

한국에서 분리된 나균의 단일염기다형성 유형에 대한 조사

한국한센복지협회 연구원

김종필

Abstract

SNP Genotypes of *Mycobacterium leprae* Isolated in Korea

Jong-Pill Kim

Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association

Leprosy is an important health problem worldwide yet. It is caused by a chronic granulomatous infection of the skin and peripheral nerves with *Mycobacterium leprae*. The clinical findings from tuberculoid to lepromatous leprosy are a result of variation in the cellular immune response to the mycobacterium. The resulting impairment of nerve function causes the disabilities associated with leprosy. The widespread implementation of multi-drug therapy (MDT) has been associated with a fall in the prevalence of the leprosy but as yet no reduction in the case-detection rate globally. The leprosy control activities must be maintained for decades to interrupt transmission of infection.

Based on the discovery of three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *Mycobacterium leprae*, it has been previously reported that there are four major SNP types associated with different geographic regions around the world. To expand the analysis of geographic distribution of *M. leprae*, classified by SNP, the author studied 56 clinical isolates from Korea isolates. And analysis SNP genotyping by PCR amplification and sequencing, PCR-RFLP, and pyrosequencing. The genotype of single-nucleotide polymorphism type 3, CTC, at positions 14676, 164275, and 2935685, was predominant (95%) for isolates originating in Korea.

Key word : leprosy, SNP genotype

한센사업의 총체적인 목표는 사회적 정의와 평등의 원칙 하에 모든 감염된 집단에 대한 한센서비스의 질적으로 보장된 접근을 제공하는 것이다. 복합화학요법을 포함하는 한센사업은 최근 몇 년간에 주목할 만한 변화를 이루었으나, 여러 개발도상국에 만연한 채로 있고 일부 지역에서는 신환자의 발생 빈도가 거의 변하지 않은 채로 남아 있다. 세계보건기구는 20만 건 이상이 국제적으로 발병했을 것으로 추산하고 있지만 병의 위축과 예방적 측면에서 근거한 가능한 손실을 포함하면 그 이상의 새로운 발병이 추정되고 있다¹⁾.

정확한 전염 방법과 사람과 사람 사이의 접촉의 잠재적 중요성을 포함하는 *M. leprae*의 역학에 대한 기본적인 정보는 알려지지 않은 채로 남아 있다. 전염의 패턴, 감염력, 그리고 배양 시간 같은 한센병의 기본적인 측면을 이해하는 것은 중요하고 *M. leprae*의 역학을 조사하기 위한 신뢰성 있는 분자생물학적 도구에 달려있다.

또한 브라질, 인도, 태국, 미국에서 분리된 나균의 비교 유전체 분석을 통하여, 작은 유전체 다양성은 한센병이 하나의 클론 기원을 가지고 있다고 밝혀냈다. 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)의 계통지리학적 분석을 통하여 나균은 아프리카에서 기원하였으며 이주 및 무역 노선에 따라 유럽과 아시아 국가로 확산하고 이후 전세계에 확산되었다고 밝혀졌다²⁾. 그리고 1500년 전 골격에 존재하는 오래된 나균 DNA의 SNP 분석에 의해 이러한 지

리적 및 시간적 이주가 또한 증명되었다³⁾.

나균의 세 가지 단일염기다형성 좌위의 발견을 바탕으로 세계의 다른 지리적 지역과 관련된 네 개의 주요 SNP 유형이 있다고 보고되었는데²⁾, 태국에서 발견된 환자의 임상 분리주와 다른 아시아 지역에서 보고된 결과를 비교한 연구에서는 PCR 증폭 및 시퀀싱에 의한 SNP 유전자형(genotyping)은 미얀마 및 태국에서는 SNP 1형 및 3형이 가장 흔하게 발견되었으며, 일본, 한국, 인도네시아에는 SNP 3형이 더 흔하게 발견되었다는 보고가 있다⁴⁻⁸⁾.

그러나 한국에서 분리된 균주에 대한 단일염기다형성 유형에 대한 국내 연구 보고가 없었다. 이에 연구자는 한국에서 분리된 나균의 단일염기다형성 유형에 대한 조사를 실시하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상

2001년부터 2010년까지 한국한센복지협회 연구원에 내원한 환자들(56명, 내국인 45명, 외국인 11명)에서 분리된 나균 DNA의 SNP 분석을 실시하였다.

