病毒基因體在 GC-rich stretch 裡面有 36-nt 區域 ( TA278 病毒株的 nt 3,816-3,851 ) 類似於 CAV 病毒的序列 nt 2,237-2,272，而其他的區域並沒有明顯的相似處。在這個 GC-rich 區域有 stem-loop 的結構( Mushahwar et al., 1999 ; Okamoto et al., 1999a )，這顯示出 DNA 複製的起源。三分之一的 TT 病毒基因體包括這個 GC-rich 的區域都是屬於非轉譯區 ( non-translating region )，且在相異的 TTVs 之間，在這個區域有高度的相似性。此外多重轉錄修飾區段 ( multiple transcription modifier motifs )，例如：ATF/CREB、AP-2 SP-1 和 NF- $\kappa$ B binding site 都散佈在這個非轉譯區( Miyata et al., 1999 )。然而，對於這些 motifs 詳細的生物重要性目前還不是很確定，

之前都只是以基因體 DNA 序列分析為基礎 ( Hino et al., 2002 )。

大約長 3.9 kb 的 TT 病毒基因體基本上可以劃分成約 2.6 kb 的轉譯區域 ( translated region ) 及約 1.2 kb 的非轉譯區域 ( untranslated region ; UTR ) 兩個主要的部分。在轉譯區域，主要由兩個開放式閱讀框架 ( open reading frames ; ORFs ) 構成且已確定能夠解碼出兩種不同的病毒蛋白質，其中比較長的片段稱為 ORF1、短的稱為 ORF2。它們兩者都是存在於正股 ( plus-strand ) 而互補於基因體的 DNA 且在不同的 reading frame，彼此有部份重疊 ( overlap )。以標準基因型的 TA278 病毒株序列為例，ORF1 全長從 nt 589 到 2898、ORF2 全長從 nt 107 到 712，分別解碼 ( encode ) 出 770 個胺基酸 ( amino acids ; aa ) 150 個胺基酸 ( amino acids ; aa )。然而，個別分離出來的不同病毒株這兩個 ORFs 的長度可能有變異，分析 11 個不同的 TT 病毒株序列顯示出有另外一小段 ORF ( 命名為 ORF3 ) 存在，能解碼出 55 個胺基酸，直接位於 ORF1 的下游 ( 在 TA278 病毒株 nt 2,904 到 3,074 ) ( Erker et al., 1999 )，而且保留在大部分的 TT 病毒株。其他推測的 ORFs 在一些 TT 病毒株已經被確認，但它們可能沒有功能 ( Miyata et al., 1999 ; Bendinelli et al., 2001 )。

TT 病毒基因體的非解碼的區域 UTR 約 1.2 kb，包含了約 120 nt 富含 guanine (G) 和 cytosine (C) 的序列 ( Mushahwar et al., 1999 ; Miyata et al., 1999 ; Okamoto et al., 1999c )，這段序列是由超過 90% 的 G and C 所組成，並且形成了一個由 stem and loop 組成的二級結構，在病毒複製過程中扮演著重要角色 ( Okamoto et al., 1999a )。

最近 TT 病毒基因體在 *in vitro* 以及 *in vivo* 研究中已證實，三個明顯大小不同的 mRNAs 是從負股 ( minus-stranded ) 的 TT 病毒基因體 DNA 轉錄出來，而不是從 antigenomic 正股 ( plus-stranded ) 的 TT 病毒基因體 DNA ( Kamahora et al., 2000 ; Okamoto et al., 2000b )。另外已經確認在 ORF1 中央部份含有三個高度可變的區域 ( hypervariable regions ; HVRs )，命名為 HVR1、HVR2 以及 HVR3，分別解碼出 22、47 以及 31 個胺基酸 ( Okamoto et al., 2001 )。

### (三) 複製 (Replication)

TT 病毒詳細的複製機制到目前為止還不是很清楚。準確地了解關於 circoviruses 病毒複製的策略可能是有幫助的，但對於這些重要的細節甚至沒有去研究。關於 TT 病毒，在基因體存在著保留的 Rep protein motif，可能指出這個病毒是透過 rolling-circle 機制( Erker et al., 1999 )。Gilbert 等人指出，對於複製單股 DNA，這個機制是特別地適合 ( Gilbert et al., 1968 )。然而，值得注意的是，TT 病毒異於尋常的遺傳多樣性也讓研究者假設病毒 DNA 的複製是透過缺乏或沒有校正活性的機制。TT 病毒的複製可能像 B 型肝炎病毒透過 RNA 中間產物，但這似乎是不太可能的，因為在 TT 病毒基因體上並沒有發現有 reverse transcriptase motif ( Nishizawa et al., 1999 ; Bendinelli et al., 2001 )。

### (四) 基因型 (Genotypes)

雖然在 23 個 TT 病毒基因型只有 10 個全部的 TT 病毒基因體被定序出來，然而在所有 TT 病毒之間非轉譯區 ( UTR ) 是被保留而解碼區 ( coding region ) 是多變的，這是很普遍被觀察到的現象 ( Muljono et al., 2001 )。有趣的是，在各種 TT 病毒基因型的 ORF1，其胺基酸序列的同源性比 nucleotide 序列的同源性還來的低。例如，TT 病毒基因型 1 分離出來的 TA278 病毒株不同於來自 TT 病毒基因型 12 分離出來的 TJN01 病毒株，在全部的基因體有 54% 的相似度，在解碼區域 ( coding region ) 有 54% 的相似度，而在非轉譯區 ( UTR ) 則有 77% 的相似度。值得注意的是，在 TA278 病毒株與 TJN01 病毒株之間胺基酸序列只有 35% 的相似度 ( Ukita et al., 2000 ; Okamoto et al., 2001 )。

截至目前為止，根據演化系統分析 ( phylogenetic analysis ) 將全部 23 個 TT 病毒基因型暫時地分類成四個主要的類別 ( groups ) ( groups 1-4，如下表 )。第一類別包含標準的 TT 病毒基因型 1 以及另外五個基因型 ( 2-6 )；第二類別由 TT 病毒分離出的基因型 7、8、以及由 PMV 病毒株代表的基因型 17 ( Hallett et al., 2000 ) 和由 Kt-08F 代表基因型 22 與由 Kt-10F 代表基因型 23 所構成 ( Muljono et al., 2001 )；第三類別則包括基因型 9-16 分別由 K60-26、K66-46、TUS01、

TJN01、SANBAN、TS4-I、TS13-II 以及 TS5-I 代表 (Hijikata et al., 1999 ; Okamoto et al., 1999c ; Biagini et al., 2000 ; Okamoto et al., 2000b ; Ukita et al., 2000 ) , 而基因型 18 則由 TYM19 所代表 , 最後是基因型 19 以及 20 ( Mushahwar et al., 2000 ; Tanaka et al., 2001 ) ; 第四類別包含 YONBAN 病毒株代表基因型 21( Takahashi et al., 2000a ; Okamoto et al., 2001 ) 。 最新的報導指出第四類別已經鑑定出有 19 個基因型 , 其中已有 9 個基因型的全部基因體被定序出來 , 而最近也分類出第五類別共有 6 個基因型 , 其中有 4 個基因型的完整基因體序列也被定序出來 ( Peng et al., 2002 ) 。 因此 , 每一個類別的 TT 病毒基因型數目以及類別的數目都會隨著分離出來 TT 病毒序列資料的累積而增加 , 這種情形是可以預期的。

		TTV	SENV
Group	Genotype	Isolate (Accession no.)	Genotype (Accession no.)
1	1	<b>TA278</b> (AB017610)	
	2	<b>JA1</b> (AF122916)	
	3	<b>T3PB</b> (AF247138)	
	4	TKM1 (AB017775)	
	5	THEM1 (AB017776)	
	6	TFC3155 (AB017777)	

#### 四、TT 病毒的檢測方法 (Methods for Detection of TTV)

到目前為止，並沒有任何檢驗試劑可供臨床上檢測 TT 病毒，一般都採用 PCR 的方法來診斷 TT 病毒感染。之前報導指出在健康的個體和肝炎病患受 TT 病毒感染的盛行率非常多樣化 ( Linnen et al., 1996 ; Simmonds et al., 1998 ; Charlton et al., 1998 ; Takahashi et al., 1998 ; Irving et al., 1999 ; Itoh et al., 1999a ; Okamoto et al., 2000c ; Christensen et al., 2000 ; Shibayama et al., 2001 )。如之前所描述的，TT 病毒基因體在解碼區域 ( coding region ) 是多變的，然而在非轉譯區域 ( untranslated region ; UTR ) 大都是保留。Nishizawa 等人是第一個報導利用引子 ( primers ) 設計 PCR 來檢測 TT 病毒 ( Nishizawa et al., 1997 )。之後，Okamoto 和 Takahashi 等人分別設計出新的引子 ( primers ) ( Okamoto et al., 1998a ; Takahashi et al., 1998 )。一般廣泛使用來檢測 TT 病毒 DNA 有兩種不同的 PCR 方式 ( Springfield et al., 2000 ) 第一種是在 TT 病毒基因體 N22 區域( nt 1,847-2,346 )的 PCR，使用的引子 ( primers ) 是以基因型 1 和 2 在解碼區域 ( N22 區域 ) 的序列為基礎 ( Linnen et al., 1996 ; Okamoto et al., 1998b )。第二種是在 TT 病毒基因體非轉譯區域( UTR 區域 )的 PCR，使用的引子( primers ) 是以保留的非轉譯區域 ( conserved UTR 區域 ) 序列為基礎( Okamoto et al., 2000c )。TTVs 第一類別包含基因型 1-6，由 N22 PCR 來檢測的 ( Muljono et al., 2001 ; Okamoto et al., 1999b )。TT 病毒第二類別的基因型 7 和 8 也是用 N22 PCR 來增幅。至於屬於 TT 病毒的第三和四類別是不使用 N22 PCR 來檢測，換句話說，UTR PCR 實際上可以用來檢測所有的 TT 病毒的基因型 ( Muljono et al., 2001 ; Okamoto et al., 2000c ; Shibayama et al., 2001 )。因此，對於檢測 TT 病毒 DNA，UTR PCR 可以稱作全體的 PCR ( universal PCR ) 或一般的 PCR ( general PCR ) ( Okamoto et al., 2001 ; Fabrizi et al., 2001 )。



## 五、TT 病毒傳染的途徑與流行病學 (Route of TTV transmission and Epidemiology)

TT 病毒是第一個被報導為非 A 到 G 型肝炎 (non-A-G hepatitis) 的病毒，它是從輸血後感染肝炎的病患檢體中檢測出來的，而且被認為是輸血感染肝炎的媒介 (Nishizawa et al., 1997)。因為在捐血人輸過凝血因子的病例、嚴重以及輕微慢性肝病病例中，常常可以檢測到 TT 病毒，所以，該病毒被認為可能經由輸血或血液製品來傳染。在歐美，超過一半以上的血液製劑產品，均被證明含有該肝炎病毒的基因體 (Nishizawa et al., 1997; Naoumov et al., 1998; Okamoto et al., 1998a; Simmonds et al., 1998)。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。實際上，在時常輸血的病人中，TT 病毒的盛行率是非常高的 (Kanda et al., 1999a; Prati et al., 1999; Takayama et al., 1999b; Kanda et al., 2001; Hino et al., 2002)。

Okamoto 等人曾報導指出，在五位含有 TT 病毒的病人中，有三位被檢測出在糞便中含有 TT 病毒 (Okamoto et al., 1998b)。Ukita 等人也曾指出 TT 病毒在肝臟進行複製，因為在膽汁中發現 TT 病毒含量比在血清中高出 10 到 100 倍，而且在膽管中的病毒本身仍然維持在可感染的狀態 (Ukita et al., 1999)。相形之下，其他發現的案例主要是在血液中檢測到 TT 病毒的存在 (Nakagawa et al., 2000)。Okamoto 等人由顯示 TT 病毒複製形式的存在，證實 TT 複製在肝臟和骨髓 (Okamoto et al., 2000a; Okamoto et al., 2000b)。

TT 病毒可以短暫性或持續性地感染寄主 (Simons et al., 1995)。TT 病毒是經由血液運送以及經由肝臟分泌到膽汁再流入糞便中 (Simon et al., 1995; Okamoto et al., 1998b; Matsumoto et al., 1999; Ukita et al., 1999)。因此，TT 病毒廣闊的分布在一般人口，不但透過輸血和血液製品的非腸胃道傳染而且透過口糞感染的腸胃道傳染。最近也在黑猩猩傳染研究證實 TT 病毒是透過糞便傳染 (Tawara et al., 2000)。除此此外，TT 病毒也常在唾液、咽喉以及其它體液包括精液、

眼淚以及母乳中被檢測出來 (Davidson et al., 1999 ; Ishikawa et al., 1999 ; Ross et al., 1999 ; Saback et al., 1999 ; Deng et al., 2000 ; Inami et al., 2000 ; Matsubara et al., 2000 )。另外 , TT 病毒透過垂直感染也已經獲得證實 ( Saback et al., 1999 ; Gerner et al., 2000 ; Tada et al., 2000 ; Okamoto et al., 2001 )。為了評估 TT 病毒垂直傳染的情形 , Saback 等人從 105 位孕婦的血清以及臍帶血 ( cord blood ) 中檢測 TT 病毒感染的情形 ( Saback et al., 1999 ) , 結果有 35 位孕婦對 TT 病毒 DNA 呈現陽性反應 , 有 7 位的臍帶血 ( cord blood ) 也是陽性反應 , 這顯示 TT 病毒可能轉位傳染 ( transplacental transmission )。TT 病毒可以經由母子感染來傳撥開來。然而 , 母子之間的感染並未被考慮為 TT 病毒傳染的主要途徑 , 因為 TT 病毒的盛行率隨著年紀而增加 ( Yamada-Osaki et al., 1998 ; Saback et al., 1999 )。在某些維持血液析離 ( hemodialysis ; HD ) 的病患中 , 約有百分之 30 到 50 的病人對於 TT 病毒呈現陽性反應 , 而其 TT 病毒盛行率比正常人還要高 ( Forns et al., 1999 ; Gallian et al., 1999 ; Ikeuchi et al., 1999 ; Oguchi et al., 1999 ; Kanda et al., 2001 )。

對於 TT 病毒的流性病學的探討 , 目前已有很多文獻報告陸續被報導 , 報告中指出 , 在正常人口中 TT 病毒的盛行率會因為所設計的引子 ( primers ) 不同而受其影響 , 而依國家地理位置不同也有高低的差別 , TT 病毒在台灣捐血人口的盛行率為 11%、在日本為 12%、在英國蘇格蘭為 10%、在北美為 1%、在哥倫比亞為 10%、在義大利為 22%、在泰國為 38%、在巴西為 62% 以及在甘比亞更高達 83% , 顯示 TT 病毒的傳染方式可能有很多種 , 以上所選用的引子 ( primers ) 都來自 N22 區域 ( Okamoto et al., 1998a ; Simmonds et al., 1998 ; Kanda et al., 1999b ; Naoumov et al., 1998 ; Charlton et al., 1998 ; Tanaka et al., 1999 ; Prati et al., 1999 ; Tanaka et al., 1998a ; Niel et al., 1999 ; Lo et al., 1999 )。然而 , 使用來自非轉譯區 ( UTR ) 的引子 ( primers ) , 發現 TT 病毒的盛行率在日本正常人口中高達 90% ( Takahashi et al., 1998 ) , 從這個差異可以解釋出為何使用來自非轉譯區 ( UTR ) 的引子 ( primers ) 所做的 PCR , 可以檢測出所有已知 TT 病毒基因型的事

實 ( Kanda et al., 2001 )。

Yamada-Osaki 等人調查在健康的小孩與成人中 TT 病毒盛行率與年齡的關聯性 ( Yamada-Osaki et al., 1998 )，發現 TT 病毒感染的發生率在幼兒時非常低 ( 約 8.3% )，在幼稚園團體中開始上升 ( 2-6 歲；23.3% )，到了小學和中學逐漸地下降 ( 7-12 歲；13.6% 以及 13-18 歲；8.5% )，然後在成年之後再次增加 ( 分別在 19-44 歲；24.4% 以及在 45 歲以後；33.3% ) ( Yamada-Osaki et al., 1998 )。在統計上，小於 15 歲的小孩比大於 16 歲的成人在 TT 病毒盛行率上顯著地低。特殊年齡的 TT 病毒盛行率在巴西正常人口中同樣獲得證實 ( Saback et al., 1999 ; Kanda et al., 2001 )。

TT 病毒在全世界分布相當地廣泛 ( Cossart et al., 1998 )，年齡層主要分布在 30 歲到 67 歲，平均年齡為 53 歲，( Simmonds et al., 1998 )。在 1986 年以前的血漿製品 ( 第 8、9 凝血因子 ) 在製造過程中沒有經過病毒去活性的步驟，用 PCR 方法檢測發現 TT 病毒陽性率頗高 ( 9/12 )，也有證據顯示，一些血友病人使用未經病毒去活化的血漿製品，其陽性率高出捐血者甚多。而在 1992 年後外加病毒去活性的步驟，則有明顯下降 ( 8/22 )，病毒去活化的方法可用 solvent/detergent 或用巴斯德滅菌法 ( 60 °C，10 小時 ) ( Simmonds et al., 1998 )。從免疫球蛋白的血液製劑中無法檢測出 TT 病毒 ( Yap et al., 1996 )。TT 病毒在捐血人口中，為何有如此高的盛行率，在英國文獻報告中指出，可能不是經由父母親傳播來的，支持這種假設的原因，主要是因為 TT 病毒感染的平均年齡為 53 歲。而 C 型肝炎和 G 型肝炎經由父母親傳播來的，其平均年齡分別為 32 以及 35 歲 ( Simmonds et al., 1998 )，在 1998 年也有一篇報導指出感染 TT 病毒有 38% 是由後天所造成的，所以是否由母親傳染給下一帶則須再進一步研究 ( Naoumov et al., 1998 )。若以血漿中的病毒量來說 TT 病毒的病毒量比其他 RNA 病毒 ( HIV、HCV ) 或 DNA 病毒 ( HBV、parvovirus B19 ) 少，大部分都需要超高速離心將病毒濃縮到一定的量才可以用 PCR 檢測。

## 六、TT 病毒感染與肝病之間的關聯性 (Relationship between TTV Infection and Liver diseases)

在 1997 年 Nishizawa 等人指出 TT 病毒會造成輸血後肝炎和 ALT 值的上升，但在臨床上還沒有直接的證據 (Nishizawa et al., 1997)。在 1998 年也有類似的報告，輸用含有 TT 病毒污染的血液並沒有任何症狀發生，但輸血後 6-9 星期 ALT 值升高。到目前為止還無法排除 TT 病毒引起嚴重肝炎的可能性 (Simmonds et al., 1998)。然而，大部分受 TT 病毒感染的病患具有正常的肝功能或過去有肝炎者僅有稍微改變，或許 TT 病毒不是造成不明原因的慢性肝炎的病因 (Naoumov et al., 1998)。雖然，少數國外學者曾發現 TT 病毒的存在與臨床症狀發生的時間可能有相關性，但這些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，仍沒有直接證據 (Charlton et al., 1998 ; Ikeda et al., 1999 ; Naoumov et al., 2000)。

### (一) 急性肝病 (Acute Liver Disease)

從不明原因的急性肝炎病患中可以檢測出 TT 病毒 DNA，但 TT 病毒的病毒量與血清中的 ALT 值之間的關聯性並不一致 (Okamoto et al., 1998a ; Simmonds et al., 1998 ; Bonis et al., 1999 ; Ikeda et al., 1999)。因此，TT 病毒是否引起急性肝病或者只是偶然發現，目前仍然不是很清楚。

### (二) 不明原因的慢性肝病 (Chronic Liver Disease of Unknown Etiology)

在大部分的文獻報告中指出，TT 病毒的存在並不能顯示其與不明原因所引起肝臟受損的生化或組織學上的現象之間關聯性 (Halfon et al., 1999 ; )。例如，在一項研究中發現，在美國有 99 位血清中 ALT 值高的捐血人與 46 位控制組之間 TT 病毒 DNA 的盛行率並沒有顯著的差異。一篇來自日本的文獻報告中也指出，在 50 位不明原因的慢性肝病者與 106 位自願的捐血者之間 TT 病毒 DNA 的盛行率是相

似的 ( Bonis et al.,1999 )。與上述的文獻報告相較之下，來自日本的另一組人卻支持 TT 病毒在慢性肝病發展的過程中可能扮演著重要的角色 ( Ikeda et al., 1999 )。在 57 位不明原因的慢性肝病患者與 97 位已知由於 C 型肝炎所引起的慢性肝病患者之間相比，發現 TT 病毒 DNA 的盛行率有顯著的高 ( 47% 比 18% )。同樣地，來自美國的一組研究人員也發現，在 33 位原因不明的肝硬化患者與 100 位健康的捐血人之間相比，TT 病毒 DNA 的盛行率更高( 15% 比 1% ) ( Charlton et al., 1998 ; Bonis et al., 1999 )。

### (三) 已知的慢性肝病形式 (Known forms of Chronic Liver Disease)

有一些文獻報告已經證明，各種慢性肝病患者比起一般正常人來說，TT 病毒的盛行率有增加的趨勢。例如，來自美國的一組研究人員指出，TT 病毒存在於 27% 的猛暴型肝衰竭病患和 18% 有輸血經歷的肝硬化病人，而只存在於 1% 健康的捐血人。然而，大部分的文獻報告指出，TT 病毒對於肝臟損害的促成並不是很明顯 ( Bonis et al., 1999 )。

### (四) 肝炎 (Hepatitis)

TT 病毒首先是從非 A 到 G 型輸血後肝炎病患身上所發現，而且 TT 病毒的病毒量與呈現陽性反應的後輸血性肝炎病患之 ALT 值一樣都有上升的趨勢 ( Nishizawa et al., 1997 )。Okamoto 等人研究在 37 位手術前血清中 ALT 值為正常的病人，而且對於 HBV 病毒、HCV 病毒以及 TT 病毒呈現陰性反應。在輸血之後 1 到 5 週，有 18 位 ( 49% ) 獲得 TT 病毒而另外 19 位 ( 51% ) 則沒有 ( Fujiwara et al., 1998 )。在 18 位感染 TT 病毒的病患中有 4 位 ( 22% ) 發展成輸血後肝炎，反之其餘 19 位沒有受到 TT 病毒感染的病患一個也沒有 (  $p=0.046$  )。手術過後，受 TT 病毒感染的病患 ALT 值比沒有受到 TT 感染的病患顯著的高 ( 67.3 比 31.8 IU/l ;  $p=0.004$  )。這 4 位輸血後肝炎病患的 TT 病毒全部都屬於基因型 1。TT 病毒基因型 1 的盛行率在血清中 ALT 值高的捐血人比正常 ALT 值的捐血人還要更高 ( Itoh et al., 1999b )，因此，基因型 1 的 TT 病毒在肝臟損壞上可能扮演致病原的角色 ( Kanda

et al., 2001 )。

## 研究動機 ( Motive )

在過去研究報告指出，TT 病毒首先從非 A 到 G 型肝炎的病患身上分離出來的，而且與肝功能不正常有關，但另有研究報告指出，TT 病毒 DNA 陽性反應與肝功能正常與否沒有太大關聯性。之前國立成功大學醫學院黎慶老師實驗室研究發現，在愛滋病患者 TT 病毒感染率比正常人還高，而愛滋病主要是靠體液或血液來傳染，肝病是另一種藉由體液或血液來傳染的疾病之一。本研究主要目的在了解 TT 病毒在台灣一般人和肝病病患的流行情形。另一方面也選殖並定序出台灣本土型 TT 病毒的基因體。在本研究裡，首先收集 80 位肝病病患以及 106 位正常人的血液檢體，分離並抽取病毒的 DNA，利用聚合酵素連鎖反應( PCR )分析 TT 病毒 DNA。另外，也從 TTV 病毒 DNA 陽性反應的肝病病患之血清選殖出 TTV 病毒基因體，並定序以確定其基因型。最後，利用統計分析肝炎病患對 TT 病毒的接受性及不同臨床症狀的肝炎患者對 TT 病毒的感染率是否有差異。希望藉此研究能更進一步了解肝炎病患與 TT 病毒感染之間的相關性，同時經由核酸定序分析結果也可以了解 TT 病毒基因體變異的情形。

