원 저

중합효소연쇄반응으로 조사한 관절염 환자의 관절액에서 *Tropheryma whipplei* DNA 검출

인하대학교 의과대학 내과학교실[1], 미생물학교실[2]
김성연[1] · 정문현[1] · 최새로운[1] · 김은실[1] · 이진수[1] · 박 원[1] · 김미경[2] · 강재승[2]

Detection of *Tropheryma whipplei* DNA in Joint Fluid of Patients with Arthritis by Polymerase Chain Reaction

Sung Yeon Kim, M.D.[1], Moon-Hyun Chung, M.D.[1], Eun-Sil Kim, M.D.[1], Jin-Soo Lee, M.D.[1]
Won Park, M.D.[1], Mee-Kyung Kim, M.D.[2] and Jae-Seung Kang, M.D.[2]
[1]Department of Internal Medicine, [2]Microbiology, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

Background : Whipple's disease is a chronic systemic infection caused by *Tropheryma whipplei* which chiefly involves gastrointestinal tract and joints. Because arthritis is often the first sign of Whipple's disease, Whipple's disease may be misdiagnosed in the early stage of illness as non-infectious inflammatory arthritis. Rheumatoid arthritis may also be caused by infectious agents, including *T. whipplei*. To elucidate the relationship between *T. whipplei* infection and various arthritis, we examined *T. whipplei* DNA in Korean patients by polymerase chain reaction (PCR).

Materials and Methods : With two *T. whipplei*-specific primers dervied from the partial heat shock protein 65 gene sequence, PCR was performed on 56 joint fluid samples : 33 samples from RA patients, 18 samples from OA patients, and 5 samples from patients with other unflammatory arthritis. In addition, the same method was applied to find out the DNA of *T. whipplei* in 8 normal adults' saliva and 22 patients' gastric juice. Due to the difficulty in obtaining the reference strain of *T. whipplei*, the PCR was performed without the positive control.

Results : The PCR method did not reveal *T. whipplei* in joint fluid from 56 patients with arthropathies, 8 samples from saliva, and 22 samples from gastric juice.

Conclusion : Though technical errors can not be excluded as a cause of absence of a positive case, our results suggest that *T. whipplei* infection may not be a common cause of various arthritis in Korea; *T. whipplei* may be associated with inflammatory arthritis indirectly by immune-mediated mechanism rather than by direct joint invasion. The examination of specimens other than joint fluid could be helpful and the study of larger number of patient is highly desirable.

Key Words : *Tropheryma whipplei*, Arthritis, Joint fluid, Saliva, Gastric juice

서 론

Whipple병은 *Tropheryma whipplei*에 의한 만성 전신 감염증으로 인체의 모든 장기가 침범될 수 있으나, 주 증상은 설사, 지방변, 복통, 체중감소, 관절통이고 때로 중추신경계와 심장 판막 이상이 보고되고 있다. 과거부터 항균제에 반응이 좋아 감염이 원인일 것으로 생각하였고, 진단은 주로 상부 위장관의 특징적인 조직 소견으로 하였으나 최근에는 확진을 위해 전자현미경과 중합효소연쇄반응이 점차 널리 사용되고 있다. 또한 중합효소연쇄반응으로 검사했을 때 Whipple병이 없는 환자에서도 위장관이나 관절액 이외의 검체에서 *T. whipplei*가 검출되었다는 보고들이 있어(1), *T. whipplei* 감염이 생각보다 널리 있을 가능성이 있으나 국내에서는 감염 상황에 대한 연구가 없었다. 류마티스 인자가 음성인 염증성 관절염의 일부 환자의 관절액에서 *T. whipplei* DNA가 검출된다는

Submitted 3 August, 2004, accepted 15 February, 2005
Correspondence : Jin-Soo Lee, M.D.
7-206, 3-Ga, Shinghung-Dong, Jung-Gu, Inchen 400-711, Korea
Department of Internal Medicine, College of Medicine,
Inha University
Tel : +82-32-890-2202, Fax : +82-32-882-6578
E-mail : ljinsoo@medmail.co.kr

보고가 있고(2), 류마티스 관절염도 과거부터 감염에 의하리라는 가설이 계속 있어, 관절염이 있는 일부 환자는 *T. whipplei* 감염 때문일 가능성이 있다.