2. 방법

1) 나균 DNA 정제

생검 조직 및 취족저점종법에 의해 얻은 균주를 이용하였는데, 취족저점종법에 의해 얻은 균주는 나균이 증식된 조직을 Nakamura⁹⁾에 의한 방법으로 균주를 분리하였으며, 이를

* 교신저자 : 김종필
전자우편 : dr_jpkim@hotmail.com
주 소 : 경기도 의왕시 원골로 59
한국한센복지협회(031-452-7094)

QIAGEN DNA mini-prep kits[®]를 이용하여 제조사가 지정한 방법)을 이용하여 나균 DNA를 얻었다.

2) 나균 DNA 확인(Table 1.)

나균 DNA 정제의 결과를 확인하기 위해서 나균의 RLEP을 대상으로 하여 중합효소연쇄반응((Polymerase Chain Reaction, PCR)을 실시하였다. 먼저 RLEP3에 대해 Bioneer사의 AccuPower[®] PCR PreMix으로 Donoghue 등¹⁰⁾의 방법에 따라 실시하였다. 그 결과는 QIAGEN사의 QIAxcel[®]로 확인하였으며, 확인 정도에 따라 시료를 구분하였다. 명확히 확인된 경우는 good으로

구분하고, 나머지의 경우는 이차적으로 Wang 등¹¹⁾이 고안한 RLEP에 대한 one-tube nested PCR을 Bioneer사의 AccuPower[®] PCR PreMi로 실시하여 그 결과는 QIAGEN사의 QIAxcel[®]로 확인하였으며, 확인 정도에 따라 moderate, 및 poor로 시료를 구분하였다.

3) 단일염기다형성 분석(Table 2, 3)

분리된 나균에서 DNA 정제 후 각 나균 단일염기다형성 유형 평가를 위한 다양한 방법 (PCR 후 시퀀싱, 제한효소절편길이다형성 분석 및 pyrosequencing)으로 분석을 실시하였다(Table 2.).

Table 1. PCR primer sequences for *M. leprae*

Primer Name		Sequence(5'-3')	Length (bp)
RLEP3*	LP1	TGCATGTCATGGCCTTGAGG	129
	LP2	CACCGATACCAGCGGCAGAA	
RLEP**	R1	CGGGTAGGGCGTTTTAGT	272
	R2	CTAGAAGGTGCCGTATGTG	
	R3	GCGTTTAGTGTGCATGTCA	230
	R4	GGATCATCGATGCACTGTT	

**Donoghue HD, Holton J, Spigelman M.: PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. J Med Microbiol. 2001;50(2):177-182

***Wang HY, Whang JH, Kim JP, et al: Improved Detection of *Mycobacterium leprae* by One-tube Nested Polymerase Chain Reaction. J. Exp. Bilomed. Sci. 2007;13:319-324

Table 2. PCR primer sequences for *M. leprae* SNP

Primer Name		Sequence(5'-3')	Length (bp)
SNP1*	SNP-14676-F	AATGGAATGCTGCTGAGAGC	194
	SNP-14676-R	CAATGCATGCTAGCCTTAATGA	
SNP2*	SNP-1642875-F	TGCTAGTTTAACCGAGTACTGCTA	189
	SNP-1642875-R	GTAGTAGTCTTCCAAGTTGTGGTG	
SNP3*	SNP-2935685-F	ATCTGGTCCGGGTAGGAATC	180
	SNP-2935685-R	ACCGGTGAGCGCACTAAG	

*Monot, M., N. Honoré, N. Garnier, R. et al. On the origin of leprosy. Science 2005.;308:1040-1042

4) 중합효소 연쇄 반응 후 제한효소 절편 길이 다형성 기법(Fig. 1, 2)

Monot 등²⁾에 의한 방법에 따라 QIAGEN사의 multiplex-PCR kit를 사용하여 PCR을 실시하고, QIAxcel[®]로 확인하였다. 확인 후 나균 단일염기다형성 1, 2, 3형 좌위에 대해 SmlI, BstUI, 및 CviKI-1 제한효소에 용인되는 염기서열은 각각 CTYRAG, RGCY, 및 CGCG 임으로, SmlI, CviKI-1, 및 BstUI(이상 New England Biolabs, MA)를 사용하여 제한효소 절편길이 다형성 기법을 실시하였다.