## 材料與方法 ( Materials and Methods )

### 一、材料

#### (一) 病人及檢體來源

本研究收集了 80 位患有肝病(liver disease)病人的血液檢體，均來自中山醫學大學附設醫院(由陳滋彥醫師提供)，另外也收集了 106 位正常人的血液，來自中山醫學大學師生和彰化基督教醫院，以作為對照控制組。

#### (二) 試劑

1. QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Cat. No. 51104)
2. PCR Kleen Spin Columns (BIO-RAD, Cat. No. 732-6300)
3. Gel-M™ Gel Extraction System Kit (VIOGENE, Cat. No. EG1001)
4. PCR-Script™ Amp Cloning Kit (*STRATGENE*, Cat. No. 21119)
5. Plasmid Miniprep Purification Kit (GENEMARK, Cat. No. DP01-50)
6. NucleoBond Plasmid Midi Kit (CLONTECH, Cat. No. K3002-2)
7. Super-Therm DNA Polymerase (伯昂實業有限公司)
8. dNTP (Promega)
9. Primers (生工有限公司)

## 二、方法

### (一) 篩檢 TT Virus

#### 1. 檢體的處理

從病人身上抽取血液，放入含 EDTA 抗凝血劑的採血管(由陳滋彥醫師提供)，放入離心機，在 4℃ 下以 3,000 rpm 離心 10 分鐘，將上層液(serum)放置於新的 1.5ml eppendorf，分裝成 3 管並儲存於-80℃。

#### 2. Viral DNA 的取得

採用 QIAGEN 公司所出產的 QIAamp DNA Blood Mini Kit：首先吸取 20  $\mu$ l Proteinase K (20mg/mL)到 1.5ml 的 eppendorff 中，加入 200  $\mu$ l serum or plasma，再加入 200  $\mu$ l 的 Buffer AL，Vortex-pulse 混合 15 秒，放入 56℃ 乾浴槽 10 分鐘，Spin-down 後加入 200  $\mu$ l 95 % Ethanol (-20℃)，用 Vortex-pulse 15 秒鐘，將上述混合物轉移置入 QIAamp spin column，於室溫下以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將 QIAamp spin column 轉移到新的 2 ml collection tube，先前的濾液丟到含碘液的消毒液中，加入 500  $\mu$ l Buffer AW1 到 QIAamp spin column，室溫下以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將 QIAamp spin column 轉移到新的 2 ml collection tube，先前的濾液丟到含碘液的消毒液中，加入 500  $\mu$ l Buffer AW2 到 QIAamp spin column，在室溫下以 14,000 rpm 離心 3 分鐘，將 QIAamp spin column 轉移到新的 1.5 ml eppendorff，先前的濾液丟到含碘液的消毒液中，加入 200  $\mu$ l Buffer AE (含有 10 mM Tris-HCl; 0.5 mM EDTA ; PH 9.0) 到 QIAamp spin column，室溫下作用 4 分鐘，再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，即可得到病毒 DNA。

#### 3. TTV DNA 的篩檢

本實驗是利用 2 種 polymerase chain reaction (PCR)方法來偵測 TT



Virus 存在與否，分別稱之為 Set-I 及 Set-II (Naoumov et al., 1998; Nishizawa et al., 1997)。PCR 方法如下：

PCR primers 序列：

No.	Primer name	Polarity	Nucleotide Sequence (5'→ 3')	Product length (bp)
Set-I	TTV-A	Sense	ACAGA CAGAG GAGAA GGCAA CATG	271 bp
	TTV-B	Antisense	CTGGC ATTTT ACCAT TTCCA AAGTT	
	TTV-C	Sense	GGCAA CATGT TATGG ATAGA CTGG	
Set-II	RD037	Sense	GCAGC AGCAT ATGGA TATGT	197 bp
	RD038	Antisense	TGACT GTGCT AAAGC CTCTA	
	RD051	Sense	CATAC ACATG AATGC CAGGC	
	RD052	Antisense	GTACT TCTTG CTGGT GAAAT	

(1) Set-I: TTV semi-nested PCR

**1<sup>st</sup> PCR**

1.	10X PCR buffer	5 µl
2.	2.5 mM dNTP	0.5 µl
3.	primer A (10 pmol)	0.5 µl
4.	primer B (10 pmol)	0.5 µl
5.	d.d. H <sub>2</sub> O	3.5 µl
6.	Viral DNA	40 µl
7.	Taq enzyme	0.1 µl

Total volume: 50 µl/reaction

**PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	94	30 sec	35
	2	58	30 sec	
	3	72	45 sec	
2	1	72	7 min	1
Hold		4		

**2<sup>nd</sup> PCR**

1.	10X PCR buffer	5 $\mu$ l
2.	2.5 mM dNTP	1 $\mu$ l
3.	primer B (10 pmol)	0.5 $\mu$ l
4.	primer C (10 pmol)	0.5 $\mu$ l
5.	d.d. H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l
6.	1 <sup>st</sup> PCR product	10 $\mu$ l
7.	Taq enzyme	0.1 $\mu$ l

---

Total volume: 50  $\mu$ l/reaction

**PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	94	30 sec	25
	2	58	30 sec	
	3	72	30 sec	
2	1	72	7 min	1
Hold		4		

Load PCR product 5  $\mu$ l to 2% agarose gel

(2) Set-II: TTV double-nested PCR

**1<sup>st</sup> PCR**

1.	10X PCR buffer	5 $\mu$ l
2.	2.5 mM dNTP	0.5 $\mu$ l
3.	primer RD037 (10 pmol)	0.5 $\mu$ l
4.	primer RD038 (10 pmol)	0.5 $\mu$ l
5.	d.d. H <sub>2</sub> O	3.5 $\mu$ l
6.	Viral DNA	40 $\mu$ l
7.	Taq enzyme	0.1 $\mu$ l

---

Total volume: 50  $\mu$ l/reaction

**PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	94	30 sec	35
	2	55	30 sec	

	3	72	45 sec	
2	1	72	7 min	1
Hold		4		

## **2<sup>nd</sup> PCR**

- |    |                             |             |
|----|-----------------------------|-------------|
| 1. | 10X PCR buffer              | 5 $\mu$ l   |
| 2. | 2.5 mM dNTP                 | 1 $\mu$ l   |
| 3. | primer RD051 (10 pmol)      | 0.5 $\mu$ l |
| 4. | primer RD052 (10 pmol)      | 0.5 $\mu$ l |
| 5. | d.d. H <sub>2</sub> O       | 3 $\mu$ l   |
| 6. | 1 <sup>st</sup> PCR product | 10 $\mu$ l  |
| 7. | Taq enzyme                  | 0.1 $\mu$ l |

Total volume: 50  $\mu$ l/reaction

## **PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	94	30 sec	25
	2	55	30 sec	
	3	72	30 sec	
2	1	72	7 min	1
Hold		4		

Load PCR product 5  $\mu$ l to 2% agarose gel

## 4. Statistical analyses

本研究之統計是以 SPSS 統計軟體進行 TT 病毒與肝病之間關聯性的統計分析，平均值與百分比用一般計算、群組之間的次數比較使用 chi-square 檢定或 Fisher's exact 檢定、群組平均值的比較使用 *t*-test，P 值小於 0.05 時在統計上才有意義。

### (二) TT Virus genomic DNA 定序

取用帶有 TT 病毒的檢體 DNA 當模板 ( Table 1 No.34 0911013 strain )，先以 PCR 方法增幅 5 段 TT Virus genomic DNA 片斷，再利用 PCR-Script<sup>TM</sup> Amp Cloning Kit 選殖 PCR 產物於 E. coli 載體中。隨後純化該 Plasmid DNA 做 DNA 定序，每段 DNA 的定序均來自三次獨立的 PCR 實驗。

## 1. PCR amplification of TTV DNA

本實驗將 TT 病毒基因體分成五個片段(A~E)分別利用 PCR 方法來增幅 TT 病毒 DNA 片段 (由於 E 段到目前為止尚未合成出來, 故 primers 沒列在下表), PCR 方法如下:

PCR primers 序列:

Fragments	Primers	Polarity	Nucleotide Sequence (5' 3')	Product length (bp)
A	PF	Sense	AGCTG CAGCA ACAGC GAATC	872 bp
	AR2	Antisense	GCCGA CGGTT TTTTG GCGCC TTTTT TC	
	PF1	Sense	GGATC TAGCA TCCTT ATTTC	
B	AF2	Sense	CACTT CCGAA TGGCT GAGTT	505 bp
	CR1	Antisense	GTTGC CTTCT CCTCT GTCTG	
	AR3	Antisense	CAGCC ATAGG CCATG GTGCT	
C	BF1	Sense	CTGGC AATGG TACTC AAGTG	1863 bp
	CR	Antisense	TTTAA TGTCT GCGTG GTATG	
	BF	Sense	TAGCT CCCAC GCTGC TATGT	
	RD038	Antisense	TGACT GTGCT AAAGC CTCTA	
D	RD037	Sense	GCAGC AGCAT ATGGA TATGT	901 bp
	DR2	Antisense	CGTAC TCCTC TTTCC AGTCA	
	RD051	Sense	CATAC ACATG AATGC CAGGC	

### (1) PCR amplification of A fragment (#2868 ~ #3739)

#### 1<sup>st</sup> PCR

- |                          |         |
|--------------------------|---------|
| 1. 10X PCR buffer        | 5 µl    |
| 2. 2.5 mM dNTP           | 0.5 µl  |
| 3. primer PF (10 pmol)   | 0.5 µl  |
| 4. primer AR2 (10 pmol)  | 0.5 µl  |
| 5. d.d. H <sub>2</sub> O | 38.5 µl |
| 6. Viral DNA             | 5 µl    |
| 7. Taq enzyme            | 0.1 µl  |

Total volume: 50 µl/reaction

#### PCR file:

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	94	3 min	1
2	1	94	45 sec	35

	2	55	30 sec	
	3	72	1 min	
3	1	72	7 min	1
Hold		4		

### **2<sup>nd</sup> PCR**

1.	10X PCR buffer	5 $\mu$ l
2.	2.5 mM dNTP	1 $\mu$ l
3.	primer PF-1 (10 pmol)	0.5 $\mu$ l
4.	primer AR2 (10 pmol)	0.5 $\mu$ l
5.	d.d. H <sub>2</sub> O	38 $\mu$ l
6.	1 <sup>st</sup> PCR product	5 $\mu$ l
7.	Taq enzyme	0.1 $\mu$ l

Total volume: 50  $\mu$ l/reaction

### **PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	94	3 min	1
2	1	94	45 sec	35
	2	55	30 sec	
	3	72	1 min	
3	1	72	7 min	1
Hold		4		

Load PCR product 5  $\mu$ l to 2% agarose gel

(2) PCR amplification of B fragment (#98 ~ #602)

### **1<sup>st</sup> PCR**

1.	10X PCR buffer	5 $\mu$ l
2.	2.5 mM dNTP	0.5 $\mu$ l
3.	primer AF2 (10 pmol)	0.5 $\mu$ l
4.	primer CR1 (10 pmol)	0.5 $\mu$ l
5.	d.d. H <sub>2</sub> O	38.5 $\mu$ l
6.	Viral DNA	5 $\mu$ l
7.	Taq enzyme	0.1 $\mu$ l

Total volume: 50  $\mu$ l/reaction

### **PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
-------	------	----------	------	-------

1	1	95	3 min	1
2	1	95	45 sec	35
	2	55	30 sec	
	3	72	1 min 30 sec	
3	1	72	7 min	1
Hold		4		

### **2<sup>nd</sup> PCR**

- |    |                             |        |
|----|-----------------------------|--------|
| 1. | 10X PCR buffer              | 5 µl   |
| 2. | 2.5 mM dNTP                 | 1 µl   |
| 3. | primer AF2 (10 pmol)        | 0.5 µl |
| 4. | primer AR3 (10 pmol)        | 0.5 µl |
| 5. | d.d. H <sub>2</sub> O       | 38 µl  |
| 6. | 1 <sup>st</sup> PCR product | 5 µl   |
| 7. | Taq enzyme                  | 0.1 µl |

Total volume: 50 µl/reaction

### **PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	95	3 min	1
2	1	95	45 sec	35
	2	55	30 sec	
	3	72	1 min	
3	1	72	7 min	1
Hold		4		

Load PCR product 5 µl to 2% agarose gel

(3) PCR amplification of C fragment (#415 ~ #2277)

### **1<sup>st</sup> PCR**

- |    |                       |         |
|----|-----------------------|---------|
| 1. | 10X PCR buffer        | 5 µl    |
| 2. | 2.5 mM dNTP           | 0.5 µl  |
| 3. | primer BF1 (10 pmol)  | 0.5 µl  |
| 4. | primer CR (10 pmol)   | 0.5 µl  |
| 5. | d.d. H <sub>2</sub> O | 38.5 µl |
| 6. | Viral DNA             | 5 µl    |
| 7. | Taq enzyme            | 0.1 µl  |

Total volume: 50 µl/reaction

### **PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
-------	------	----------	------	-------

1	1	94	3 min	1
2	1	94	45 sec	35
	2	55	30 sec	
	3	72	2 min	
3	1	72	7 min	1
Hold		4		

### **2<sup>nd</sup> PCR**

- |    |                             |        |
|----|-----------------------------|--------|
| 1. | 10X PCR buffer              | 5 µl   |
| 2. | 2.5 mM dNTP                 | 1 µl   |
| 3. | primer BF (10 pmol)         | 0.5 µl |
| 4. | primer RD038 (10 pmol)      | 0.5 µl |
| 5. | d.d. H <sub>2</sub> O       | 38 µl  |
| 6. | 1 <sup>st</sup> PCR product | 5 µl   |
| 7. | Taq enzyme                  | 0.1 µl |

Total volume: 50 µl/reaction

### **PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	94	3 min	1
2	1	94	45 sec	35
	2	55	30 sec	
	3	72	2 min	
3	1	72	7 min	1
Hold		4		

Load PCR product 5 µl to 2% agarose gel

(4) PCR amplification of D fragment (#2061 ~ #2961)

### **1<sup>st</sup> PCR**

- |    |                       |         |
|----|-----------------------|---------|
| 1. | 10X PCR buffer        | 5 µl    |
| 2. | 2.5 mM dNTP           | 0.5 µl  |
| 3. | primer BF1 (10 pmol)  | 0.5 µl  |
| 4. | primer CR (10 pmol)   | 0.5 µl  |
| 5. | d.d. H <sub>2</sub> O | 38.5 µl |
| 6. | Viral DNA             | 5 µl    |
| 7. | Taq enzyme            | 0.1 µl  |

Total volume: 50 µl/reaction

### **PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
-------	------	----------	------	-------

1	1	94	3 min	1
2	1	94	45 sec	35
	2	55	30 sec	
	3	72	2 min	
3	1	72	7 min	1
Hold		4		

### **2<sup>nd</sup> PCR**

- |    |                             |             |
|----|-----------------------------|-------------|
| 1. | 10X PCR buffer              | 5 $\mu$ l   |
| 2. | 2.5 mM dNTP                 | 1 $\mu$ l   |
| 3. | primer BF (10 pmol)         | 0.5 $\mu$ l |
| 4. | primer RD038 (10 pmol)      | 0.5 $\mu$ l |
| 5. | d.d. H <sub>2</sub> O       | 38 $\mu$ l  |
| 6. | 1 <sup>st</sup> PCR product | 5 $\mu$ l   |
| 7. | Taq enzyme                  | 0.1 $\mu$ l |

Total volume: 50  $\mu$ l/reaction

### **PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	94	3 min	1
2	1	94	45 sec	35
	2	55	30 sec	
	3	72	2 min	
3	1	72	7 min	1
Hold		4		

Load PCR product 5  $\mu$ l to 2% agarose gel

### 2. Confirmation of the TTV PCR products

為了要確認 PCR 產物的真實性,本實驗利用不同的引子( primers ) 做 PCR 反應 , 同時也用 restriction enzyme digestion 來證實之。

#### (1) Confirmation of the TTV PCR products by PCR

取 PCR 增幅的產物稀釋 100 倍當作模板 , 利用適當的引子 ( primers ) 來做 PCR , 其方法如下 :

PCR primers 序列與產物大小 : 如 Table 9a

- |    |                |           |
|----|----------------|-----------|
| 1. | 10X PCR buffer | 5 $\mu$ l |
| 2. | 2.5 mM dNTP    | 1 $\mu$ l |



3. primer A (10 pmol)	0.5 µl
4. primer B (10 pmol)	0.5 µl
5. d.d. H <sub>2</sub> O	42 µl
6. PCR product	1 µl
7. Taq enzyme	0.1 µl

Total volume: 50 µl/reaction

**PCR file:**

Stage	Step	Temp ( )	Time	Cycle
1	1	94	3 min	1
2	1	94	45 sec	25
	2	55	30 sec	
	3	72	1 min	
3	1	72	7 min	1
Hold		4		

Load PCR product 5 µl to 2% agarose gel

(2) Digestion of the amplified TTV genomic DNA fragments

取 PCR 增幅的產物 2 µl 放入 0.5 ml 的 eppendorff, 各別加入不同的 restriction enzyme (如下表) 0.2 µl (以 TTV 1a 基因體為基礎, 利用 New England Biolabs 公司的 <http://circuit.neb.com/> 網站上之 NEBcutter V1.0 軟體來設計 restriction enzyme 位置), 混合均勻, 在 37 °C 下作用 16 h 以上, 跑 2 或 3% 的洋菜膠 (含 ethidium bromide), 使用 UV 照膠 (Okamoto et al., 1999c)。

Fragments	Restriction enzyme	Product length (bp)
A	<i>BssH</i> II	19, 318, 535
	<i>BstE</i> II	43, 829
	<i>Hpa</i> II	55, 120, 697
	<i>Msp</i> I	55, 120, 697
B	<i>Ava</i> I	69, 56, 380
	<i>Bsp</i> 1286 I	16, 96, 126, 267
	<i>Nco</i> I	15, 490
C	<i>EcoR</i> I	557, 1306

	<i>EcoR</i> V	631, 1232
	<i>Hinc</i> II	616, 1247
D	<i>BstE</i> II	51, 850
	<i>Pst</i> I	196, 705
	<i>Pvu</i> II	201, 700

### 3. TT Virus genomic fragment 的選殖

將 PCR 產物利用 VIOGENE 公司出產的 Gel-M™ Gel Extraction System Kit 純化出來，然後用 STRATGENE 公司出產的 PCR-Script™ Amp Cloning Kit 來選殖 TT 病毒基因體片段。方法如下：

#### (1) Purification the PCR product

首先將 PCR 產物利用真空濃縮機濃縮，然後跑 DNA 電泳。用小刀將跑完電泳的 Agarose Gel 從 target DNA band 的地方切下(大約 50~200 mg)，將 gel 切片轉移到新的 1.5 ml 的 eppendorff 中，加入 0.5 ml GEX Buffer( VIOGENE 公司出產的 Gel-M™ Gel Extraction System Kit )，在 60 °C 下作用 5-10 分鐘使洋菜膠完全融化，每 1-2 分鐘翻轉 tube，完全融化後冷卻到室溫。將 Gel-M™ column 放在 2 ml 的 collection tube，當 gel 切片完全融化之後將前步驟融化的液體轉移到 column 上，在室溫下以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉濾液。加入 500 µl WF Buffer 到 column，在室溫下以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉濾液，加入 700 µl WS Buffer 到 column，在室溫下以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉濾液，室溫下再以 13,000 rpm 離心 3 分鐘，以去除殘留的 Ethanol。將 Spin column 轉移到新的 1.5mL tube，然後放入 60 °C 的烘箱作用 5-10 分鐘，以去除所有的 Ethanol。加入 30~50 µl Elution Solution 到 column，在室溫下作用 4 分鐘，再以 13,000 rpm 離心 1-2 分鐘。即可得到 DNA (因為 DNA 會很快溶解，所以不需在 37 °C)，利用分光光度計測量 OD 260/280 值，然後儲存在 -20 °C。

#### (2) Polishing the Purified PCR Products

將 purified PCR product 10 µl 10 mM 的 dNTP mix (2.5 mM each) 1 µl 10X polishing buffer 1.3 µl 和 cloned *Pfu* DNA polymerase (0.5U) 1

$\mu\text{l}$  加到 0.5ml 的 tube, 混合均勻後, 加入礦物油 20  $\mu\text{l}$ , 放入 water bath 72 , 作用 30 分鐘。

### (3) Ligation the Insert

將 pPCR-Script Amp SK(+) cloning vector (10 ng/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、PCR-Script 10X 的 reaction buffer 1  $\mu\text{l}$ 、10 mM 的 rATP 1  $\mu\text{l}$ 、blunt-ended PCR product 2-4  $\mu\text{l}$  或 control PCR insert 4  $\mu\text{l}$ 、Srf I restriction enzyme (5 U/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$  和 T4 DNA ligase (4U/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$  加到 0.5ml 的 tube, 最後補 d.d. H<sub>2</sub>O 至 Total 體積為 10  $\mu\text{l}$ 。混合均勻後, 放置室溫 1 小時以上, 然後在 65 加熱 10 分鐘, 最後將 Ligation reaction 存放在冰上。