이에 저자들은 다양한 관절염 환자에서 관절액을 채취하고 관절액에 존재하는 *T. whipplei*를 중합효소 연쇄반응검사를 통하여 검사하였다. 또한 위장관 집락을 알기 위해 타액과 위액에서도 같은 실험을 하였다.

재료 및 방법

1. 대 상

관절염 환자군은 1997년 7월부터 2002년 3월 사이에 인하대병원 류마티스 내과에 관절 종창으로 방문한 56명으로, 나이는 18세에서 87세까지 다양하였으며 성별은 남자 14명, 여자 42명이었다. 진단에 따라 류마티스 인자 양성인 류마티스 관절염 환자 19명(남자 4명, 여자 15명), 류마티스 인자 음성인 류마티스 관절염 환자 14명(남자 3명, 여자 11명), 골 관절염 환자 18명(남자 4명, 여자 14명), 그 외의 여러 원인에 의한 염증성 관절염 환자 5명(남자 2명, 여자 3명)이 포함되었다(Table 1). 이들의 슬관절강을 무균법으로 천자하여 얻은 관절액을 -80℃에서 냉동 보관하였다가 검사하였다.

건강한 성인 8명의 타액과 22명의 위액을 같은 실험방법으로 중합효소연쇄반응으로 검사하였다. 타액을 제공한 사람의 평균 나이는 33세 남녀 수는 3명과 5명이었다. 위액은 건강 검진을 위해 인하대병원에서 위내시경을 시행한 사람들에서 무작위 추출하였다. 이들의 평균 나이는 46.7세이고 남녀비는 10:12였다.

2. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)

보관 중이던 관절액을 해동한 후, 세포를 채취하기 위해 관절액 1 mL를 튜브에 담고 4℃에서 10,000 g로 30분간 원심분리하였고 생성된 원심침전물을 인산완충식염수(PBS)로 세척 후 다시 5분간 원심분리한 후 실험에 사용하였다.

이상에서 얻은 세포에 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 10 mM NaCl]을 가하여 세포를 부유한 후 1% sodium dodecy sulfate를 넣어 세포를 용해시켰다. DNA를 정제하기 위하여 세포 용해액에 proteinase K (200 μg/mL)를 가한 후 48℃ 수조에서 하루 밤 동안 반응시킨 후, ethanol을 가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 TEF buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 200 μg/ml RNase)로 용해한 후 농도를 측정하였다. 시동체로는 *T. whipplei* heat shock protein 65 gene의 일부분을 증폭하는 시동체로, ① Whipp-frw1 (sense: 5′-TGA CGG GAC CAC AAC ATC TG-3′, antisense: 5′-ACA TCT TCA GCA ATG ATA AGA AGT T-3′)과 ② Whipp-frw2 (5′-CGC GAA AGA GGT TGA GAC TG-3′, antisense: 5′-ACA TCT TCA GCA ATG ATA AGA AGT T-3′)를 사용하였다(3). PCR의 조건으로는 Whipp-frw1는 95℃에서 1분, 57℃에서 1분, 72℃에서 1분을 40회 반복하였고, Whipp-frw2는 95℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분을 40회 반복하였다. PCR이 끝난 후 증폭산물은 agarose gel electrophoresis를 이용하여 확인하였다. Whipp-frw1로 500 base pair, Whipp-frw2로 357 base pair의 증폭산물을 나타내면, 염기순서분석을 시행할 예정이었다.

Table 1. The Characteristics of the Enrolled Patients

	N (%)	Age (Year) (Mean±S.D.)	Sex (M/F)
Seropositive RA	19 (34)	54 (±15)	4/15
Seronegative RA	14 (25)	45 (±21)	3/11
Osteoarthritis	18 (32)	63 (±13)	4/14
Others inflammatory arthritis			
Behcet's disease	2 (3.5)	43	1/ 1
	1 (1.7)	39	1/ 0
Oligoarthritis	1 (1.7)	64	0/ 1
Overlap syndrome	1 (1.7)	42	0/ 1

Abbreviations: RA, rheumatoid arthritis; AS, ankylosing spondylitis

결 과

1. 관절염 환자의 관절액에서 *T. whipplei* DNA 검사

56명 모두에서 PCR 증폭물을 검출할 수 없었다. 4번과 8번 환자에서 얻은 검체에서 primer 1을 사용한 PCR에서 600 bp에 해당하는 증폭물이 있었으나 예상되는 500 bp에 대한 DNA띠가 아니므로 의미를 두지 않았다(Figure 1).