PCR 산물 10ul를 1unit 제한효소를 사용하여 각각 55°C, 60°C, 및 37°C 온도로 1시간 동안 분해하였고, 그 결과는 QIAxcel[®]로 확인하였다. 그 후 나머지 시료는 BIONICS사에 시퀀싱을 의뢰하여 결과를 확인하였다.

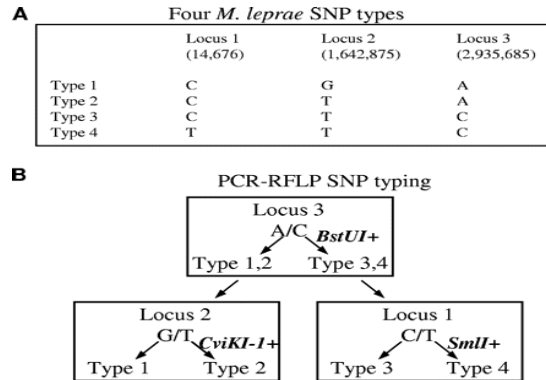


Fig. 1. Schematic of *M. leprae* SNP subtyping of samples based on PCR-RFLP. (A) The four major SNP types. (B) Scheme of *M. leprae* subtyping. (citation from 'Sakamuri RM, Kimura M, Li W, et al. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. J Clin Microbiol. 2009;;47(9):2844-54.')

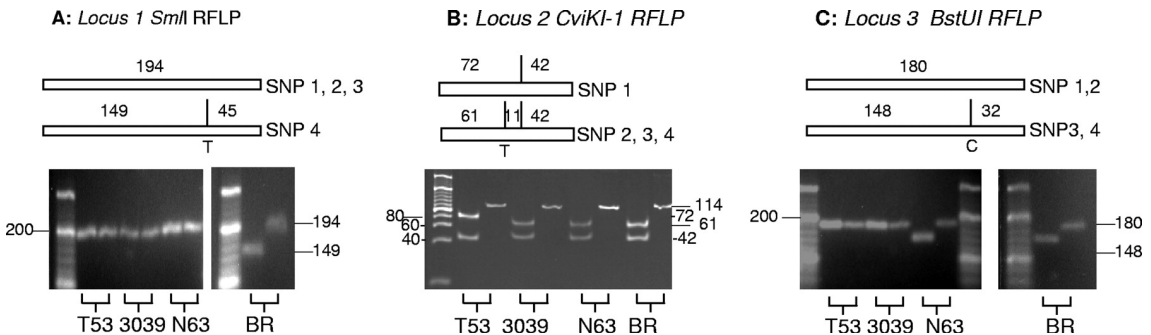


Fig. 2. PCR-RFLP patterns of four *M. leprae* reference strains(Thai-53, 3039/21, NHDP63 and BR4923) (citation from Sakamuri RM, Kimura M, Li W, et al. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. J Clin Microbiol. 2009;;47(9):2844-54.)

5) Pyrosequencing(Table 3, 4)

QIAGEN사의 PyroMark[®] Q24로 Pyrosequencing을 실시하였다. 동사가 제공한 Pyromark Assay관련 프로그램을 이용하여 시발체를 제작하여 QIAGEN사의

multiplex-PCR kit를 사용하여 PCR을 실시하고 그 결과는 QIAxcel[®]로 확인한 후, 이 PCR 산물로 Pyrosequencing을 실시하였다.

Table 3. Pyrosequencing primer set sequences.

Primer Name		Sequence(5'-3')	Length (bp)
SNP-14676	PCR Primer	Biotin-AGTCTCGTAACCGTGTTCG CAATGCATGCTAGCCTTAATGAA	116
	Sequencing Primer	TGGAAAAGTCTATTCTCA	
SNP-1642875	PCR Primer	TAACTGGGCGCAGAGGAA GAACCGTCGGGGTAGTAGT-Biotin	174
	Sequencing Primer	AATTCGACGATC	
SNP-2935685	PCR Primer	Biotin-GGTGTCGGTCTCCATCCAGATT ATGCTGCTCGGCTCGTGTC	228
	Sequencing Primer	AAGGGCGGTTTCTAC	