### (4) Transformation

將裝有 20  $\mu\text{l}$  Epicurian Coli XL10-Gold Kan ultracompetent cells 的 1.5 ml 的 tube 放置在冰上, 緩慢的混合均勻, 加入 XL-Gold  $\beta$ -mercaptoethanol 0.8 $\mu\text{l}$ , 在冰上混合均勻, 放置 10 分鐘, 每兩分鐘緩慢地旋轉。將前述 ligation reaction 的產物 2  $\mu\text{l}$  或 pUC18 control plasmid 2  $\mu\text{l}$  與 competent cells 混合均勻, 放置在冰上緩慢地旋轉反應物, 將 tube 放置在冰上作用 30 分鐘。將 NZY<sup>+</sup> broth (per Liter 含 NZ amine (casein hydrolysate) 10 g yeast extract 5 g NaCl 5 g, 使用 NaOH 調 pH 值至 7.5, autoclave; 使用前加入 1 M 的 MgCl<sub>2</sub> 12.5 ml 1 M 的 MgSO<sub>4</sub> 12.5 ml 2 M 的 filter-sterilized glucose 溶液 10 ml 或 20% (w/v) 的 glucose 20 ml, filter sterilize) 放置在 42 的 water bath 中預熱。將 tube 放置 42 的 water bath 30 秒, 然後放置在冰上作用 2 分鐘, 加入之前預熱的 (42 ) NZY<sup>+</sup> 0.45 ml, 將 tube 放置在 37 作用 1 小時, 並在 225-250 rpm 下搖動。一小時之後, 快速離心 1,000 rpm 10 分鐘, 去除上層液約 350  $\mu\text{l}$ , 剩餘的 media 約 100  $\mu\text{l}$  再 resuspend cell 回去, 最後, 將菌液分成 20 $\mu\text{l}$  和 80 $\mu\text{l}$  個別加入 4% 的 X-gal 25  $\mu\text{l}$  及 0.1 M 的 IPTG 5  $\mu\text{l}$  分別塗抹在含有 Ampicillin (50  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) 的 LB (Luria-Bertaini) (per Liter 含有 NaCl 5 g tryptone 10 g yeast extract 5 g agar 15 g) 培養盤上 (LB plate 使用前需在 37 下烘乾) 在 37

作用 overnight，隔天挑白色菌落。

#### (5) Extraction of Plasmid DNA (mini-prep.)

在培養皿中分別挑一個白色單一的菌落種入 3 ml 的 LB (含有 1 % 的 tryptone、0.5 % 的 yeast extract 及 0.5 % 的 NaCl, 以 1 ml medium : 3  $\mu$ l Ampicillin (50 mg/ml) 的比例加入 9  $\mu$ l 的 Ampicillin), 在 37 培養 14~16 小時, 抽取 plasmid DNA。方法如下:

將菌液倒入 1.5 ml 的 eppendorf 中(約九分滿), 在室溫下以 8,000 rpm 離心 5 分鐘, 移除 media(可直接用倒的), 將 pellet 用 reack 刮散, 加入冰的 Solution (含有 50 mM 的 glucose 10 mM 的 EDTA (pH 7.5) 及 25 mM 的 Tris-HCl (pH 8.0) 100 $\mu$ l, 上下用力振盪均勻, 將 pellet 打散均勻(可 Vortex), 放置在室溫下 5 分鐘, 加入 Solution (需現配, 1 ml : d.d. H<sub>2</sub>O 910  $\mu$ l, 5N 的 NaOH 40  $\mu$ l, 20 % 的 SDS 50  $\mu$ l) 200 $\mu$ l, 上下輕搖(不可 Vortex), 放在冰上靜置 5 分鐘, 加入 Solution (100 ml 含有 5 M 的 potassium acetate 60 ml glacial acetic acid 11.5 ml) 150  $\mu$ l, 立即輕微翻轉 tube, 放在冰上靜置 5 分鐘, 於 4 下以 14,000 rpm 離心 10 分鐘, 吸取上層液至另一個新的 1.5 mL eppendorff (約 450  $\mu$ l), 加入 RNase A(10  $\mu$ g/ $\mu$ l) 5 $\mu$ l, 在 37 下作用 30 分鐘。加入等體積的 phenol/chloroform 混合液(phenol: chloroform = 1:1)混合後, Vortex 均勻, 於 4 下以 14,000 rpm 離心 5 分鐘, 吸取上層液至另一個新的 1.5 mL eppendorff, 加入冰的 99 % 酒精(為總體積的 2~2.5 倍), 在 -80 下作用 20 分鐘(不可超過 30 分鐘)。在室溫下以 12,000 rpm 離心 10 分鐘, 用抽氣幫浦去除上清液後, 加入 75 % 酒精 300  $\mu$ l wash, 在室溫下以 12,000 rpm 離心 3 分鐘, 用抽氣幫浦去除上清液(重複二次), 在 Hood 中乾燥 pellet 10 分鐘, 以適量的 0.1 X TE buffer( pH 8.0) 20  $\mu$ l 溶解(可視 pellet 大小增減)\* 因為 plasmid DNA 會很快溶解, 所以不需在 37 。之後用 restriction enzyme (*Not I* 和 *BamH I*) 切下跑 DNA 電泳, 以確認載體所接的 DNA 片段是正確的。

#### 4. Sequencing

將抽好的 plasmid DNA, 以 1.0~0.5  $\mu$ g/10  $\mu$ l 的濃度下送本校貴重

儀器室，使用 ABI PRISM<sup>®</sup>公司出產的 BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits，並利用 T3 和 T7 以及 Table 9b 為定序 primer，以 Applied Biosystems 310 自動定序儀來進行定序分析，其結果利用 National Center for Biotechnology Information (NCBI)網站上的 BLAST 作搜尋比對(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。

## 5. 序列比對

以 TTV-1a (strain TA278)為比較基準點，使用 GCG 軟體 (<http://gcg.nhri.org.tw:8003/gcg-bin/seqweb.cgi>)比對自動定序所得的選殖 TT 病毒基因體序列，並比較序列的差異。

## 結果 ( Results )

### 一、Liver Disease 病人的基本資料分析

收集 80 位肝病 ( liver disease ) 病患的血液檢體 , 定量分析下列酵素功能或蛋白表現如 : ALT (alanine aminotransferase 胺基丙酸胺基轉基酵素 ; SGPT)、AST (aspartate aminotransferase 天門冬胺酸鹽胺基轉基酵素 ; SGOT)、AFP (a-fetal protein 甲型胎兒蛋白) , B 型肝炎表面抗原 ( HBsAg ) 與 C 型肝炎 ( Anti-HCV ) 檢測。在這 80 位病患中 , 男性佔有 49 人 ( 61.2% ) , 而女性有 31 人 ( 38.8% ) 。病患年齡範圍為 18 歲至 78 歲 , 平均年齡為 48 歲、標準差為 13.34。肝功能檢測部分 ALT 正常值小於 45(IU/l) , AST 正常值小於 40(IU/l)。而這 80 位肝病病患根據病情分成下列數種 : 急性肝炎 ( acute hepatitis ; AH )、慢性肝炎 ( chronic hepatitis ; CH )、肝硬化 ( cirrhosis ; LC )、慢性活動性肝炎 ( chronic active hepatitis ; CAH )、B 型肝炎帶原者--健康 ( C )、脂肪肝 ( Fatty liver )、肝硬化併發肝癌 ( cirrhosis combined with hepatocellular carcinoma ; LC/HCC ) 和原因不明的肝炎 ( hepatitis with unknown etiology ; N ) , 詳細數值列於 Table 1。另外也收集了 106 位正常人的血液檢體 , 以作為對照控制組。以上收集的血液檢體都進行 TT 病毒 DNA 檢測 , 詳細的結果都列於 Table 1、 2。

## 二、台灣本土 TT Virus 的篩檢結果及統計分析

從 80 位登記有肝病的病人，抽取血液檢體並分離出病毒的 DNA，利用 2 種 PCR 方法來偵測 TT 病毒存在與否，分別稱之為 Set-I 及 Set-II 如 Fig. 2，TT 病毒 DNA 經由 Set-I 或 Set-II PCR 反應後，所得到的片斷長度為 271 或 197 bps，部分檢體經由 TT 病毒 DNA-PCR 檢測，其電泳跑膠圖片顯示在 Fig. 3。根據這項實驗，在 80 位病人中，TT 病毒 DNA 在血清中的陽性率為 33.8 % (28/80)，其中 ALT 值大於 45 (IU/l) 有 42 位，TT 病毒 DNA 的陽性率為 33.3 % (14/42)，ALT 值小於 45 (IU/l) 有 28 位，TT 病毒 DNA 的陽性率為 35.7 % (10/28)；而在 106 位正常人中，TT 病毒 DNA 在血清中的陽性率為 17.9 % (19/106)，如 Fig. 4。由結果得知在患有肝病的病人當中得到 TT 病毒感染的比例 33.8 % (27/80) 比正常人 17.9 % (19/106) 高 ( $P < 0.05$ )，而肝病病患其 ALT 值與感染到 TT 病毒之間並沒有相關性 ( $P > 0.05$ )。

分析肝病病患在 TT 病毒 DNA 陽性與陰性之間比較其臨床上的特徵，如 Table 3 TT 病毒感染率在男性 (14/49, 28.6%) 與女性 (13/31, 41.9%) 之間並無顯著差異；比較平均年齡、ALT 值、AST 值和 AFP 值在 TT 病毒 DNA 陽性與陰性 (分別為  $47.0 \pm 12.8$ 、 $75.7 \pm 74.2$ 、 $66.3 \pm 39.9$  和  $14.5 \pm 25.7$  比  $48.7 \pm 13.7$ 、 $155.8 \pm 202.2$ 、 $103.1 \pm 130.3$  和  $19.1 \pm 36.6$ ) 之間並無顯著的差異。另外觀察 ALT 值異常 ( $> 45$  IU/L) 和 AST 值異常 ( $> 40$  IU/L) 比率在 TT 病毒 DNA 陽性 (14/24, 58.3% 和 16/24, 66.7%) 與陰性 (28/46, 60.9% 和 30/46, 65.2%) 之間並無顯著差異。

從 Table 4 得知 liver disease 以及 TT 病毒 DNA 的陽性率。TT 病毒 DNA 在 normal 與 liver disease 身上之陽性率分別為 17.9% 以及 33.8% ( $p < 0.05$ )。此項結果顯示，TT 病毒的感染，在統計學上，與肝病有相關性。

在 Table 5 顯示 TT 病毒感染與各種肝病之間的關聯性。在分別排除 7 位 B 型肝炎帶原者--健康 (C) 以及 10 位原因不明的病患之後，分析 63 位肝病病患之中各種肝病分布情形如下：急性肝炎 2 人 (3.2%)、慢性肝炎 29 人 (46.0%)、肝硬化 22 人 (34.9%)、慢性活動性肝炎 9 人 (14.3%)、脂肪肝 1 人 (1.5%)，在 63 位肝病病患中檢測出有 21 位含有 TT 病毒 DNA (33.3%)。依據不同肝病種類所分的病患族群，觀察在慢性肝炎 (31.0% ; 9/29) 與非慢性肝炎 (35% ; 12/34) 或者肝硬化 (45.5% ; 10/22) 與非肝硬化 (26.8% ; 11/41) 之間，其 TT 病毒陽性率並無顯著差異。

由 Table 6 指出，在肝病病患中具有不同的肝炎病毒其獲得 TT 病毒感染的情形。TT 病毒在具有 HBsAg 或 anti-HCV 的肝病病患之感染陽性率分別為 26.2% (11/42) 以及 29.0% (9/31)。在 TT 病毒與 HBsAg 或 anti-HCV 陽性反應之間沒有關聯性。

此外由 Table 6 也發現在感染 B 型肝炎病毒的 42 位病人中，有 11 位 (26.2%) 病人同時感染 TT 病毒，但這 11 位 TT 病毒 DNA 與 HBsAg 呈現陽性反應的病人在 ALT、AST、AFP 和平均感染年紀，跟其他 69 位病人並無顯著差異 (Table 7)，在感染 C 型肝炎病毒的 31 位病人中，有 9 位 (29.0%) 病人同時感染 TT 病毒，但這 9 位 TT 病毒 DNA 與 Anti-HCV 呈現陽性反應的病人在 ALT、AST、AFP 和平均感染年紀，跟其他 71 位病人並無顯著差異 (Table 8)。



### 三、台灣本土 TT Virus Genomic DNA 定序

實驗首先取用帶有 TT 病毒的檢體 DNA 當模板，先以 PCR 方法增幅 TT Virus genomic DNA 片斷，再利用 PCR-Script™ Amp Cloning Kit 選殖 PCR 產物於 E. coli 載體中。隨後純化該 Plasmid DNA 做 DNA 定序，每段 DNA 的定序均來自三次獨立的 PCR 實驗。

#### 1. PCR amplification of TT Virus genomic DNA

本實驗將 TT Virus genomic DNA 分成五個片段(A~E)分別利用 PCR 方法來增幅 TT Virus DNA 片段，其 primers 之位置如 Fig. 5。PCR 產物經 2% 洋菜膠分離後可以看到在 872 bp 附近有一個明顯的 band，為 TT 病毒基因體 DNA 片段 A (TTV-A)；在 505 bp 附近有一個明顯的 band，為 TT 病毒基因體 DNA 片段 B (TTV-B)；在 1,863 bp 附近有一個明顯的 band，為 TT 病毒基因體 DNA 片段 C (TTV-C)；以及在 901 bp 附近有一個明顯的 band，為 TT 病毒基因體 DNA 片段 D (TTV-D)，如 Fig. 6。TT 病毒基因體 DNA 片段 E (TTV-E) 目前尚未合成出來。

#### 2. Confirmation of the TTV PCR products by PCR amplification and restriction enzyme digestion

為了確認所合成出來的 PCR 產物是否正確，所以，首先以 TT 病毒基因體增幅的片段當模板，採用多組 primers，如 Table 9a，利用 PCR 方法來確認，其結果與預期產物相同如 Fig. 7 和 Table 9a。

另一方面也利用 restriction enzyme 來確認所合成出來的 PCR 產物是否正確，首先取 PCR 增幅的產物，分別加入 restriction enzyme 處理，其結果與預期產物相同如 Fig. 8。

由以上的結果可以證實本實驗所合成出來的 PCR 產物是正確的

#### 3. Cloning the TT Virus genomic DNA fragment

為了大量生產 DNA 以利於後面 genome DNA 選殖實驗用，故選

用載體 pPCR-Script Amp SK (+)。載體 pPCR-Script Amp SK (+)為 ampicillin resistant , *lac Z* 基因上有 Multiple cloning site (MCS) , 可以將目標 DNA ( target DNA ) 插入此區域。然後將 PCR 產物從 2% 洋菜膠利用 VIOGENE 公司出產的 Gel-M™ Gel Extraction System Kit 方法純化出來 , 利用 cloned *Pfu* DNA polymerase 將 PCR 產物的 3' 和 5' 端補成 blunt-ended 的 DNA 片斷當作目標 DNA , 再經由 restriction enzyme (*Srf* I) 和 T4 DNA ligase 酵素做用與 pPCR-Script 載體接合之後 , 送入 Epicurian Coli XL10-Gold Kan ultracompetent cells 中 , 利用 X-gal 及 IPTG 呈色系統作藍白篩選。由於目標 DNA 接入 pPCR-Script 的 *lac Z* 基因 , 所以一但接合成功即會破壞 *lac Z* 基因 , 而不能產生酵素代謝 X-gal , 因此菌落之顏色為白色 , 而不呈現藍色。另外也使用 pUC-18 control plasmid 來當作對照組。

從白色的菌落用牙籤挑取一點菌種培養在 3ml 的 LB medium , 抽取 plasmid DNA , 經由 restriction enzyme (*Not* I 和 *Bam*H I) digestion 之後 , 跑 2% 洋菜膠分離 DNA , 發現有兩段 DNA , 位置在 3,000 bp 以及 872 bp 附近 , 而 pPCR-Script 載體的大小為 2,961 bp , 所以初步確定 plasmid 接合成功 , 並命名為 pPCR-Script-TTV-A , 如 Fig. 9。為了更確定此質體所含的 DNA 為 TTV-A , 所以採用 GENEMARK 公司出產的 Plasmid Miniprep Purification Kit 抽取 plasmid DNA , 直接送去本校貴儀室用自動定序儀定序 , 其結果利用 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的 BLAST 搜尋比對 , 發現 TTV-A 片段與已發表的 TTV 基因型 1a TA278 病毒株序列上是相近的 , 如 Fig. 10 ( 在圖中圈起來並用箭頭指示為相異點 ) ; 另外也分別接好其他三段 plasmid ( B, C, and D ) 利用 restriction enzyme (*Not* I 和 *Bam*H I) 切下跑 2% 洋菜膠分離 DNA , 發現有兩段 DNA 分別為 3,000 bp 以及 505 bp、 3,000 bp 以及 1,863 bp 和 3,000 bp 以及 901 bp , 所以初步確定其他三段 plasmid 接合成功 , 分別命名為 pPCR-Script-TTV-B、 pPCR-Script-TTV-C 和 pPCR-Script-TTV-D , 如 Fig. 9。定序結果利用 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的 BLAST 搜尋比對 , 發現 TTV-B、 TTV-C 和 TTV-D 片段與已發表的 TTV 基因型 1a

TA278 病毒株序列上是相近的，如 Fig. 11、12 和 13 (在圖中圈起來並用箭頭指示為相異點)。

將以上選殖出來的四段 TTV 病毒 DNA 片斷 A~D，經過定序後 (定序用之 primers 如 Table 9b)，四段連起來，其總長為 3,642 bp，如 Fig. 14 (約佔全長的 95%)。以 TTV-TA278 (TTV-1a strain) 為比較基準點，使用 GCG 軟體比對自動定序所得的選殖 TT 病毒基因體序列，並比較序列的差異，結果顯示本實驗所合成出來的 TT 病毒基因體 (0911013 strain) 與 TTV-TA278 (TTV-1a strain) 在 N22 區域 (nt 1,847-2,345) 有 98% 的相似度，如 Fig. 15。

## 討論 ( Discussion )

TT 病毒是一個高度變異性的病毒，自從於 1997 年被發現以來，很多有關 TT 病毒的變異型與地理分布的關係陸續被報導出來，在不同的國家與區域 TT 病毒盛行率也不一樣，例如：在英國為 1.9% ( Simmonds et al., 2002 ) 在日本為 12-81.7% ( Okamoto et al., 1998a ; Kato et al., 1999 ; Tanaka et al., 1999 ) 在巴西為 62% ( Niel et al., 1999 ) 在中國為 28% ( He et al., 1999 ) 在北美洲為 1% ( Charlton et al., 1998 )，至於在台灣為 10-37% ( Kao et al., 1999 ; Lo et al., 1999 ; Zein et al., 1999 ; Kao et al., 2000 )。根據基因序列分析的結果，該病毒基因體在 ORF1 基因序列範圍間有極大的變異。依據 Okamoto 等人的報告，該區域約 200 鹼基的基因序列，其變異程度可達 30% 以上 ( Okamoto et al., 1999a )。

不同的引子 ( primers )，對於 TT 病毒的偵測具有不同之專一性與敏感度。本實驗所用的引子 ( primers ) Set I 和 Set II 來自解碼區域 ( coding region ) 的 N22 區域，經過 PCR 反應後，TT 病毒在正常控制組與肝病患者血清中的 TT 病毒陽性率分別為 17.9% ( 19/106 ) 以及 33.8% ( 28/80 ) (  $p < 0.05$  )，由此結果得知 TT 病毒的感染與肝病之間有相關性，比起台灣一般人帶原率為 11% ( Lo et al., 1999 )，在肝病患者中，TT 病毒的盛行率的確要比一般人高。由於 TT 病毒一般都是透過輸血和血液製品的非腸胃道傳染、口糞感染的腸胃道傳染、體液包括精液和眼淚、母乳以及母子之間的垂直感染，而肝病患者的感染途徑與 TT 病毒類似，因此，肝病患者得到 TT 病毒感染的風險因子由結果顯示的確比正常人來的高，此項結果也證實 TT 病毒傳染途徑確實與罹患肝病的途徑一致。雖然目前仍無法判斷 TT 病毒是否會引發肝炎，而本實驗也針對肝病患者 ALT 值高低與 TT 病毒感染情形做統計分析，發現 ALT 值大於 45 ( IU/l ) 與 ALT 值小於 45 ( IU/l ) 在 TTV 病毒 DNA 的陽性率分別為 33.3 % ( 14/42 ) 以及 35.7 % ( 10/28 )

( $p>0.05$ )，由結果得知肝病病患其 ALT 值與感染到 TT 病毒之間並沒有相關性，這意味著，得到 TT 病毒並不一定會使 ALT 值增加，推測肝病病人在 ALT 值高或低時感染到 TT 病毒，或者是得到 TT 病毒後 ALT 值上升，但幾週後 ALT 值又恢復 (Kao et al., 2000)，所以 TT 病毒是否會引發肝炎仍須學者進一步研究。另一方面，由於本實驗室主要是針對肝病病患作為研究對象，所以病患的 ALT 值明顯是偏高的，此時感染到 TT 病毒的盛行率就沒有顯著差異。

本實驗也針對肝病做分類，其獲得 TT 病毒感染的情形分別如下：急性肝炎為 50% (1/2)、慢性肝炎為 31% (9/29)、肝硬化為 45.5% (10/22)、慢性活動性肝炎為 11.1% (1/9)、B 型肝炎帶原者--健康 28.6% (2/7)、脂肪肝 0% (0/1) 和原因不明的肝炎 40% (4/10)，由結果發現除了慢性活動性肝炎和脂肪肝外 TT 病毒盛行率都超過 28%。由於各類型的肝炎人數不夠多，故再統計上無法有意義的分析，但一般而言對 TTV 的盛行率也都比正常人 (17.9%) 來的高，而由此項結果將來也可以對 TT 病毒與各種肝病的關聯性做更進一步的研究。

此外本實驗也對 B 型及 C 型肝炎的肝病患者與 TT 病毒的關聯性做統計分析，發現 TT 病毒在具有 HBsAg 或 Anti-HCV 的肝病患者之盛行率分別為 26.2% (11/42) 以及 29.0% (9/31)，由分析結果得知，具有 HBsAg 或 Anti-HCV 的肝病患者其與 TT 病毒盛行率並沒有關聯性，也就是說有 B 型或 C 型肝炎的肝病患者，並不會比較容易得到 TTV 病毒的。這與之前的報導類似，例如：在美國明尼蘇達州 HCV 病患為 27% (Zein et al., 1999) 以及在北台灣 HCV 病患為 36% (Wang et al., 1999)，但比在南台灣 HCV 病患 51% 來的低 (Dai et al., 2000)。此外 HBsAg 與 TT 病毒都呈現陽性反應的病患其 ALT、AST、AFP 和平均感染年紀與其他病患並無明顯差異，也說明 TT 病毒感染並不受 HBV 病毒感染的影響，而 Anti-HCV 與 TT 病毒都呈現陽性反應的病患也是一樣，這也證實 TT 病毒感染也不受 HCV 病毒感染的影響。所以，無論是 B 型或是 C 型肝炎病患，TT 病毒並不會影響其肝功能指數。有關在台灣 Anti-HCV 陽性族群中 TT 病毒 DNA 之陽性率，