2. 정상인의 타액과 신체검사에서 시행한 위내시경에서 얻은 위액에서 검사

정상인 8명의 타액이나 건강검진을 받은 22명의 위액에서도 *T. whipplei* DNA를 발견할 수 없었다.

고 찰

1907년 Whipple이 은염색에 염색되는 간균체를 기술하

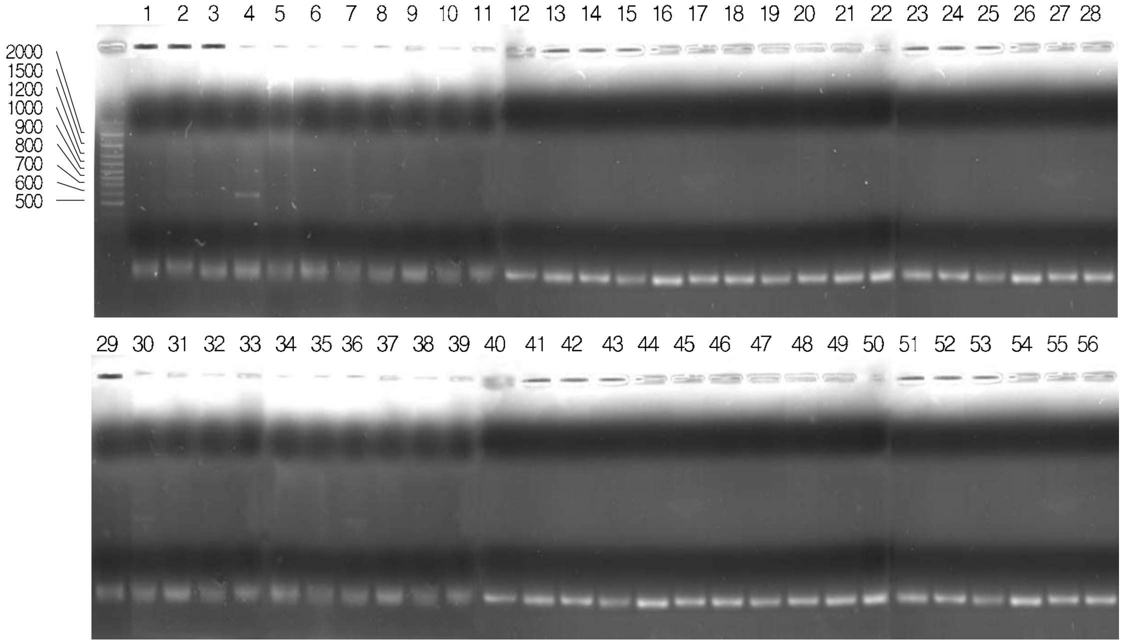

Figure 1. Polymerase chain reaction against *T. whippelii* hsp65 gene in joints fluid from patients with various arthritis.

였으나 당시에는 원인균을 분리하거나 동정할만한 기술이 개발되지 않아 원인균을 밝히지 못하다가, 1990년대 초에 환자로부터 얻은 조직에서 박테리아 16S ribosomal RNA 유전체의 특정부위가 PCR에 의해 증폭되면서 균의 분류가 가능해졌고, 새로운 속과 종으로 분류되면서 Tropheryma whippelii로 명명되었다. 이후 1997년 interlukin-4에 의해 비활성화된 인간의 대식세포에서 *T. whippelii*를 증식시키는데 성공하였으며(1) 2003년에 *Tropheryma whipplei*로 개칭되었다(4).