Table 4. Sequence with marked primers of Pyrosequencing

SNP-14676	
AGTCTCGTAA CCGTGTTC G	
598 AGTCTCGTAA CCGTGTTC GACGAAGTAC TTTATGTGT TAACAACGCT GCCGGTCTTC TAATGGAGAC YTGAGAATAG ACTTTTCCAA	
	ACTCTTATC TGAAAAGT
688 GCCTTCATTA AGGCTAGCAT GCATTG 714	
AAGTAAT TCCGATCGTA CGTAAC	
SNP-1642875	
TAACTGGGCG CAGAGGAA	
361 TAACTGGGCG CAGAGGAACA GTTCAAGGC GGCATGTGCG GCTTCATGGC TCGTCACAAA TCCGAGTTTG AATGCGACCA AACGTACTTT	
AATTCG GCACGATC	
451 CTGAATTCG GCACGATCGG CKTGCTGGGA GCTGATCATG CTCGAGGGCA CCACAACCTG GAAGACTACT ACCCCCGACG GTTC 535	
	TGATGA TGGGGGCTGC CAAG
SNP-2935685	
GGTGTGCGTC TCCATCCAGA TT	
497 GGTGTGCGTC TCCATCCAGA TTAATCGAC TAACGGCGCA TAGATTTTG CCCGAGCGAT ACAGAGCTCG ATGCCGTTCT TGGCGMGGTA	
	CAT
587 GAAACCGCCC TTAGTGCCT CACCGGTGAT TAACGGCCG TCACGCTCGT CTACGTCGGA GGTATCAGG GTGGCAACCT CGGCGTTGGG	
CTTTGGCGGG AA	
677 ACGGCAATC ATGACAGTCA GCACGTCGAA CACGAGCCGA GCAGACAT 725	
CTT GTGCTCGGCT CGTCTGTA	

결 과

1. 대상 결과

내국인 45명 및 외국인 11명에 대한 요약은 표와 같다(Table 5, 6).

Table 5. Profile of subjects(Korean)

Case	Sex	Age	WHO classification	Disease status	Year
k1	male	59	MB	new case	2001
k2	female	63	MB	relapse case	2003
k3	male	65	MB	relapse case	2003
k4	male	60	MB	relapse case	2003
k5	male	77	MB	new case	2003
k6	male	62	MB	new case	2003
k7	female	66	MB	new case	2003
k8	female	63	MB	relapse case	2003
k9	male	69	MB	relapse case	2003
k10	male	67	MB	new case	2003
k11	female	66	MB	new case	2003
k12	female	62	PB	relapse case	2004
k13	female	72	MB	new case	2004
k14	male	16	MB	new case	2004
k15	female	64	MB	new case	2004
k16	male	49	MB	relapse case	2005
k17	male	66	MB	relapse case	2005
k18	female	76	MB	relapse case	2005
k19	male	61	MB	new case	2005
k20	female	79	MB	new case	2005
k21	female	65	MB	relapse case	2005
k22	female	63	MB	new case	2005
k23	male	70	MB	relapse case	2005
k24	male	74	PB	new case	2006
k25	male	73	MB	new case	2006
k26	female	75	MB	new case	2006
k27	female	71	MB	new case	2006

k28	male	45	MB	new case	2006
k29	male	68	MB	new case	2006
k30	male	69	MB	new case	2007
k31	female	78	PB	new case	2007
k32	male	63	MB	new case	2007
k33	male	55	MB	relapse case	2007
k34	male	70	MB	new case	2007
k35	male	54	MB	relapse case	2008
k36	female	55	MB	relapse case	2008
k37	female	69	MB	relapse case	2008
k38	male	76	MB	new case	2008
k39	female	35	PB	new case	2008
k40	female	64	MB	new case	2009
k41	male	58	MB	relapse case	2009
k42	female	68	MB	new case	2009
k43	male	48	PB	new case	2009
k44	male	71	MB	new case	2010
k45	female	55	MB	relapse case	2010

Table 6. Profile of subjects(Foreigners)