Kao 等人及 Ho 等人的報告分別為 37% 及 15% (Ho et al., 2000; Kao et al., 2000)。雖然，這與本研究結果之 29.0% 有差異，但這是因為材料取樣與地區之不同使然。肝功能檢查這正常與否並不與 TT 病毒感染與否而有差異 (29.0% VS 37% ;  $p > 0.05$ )。

在做選殖 TT 病毒基因體片段實驗時，發現有些未接合成功的 plasmid DNA，當 Transformation 之後其菌落仍為白色，推測可能原因是載體 (pPCR-Script) 在自我接合的過程中，可能使得讀碼架 (reading frame) 出錯或接到一些殘存較小的 DNA 片段，而不能產生酵素代謝 X-gal，因此菌落之顏色為白色。另外，有些較小的白色菌落有可能是雜菌。

雖然 TT 病毒是目前較被大家認同的屬於肝炎病毒，因為研究報告指出 TT 病毒與肝功能不正常有關 (Nishizawa et al., 1997)，但也有研究報導指出 TT 病毒陽性反應與肝功能正常與否沒有太大關聯 (Lo et al., 1999)，從本實驗結果也證實在肝病患者中 TT 病毒與肝功能指數無顯著相關，此外也觀察到 TT 病毒在控制組中有高的盛行率 (18%)，比起另一篇發表的台灣盛行率 11% 要來的高 (Lo et al., 1999)，這是由於採用兩組不同引子 (Set-I 和 Set-II) 的 PCR 反應去檢測 TT 病毒 DNA 所致，所以發現率較高，一般都只有用一組來篩選。TT 病毒是近五年來新發現的病毒，對人體的致病機轉還不是很清楚，因此，還需要更多的研究報告來加以佐證。

TT 病毒的特徵除了高盛行率之外，還有基因體高變異性，截至目前為止，至少有 23 種不同的基因型，而它們彼此之間有 30% 的差異性 (Okamoto et al., 1998a)，然而，隨後有越來越多關於 TT 病毒不同的基因型陸續被報導出來 (Simmonds et al., 1998; Tanaka et al., 1998b)。

TT 病毒在全球最主要的基因型為基因型 1 (Genotype 1)。本實驗所用的 TT 病毒經過定序後發現與 TT 病毒基因型 1a 十分相似，至少有 98% 以上的相似度，由此可見 TT 病毒的基因體是多樣化的，縱使是相同病毒株也會因為在不同個體，其基因體序列也不盡完全相

同，而這也印證了 DNA 病毒突變機率比一般生物來的高。至於突變機率為何比一般生物來的高，推測可能是因為 DNA 病毒在複製時缺乏 3'到 5'端的校正功能，所以只要在不影響病毒的蛋白質功能下，是被允許有些微錯誤的。

過去的研究顯示 TT 病毒基因型 1 的盛行率在血清中 ALT 值高的捐血人比正常 ALT 值的捐血人還要更高 ( Itoh et al., 1999b )，因此有些學者推測基因型 1 的 TT 病毒在肝臟損壞上可能扮演致病原的角色 ( Kanda et al., 2001 )，而本實驗所選用的病人其基因型為 1 而其 ALT 值也比正常人高，將來也許可以將此病人的完整 TT 病毒基因體選殖出來，並分析其與肝病的關聯性。

從本實驗結果得知，在選定研究族群裡，TT 病毒似乎與肝病有些相關，未來可以收集更多的不同種類病人檢體，做更進一步的研究分析，雖然本實驗的結果中，TT 病毒似乎與 C 型肝炎病毒感染率無關，且與 ALT 值的高低無關，但這可能是受檢體數目不足的影響，將來可以再收集更多的檢體，做更詳細的統計分析。至於所選殖出來的 TT 病毒斷片，由於 TT 病毒基因體末端含有一段約 114 鹼基的 GC-rich 區域，一般 PCR 反應很難合成，所以目前本實驗只完成 95% TT 病毒基因體的選殖，將來也許可以克服完成全部基因體的選殖並且連接成一完整的病毒基因體，然後送入不同的細胞，觀察其在細胞內的複製以及蛋白質的表現情形，以建立 TT 病毒在細胞內的生長模式，未來也可以進一步用 Microarray assay 來分析 TT 病毒感染肝細胞後有哪些基因表達是上升或下降，這將有助於了解 TT 病毒對肝臟的影響。也可以用分子模式來釐清 TT 病毒與肝炎之間的關聯性。

## 參考文獻 ( Reference )

Bendinelli, M., Pistello, M., Maggi, F., Fornai, C., Freer, G., and Vatteroni, M. L. (2001). Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 98-113.

Biagini, P., Attoui, H., Gallian, P., Touinssi, M., Cantaloube, J. F., de Micco, P, and de Lamballerie, X. (2000). Complete sequences of two highly divergent european isolates of TT virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *271*, 837-841.

Bonis, P. A. (1999). TT virus. *J. Am. Soc. Nephrol.* *10*, 1828-1832.

Charlton, M., Adjei, P., Poterucha, J., Zein, N., Moore, B., Therneau, T, Krom, R., and Wiesner, R. (1998). TT-virus infection in North American blood donor, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* *28*, 839-842.

Christensen, J. K., Eugen-Olsen, J., SLrensen, M., Ullum, H., Gjedde, S. B., Pedersen, B. K., Nielsen, J. O., and Krogsgaard, K. (2000). Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* *181*, 1796-1799.

Cossart, Y. (1998). TTV a common virus, but pathogenic? *Lancet* *352*, 164.

Dai, C. Y., Yu, M. L., Chuang, W. L., Lu, S. N., Wang, J. H., Huang, J. F., Hou, C., Chen, S. C., Lin, Z. Y., Hsieh, M. Y., Wang, L. Y., Tsai, J. F., and Chang, W. Y. (2000). The epidemiology of TT virus (TTV) infection in a hepatitis C and B virus hyperendemic area of southern Taiwan. *Kaohsiung J. Med. Sci.* *16*, 500-509.

Davidson, F., MacDonald, D., Mokili, J. L., Prescott, L. E., Graham, S., and Simmonds, P. (1999). Early acquisition of TT virus (TTV) in an area endemic for TTV infection. *J. Infect. Dis.* *179*, 1070-1076.

Deng, X., Terunuma, H., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M., and Akahane, Y. (2000). Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *J. Med. Virol.* *62*, 531-537.



Erker, J. C., Leary, T. P., Desai, S. M., Chalmers, M. L., and Mushahwar, I. K. (1999). Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J. Gen. Virol.* *80*, 1743-1750.

Fabrizi, F., Martin, P., Lunghi, G., and Locatelli, F. (2001). TT virus infection in end-stage renal disease (ESRD). *J. Nephrol.* *14*, 80-87.

Feray, C., Gigou, M., Samuel, D., Reyes, G., Bernuau, J., Reynes, M., Bismuth, H., and Brechot, C. (1993). Hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA in serum and liver of patients with fulminant hepatitis. *Gastroenterology* *104*, 549-555.

Forns, X., Hegerich, P., Darnell, A., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. (1999). High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. *J. Med. Virol.* *59*, 313-317.

Fujiwara, T., Iwata, A., Iizuka, H., Tanaka, T., and Okamoto, H. (1998). Transfusion transmitted virus. *Lancet* *352*, 1310.

Gallian, P., Berland, Y., Olmer, M., Raccach, D., Micco, P. de, Biagini, P., Simon, S., Bouchouareb, D., Mourey, C., Roubicek, C., Touinssi, M., Cantaloube, J. F., Dussol, B., and de Lamballerie, X. (1999). TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 2538-2542.

Gerner, P., Oettinger, R., Gerner, W., Falbrede, J., and Wirth, S. (2000). Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr Infect. Dis. J.* *19*, 1074-1077.

Gilbert, W., and Dressler, D. (1968) DNA replication: the rolling circle model. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* *33*, 473-484.

Halfon, P., Bourliere, M., Feryn, J. M., Khiri, H., Chanas, M., Salvadori, J. M., and Ouzan, D. (1999). Prevalence of transmitted transfusion virus (TTV) in populations at different risk for hepatitis virus: hemodialysis, chronic hepatitis C and cryptogenetic hepatitis patients. *J. Hepatol.* *30*, 552.

Hallett, R. L., Clewley, J. P., Bobet, F., McKiernan, P. J., and Teo, C. G. (2000). Characterization of a highly divergent TT virus genome. *J. Gen. Virol.* *81*, 2273-2279.

He, C., Nomura, F., Yukimasa, N., Itoga, S., Yamada-Osaki, M., Sumazaki, R., and Nakai, T. (1999). Transfusion-transmitted virus infection in China: prevalence in blood donors and in patients with liver diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 899-903.

Hijikata, M., Takahashi, K., and Mishiro, S. (1999). Complete circular

DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 260, 17-22.

Hino, S. (2002) TTV, a new human virus single stranded circular DNA genome. *Rev. Med. Virol.* 12, 151-158.

Ho, T. F., Yang, S. C., Huang, Y. T., Hsieh, M. H. (2000). TT virus infection in screened Taiwanese blood donors. *Vox Sang* 79, 198-200.

Inami, T., Konomi, N., Arakawa, Y., and Abe, K. (2000). High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2407-2408.

Ikeda, H., Takasu, M., Inoue, K., Okamoto, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999). 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.* 30, 205-212.

Ikeuchi, T., Okuda, K., Yokosuka, O., Kanda, T., Kobayashi, S., Murata, M., Hayashi, H., Yokozeki, K., Ohtake, Y., Kashima, T., and Irie, Y. (1999). Superinfection of TT virus and hepatitis C virus among chronic haemodialysis patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 796-800.

Irving, W. L., Ball, J. K., Berridge, S., Curran, R., Grabowska, A. M., Jameson, C. L., Neal, K. R., Ryder, S. D., and Thomson, B. J. (1999). TT virus infection in patients with hepatitis C: frequency, persistence, and sequence heterogeneity. *J. Infect. Dis.* 180, 27-34.

Ishikawa, T., Hamano, Y., and Okamoto, H. (1999). Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. *Infection* 27, 298.

Itoh, K., Hirakawa, K., Okamoto, H., Ukita, M., Tanaka, H., Sawada, N., Tsuda, F., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999b). Infection by an unenveloped DNA virus associated with non-A to -G hepatitis in Japanese blood donors with or without elevated ALT levels. *Transfusion* 39, 522-526.

Itoh, Y., Takahashi, M., Fukuda, M., Shibayama, T., Ishikawa T., Tsuda, F., Tanaka, T., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (2000). Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 718-24.

Itoh, K., Takahashi, M., Ukita, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (1999a). Influence of primers on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 180, 1750-1751.

Jarvis, L. M., Davidson, F., Hanley, J. P., Yap, P. L., Ludlam, C. A., and Simmonds, P. (1996). Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet* 348, 1352-1355.

Kamahora, T., Hino, S., and Miyata, H. (2000). Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J. Virol.* *74*, 9980-9986.

Kanda, Y., Chiba, S., Tanaka, Y., Kami, M., Saito, T., Asai, T., Izutsu, K., Yuji, K., Ogawa, S., Honda, H., Mitani, K., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1999a). TT virus in frequently transfused patients. *Am. J. Med.* *106*, 116-117.

Kanda, Y., and Hirai, H. (2001). TT Virus in hematological disorders and bone marrow transplant recipient. *Leuk. Lymphoma* *40*, 483-489.

Kanda, Y., Tanaka, Y., Kami, M., Saito, T., Asai, T., Izutsu, K., Yuji, K., Ogawa, S., Honda, H., Mitani, K., Chiba, S., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1999b). TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood* *93*, 2485-2490.

Kao, J. H., Chen, W., Chen, P. J., Lai, M. Y., and Chen, D. S. (2000). TT virus infection in patients with chronic hepatitis B or C: influence on clinical, histological and virological features. *J. Med. Virol.* *60*, 387-392.

Kao, J. H., Chen, W., Hsiang, S. C., Chen, P. J., Lai, M. Y., and Chen, D. S. (1999). Prevalence and implication of TT virus infection: minimal role in patients with non-A-E hepatitis in Taiwan. *J. Med. Virol.* *59*, 307-312.

Kato, T., Mizokami, M., Orito, E., Nakano, T., Tanaka, Y., Ueda, R., Hirashima, N., Iijima, Y., Kato, T., Sugauchi, F., Mukaide, M., Shimamatsu, K., Kage, M., and Kojiro, M. (1999). High prevalence of TT virus infection in Japanese patients with liver diseases and in blood donors. *J. Hepatol.* *31*, 221-227.

Linnen, J., Wages, J., Jr., Zhang-Keck, Z. Y., Fry, K. E., Krawczynski, K. Z., Alter, H., Koonin, E., Gallagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Fung, K., Nakatsuji, Y., Shih, J. W., Young, L., Piatak, M., Jr., Hoover, C., Fernandez, J., Chen, S., Zou, J. C., Morris, T., Hyams, K. C., Ismay, S., Lifson, J. D., Kim, J. P., and et al. (1996). Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* *271*, 505-508.

Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., and Wigler, M. (1993). Cloning the difference between two complex genomes. *Science* *259*, 946-951.

Lo, S. Y., Peng, K. F., Ma, H. C., Yu, J. H., Li, Y. H., Lin, H. H., Lua, A. C., and Lee, M. L. (1999). Prevalence of TT virus DNA in eastern Taiwan aborigines. *J. Med. Virol.* *59*, 198-203.

Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Yano, M., Akbar, S. M., Torisu, M., and Onji, M. (2000). Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects.

*Intervirology* 43, 16-19.

Matsumoto, A., Yeo, A. E., Shih, J. W., Tanaka, E., Kiyosawa, K., and Alter, H. J. (1999). Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* 30, 283-288.

Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M. A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K., and Hino, S. (1999). Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J. Virol.* 73, 3582-3586.

Muljono, D. H., Nishizawa, T., Tsuda, F., Takahashi, M., and Okamoto, H. (2001). Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Arch. Virol.* 146, 1249-1266.

Mushahwar, I. K., Erker, J. C., Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Birkenmeyer, L. G., Chalmers, M. L., Pilot-Matias, T. J., and Dexai, S. M. (1999). Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3177-3182.

Mushahwar, I. K. (2000). Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *J. Med. Virol.* 62, 399-404.

Nakagawa, N., Ikoma, J., Ishihara, T., Yasui-Kawamura, N., Fujita, N., Iwasa, M., Kaito, M., Watanabe, S., and Adachi, Y. (2000). Biliary excretion of TT virus (TTV). *J. Med. Virol.* 61, 462-427.

Naoumov, N. V., Petrova, E. P., Thomas, M. G., and Williams, R. (1998). Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 352, 195-1197.

Naoumov, N. V. (2000). TT virus--highly prevalent, but still in search of a disease. *J. Hepatol.* 33, 157-159.

Niagro, F. D., Forsthoefel, A. N., Lawther, R. P., Kamalanathan, L., Ritchie, B. W., Latimer, K. S., Lukert, P. D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 143, 1723-1744.

Niel, C., de Oliveira, J. M., Ross, R. S., Gomes, S. A., Roggendorf, M., and Viazov, S. (1999). High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J. Med. Virol.* 57, 259-263.

Niel, C., Saback, F. L., and Lampe, E. (2000). Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1926-1930.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1997). A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *241*, 92-97.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Tsuda, F., Aikawa, T., Sugai, Y., Konishi, K., Akahane, Y., Ukita, M., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999). Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol.* *73*, 9604-9608

Oguchi T, Tanaka E, Orii K, Kobayashi M, Hora K, Kiyosawa K. (1999). Transmission of and liver injury by TT virus in patients on maintenance hemodialysis. *J. Gastroenterol.* *34*, 234-240.

Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1998b). Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J. Med. Virol.* *56*, 128-132.

Okamoto, H., Mayumi, M. (2001). TT virus: virological and genomic characteristics and disease associations. *J. Gastroenterol* *36*, 519-529.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1998a). Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology* *10*, 1-16.

Okamoto, H., Nishizawa, T., and Ukita, M. (1999a). A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirology* *42*, 196-204.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Peng, Y., Takahashi, M., Kishimoto, J., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (2000a). Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. *Virology* *277*, 368-378.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Ukita, M., Takahashi, M., Fukuda, M., Iizuka, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999c). The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology* *259*, 437-448.

Okamoto, H., Takahashi, M., Kato, N., Fukuda, M., Tawara, A., Fukuda, S., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (2000c). Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* *74*, 10236-10239.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Sugai, Y., Sai,

T., Tanaka, T., and Tsuda, F. (2000b). Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 657-662.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999b). Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 259, 428-436.

Okamoto, H., Ukita, M., Nishizawa, T., Kishimoto, J., Hoshi, Y., Mizuo, H., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (2000d). Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. *J. Virol.* 74, 5161-5167.

Peng, Y. H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Ishikawa, T., Yoshikawa, A., Okamoto, H. (2002). Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch. Virol.* 147, 21-41.

Prati, D., Lin, Y. H., De Mattei, C., Liu, J. K., Farma, E., Ramaswamy, L., Zanella, A., Lee, H., Rebulli, P., Allain, J. P., Sirchia, G., and Chen, B. (1999). A prospective study on TT virus infection in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia. *Blood* 93, 1502-1505.

Prescott, L. E., and Simmonds, P. (1998). International collaborators: Global distribution of Transfusion-transmitted virus (letter). *N. Engl. J. Med.* 339, 776-777.

Ross, R. S., Viazov, S., Runde, V., Schaefer, U. W., and Roggendorf, M. (1999). Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J. Clin. Virol.* 13, 181-184.

Saback, F. L., Gomes, S. A., de Paula, V. S., da Silva, R. R., Lewis-Ximenez, L. L., and Niel, C. (1999). Age-specific prevalence and transmission of TT virus. *J. Med. Virol.* 59, 318-322.

Shibayama, T., Masuda, G., Ajisawa, A., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tsuda, F., and Okamoto, H. (2001). Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS.* 30, 563-570.

Simmonds, P., Davidson, F., Lycett, C., Prescott, L. E., MacDonald, D. M., Ellender, J., Yap, P. L., Ludlam, C. A., Haydon, G. H., Gillon, J., and Jarvis, L.M. (1998). Detection of a novel DNA virus (TT virus) in blood donors and blood products. *Lancet* 352, 191-195.

Simmonds, P. (2002). TT virus infection: a novel virus-host relationship.

*J. Med. Microbiol.* 51, 455-458.

Simons, J.N., Leary, T.P., Dawson, G.J., Pilot-Matias, T.J., Muerhoff, A.S., Schlauder, G.G., Desai, S.M., and Mushahwar, I.K. (1995). Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat. Med.* 1, 564-569.

Springfeld, C., Bugert, J. J., Schnitzler, P., Tobiasch, E., Kehm, R., and Darai, G. (2000). TT virus as a human pathogen: significance and problems. *Virus Genes* 20, 35-45.

Tada, K., Tajiri, H., Kondou, H., Mishiro, S., and Okada, S. (2000). Confirmation of mother-to-child transmission of TT virus. *Pediatr Infect. Dis. J.* 19, 255-256.

Takahashi, K., Hoshino, H., Ohta, Y., Yoshida, N., and Mishiro, S. (1998). Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatology* 12, 233-239.

Takahashi, K., Hijikata, M., Samokhvalov, E. I., and Mishiro, S. (2000a). Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirology* 43, 119-123.

Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M., and Mishiro, S. (2000b). Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch. Virol.* 145, 979-993.

Takayama, S., Miura, T., Matsuo, S., Taki, M., and Sugii, S. (1999b). Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs. *Br. J. Haematol.* 104, 626-629.

Takayama, S., Yamazaki, S., Matsuo, S., and Sugii, S. (1999a). Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 208-211.

Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Kato, T., Kato, H., Mukaide, M., Park, Y. M., Kim, B. S., and Ueda, R. (1998b). New genotypes of TT virus (TTV) and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *F. E. B. S. Lett.* 437, 201-206.

Tanaka, H., Okamoto, H., Luengrojanakul, P., Chainuvati, T., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1998a). Infection with an unenveloped DNA Virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. *J. Med. Virol.* 56, 234-238.

Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Nakano, T., Kato, T., Ding, X.,

Ohno, T., Ueda, R., Sonoda, S., Tajima, K., Miura, T., and Hayami, M. (1999). A new genotype of TT virus (TTV) infection among Colombian native Indians. *J. Med. Virol.* *57*, 264-268.

Tawara, A., Akahane, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ishikawa, T., and Okamoto, H. (2000). Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *278*, 470-476.

Tsuda, F., Okamoto, H., Ukita, M., Tanaka, T., Akahane, Y., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999). Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J. Virol. Methods* *77*, 199-206.

Ukita, M., Okamoto, H., Kato, N., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999). Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J. Infect. Dis.* *179*, 1245-1248.

Ukita, M., Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Iizuka, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (2000). The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates. *Arch. Virol.* *145*, 1543-1559.

Wang, J. H., Lu, S. N., Wu, J. C., Huang, J. F., Yu, M. L., Chen, S. C., and Chuang, W. L. (1999). A hyperendemic community of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection in Taiwan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *93*, 253-254.

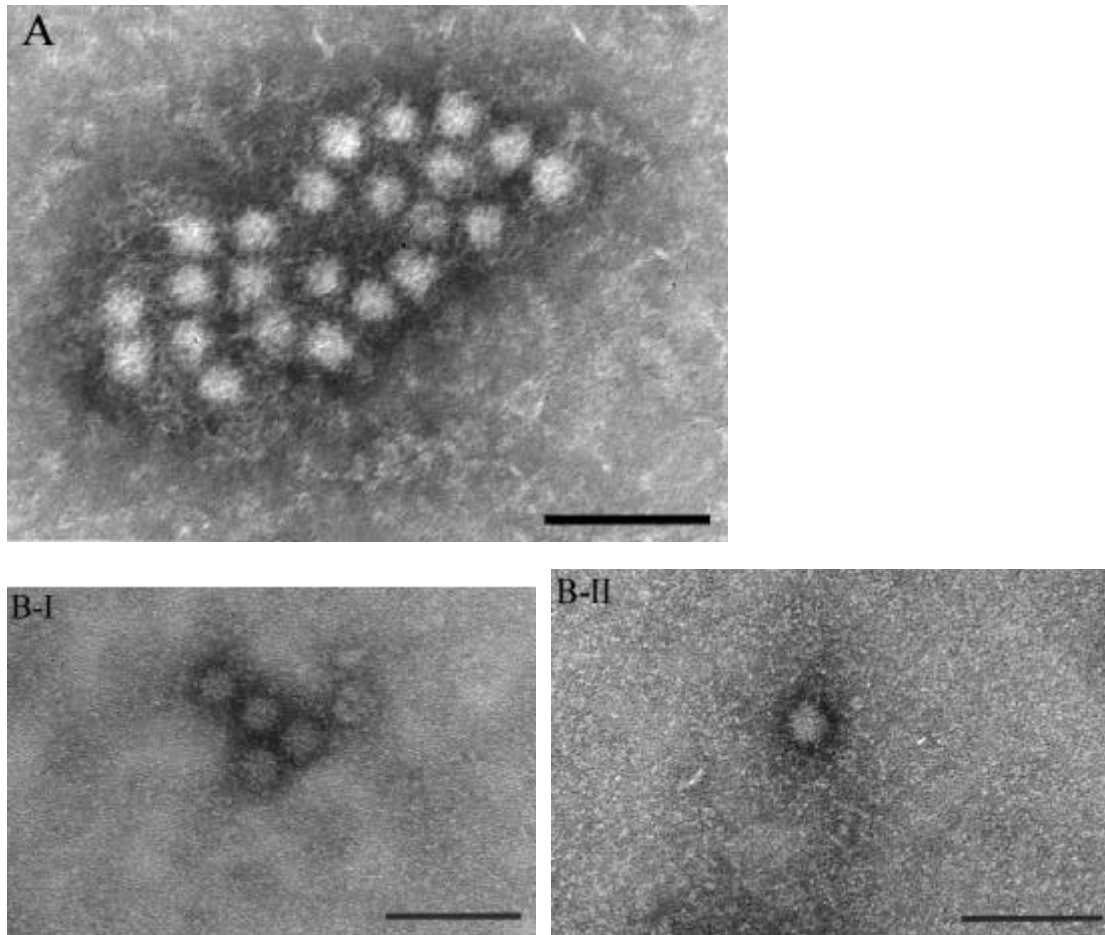
Woodfield, D. G., Gane, E., and Okamoto, H. (1998). Hepatitis TT virus is present in New Zealand. *N. Z. Med. J.* *111*, 195-196.