Whipple병은 드물게 발생하는 만성 전신 감염으로 다양한 임상상을 보인다. 소장 침범에 의한 체중 감소와 설사가 대표적인 증상이며 근골격계, 심혈관계, 중추신경계도 흔히 침범된다. 관절염은 대다수의 환자에서 이 질환의 특징적인 소견으로 나타나며 선행 증상이기도하다. 한 보고에 의하면 82%의 환자에서 진단되기 전 평균 8년 동안 관절염 증상을 보인 것으로 기술되어 있고(5), 대략 30%의 환자에서 HLA-B27 양성을 보인다. 이런 특징은 류마토이드 인자가 음성인 관절증(seronegative spondyloarthropathy)으로 오진될 가능성이 있다. 기전으로 보았을 때에도 shigella, yersinia, salmonella, campylobacter에 의한 장관 감염 후 관절염이 발생하는 것은 잘 알려진 예이고, *Helicobacter pylori*와 같은 만성 위장 감염에서도 반응성 관절염이 발생한 예가 있다(6). 따라서 *T. whipplei* 위장관 감염과 관련된 반응성 관절염이 생길 가능성은 충분히 있다고 생각되었지만, 이번 연구에서는 대상 관절증 환자 56명 모두에서 *T. whipplei*에 감염된 증거를 찾지 못하였다. 이는 이번 연구에 포함된 여러 염증성 관절염에서는 *T. whipplei*가 드물게 관련이 되거나 관련된다고 하여도 직접 침범보다는 위장관 감염에 의한 면역 기전의 조율 장애 등에 의해 간접적으로 관절염이 생길 가능성을 의미한다. 다른 가능성으로 대상 환자들이 전체를 대변하지 못하였을 가능성, 즉 류마티스 인자 음성인 류마티스 관절염 환자나 척추관절병증 환자의 표본이 적은 점 등을 생각할 수 있고, 관절액을 조사한 환자들이 관절액 채취 이전에 이미 항균제에 노출되었을 가능성 또한 배제하기 힘들다. 양성 대조군을 포함되지 않아 실험 방법에서 오류가 있을 가능성이 있고, 한국의 *T. whipplei* 균주는 환경에는 적어 사람에게 감염이 적거나 주로 비병원성이어서 사람 감염이 적을 가능성도 생각할 수 있고, 장기간 냉동 보관된 검체를 검사하여 핵산이 변성되어 중합효소연쇄반응에 음성 결과가 나왔을 가능성이 있다.

류마티스 관절염 역시 병인이 밝혀지지 않은 만성 염증성 질환으로 치료제 중에 chloroquine이 있다. 또한 minocycline도 류마티스 관절염에 치료 효과를 보이며(7) 항균제로서 작용이라기보다는 항염증 효과와 면역조절자로서 어떤 작용을 했을 것이라 생각되어지나(8) *T. whipplei*와 같은 감염균에 대한 항균 효과라고도 해석할 수 있다. 특히 *T. whipplei*의 항균제 감수성 결과 minocycline과 같은 계열인 doxycycline이 항균력이 있으며,

chloroquine과 doxycycline의 병합은 살균 작용이 있어(9), 실제 류마티스 관절염에서 사용하는 치료제와 일치하여 류마티스 관절염에서도 *T. whipplei*가 관여할 가능성도 배제할 수는 없다. 그러나 이번 실험에서는 류마티스 관절염 환자의 관절액에서도 *T. whipplei* DNA를 증명할 수 없어 *T. whipplei*의 직접 침범이 류마티스 관절염의 흔한 원인은 아닐 것으로 생각된다.