Case	Sex	Age	Nationality	WHO classification	Disease status	Year
f1	male	35	Philippine	MB	new case	2003
f2	male	22	Sri Lanka	MB	new case	2005
f3	male	23	Indonesia	MB	new case	2005
f4	female	23	Sri Lanka	PB	new case	2006
f5	male	25	Thailand	PB	new case	2006
f6	male	38	Philippine	MB	new case	2007
f7	male	25	Nepal	MB	new case	2008
f8	male	31	Sri Lanka	MB	new case	2008
f9	male	29	Philippine	MB	new case	2009
f10	male	31	Indonesia	MB	new case	2010
f11	male	25	Indonesia	MB	new case	2010

내국인 45명의 평균연령은 63.4세(남자 63.4세, 여자 61.8세)이었고, 남자가 25명, 여자가 20명이었으며, 신환자는 28명, 재발환자는 17명이었고, 40명이 다균형, 5명이 희균형이었다(Fig. 3).

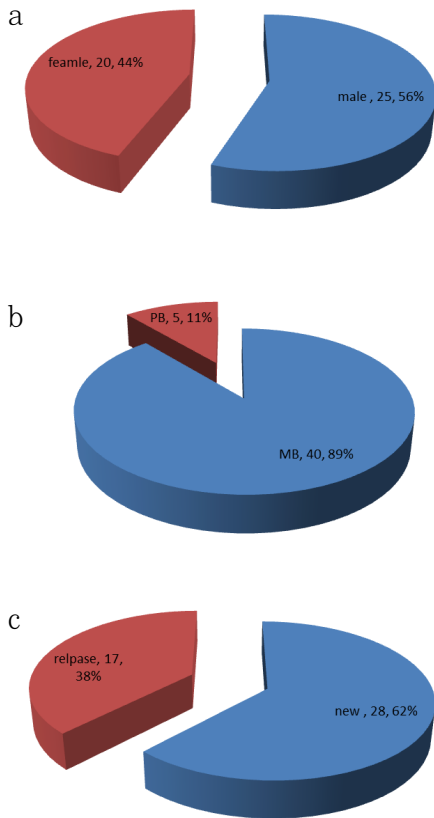


Fig. 3. Summary of Korean subjects (a: Sex, b: WHO classificatio & c: Disease satus)

외국인 11명은 인도네시아, 필리핀, 및 스리랑카가 각각 3명이었고, नेपाल과 태국이 각각 1명이었다(Fig. 4). 이들의 평균연령은 27.9세이었고, 남자가 10명, 여자가 1

명이었으며, 11명 모두가 신환자이고, 9명이 다균형, 2명이 희균형이었다(Fig. 5).

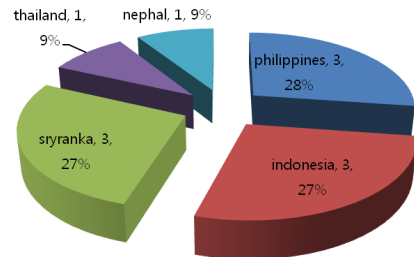


Fig. 4. Result of Foreigners' Nationality

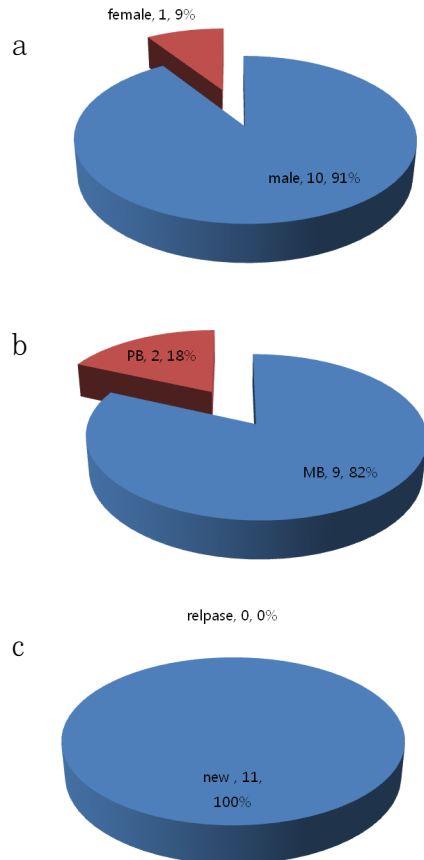


Fig. 5. Summary of Foreigners subjects (a: Sex, b: WHO classificatio & c: Disease satus)

2. 나균 DNA 확인

대상자 46명의 생검 조직 및 귀족저접종법에 의해 얻은 균주를 이용하였는데 얻은 시료들에 대한 나균 DNA 확인을 위한 PCR 후 77개의 시료를 선정하여 단일염기다형성 유형을 위한 과정을 진행하였다. 이 시료는 생검 조직 시료가 52개, 귀족저접종법에 의해 얻은 균주 시료가 25개였고, god이 35개, moderate가 10개, poor가 32개였다(Table 7).