Yamada-Osaki, M., Sumazaki, R., Noguchi, E., Shibasaki, M., and Matsui, A. (1998). Frequency of TTV viraemia in Japanese population by age. *Lancet* *352*, 1310.

Yap, P. L. (1996). The viral safety of intravenous immune globulin. *Clin. Exp. Immunol.* *104*, 35-42.

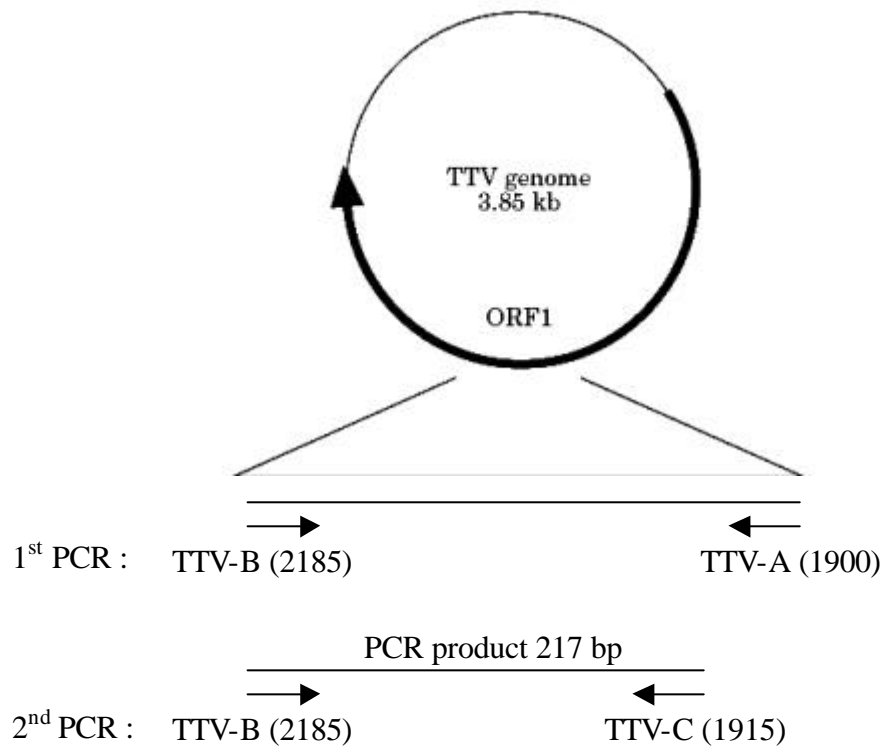
Zein, N. N., Arslan, M., Li, H., Charlton, M. R., Gross, J. B. Jr, Poterucha, J. J., Therneau, T. M., Kolbert, C. P., and Persing, D. H. (1999). Clinical significance of TT virus infection in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* *94*, 3020-3027.



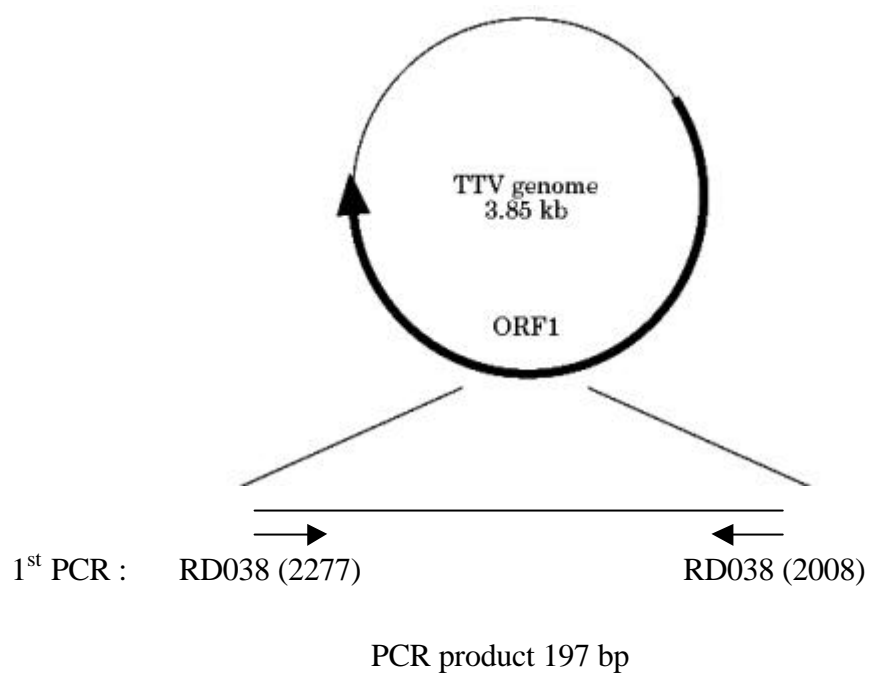


**Fig. 1 Electron micrographs of TTV-associated particles.** (A) An aggregated form of TTV-associated particles with a diameter of 30-32 nm from serum sample with a TTV DNA titer of  $10^8$  copies/ml. (B-I) An aggregate comprised of four TTV-associated particles with a diameter of 30-32 nm, with halos, observed upon incubation of fecal supernatant containing TTV of genotype 1a with  $\gamma$ -globulins of human plasma containing TTV genotype 1a-specific antibody. (B-II) A single, spherical particle, similar to that in (B-I), without apparent antibody observed upon incubation of the fecal supernatant with the  $\gamma$ -globulins of human plasma which does not contain genotype 1a-specific antibody (control). The scale bar represents 100 nm. (Adapted from Ref. Itoh et al., 2000)

Set I : TTV semi-nested PCR

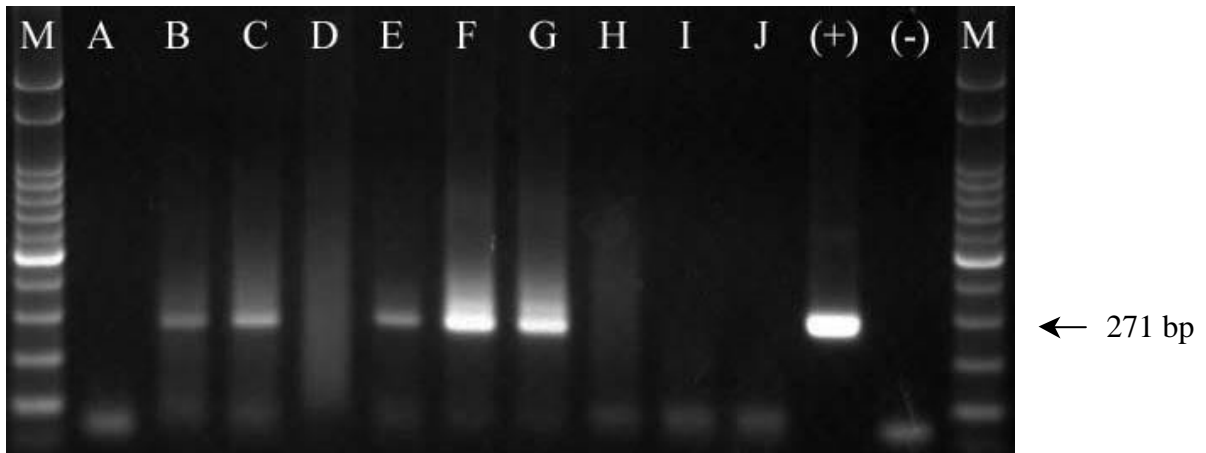


Set II : TTV double-nested PCR

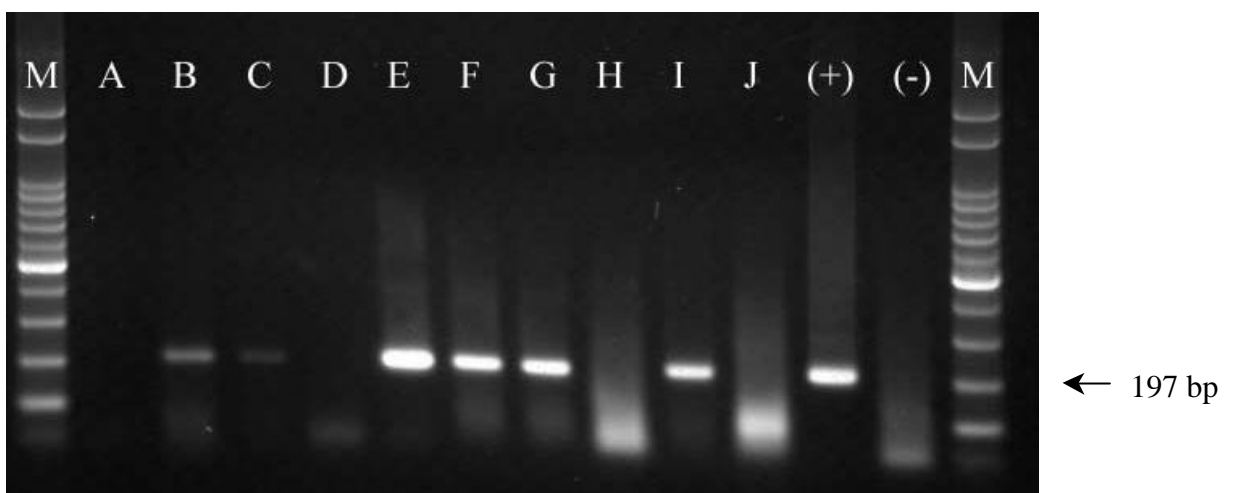


2<sup>nd</sup> PCR :                       $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$                        $\xleftarrow{\hspace{1cm}}$   
    RD052 (2257)                      RD052 (2061)

**Fig. 2 Map and the locations of primers used to screen of virus.**



**Fig. 3A Agarose gel electrophoresis of TTV PCR products (set-I).** PCR was carried out with semi-nested PCR protocol with Set-I primers and the labels of A-J are the detecting samples. The result shows that B, C, E, F, and G are positive, whereas A, D, H, I, and J are negative. The expected sizes of products by Set-I primers are 271 bp. Mark (-) indicates a negative control which PCR with no DNA template in it, (+) TW128 (from Dr. Ching Li's lab.) used as a positive control, and M refers as DNA MW Marker.



**Fig. 3B Agarose gel electrophoresis of TTV PCR products (set-II).** PCR was carried with double-nested PCR protocol with Set-II primers and the labels of A-J are the detecting samples. The result shows that B, C, E, F, G, and I are positive, whereas A, D, H, and J are negative. The

expected sizes of PCR products by Set-II primers is 197 bp. Mark (-) indicates a negative control, (+) TW128 used as a positive control, and M refers as DNA MW Marker.

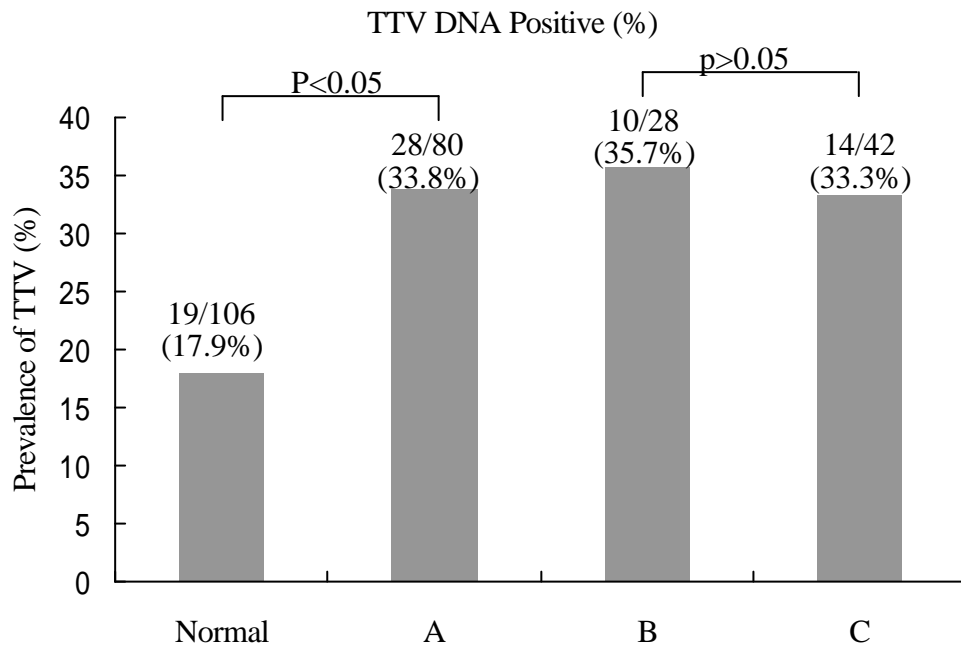
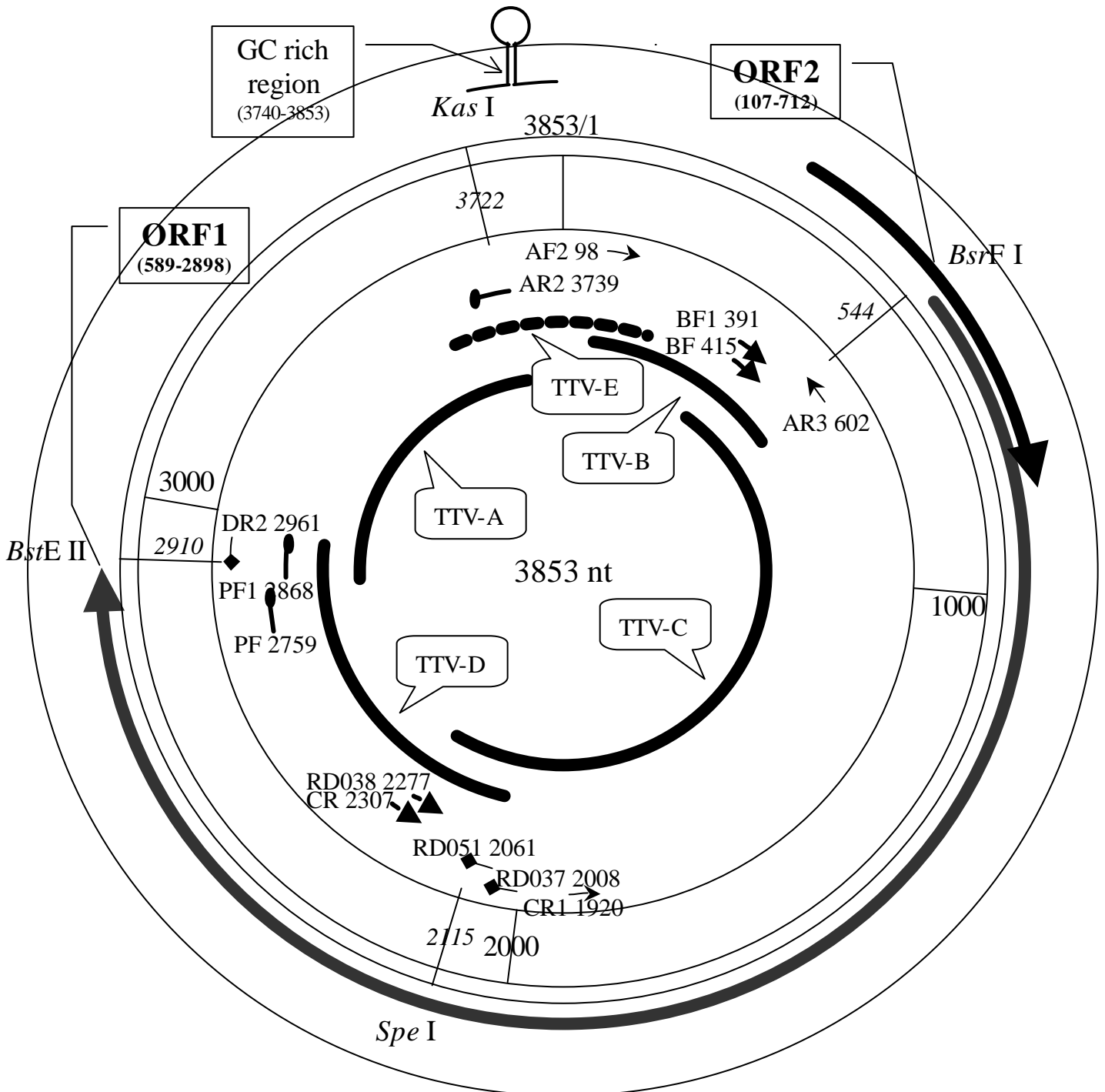
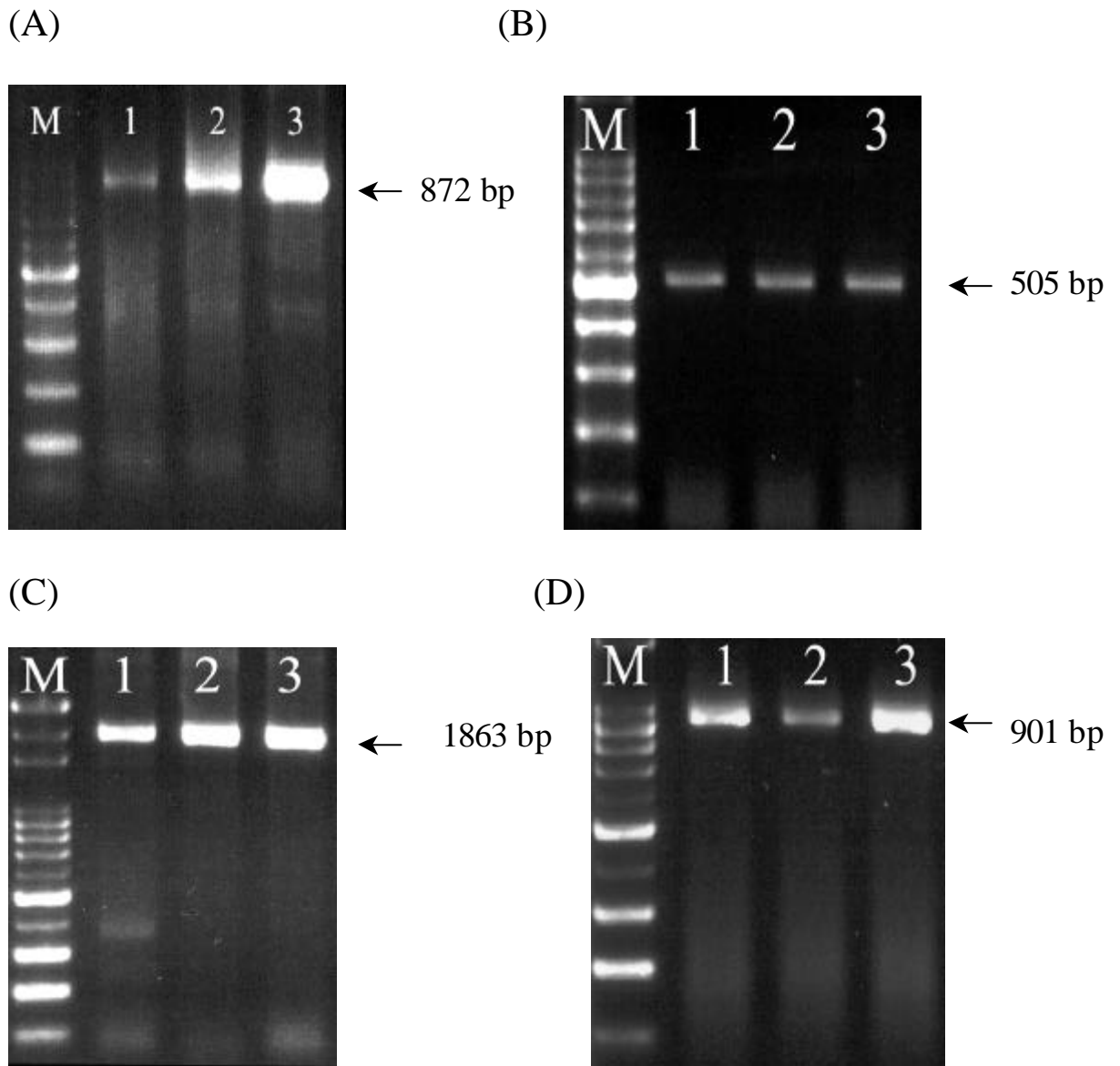


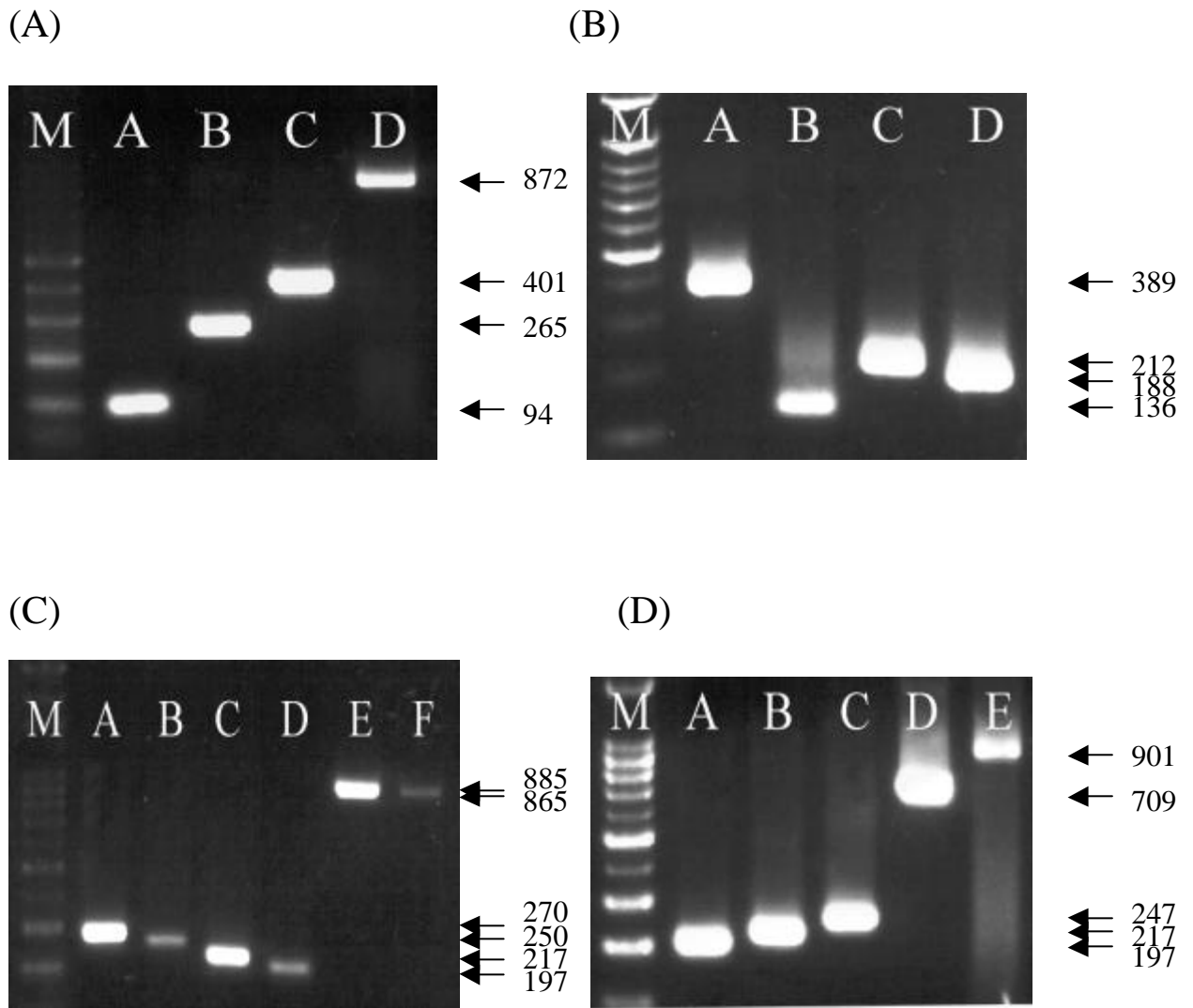
Fig. 4 **The incidence of TT Virus in Liver Disease and Normal.** A, The liver disease patients; B, The liver disease patients, ALT = 45 IU/L; C, The liver disease patients, ALT > 45 IU/L; Normal, The health people without liver disease.