여러 연구에서 Whipple병이 없는 사람의 타액, 위액, 대변을 PCR로 검사했을 때 *T. whipplei*가 검출된 보고들이 나오면서 사람이 *T. whipplei*의 보균자일 것으로 생각한 적이 있다(10-12). 한 연구에서는 239명의 소화기 질환자와 215명의 건강한 성인을 대상으로 대변과 타액에서 *T. whipplei* DNA의 양성률을 조사한 결과 소화기 질환자의 4.2%와 건강한 성인 7.0%에서 양성을 나타내었다(11). 그러나 아직까지도 양성률은 조사 방법이나 연구자마다 차이가 커서, 사용한 PCR 시동체가 16S ribosomal RNA gene에 대한 시동체인지 heat shock protein 유전체에 대한 시동체인지에 따라 다른 것인지 아니면 지역적 차이에 따른 *T. whipplei* 변이주 때문인지 확인되지 않았고, 결과적으로 *T. whipplei*의 전파 방법이나 유병률에 대해 알려진 바가 적다. 저자들도 타액과 위액에서 *T. whipplei*가 5-10%정도의 양성률을 보일 것으로 예상하여 총 30명을 대상으로 타액이나 위액에서 *T. whipplei* 핵산을 검사했으나 결과는 모두 음성으로 나타났다. 초기 보고와는 달리 2001년 보고에서는 Whipple병이 없는 342명의 위장관 질환자들에서 모두 음성을 보여(13), Whipple병이 없는 사람의 위장관에서 DNA가 발견되는지는 아직 연구가 더 필요한 실정이며, 저자들의 결과는 음성 결과를 보고하는 논문과 일치하는 결과이다. 이렇게 결과가 다른 이유로는 이번 조사에 사용한 연쇄다중반응의 시동체가 *T. whipplei*에 특이한 heat shock protein DNA에만 반응하고 구강이나 위장관 점막에 존재하는 *T. whipplei*와 유사한 균이나 비병원성 *T. whipplei*와 교차반응을 하지 않았기 때문일 것으로 생각한다.

이번 연구는 양성 대조군이 없는 단점이 있어, 양성 예가 없다는 연구 결과가 실제로 관절 감염이나 위장관 집락이 없는 것인지 검사 과정이 잘못되었는지는 구분할 수 없다. *T. whipplei*을 양성 대조군으로 사용했으면 좋았으나, 배양이 2000년에나 되었을 정도로 어렵고 또한 이 균을 갖고 있는 기관도 많지 않아 개인적으로 구하기 어렵고, 상용으로 판매하지 않아 구할 수가 없었다. 국내에서 다른 방법으로 확진된 예가 있으면 양성군으로 사용할 수 있으리라 생각되나 아직 국내에서는 Whipple병에 대해서는 연구가 없어 임상 검체를 대조군으로 사용할 수도 없었다. 그러나 PCR 검사 자체는 이미 어느 정도 방법이 정립되었고 다른 실험에서도 많이 하고 있어 방법 상 잘못이 주 원인은 아닐 것으로 생각하며 primer 1을 사용한 PCR에서 비특이 증폭물이 검출되는 것으로 판단컨대, 증폭 이후 과정에서 오류는 큰 요인이 아닐 것으로 생각한다.

이상으로, 환자 선정이나 실험 방법에 여러 문제점들이 있지만, 한국 사람에서 *T. whipplei*의 위장관 집락률은 높지 않을 가능성이 있고, 류마티스 관절염을 포함하는 염증성 관절염에서 *T. whipplei*가 직접 침범에 의할 가능성은 낮거나 간접적으로 면역 기전 등에 의할 것으로 생각된다. *T. whipplei*가 주로 소화기계와 밀접한 관련이 있다는 것을 고려할 때 지역이나 인종간의 식습관과 관련되어 발생이 다르거나 국내 균주가 다를 가능성도 고려해야 하며, 위장관을 주로 침범한 환자를 대상으로 조사할 필요가 있고, 배양음성 심내막염, 원인이 불분명한 뇌증 등에서도 조사가 필요할 것으로 생각된다. 관절액 이외의 검체에서 조사한다면 또 다른 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며 앞으로 더 많은 환자들을 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요　　약

목 적 : Whipple병은 *Tropheryma whipplei*에 의한 전신적인 감염 질환으로 소장과 관절 침범이 특징이며, 흔히 병의 초기에는 수년 동안 다른 증상 없이 관절염 소견만 보이므로, 일부 환자는 염증성 관절염으로 진단받을 가능성이 있다. 또한 류마티스 관절염을 포함하여 여러 염증성 관절염에서는 아직 병인이 밝혀지지 않았지만 감염이 관련될 가능성은 꾸준히 언급이 되었다. 저자들은 국내에서도 *T. whipplei*가 존재할 것이라는 가정 하에 한국인에서 중합효소연쇄반응으로 *T. whipplei* DNA를 조사하였다.