Table 7. Result of PCR for *M. leprae*

	Good	Moderate	Poor	Total
Biopsy	21	8	23	52
Serial passage of nude mouse	14	2	9	25
Total	35	10	32	77

3. 단일염기다형성 유형

전체 56명에 대한 나균 단일염기다형성 유형 평가를 위한 다양한 방법(PCR 후 시퀀싱, 제한효소절편길이다형성 분석 및 pyrosequencing)으로 분석을 실시 후 3예(내국인 2예, 외국인 1예)에서 결과를 판정할 수 없었다.

분석이 가능했던 53예에서 한국인 43예에서는 단일염기다형성 3형은 41예, 2형은 2예로, 인도네시아인 3예에서는 단일염기다형성 3형은 2예, 2형은 1예로, 네팔인 1예에서는 단일염기다형성 2형은 1예로, 필리핀인 2예에서는 단일염기다형성 1형은 2예로, 스리랑카인 3명에서는 단일염기다형성 1형은 3예로, 태국인 1예에서는 단일염기다형성 1형은 1예로 확인되었다(Table 8, Fig. 6).

Table 8. SNP analysis of *M. leprae*

Country	SNP Type 1	SNP Type 2	SNP Type 3	SNP Type 4
Korea(N=43)		2	41	
Indonesia(N=3)		1	2	
Nepal(N=1)		1		
Philippine(N=2)	2			
Sri Lanka(N=3)	3			
Thailand(N=1)	1			

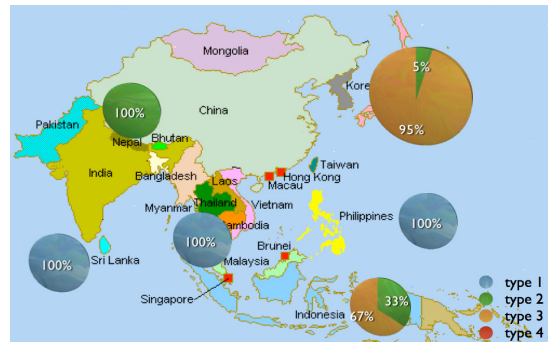


Fig. 6. Distribution of SNP subtyping results

4. 종합효소 연쇄 반응 후 제한효소 절편 길이 다형성 기법 및 시퀀싱 결과 비교

77예의 종합효소 연쇄 반응 후 제한효소 절편길이 다형성 기법 및 시퀀싱 시행 후 단일염기다형성 좌위 3에서는 PCR-RFLP에서는 64예(83.1%)에서, 시퀀싱에서는 67예(87.0%)에서 확인이 가능했고, 단일염기다형성 좌위 2에서는 PCR-RFLP에서는 16예(20.8%)에서, 시퀀싱에서는 74예(96.1%)에서 확인이 가능했으며, 단일염기다형성 좌위 1에서는 PCR-RFLP에서는 67예(87.0%)에서, 시퀀싱에서는 76예(98.7%)에서 확인이 가능하였다. 단일염기다형성 유형은 PCR-RFLP에서는 47예(61.0%)에서, 시퀀싱에서는 60예(77.9%)에서 확인이 가능하였다(Table 9, Fig. 7).

Table 9. Comparison of PCR-RFLP & sequencing

		Total(N=77)
Restriction	locus 3	64
	(%)	83.1
	locus 2	16
	(%)	20.8
Sequencing	locus 1	67
	(%)	87.0
	SNP type	47
	(%)	61.0
Sequencing	locus 3	67
	(%)	87.0
	locus 2	74
	(%)	96.1
Sequencing	locus 1	76
	(%)	98.7
	SNP type	60
	(%)	77.9