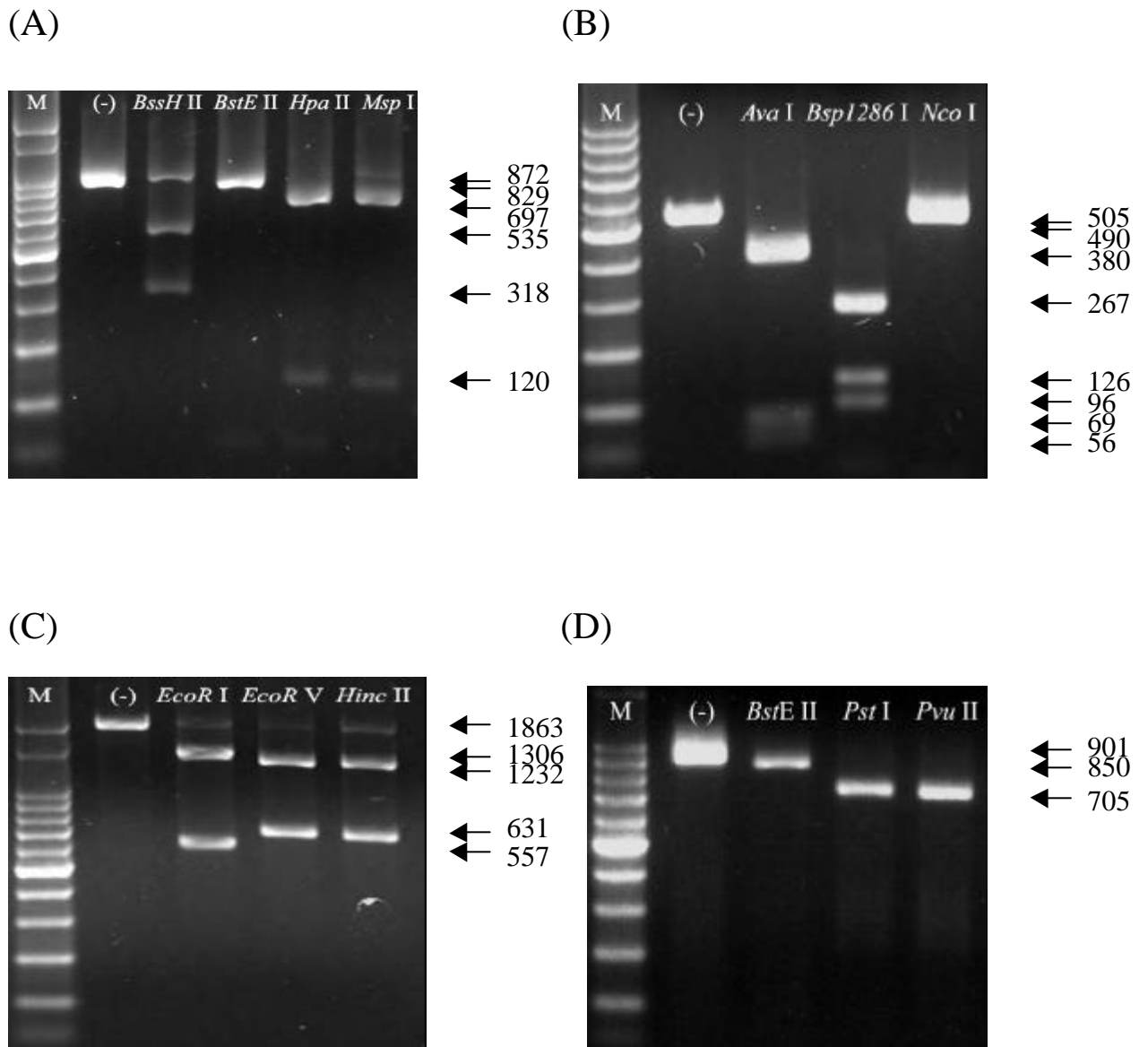
**Fig. 5 TTV DNA map and the locations of primers used for PCR amplification.** The genome of TTV is presented as a circle which is numbered according to the size of the virus. Many primers were designed and synthesized according to the nucleotide sequence published (Miyate et al., 1999; Mushahwar et al., 1999). These primers were used to amplify genomic fragments of TTV that flanking with restriction enzyme sites, as shown in this figure, which may later be used to assembling viral genome. The two main ORFs are indicated by arrows. Domains TTV-A, B, C, and D represent the four overlapping PCR fragments subsequently cloned.



**Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of TTV PCR products** (A) (B) (C) (D) Panels are represented TTV PCR fragments of A, B, C, D, respectively. The expected sizes of the PCR products from A~D fragments of TTV genomic DNA were 872, 505, 1863, and 901 bp, respectively (marked by an arrow). M refers as DNA MW Marker.

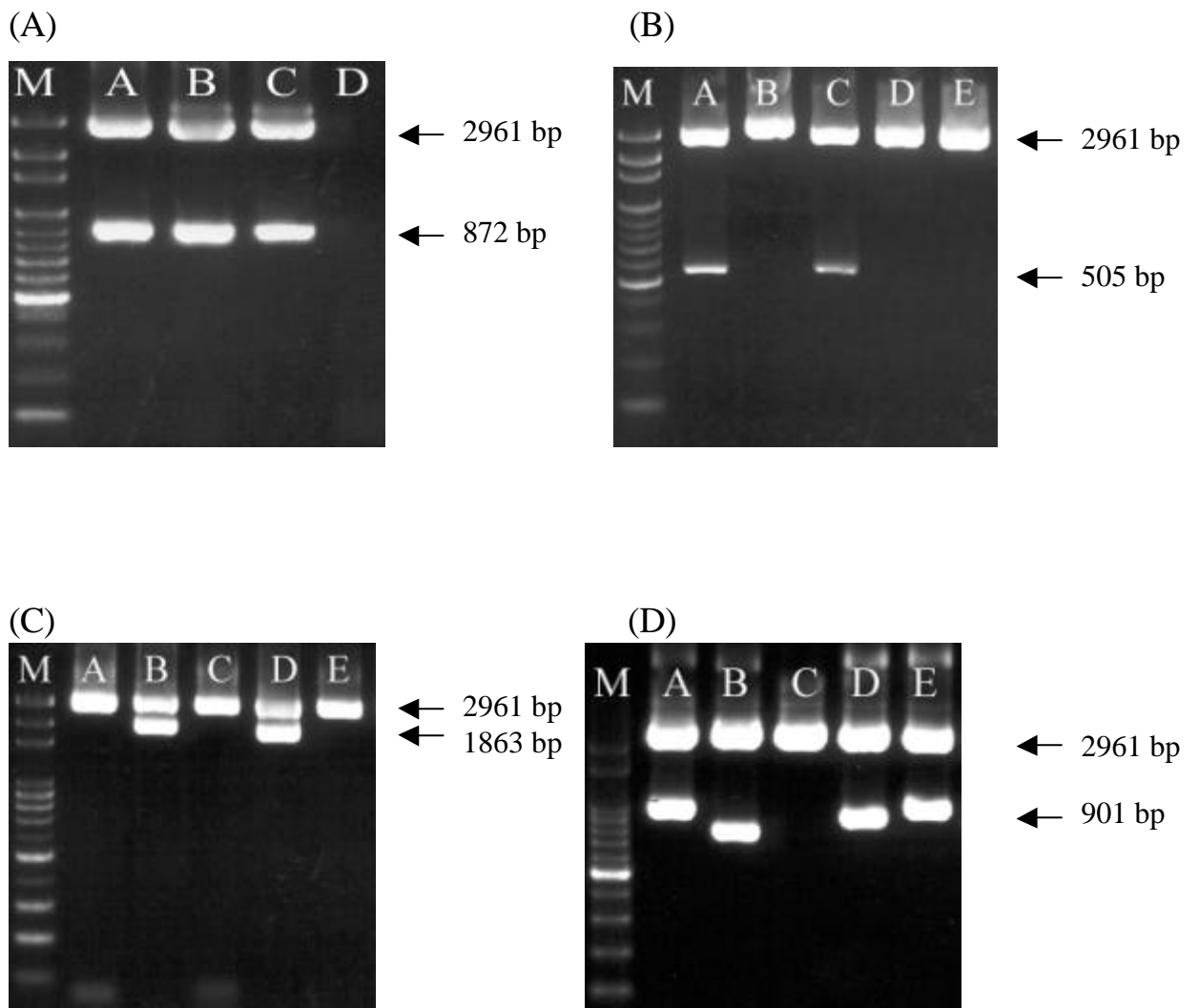


**Fig. 7 PCR amplification to confirm the TTV PCR product reality.** (A) The PCR products from A fragment of TTV genomic DNA were subjected to amplification with primers (listed in Table 9a). (B) The PCR products from B fragment of TTV genomic DNA were subjected to amplification with primers (listed in Table 9a). (C) The PCR products from C fragment of TTV genomic DNA were subjected to amplification with primers (listed in Table 9a). (D) The PCR products from D fragment of TTV genomic DNA were subjected to amplification with primers (listed in Table 9a). M refers as DNA MW Marker.



**Fig. 8 Restriction enzyme digestion of the TTV PCR products.** (A) (B) (C) (D) Panels are represented TTV PCR fragments of A, B, C, D, respectively. The restriction enzymes used were indicated on each lane. (-), no restriction enzyme digested. M refers as DNA MW Marker.





**Fig. 9 Cloning the TTV PCR fragments into the pPCR-Script Amp SK (+) vector.** (A) (B) (C) (D) Panels are represented the TTV DNA; A, B, C, and D tragements cloning, respectively, each fragment was cloned into pPCR-Script Amp SK (+) vector, miniprep DNA was digested with the *Not* I and *Bam*H I restriction enzymes to cut out the TTV DNA fragment insert.



Model 377  
Version 3.0  
SemiAdaptive  
Version 3.0  
21-TTV-G4-T7  
Lane 21

Signal G:150 A:154 T:155 C:145  
DT {BD Set Any-Primer}  
Matrix0825  
Points 950 to 4280 Base 1: 950  
Page 1 of 1  
Mon, Dec 9, 2002 5:09 AM  
Wed, Aug 14, 2002 6:08 AM  
Spacing: 9.00(-9.00)

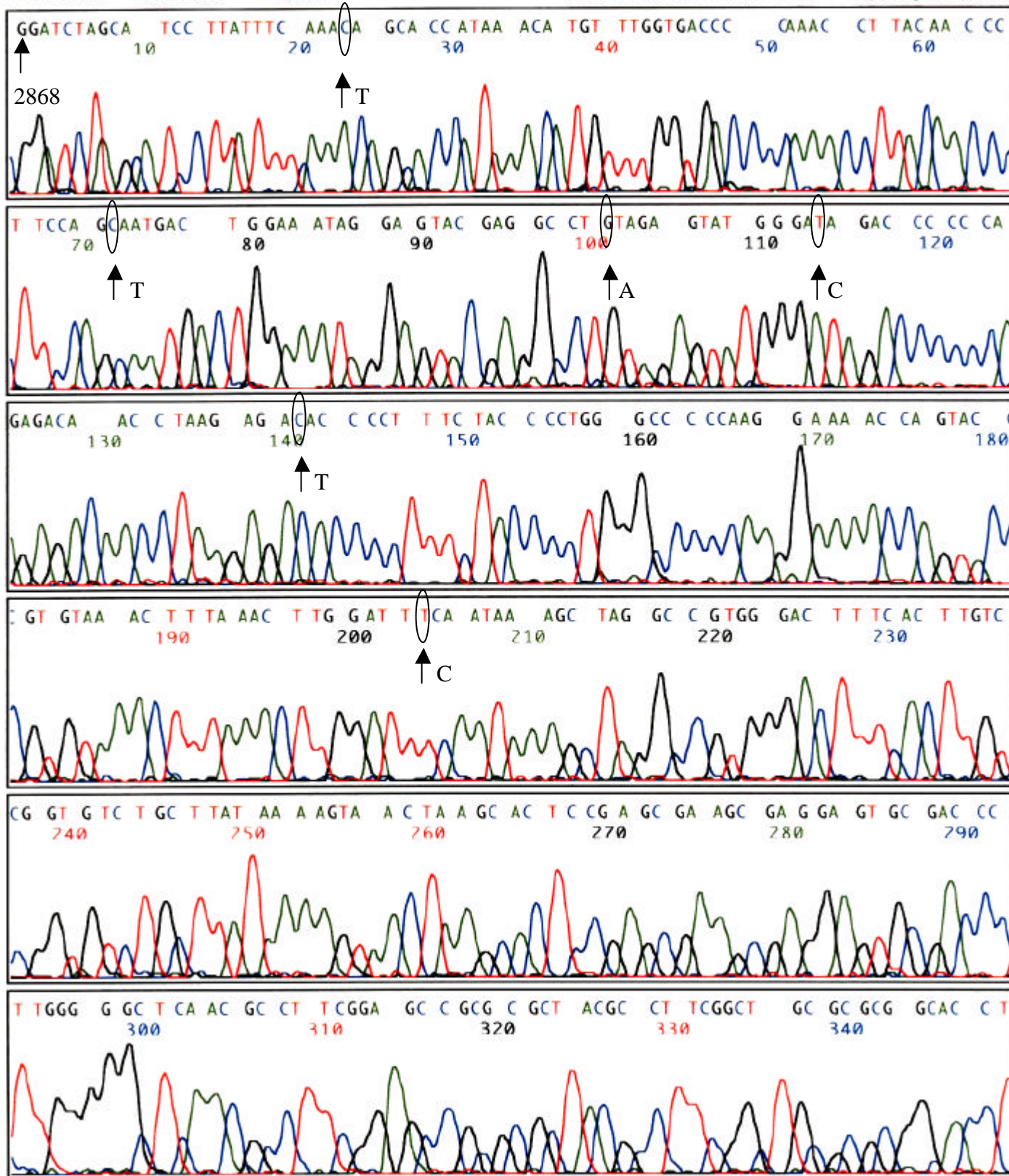


Fig. 10 The sequence of TTV DNA; fragment A.





Model 377  
Version 3.0  
SemiAdaptive  
Version 3.0  
24•TTV-I-3-T7  
24•TTV-I-3-T7  
Lane 24

Signal G:150 A:102 T:109 C:89  
DT {BD Set Any-Primer}  
Matrix0825  
Points 1675 to 5780 Base 1: 1675 Spacing: 9.00(-9.00)  
Page 1 of 2  
Mon, Dec 9, 2002 5:28 AM  
Tue, Nov 12, 2002 5:43 AM

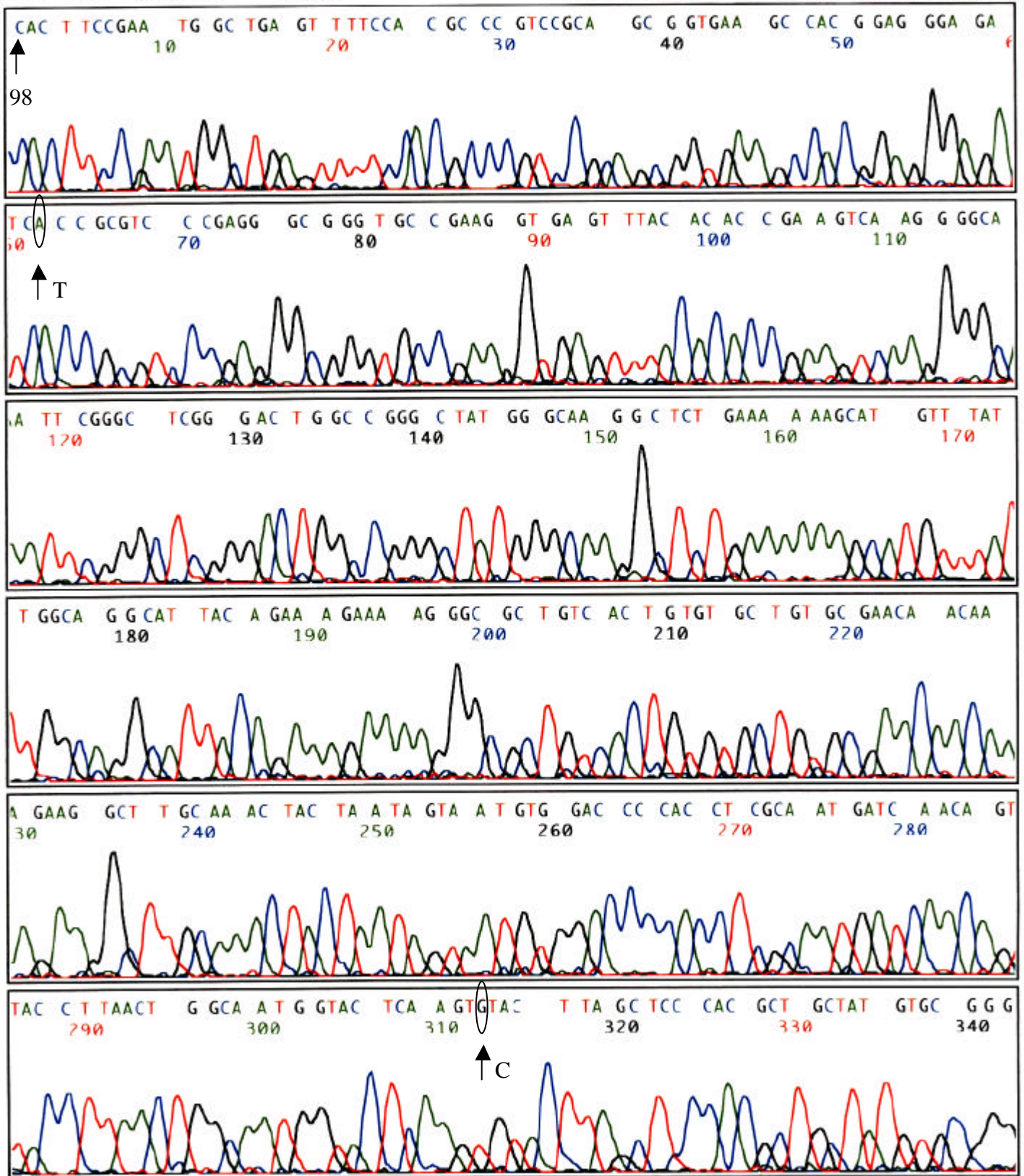


Fig. 11 The sequence of TTV DNA; fragment B.