재료 및 방법 : 대상 환자군은 1997년부터 2002년 사이에 인하대병원 류마티스 내과에 관절 종창으로 내원한 환자들로, 류마티스 관절염 환자 33명, 골관절염 환자 18명, 기타 질환에서 관절 이상인 환자들로 5명이 포함되었다. 건강한 성인 8명의 타액과 22명의 위내시경을 받은 환자의 위액을 채취하여 검사하였다. 중합효소연쇄반응은 *T. whipplei* heat shock protein의 일부 유전자를 증폭할 수 있는 2개의 시동체를 사용하였다. 표준 균주를 얻기가 어려워 양성 대조군 없이 중합효소연쇄반응을 시행하였

다.

결 과: 관절염 환자의 관절액, 정상인의 타액, 위내시경을 받은 사람의 위액에서 모두 중합효소 연쇄반응으로 핵산을 증명할 수 없었다.

결 론: 양성대조군이 없어 검사 잘못일 가능성도 배제할 수 없으나, Whipple병이 염증성 관절염의 흔한 원인이 아니거나 관절의 직접 침범보다는 위장관 감염 후 생기는 면역 반응에 의한 반응성 관절염일 가능성이 있다. 관절액 이외의 검체에서 조사한다면 다른 결과를 얻을 수도 있으리라 생각하며 앞으로 이들에 대한 조사가 필요하다.

참 고 문 헌

1) Marth T: *Whipple's disease, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed. p1306-1310, Philadelphia, Churchill Livingstone, 2005*
2) O'Duffy JD, Griffing WL, Li CY, Abdelmalek MF, Persing DH: *Whipple's arthritis: direct detection of Tropheryma whippelii in synovial fluid and tissue. Arthritis Rheum 42:812-7, 1999*
3) Morgenegg S, Dutly F, Altwegg M: *Cloning and sequencing of a part of the heat shock protein 65 gene (hsp65) of "Tropheryma whippelii" and its use for detection of "T. whippelii" in clinical specimens PCR. J Clin Microbiol 38:2248-53, 2000*
4) La Scola B, Fenollar F, Fournier PE, Altwegg M, Mallet MN, Raoult D: *Description of Tropheryma whipplei gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus. Int J Syst Evol Microbiol 51:1471-9, 2001*
5) Fleming JL, Wiesner RH, Shorter RG: *Whipple's disease: clinical, biochemical, and histopathologic features and assessment of treatment in 29 patients. Mayo Clin Proc 63:539-51, 1988*
6) Melby KK, Kvien TK, Glennas A: *Helicobacter pylori-a trigger of reactive arthritis? Infection 27:252-5, 1999*
7) Tilley BC, Alarcon GS, Heyse SP, Trentham DE, Neuner R, Kaplan DA, Clegg DO, Leisen JC, Buckley L, Cooper SM, Duncan H, Pillemer SR, Tuttleman M, Fowler SE: *Minocycline in rheumatoid arthritis. A 48-week, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 122:81-8, 1995*
8) Kloppenburg M, Miltengburg AM, Verdonk MJ: *Minocycline inhibits T cell proliferation and interferon gamma production after stimulation with anti-CD3 monoclonal antibodies. Br J Rheumatol 31:S41, 1992*
9) Bouloa A, Robin JM, Raoult D: *Antibiotic susceptibility of Tropheryma whippelii in MRC5 cells. Antimicrob Agents Chemother 48:747-52, 2004*
10) Gross M, Jung C, Zoller WG: *Detection of Tropheryma whippelii DNA in faeces. Ital J Gastroenterol Hepatol 31:70-2, 1999*
11) Amsler L, Bauernfeind P, Nigg C, Maibach RC, Steffen R, Altwegg M: *Prevalence of Tropheryma whippelii DNA in patients with various gastrointestinal diseases and in healthy controls. Infection 31:81-5, 2003*
12) Zinkernagel AS, Gmur R, Fenner L, Schaffner A, Schoedon G, Schneemann M: *Marginal and subgingival plaque-a natural habitat of Tropheryma whipplei? Infection 31:86-91, 2003*
13) Matthias M, Axel von Herbay, David H. Persing: *Tropheryma whippelii DNA is rare in the intestinal mucosa of patients without other evidence of Whipple's disease. Ann Intern Med 134:115-9, 2001*