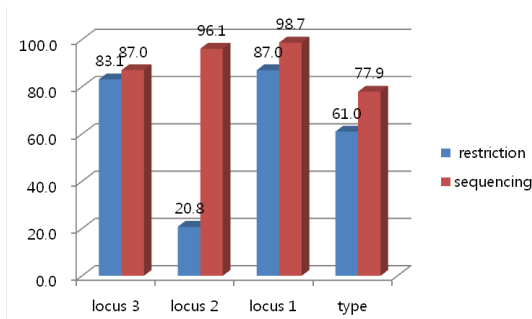


Fig. 7. Comparison of PCR-RFLP & sequencing

5. 종합효소 연쇄 반응 후 제한효소 절편길이 다형성 기법, 시퀀싱, 및 Pyrosequencing 결과 비교

45예의 종합효소 연쇄 반응 후 제한효소 절편 길이가 다형성 기법, 시퀀싱, 및 Pyrosequencing 시행 후 단일염기다형성 좌위 3에서는 PCR-RFLP에서는 37예(82.2%)에서, 시퀀싱에서는 38예(84.4%)에서, Pyrosequencing에서는 39예(86.7%)에서, Pyrosequencing

에서는 39예(86.7%)에서 확인이 가능했고, 단일염기다형성 좌위 2에서는 PCR-RFLP에서는 0예(0%)에서, 시퀀싱에서는 44예(97.8%)에서, Pyrosequencing에서는 35예(77.8%)에서 확인이 가능했으며, 단일염기다형성 좌위 1에서는 PCR-RFLP에서는 41예(91.1%)에서, 시퀀싱에서는 45예(100%)에서 확인이 가능하였다. 단일염기다형성 유형은 PCR-RFLP에서는 26예(57.8%)에서, 시퀀싱에서는 36예(80.0%)에서, Pyrosequencing에서는 36예(80.0%)에서 확인이 가능하였다(Table 10, Fig. 8).

Table 10. Comparison of PCR-RFLP, sequencing & Pyrosequencing

		Pyrosequencing (N=45)
Restriction	locus 3	37
	(%)	82.2
	locus 2	0
	(%)	0.0
Sequencing	locus 1	41
	(%)	91.1
	SNP type	26
	(%)	57.8
Pyrosequencing	locus 3	38
	(%)	84.4
	locus 2	44
	(%)	97.8
Pyrosequencing	locus 1	45
	(%)	100.0
	SNP type	36
	(%)	80.0
Pyrosequencing	locus 3	39
	(%)	86.7
	locus 2	35
	(%)	77.8
Pyrosequencing	locus 1	45
	(%)	100.0
	SNP type	36
	(%)	80.0

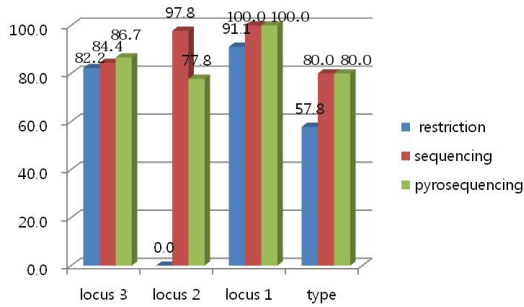


Fig. 8. Comparison of PCR-RFLP, sequencing & Pyrosequencing

6. 단일염기다형성 좌위 및 유형 안정성

생검 조직 및 쥐족저접종법에 의해 얻은 균주에서 정제한 나균 DNA의 11종 27에서 확인한 단일염기다형성 유형 확인에서 모두 예에서 안정성을 확인하였다(Table 11).

Table 11. Stability of single-nucleotide(SNP) among strains subjected to serial passage in nude mouse

Strain and generation	Genotype		Nationality
	Nucleotide	SNP type	
K22	biopsy	CTC	Korean
	6th	CTC	
	7th	CTC	
K29	biopsy	CTC	Korean
	4th	CTC	
	5th	CTC	
K30	biopsy	CTC	Korean
	3rd	CTC	
	4th	CTC	
K33	biopsy	CTC	Korean
	4th	CTC	
K34	3rd	CTC	Korean
	4th	CTC	
K36	biopsy	CTC	Korean
	3rd	CTC	
	4th	CTC	
K40	1st	CTC	Korean
	2nd	CTC	
K41	biopsy	CTC	Korean
	1st	CTC	
F5	biopsy	CGA	Thailand
	3rd	CGA	
F8	biopsy	CGA	Sri Lanka
	2nd	CGA	
	3rd	CGA	
F10	1st	CTC	Indonesia
	2nd	CTC	

Nucleotide at position 14676, 164275 and 2935685

고찰

한센병은 나균의 감염에 의해 발생하는 신경학적 결과를 유발시킬 수 있는 수천년 간 인류 집단을 괴롭힌 만성 감염병이고, Hansen에 의해 1873년 나균(*Mycobacterium leprae*)이 감염체로 확인하기까지 과학자에게 이해할 수 없게 만들었다¹²⁾. 한센병 퇴치 사업과 함께 한센병 진단 및 치료에 대한 전세계적인 표준화된 지침이 지난 20여년간 활용되었다¹⁾.