Model 377  
Version 3.0  
ABI100  
Version 3.0  
05-TTV-B8-T7  
05-TTV-B8-T7  
Lane 5

Signal G:287 A:191 T:225 C:197  
DT {BD Set Any-Primer}  
Matrix0825  
Points 1510 to 4620 Base 1: 1510 Spacing: 9.43(9.43)  
Page 1 of 1  
Mon, Dec 9, 2002 5:41 AM  
Wed, Apr 17, 2002 5:03 PM

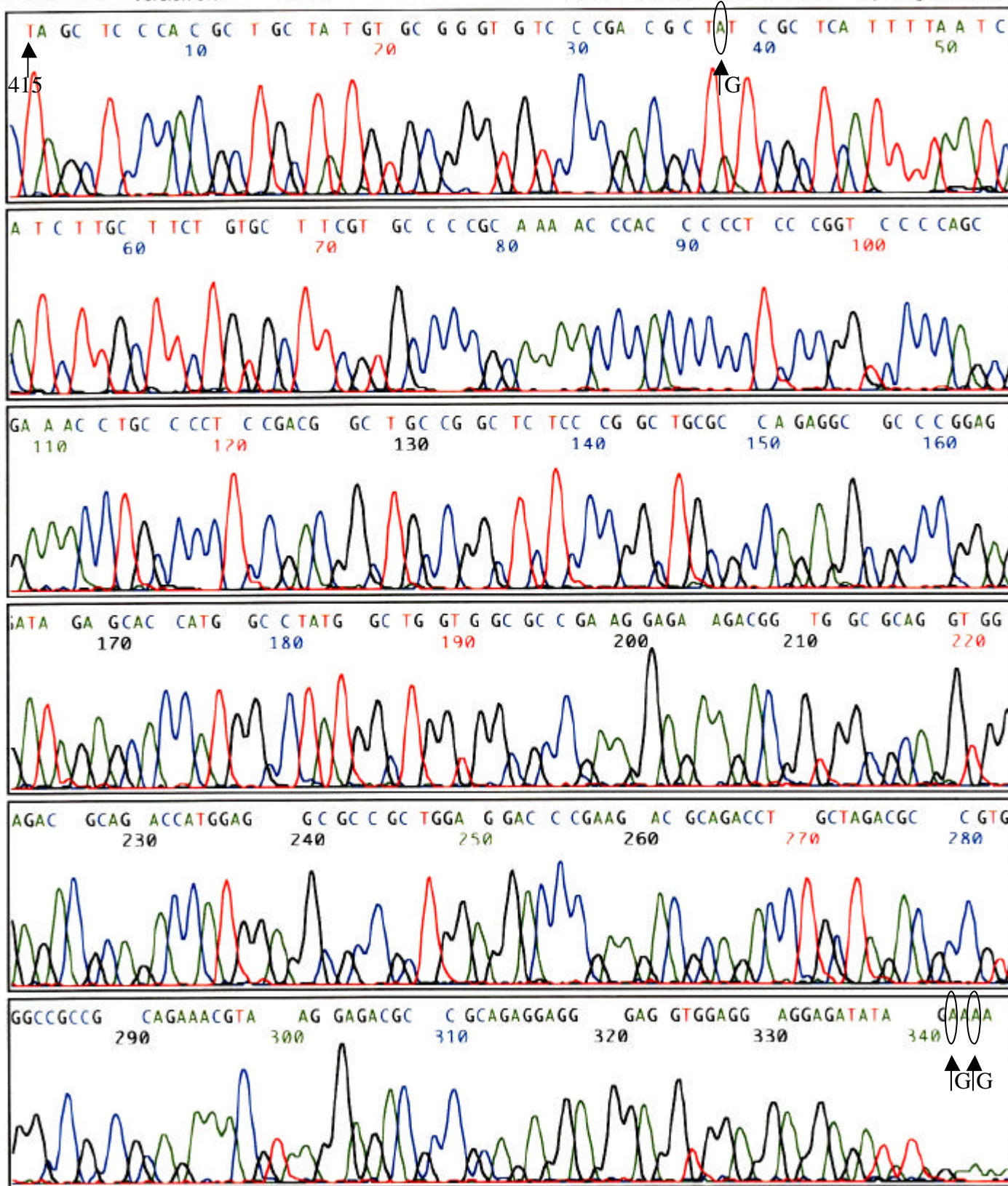


Fig. 12 The sequence of TTV DNA; fragment C.





Model 377  
Version 3.0  
SemiAdaptive  
Version 3.0

10-TTV-D1-T7  
10-TTV-D1-T7  
Lane 10

Signal G:158 A:275 T:242 C:271  
DT {BD Set Any-Primer}  
Matrix0825  
Points 1305 to 5000 Base 1: 1305 Spacing: 9.00(-9.00)

Page 1 of 2

Mon, Dec 9, 2002 5:50 AM

Thu, Jun 6, 2002 8:05 PM

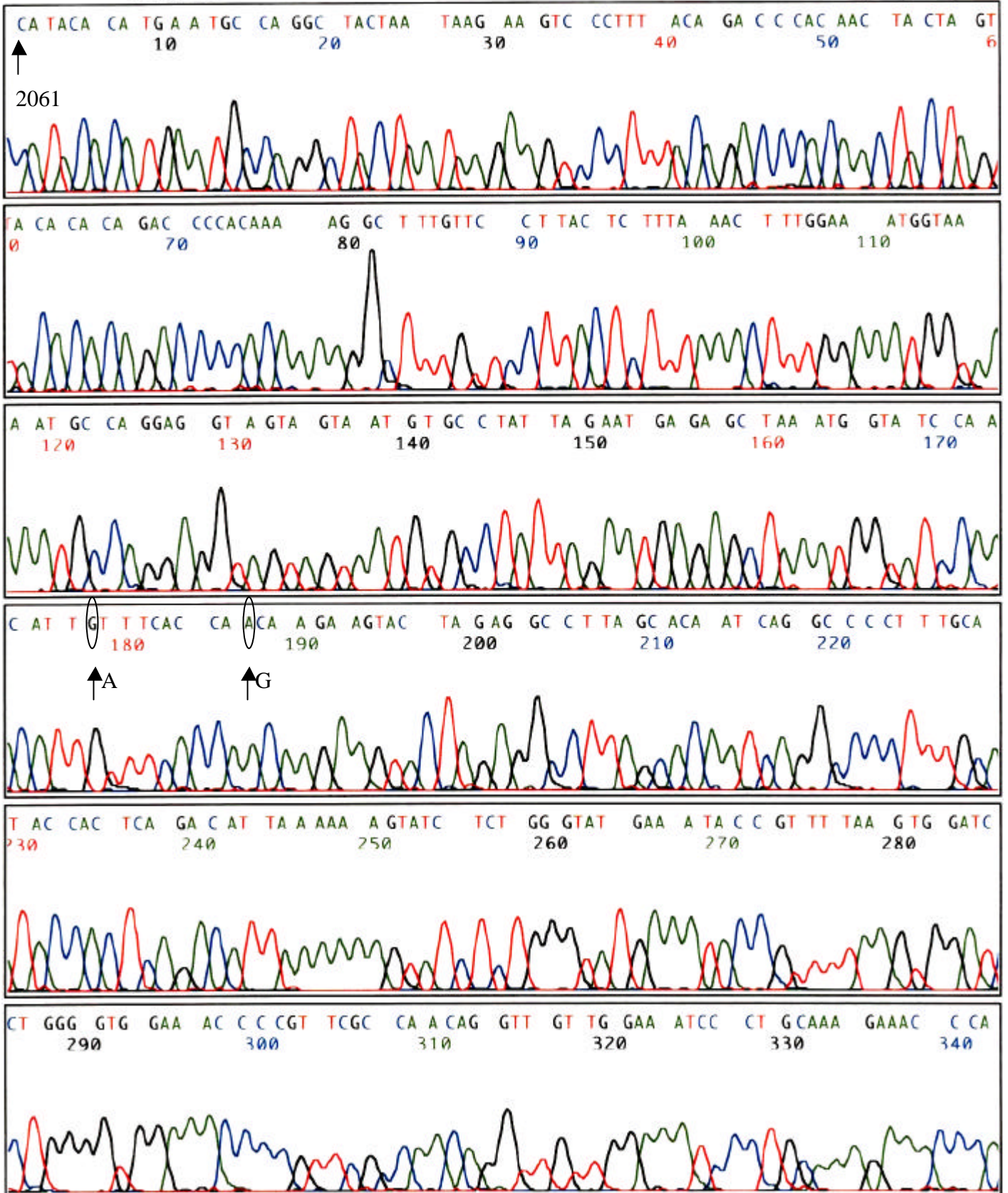


Fig. 13 The sequence of TTV DNA; fragment D.

1 -----  
51 -----CAC  
101 TTCCGAATGG CTGAGTTTTT CACGCCCGTC CGCAGCGGTG AAGCCACGGA  
151 GGGAGATCAC CGCGTCCCGA GGGCGGGTGC CGAAGGTGAG TTTACACACC  
201 GAAGTCAAGG GGCAATTCCG GCTCGGGACT GGCCGGGCTA TGGGCAAGGC  
251 TCTGAAAAAA GCATGTTTAT TGGCAGGCAT TACAGAAAAGA AAAGGGCGCT  
301 GTCACGTGTG GCTGTGCGAA CAACAAAGAA GGCTTGCAAA CTAATAATAG  
351 TAATGTGGAC CCCACCTCGC AATGATCAAC AGTACCTTAA CTGGCAATGG  
401 TACTCAAGTG TACTTAGCTC CCACGCTGCT ATGTGCGGGT GTCCCGACGC  
451 TATTGCTCAT TTTAATCATC TTGCTTCTGT GCTTCGTGCC CCGCAAAACC  
501 CACCCCTCC CGGTCCCCAG CGAAACCTGC CCCTCCGACG GCTGCCGGCT  
551 CTCCCGGCTG CGCCAGAGGC GCCCGGAGAT AGAGCACCAT GGCTATGGC  
601 TGGTGGCGCC GAAGGAGAAG ACGGTGGCGC AGGTGGAGAC GCAGACCATG  
651 GAGGCGCCGC TGGAGGACC GAAGACGCAG ACCTGCTAGA CGCCGTGGCC  
701 GCCGCAGAAA CGTAAGGAGA CGCCGAGAG GAGGGAGGTG GAGGAGGAGA  
751 TATAGAAAAT GGAAAAAGAA GGGCAGGCGC AGAAAAAAG CTAAAATAAT  
801 AATAAGACAA TGGCAACCAA ACTACAGAAG GAGATGTAAC ATAGTAGGCT  
851 ACATCCCTGT ACTAATATGT GCGGAAAATA CTGTCAGCAG AAATATGCC  
901 ACACACTCAG ACGATACCAA CTACCCAGGA CCCTTTGGGG GGGGTATGAC  
951 TACAGACAAA TTTACTTTAA GAATTCTGTA TGACGAGTAC AAAAGGTTTA  
1001 TGAACTACTG GACAGCATCT AACGAAGACC TAGACCTTTG TAGATATCTA  
1051 GGAGTACAAC TGTACTTTTT CAGACACCCA GATGTAGATT TTATCATAAA  
1101 AATTAATACC ATGCCTCCTT TTCTAGACAC AGAACTCACA GCCCCTAGCA  
1151 TACACCCAGG CATACTAGCC CTAGACAAAA GAGCAAGATG GATACCTAGC  
1201 TTAAAACTA GACCAGGAAA AAAACACTAT ATTAATAATA GAGTAGGGGC  
1251 ACCAAAAATG TTCACTGATA AATGGTACCC CCAAACAGAT CTTTGTGACA  
1301 TGGTGCTGCT AACTGTCTAT GCAACCGCAG CGGATATGCA ATATCCGTTT  
1351 GGCTCACCAC TAACTGACTC TGTGGTTGTG AACTTCCAGG TTCTGCAATC  
1401 CATGTATGAT AAACATATTA GCATATTACC AGACGAAAAG ACTACAAGAG  
1451 ACACCCACT TAATAACATA GCAAAC TACA TTCCCTTTTA TAATACCACA  
1501 CAAACTATAG CCCAATTAAA GCCATTTGTA GATGCAGGCA ATGTAACATC  
1551 AGGCACAACA GTAACAACAT GGGGATCATA CATAAACACA ACCAAATTTA  
1601 CTACAACAGC CACAACAAC TATACATATC CAGGCACTAA CACTACCACA  
1651 GTAACATATG TAACCTGCAA TGACTCCTGG TACAGAGGAA CAGTATATAA  
1701 CAATCAAAAT AAAGACTTAC CAAAAAAGC AGCTACATTA TACTACTAG  
1751 CAACAAAAAC CTTGCTAGGA AACACCTTCA CAACTGAAGA CCACACACTA  
1801 GAATACCATG GAGGACTGTA CAGCTCAATA TGGCTATCCG CTGGTAGATC  
1851 TTACTTTGAA ACACCAGGAG CATAACAGAG CATAAAATAC AATCCATTCA  
1901 CAGACAGAGG AGAAGGCAAC ATGTTATGGA TAGACTGGCT AAGCAAAAAA  
1951 AACATGAACT ATGACAAAGT ACAAAGTAAA TGCTTAGTAG CAGACCTACC  
2001 TCTATGGGCA GCAGCATATG GATATGTAGA ATTTTGTGCA AAAAGTACAG  
2051 GAGACCAGAA CATAACATG AATGCCAGGC TACTAATAAG AAGTCCCTTT  
2101 ACAGACCCAC AACTACTAGT ACACACAGAC CCCACAAAAA GCTTTGTTCC

```

2151  TTACTCTTTA AACTTTGGAA ATGGTAAAAT GCCAGGAGGT AGTAGTAATG
2201  TGCCATTAG AATGAGAGCT AAATGGTATC CAACATTGTT TCACCAACAA
2251  GAAGTACTAG AGGCCTTAGC ACAGTCAGGC CCCTTTGCAT ACCACTCAGA
2301  CATTAAAAAA GTATCTCTGG GTATGAAATA CCGTTTTAAG TGGATCTGGG
2351  GTGGAAACCC CGTTCGCCAA CAGGTTGTTA GAAATCCCTG CAAAGAAACC
2401  CACTCCTCGG GCAATAGAGT CCCTAGAAGC TTACAAATCG TTGACCCGAA
2451  ATACAACCTCA CCGGAACTCA CATTCCATAC CTGGGACTTC AGACGCGGTC
2501  TCTTTGGCCC GAAAGCTATT CAGAGAATAC AACAGCAACC AACAACTACT
2551  GACATTTTTT CAGCAGGCCG CAAGAGACCC AGGAGGGACA CCGAGGTGTA
2601  CCACTCCAGC CAAGAAAGGG AGCAAAAAGA AAGCTTACTT TTCCCCCAG
2651  TCAAGTTCCT CAGACGAGTC CCCCCGTGGG AAGACTCGCA GCAGGAGGAA
2701  AGCGGGTCGC AAAGCTCAGA GGAAGAGACG CAGACCGTCT CCCAGCAGCT
2751  CAAGCAGCAG CTGCAGCAAC AGCGAATCCT GGGAGTCAAA CTCAGACTCC
2801  TGTTCAACCA AGTCCAAAAA ATCCAACAAA ATCAAGATAT CAACCCCTACC
2851  TTGTTACCAA GGGGGGGGA TCTAGCATCC TTATTTCAA TAGCACCATA
2901  AACATGTTTG GTGACCCCAA ACCTTACAAC CCTTCCAGCA ATGACTGGAA
2951  AGAGGAGTAC GAGGCCTGTA GAGTATGGGA TAGACCCCCC AGAGGCAACC
3001  TAAGAGACAC CCCTTTCTAC CCCTGGGCCC CCAAGGAAAA CCAGTACCGT
3051  GTAAACTTTA AACTTGGATT TCAATAAAGC TAGGCCGTGG GACTTTTACT
3101  TGTCCGTGTC TGCTTATAAA AGTAACTAAG CACTCCGAGC GAAGCGAGGA
3151  GTGCGACCC TGGGGCTCA ACGCCTTCGG AGCCGCGCGC TACGCCTTCG
3201  GCTGCGCGG GCACCTCAGA CCCCCGCTCG TGCTGACACG CTCGCGCGTG
3251  TCAGACCACT TCGGGCTCGC GGGGGTCTGG AAATTTACTA AACAGACTCC
3301  GAGTTGCCAT TGGACTTAGG AGCTATGAAT CAGTAACGAA AGTGAGTGGG
3351  GCCAGACTTC GCCATAAGGC CTTTATCTTC TCGCCATTTG TCAGTAACAG
3401  GGGTCGCCAT AGACTTCGGC CTCCATTTTA CCTTGTAATA ACTACCAAAA
3451  TGGCTGTTCC ACTGACGTCA TAGCCGCCAT TTTAAGTAGC TGACGTCAAG
3501  GATTGACGTA GAGGTTAAAG GTCATCCTCG GCGGAAGCTA CAAAAATGG
3551  TGGACAACAT CTTCCGGGTT AAAGGTCGTG CATACGTCAC AAGTCACGTG
3601  GTAGGGACCC GCTGTAACCC GGAAGTAGGC CCCGTCACGT GACTTACCAC
3651  GTGTGTACAC GTCACCGCCG CCATTTTGTT TTACAAAATG GCTGACTTCC
3701  TTCTCTTTT TTGAAAAAAG GCGCCAAAAA ACCGTCGGC- - - - -
3751  - - - - -
3801  - - - - -
3851  - - -

```

3853

Fig. 14 The 95% of TTV genome (0911013 strain) sequence.

```

0911013 ~~~~~ 50
TTV-1a attttgctac gtcactaacc acgtgacacc cacaggccaa ccgaatgcta
Consensus -----

0911013 ~~~~~ 100
TTV-1a tgtcatccat ttcttgggccc gggctctacgt cctcatataa gtaagtg---
Consensus -----CAC

0911013 ----- 150
TTV-1a -----
Consensus TTCCGAATGG CTGAGTTTTC CACGCCCGTC CGCAGCGGTG AAGCCACGGA

0911013 ----- 200
TTV-1a -----a- -----t- -----
Consensus GGGAGATC-C CGCGTCCCGA GGGCGGGTGC CGAAGGTGAG TTTACACACC

0911013 ----- 250
TTV-1a -----
Consensus GAAGTCAAGG GGCAATTCCG GCTCGGGACT GGCCGGGCTA TGGGCAAGGC

0911013 ----- 300
TTV-1a -----
Consensus TCTGAAAAAA GCATGTTTAT TGGCAGGCAT TACAGAAAGA AAAGGGCGCT

0911013 ----- 350
TTV-1a -----
Consensus GTRACTGTGT GCTGTGCGAA CAACAAAAGAA GGCTTGCAAA CTAATAATAG

0911013 ----- 400
TTV-1a -----g----- -c-----
Consensus TAATGTGGAC CCCACCTCGC AATGATCAAC A-TACCTTAA CTGGCAATGG

0911013 ----- 450
TTV-1a -----g-----a-----
Consensus TACTCAAGT- TACTTAGCTC CCACGCTGCT ATGTGCCGGT GTCCCGACGC

0911013 ----- 500
TTV-1a -----a-----g-----
Consensus T-TCGCTCAT TTTAATCATC TTGCTTCTGT GCTTCGTGCC CCGCAAAACC

0911013 ----- 550
TTV-1a -----
Consensus CACCCCTCC CGGTCCCCAG CGAAAACCTGC CCCTCCGACG GCTGCCGGCT

0911013 ----- 600
TTV-1a -----
Consensus CTCCCGGCTG CGCCAGAGGC GCCCGGAGAT AGAGCACCAT GGCCATATGGC

0911013 ----- 650
TTV-1a -----
Consensus TGGTGGCGCC GAAGGAGAAG ACGGTGGCGC AGGTGGAGAC GCAGACCATG

0911013 ----- 700
TTV-1a -----
Consensus GAGGCGCCGC TGGAGGACCC GAAGACGCAG ACCTGCTAGA CGCCGTGGCC

0911013 ----- 750
TTV-1a -----
Consensus GCCGCAGAAA CGTAAGGAGA CGCCGCAGAG GAGGGAGGTG GAGGAGGAGA

0911013 ----- 800
TTV-1a -----a-a-----g-g-----
Consensus TATAG-A-AT GGAAAAGAAA GGGCAGGCCG AGAAAAAAG CTAATAAT

0911013 ----- 850
TTV-1a -----
Consensus AATAAGACAA TGGCAACCAA ACTACAGAAG GAGATGTAAC ATAGTAGGCT

```



0911013 ----- 900  
TTV-1a -----  
Consensus ACATCCCTGT ACTAATATGT GGCGAAAATA CTGTCAGCAG AAACATATGCC

0911013 ----- 950  
TTV-1a -----  
Consensus ACACACTCAG ACGATACCAA CTACCCAGGA CCCTTTGGGG GGGGTATGAC

0911013 ----- 1000  
TTV-1a -----  
Consensus TACAGACAAA TTTACTTTAA GAATTCGTGTA TGACGAGTAC AAAAGGTTTA

0911013 ----- 1050  
TTV-1a -----  
Consensus TGAACACTG GACAGCATCT AACGAAGACC TAGACCTTTG TAGATATCTA

0911013 ----- 1100  
TTV-1a -----  
Consensus GGAGTA-A-C TGTACTTTTT CAGACACCCA GATGTAGATT TTATCATAAA

0911013 ----- 1150  
TTV-1a -----  
Consensus AATTAATACC ATGCCTCCTT TTCTAGACAC AGAACTCACA GCCCCTAGCA

0911013 ----- 1200  
TTV-1a -----  
Consensus TACACCCAGG CAT-CTAGCC CTAGACAAAA GAGCAAGATG GATACCTAGC

0911013 ----- 1250  
TTV-1a -----  
Consensus TTAAAATCTA GACC-GGAAA AAAACACTAT ATTAAAATAA GAGTAGGGGC

0911013 ----- 1300  
TTV-1a -----  
Consensus ACCAA-AATG TTCACTGATA AATGGTACCC CCAAACAGAT CTTTGTGACA

0911013 ----- 1350  
TTV-1a -----  
Consensus TGGTGCT-CT AACTGTCTAT GCAACCGCAG CGGATATGCA ATATCCGTTT

0911013 ----- 1400  
TTV-1a -----  
Consensus GGCTCACCAC TAACTGACTC TGTGGTTGTG AACTTCCAGG TTCTGCAATC

0911013 ----- 1450  
TTV-1a -----  
Consensus CATGTATGAT AAA---ATTA GCATATTACC AGACGAAAA -C---AAGAG

0911013 ----- 1500  
TTV-1a -----  
Consensus A-A--CTACT TAA-AA-ATA GCAA--TACA TTCCCTTTTA TAATACCACA

0911013 ----- 1550  
TTV-1a -----  
Consensus CAAACTATAG CCCAATTAAA GCCATTT-TA GATGCAGGCA ATGTAACATC

0911013 ----- 1600  
TTV-1a -----  
Consensus AGGC-CAACA G-AACAACAT GGG-ATCATA CATAAACACA ACCAAATTTA

0911013 ----- 1650  
TTV-1a -----  
Consensus CTACA-CA-C CACAACAAC TAT-CATATC CAGGCAC-AA CA---CC-CA

0911013 ----- 1700  
TTV-1a -----  
Consensus GTAACATATGT TAACCTG-AA TGA CTCC TGG TACAGAGGAA CAGTATATAA

0911013	--at-----	a-g-c----	---a-----	----c----	----c-cta-	1750
TTV-1a	--ca-----	c-c-g----	---t-----	----a----	---t-gag-	
Consensus	CA--CAAATT	-AA-A-TTAC	CAA-AAAAGC	AGCTA-ATTA	TACT-A---G	
0911013	-----	-----	-----	---c--a--	-c-----	1800
TTV-1a	-----	-----	-----	---a--g--	-t-----	
Consensus	CAACAAAAAC	CTTGCTAGGA	AACACCTTCA	CAA-TGA-GA	C-ACACACTA	
0911013	-----c----	-----	-----	-----g	-----	1850
TTV-1a	-----t----	-----	-----	-----c	-----	
Consensus	GAATA-CATG	GAGGACTGTA	CAGCTCAATA	TGGCTATCC-	CTGGTAGATC	
0911013	-----	---c-----	---c-----	-----a--	-----	1900
TTV-1a	-----	---a-----	---t-----	-----g--	-----	
Consensus	TTACTTTTGAA	ACA-CAGGAG	CATA-ACAGA	CATAAA-TAC	AATCCATTCA	
0911013	-----	-----	-----	-----	-----	1950
TTV-1a	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	CAGACAGAGG	AGAAGGCAAC	ATGTTATGGA	TAGACTGGCT	AAGCAAAAAA	
0911013	-----	-----	-----	-----g--g	-----	2000
TTV-1a	-----	-----	-----	-----a--t	-----	
Consensus	AACATGAACT	ATGACAAAGT	ACAAAGTAAA	TGCTTA-TA-	CAGACCTACC	
0911013	-----	-----	-----	-----	-----	2050
TTV-1a	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	TCTATGGGCA	GCAGCATATG	GATATGTAGA	ATTTTGTGCA	AAAAGTACAG	
0911013	-----g--	-----	-----	-----	-----	2100
TTV-1a	-----a--	-----	-----	-----	-----	
Consensus	GAGACCA-AA	CATACACATG	AATGCCAGGC	TACTAATAAG	AAGTCCCTTT	
0911013	-----	-----	-----	-----	-----	2150
TTV-1a	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	ACAGACCCAC	AACTACTAGT	ACACACAGAC	CCCACAAAAG	GCTTTGTTCC	
0911013	-----	-----	-----	-----	-----	2200
TTV-1a	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	TTACTCTTTA	AACTTTGGAA	ATGGTAAAAAT	GCCAGGAGGT	AGTAGTAATG	
0911013	-----	-----	-----	-----g--	-----a--	2250
TTV-1a	-----	-----	-----	-----a--	-----g--	
Consensus	TGCCTATTAG	AATGAGAGCT	AAATGGTATC	CAACATT-TT	TCACCA-CAA	
0911013	-----	-----	-----	-----	-----	2300
TTV-1a	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	GAAGTACTAG	AGGCCTTAGC	ACAGTCAGGC	CCCTTTGCAT	ACCACTCAGA	
0911013	-----	-----	-----	-----	-----	2350
TTV-1a	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	CATTAAAAAA	GTATCTCTGG	GTATGAAATA	CCGTTTTAAG	TGGATCTGGG	
0911013	-----	-----	-----	-----	-----	2400
TTV-1a	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	GTGGAAACCC	CGTTCGCCAA	CAGGTTGTTA	GAAATCCCTG	CAAAGAAACC	
0911013	-----	-----	-----	-----	-----	2450
TTV-1a	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	CACTCCTCGG	GCAATAGAGT	CCCTAGAAGC	TTACAAATCG	TTGACCCGAA	
0911013	-----	-----	-----	-----	-----c--t-	2500
TTV-1a	-----	-----	-----	-----	-----t--c-	
Consensus	ATACAACCTCA	CCGGAACCTCA	CATTCCATAC	CTGGGACTTC	AGACG-GG-C	
0911013	-----	-----	-----a-	-----g-	-----	2550
TTV-1a	-----	-----	-----g-	-----a-	-----	
Consensus	TCTTTTGGCCC	GAAAGCTATT	CAGAGAAT-C	AACA-CAACC	AACAACACT	

0911013 ----- 2600  
 TTV-1a -----  
 Consensus GACATTTTTT CAGCAGGCCG CAAGAGACCC AGGAGGGACA CCGAGGTGTA

0911013 ----- 2650  
 TTV-1a -----  
 Consensus CCACTCCAGC CAAGAAGGGG AGCAAAAAGA AAGCTTACTT TTCCCCCAG

0911013 ----- 2700  
 TTV-1a -----  
 Consensus TCAAG-tCCT CAGACGAGTC CCCCCGTGGG AAGACTCGCA GCAGGAGGAA

0911013 ----- 2750  
 TTV-1a -----  
 Consensus AGCGGGTCGC AAAGCTCAGA GGAAGAGACG CAGACCGTCT CCCAGCAGCT

0911013 ----- 2800  
 TTV-1a -----  
 Consensus CAAGCAGCAG CTGCAGCAAC AGCGAATCCT GGGAGTCAAA CTCAGACTCC

0911013 ----- 2850  
 TTV-1a -----  
 Consensus TGTTCAACCA AGTCCAAAAA ATCCAACAAA ATCAAGATAT CAACCCTACC

0911013 ----- 2900  
 TTV-1a -----  
 Consensus TTGTTACCAA GGGGGGGGGA TCTAGCATCC TTATTTCAAA TAGCACCATA

0911013 ----- 2950  
 TTV-1a -----  
 Consensus AACATGTTTG GTGACCCCAA ACCTTACAAC CCTTCCAG-A ATGACTGGAA

0911013 ----- 3000  
 TTV-1a -----  
 Consensus AGAGGAGTAC GAGGCCTGTA GA-TATGGGA -AGACCCCC AGAGGCAACC

0911013 ----- 3050  
 TTV-1a -----  
 Consensus TAAGAGA-AC CCCTTTCTAC CCCTGGGCC CCAAGGAAAA CCAGTACCGT

0911013 ----- 3100  
 TTV-1a -----  
 Consensus GTAAACTTTA AACTTTGATT -CAATAAAGC TAGGCCGTGG GACTTTCACT

0911013 ----- 3150  
 TTV-1a -----  
 Consensus TGTGGGTGTC TGCTTATAAA AGTAACTAAG CACTCCGAGC GAAGCGAGGA

0911013 ----- 3200  
 TTV-1a -----  
 Consensus GTGCGACCT TGGGGGCTCA ACGCCTTCGG AGCCGCGCGC TACGCCCTCG

0911013 ----- 3250  
 TTV-1a -----  
 Consensus GCTGCGCGG GCACCTCAGA CCCCCGCTCG TGCTGACACG CTCGCGCGTG

0911013 ----- 3300  
 TTV-1a -----  
 Consensus TCAGACCACT TCGGGCTCGG GGGGTCGGG AAATTTACTA AACAGACTCC

0911013 ----- 3350  
 TTV-1a -----  
 Consensus GAGTTGCCAT TGGACT-AGG AGCTATGAAT CAGTAACGAA AGTGAGTGGG

0911013 ----- 3400  
 TTV-1a -----  
 Consensus GCCAGACTTC GCCATAAGGC CTTTATCTTC T-GCCATTTG TCAGTAACAG

```

0911013 ----- -t----- 3450
TTV-1a ----- -c-----
Consensus GGGTCGCCAT AGACTTCGGC CTCCA-TTTA CCTTGTAATA ACTACCAAAA

0911013 ----t----- -c----- t----- 3500
TTV-1a ----c----- -g----- c-----
Consensus TGGC-GTTCC A-TGACGTCA -AGCCGCCAT TTTAAGTAGC TGACGTCAAG

0911013 ----- g----- 3550
TTV-1a ----- a-----
Consensus GATTGACGTA -AGGTTAAAG GTCATCCTCG GCGGAAGCTA CACAAAATGG

0911013 ----- -t----- -c--- -a----- 3600
TTV-1a ----- -c----- -t--- -g-----
Consensus TGGACAACAT CTTCCGGGT- AAAGGT-GTG C-TACGTCAC AAGTCACGTG

0911013 -ta----- 3650
TTV-1a -ag-----
Consensus G--GGGACCC GCTGTAACCC GGAAGTAGGC CCCGTCACGT GACTTACCAC

0911013 ----- 3700
TTV-1a -----
Consensus GTGTGTACAC GTCACCGCCG CCATTTTGTT TTACAAAATG GCTGACTTCC

0911013 ----- 3750
TTV-1a ----- -g ggggggccgc
Consensus TTCCTCTTTT TTGAAAAAAG GCGCCAAAAA ACCGTCGGC-

0911013 ~~~~~ 3800
TTV-1a gcgctgcgcg cgcggccccc ggggggaggc attgacctccc ccccccgcgc
Consensus -----

0911013 ~~~~~ 3850
TTV-1a gcatgcgcgc ggggtccccc cctccgggg ggctccgccc cccggccccc
Consensus -----

0911013 ~~~ 3853
TTV-1a ccc
Consensus ---

```

Fig. 15 Comparison of TTV (0911013 strain) with TTV-TA278 (TTV-1a strain) at nucleotide level. (~), No DNA sequence.

Table 1 The detection of TTV in hepatitis patients

No.	Sex	Age	HBsAg	Anti-HCV	Diseases	AST	ALT	AFP	TTV Set-I PCR	TTV Set-II PCR	TTV (+ / -)
1	F	43	-	+	AH	216	405	6.5	-	-	-
2	F	46	-		AH	131	335		-	+	+
3	F	18	+		C	19	9	1.4	-	-	-
4	F	44	+	-	C	17	16	6.9	+	+	+
5	M	21	+		C	22	27	1.5	-	-	-
6	M	31	+		C	23	34		+	+	+
7	F	49	+		C	66	86	3	-	-	-
8	F	58	+	+	C	28	43	2.2	-	-	-
9	M	51	+	-	C			2.4		-	-
10	M	48	+		CAH	39	49	12.3	-	-	-
11	M	23	+		CAH			13.4	-	-	-
12	M	28	+	-	CAH	21	31	3	+		+
13	M	47	-	+	CAH	129	255	2.7	-	-	-
14	M	34	-	+	CAH	235	275	188		-	-
15	F	48	+	-	CAH	796	1117	52		-	-
16	M	33	+	-	CAH	325	535	7.1		-	-
17	F		+	-	CAH	106	96	68.5		-	-
18	F	58	+	-	CAH,LC	53	45	22.3	-	-	-
19	M	77	+	-	CH	66	64	2.2	-	-	-
20	M	63	-	+	CH	61	84	1.9	+	+	+
21	F	39	+	-	CH	213	360	73.7	-	-	-
22	M		+	-	CH	27	25	2.5	+		+
23	M	47	-	+	CH	27	23		-	-	-
24	M	29	+		CH	35	83	2.1	-	-	-
25	F	43	+	+	CH	319	401	9.3	-	-	-
26	F	47	+		CH	86	154	4.2	+	+	+
27	M	54	+	-	CH	25	26	4.8	-	-	-
28	F	51		+	CH	53	74	10.2	+	-	+
29	F	62	-	+	CH	137	159			-	-
30	M	35	-	+	CH	50	65	3.9		+	+
31	M	38	+	-	CH	20	21	2.8		+	+
32	F	26	-	+	CH	31	66	2.4		+	+

33	M	63	-	+	CH	41	42	2.1		-	-
34	F	51	-	-	CH	139	106	2.2		+	+
35	F	59	+	+	CH	210	402	6.9		-	-
36	F	38	+	+	CH	36	45	6.1		-	-
37	M	66	-	+	CH	56	41			-	-
38	M	42	-	+	CH	123	209	7.8		+	+
39	F	53	-	+	CH	78	109	5.4		-	-
40	M	44	+		CH	48	67	14.7		-	-
41	M	48	-	+	CH	29	40			-	-
42	M	36	-	+	CH	46	64			-	-
43	M	43	-	+	CH	96	413	4.7		-	-
44	M	49	-	+	CH	126	244	9.8		-	-
45	M	44	+	-	CH	63	72	4.1		-	-
46	M	38	+	-	CH	217	423	21.5		-	-
47	F	67	+		CH	146	288	20.2		-	-
48	F	58	+	-	Fatty liver			3.5		-	-
49	M	63	+	-	HCC, LC	130	99		+	+	+
50	F	68	+	-	LC	78	32	11.6	+	+	+
51	M	43	+		LC	34	36	12.5	-	-	-
52	M	52	+	-	LC	89	143	6.4	+		+
53	M	37	+	+	LC	46	65	2.3	-	-	-
54	M	47	+	+	LC	115	197	4.7	-	-	-
55	M	32	+	-	LC	49	46	11.2	+	+	+
56	M	37	-	-	LC	48	43	11.4	+		+
57	M	40	+		LC	45	37	9.3	-	-	-
58	F		+		LC	109	87	85.9	+		+
59	F	57	-	+	LC	90	52	14.7	+	+	+
60	F	53	+	-	LC	36	25	3.5	-	-	-
61	M	60	+	-	LC	40	41	2.8		-	-
62	M	55	+	-	LC	26	29	2.8		-	-
63	F	62	-	+	LC	73	47	6		+	+
64	F	68	-	+	LC	32	43	20.6		-	-
65	M	65	-	+	LC	73	124	32.6		-	-
66	F	68	-		LC	66	45	5.9		-	-
67	M	45	-	+	LC	91	5	3.6		+	+
68	M	53		+	LC	70	65	139		-	-
69	M	67	-	+	LC	37	27	91.7		+	+

70	M	78	-	-	LC	34	30	6.6		-	-
71	M		+	-	Other			4.1	-	-	-
72	M	30			Other				-	-	-
73	F	49			Other	16	15		-	+	+
74	M	35			Other					+	+
75	M	53			Other					-	-
76	F	39			Other					+	+
77	F	66			Other					+	+
78	M	67			Other					-	-
79	M	34	-	+	Other	32	51			-	-
80	M	47			Other	46	73			-	-

Individuals were regarded as TTV-infected as PCR yielded a DNA band on gel with expected size when amplified with either Set-I or -II primer set. AH, acute hepatitis; CH, chronic hepatitis; LC, cirrhosis; LC/HCC, cirrhosis combined with hepatocellular carcinoma; Other, hepatitis with unknown etiology; TTV, TT Virus; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase

**Table 2 The detection of TTV in control group**

<b>Age</b>	<b>Total</b>	<b>Man (%)</b>	<b>TTV (+) (%)</b>	<b>Woman (%)</b>	<b>TTV (+) (%)</b>
30 down	30	16 (53.3)	4 (13.3)	14 (46.7)	4 (13.3)
31 ~ 40	29	16 (55.2)	1 (3.4)	13 (44.8)	2 (6.9)
41 ~ 50	21	11 (52.4)	3 (14.3)	10 (47.6)	0 (0.0)
51 ~ 60	16	8 (50.0)	1 (6.3)	8 (50.0)	3 (18.8)
61 up	10	4 (40.0)	0 (0.0)	6 (60.0)	1 (10.0)
<b>Total</b>	<b>106</b>	<b>55 (51.9)</b>	<b>9 (8.5)</b>	<b>51 (48.1)</b>	<b>10 (9.4)</b>

**Table 3 Comparison of clinical characteristic between individuals with and without TTV viremia in Chung Shan Medical University (CSMU) Hospital, Taichung**

	No.	No.(%) of patients with TTV DNA		P value
		Positive	Negative	
Sex				NS <sup>e</sup>
Male	49	14 (28.6)	35 (71.4)	
Female	31	13 (41.9)	18 (58.1)	
Age (year, mean $\pm$ SD) <sup>a</sup>		47.0 $\pm$ 12.8	48.7 $\pm$ 13.7	NS
ALT <sup>b</sup> (IU/L, mean $\pm$ SD)		75.7 $\pm$ 74.2	155.8 $\pm$ 202.2	NS
Normal ( $\leq$ 45 IU/L)	28	10 (35.7)	18 (64.3)	
Abnormal (> 45 IU/L)	42	14 (33.3)	28 (66.7)	NS
AST <sup>c</sup> (IU/L, mean $\pm$ SD)		66.3 $\pm$ 39.9	103.1 $\pm$ 130.3	NS
Normal ( $\leq$ 40 IU/L)	24	8 (33.3)	16 (66.7)	
Abnormal (> 40 IU/L)	46	16 (34.8)	30 (65.2)	NS
AFP <sup>d</sup> (IU/L, mean $\pm$ SD)		14.5 $\pm$ 25.7	19.1 $\pm$ 36.6	NS

<sup>a</sup> mean  $\pm$  SD, mean  $\pm$  standard deviation

<sup>b</sup> ALT , alanine aminotransferase

<sup>c</sup> AST : aspartate aminotransferase

<sup>d</sup> AFP : a-fetal protein

<sup>e</sup> NS : not significant

**Table 4 Comparison of the prevalence of TTV between normal and liver disease**

	No.	No.(%) TTV DNA		Age (year, mean $\pm$ SD)	P value
		Positive	Negative		
Normal	106	19 (17.9)	87 (82.1)	40.3 $\pm$ 14.9	P<0.05
Liver disease	80	27 (33.8)	53 (66.2)	48.2 $\pm$ 13.3	



**Table 5 The distribution of types of liver disease on 80 individuals with and without concurrent TTV viremia in Chung Shan Medical University (CSMU) Hospital, Taichung**

Liver Disease	Total (n=80)	TTV DNA-Positive (n=27)(%)	TTV DNA-Negative (n=53)(%)
AH	2	1 (50)	1 (50)
CH	29	9 (31)	20 (69)
LC	22	10 (45.5)	12 (54.5)
CAH	9	1 (11.1)	8 (88.9)
C	7	2 (28.6)	5 (71.4)
Fatty liver	1	0 (0)	1 (100)
Other	10	4 (40)	6 (60)

**Table 6 Comparison of virological markers between individuals with and without TTV viremia in Chung Shan Medical University (CSMU) Hospital, Taichung**

	No.	No.(%) of patients with TTV DNA		P value
		Positive	Negative	
HBsAg				NS
Positive	42	11 (26.2)	31 (73.8)	
Negative	28	10 (35.7)	18 (64.3)	
Anti-HCV				NS
Positive	31	9 (29.0)	22 (71.0)	
Negative	21	10 (47.6)	11 (52.4)	

**Table 7 Correlation between ALT, AST, AFP and age on 80 HBsAg (+) with TTV-DNA patients and other patients**

	HBsAg (+) with TTV-DNA	The Other Patients	P value
ALT (IU/L, mean $\pm$ SD)	62.5 $\pm$ 50.1	140.6 $\pm$ 185.1	NS
AST (IU/L, mean $\pm$ SD)	59.0 $\pm$ 40.8	96.4 $\pm$ 116.9	NS
AFP (IU/L, mean $\pm$ SD)	14.9 $\pm$ 26.8	18.1 $\pm$ 34.5	NS
Age (IU/L, mean $\pm$ SD)	44.8 $\pm$ 14.2	48.6 $\pm$ 13.3	NS

**Table 8 Correlation between ALT, AST, AFP and age on 80 Anti-HCV (+) with TTV-DNA patients and other patients**

	Anti-HCV (+) with TTV-DNA	The Other Patients	P value
ALT (IU/L, mean $\pm$ SD)	69.9 $\pm$ 57.6	137.0 $\pm$ 182.9	NS
AST (IU/L, mean $\pm$ SD)	67.7 $\pm$ 29.6	93.9 $\pm$ 116.2	NS
AFP (IU/L, mean $\pm$ SD)	15.8 $\pm$ 28.8	17.9 $\pm$ 34.3	NS
Age (IU/L, mean $\pm$ SD)	49.8 $\pm$ 13.9	47.9 $\pm$ 13.3	NS

**Table 9 PCR primers designed for this studing**  
**9a Primers for PCR product re-checked**

Fragment	No.	Primer name (location site)	Polarity	Nucleotide Sequence (5' 3')	Product length (bp)
A	A	PF1 (2868)	Sense	GGATC TAGCA TCCTT ATTTC	94
		DR2 (2961)	Antisense	CGTAC TCCTC TTTCC AGTCA	
	B	PF1 (2868)	Sense	GGATC TAGCA TCCTT ATTTC	265
		DR (3132)	Antisense	TGCTT GGTGA CCTTT ATAAG	
C	C	PF1 (2868)	Sense	GGATC TAGCA TCCTT ATTTC	401
		DR1 (3268)	Antisense	AAGCC CGAAG TGGTC TGACG	
D	D	PF1 (2868)	Sense	GGATC TAGCA TCCTT ATTTC	872
		AR2 (3739)	Antisense	GCCGA CGGTT TTTTG GCGCC TTTTT TC	
B	A	AF2 (98)	Sense	CACTT CCGAA TGGCT GAGTT	389
		AR1 (486)	Antisense	CGAAG CACAG AAGCA AGATG	
	B	AF2 (98)	Sense	CACTT CCGAA TGGCT GAGTT	136
		NG147 (233)	Antisense	GCC AGT CCC GAG CCC GAA TTG CC	
C	C	BF1 (391)	Sense	CTGGC AATGG TACTC AAGTG	212
		AR3 (602)	Antisense	CAGCC ATAGG CCATG GTGCT	
D	D	BF (415)	Sense	TAGCT CCCAC GCTGC TATGT	188
		AR3 (602)	Antisense	CAGCC ATAGG CCATG GTGCT	
C	A	RD037 (2008)	Sense	GCAGC AGCAT ATGGA TATGT	270
		RD038 (2277)	Antisense	TGACT GTGCT AAAGC CTCTA	
	B	RD037 (2008)	Sense	GCAGC AGCAT ATGGA TATGT	250
RD052 (2257)		Antisense	GTACT TCTTG CTGGT GAAAT		
C	C	RD051 (2061)	Sense	CATAC ACATG AATGC CAGGC	217
		RD038 (2277)	Antisense	TGACT GTGCT AAAGC CTCTA	

C	D	RD051 (2061) RD052 (2257)	Sense Antisense	CATAC ACATG AATGC CAGGC GTACT TCTTG CTGGT GAAAT	197
	E	CF (1393) RD038 (2277)	Sense Antisense	CTGCA ATCCA TGTAT GATGA TGACT GTGCT AAAGC CTCTA	885
	F	CF (1393) RD052 (2257)	Sense Antisense	CTGCA ATCCA TGTAT GATGA GTACT TCTTG CTGGT GAAAT	865
D	A	RD051 (2061) RD052 (2257)	Sense Antisense	CATAC ACATG AATGC CAGGC GTACT TCTTG CTGGT GAAAT	197
	B	RD051 (2061) RD038 (2277)	Sense Antisense	CATAC ACATG AATGC CAGGC TGACT GTGCT AAAGC CTCTA	217
	C	RD051 (2061) CR (2307)	Sense Antisense	CATAC ACATG AATGC CAGGC TTTAA TGTCT GCGTG GTATG	247
	D	RD051 (2061) PR (2769)	Sense Antisense	CATAC ACATG AATGC CAGGC TTGCT GCAGC TGCTG CTTGA	709
	E	RD051 (2061) DR2 (2961)	Sense Antisense	CATAC ACATG AATGC CAGGC CGTAC TCCTC TTTCC AGTCA	901

### 9b Primers for sequencing used

Fragment	primer	Nucleotide position	Nucleotide Sequence (5' ? 3')
A	PF1	2868-2887	GGATC TAGCA TCCTT ATTTC
	AF3	3249-3268	TGTCA GACCA CTTCG GGCTC
B	AF2	98-117	CACTT CCGAA TGGCT GAGTT
C	BF	415-434	TAGCT CCCAC GCTGC TATGT
	BF2	736-755	AGGTG GAGGA GGAGA TATAG
	BF3	1272-1291	ATGGT ACCCC CAAAC AGATC
	CF	1393-1412	CTGCA ATCCA TGTAT GATGA
	TTV-A	1900-1923	ACAGA CAGAG GAGAA GGCAA CATG
D	RD051	2061-2080	CATAC ACATG AATGC CAGGC
	DF1	2411-2430	GCAAT AGAGT CCCTA GAAGC

## 自述

姓名：何志桐

籍貫：台灣省嘉義縣

出生日期：西元 1975 年 8 月 31 日

學歷：私立中山醫學大學生物化學所 (2003)

私立東海大學食品科學系 (2000)

省立嘉義高級中學 (1993)

縣立民雄國民中學 (1990)

縣立民雄國民小學 (1987)