그러나 신환자 발견률은 일부 유병지역에서는 변화하지 않고 있어, 전과 경로 및 근원과 의심의 여지가 없는 한센병 관련 사업 평가 척도의 효율성에 대한 근본적인 의문점이 남아 있다. 전통적인 역학적 판단 및 한센병 관리 프로그램에서는 일반 주민보다 환자의 가족 접촉자가 한센병의 높은 위험도를 가지고 있다고 견해를 가지고 있다¹³⁻¹⁵⁾. 신환자들과 환자의 가족 접촉자와의 관계성 및 근원 추적 등과 같은 설명 또는 도구가 일상적으로 진행되고 있지는 않다^{16,17)}.

감염되기 쉬운 개인들에서, 한 개 또는 여러 개의 한센병 피부 병변이 종종 주목되지 못하거나 보고되지 않기도 하고, 진단되지 않은 상태로 오랜 기간 지낼 수도 있다. 피부도말 검사 및 피부조직 생검검사를 포함한 검사실 검사들이 한센병 진단을 위해 보편적으로 사용되지 않고 있다. 나균은 발견된 후에도 실험실에서 배양할 수 없다. 이런 요인들과 사회적 요인들이 지역사회 내에서 한센병 감염의 탐지를 지체시킨다. 반면에 피부병변 및 피부도말 검사로부터 직접 얻은 감염체의 종 유형과 같은 분자생물학적 기술은 전통적인 한센병 관리 시스

템에서 이러한 어려움을 극복하고 새로운 정보를 제공해 줄 수 있게 한다.

비교유전학의 발전은 확고한 계통 관계의 정립을 가능하게 하였다. 그러나 한센병 전파의 양상 연구에서 어려운 점은 세균 게놈 DNA의 변동이 적다는 것이다. 2000년 Matsuoka 등¹⁸⁾과 Shin 등¹⁹⁾이 2가지의 염기쌍나열반복의 변수(Variable Number Tandem Repeat, VNTR)을 발견하기 전까지 사용할 유전자형 분류 도구가 없었다. 그 후 유전자형 분류의 가능성을 갖은 짧은 염기서열반복표지자(short tandem repeats, STR)가 발견되었다^{20,21)}. STR 다형성을 이용한 지역사회 기반 역학적 분석에서 한센병 고유병 지역의 다양한 분리 균주의 존재를 확인하였다^{21,22)}.

인도 Tami Nadu(TN 균주)은 나균의 아마딜로 배양 균주의 게놈 서열 비교에서의 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)과 긴밀한 관련성은 주요한 돌파구를 유도했다^{23,24)}. 인도 Tami Nadu(TN 균주)은 나균의 단일염기다형성 좌위는 28,400 염기 당 하나로 이는 다른 인간 병원체에 비해 의미 있게 적게 나타난다. 나균 게놈 DNA의 뉴클레오티드 위치 14676, 164275, 및 2935685에서의 단일염기다형성이 발견되었고, 단일염기다형성을 통한 유전자형 분류 역시 한센병에 세계적 분포 분석에 유용함이 발견되었다.

Monat 등²⁾은 단일염기다형성은 나균 게놈 DNA의 뉴클레오티드 위치 14676, 164275, 및 2935685에서 각각의 염기서열 CGA는 1형으로, CTA는 2형으로, CTC는 3형으로, TTC는 4형으로 분류하였다. 비교유전체학적 기법을 이용하여 모든 현존하는 한센병 증례들이 한 개의 클론에

서 기인하였음을 증명하였다. 매우 드문 단일염기다형성의 분석을 통해 전세계적인 확산을 근원을 살펴볼 수 있게 되었다.

5개 대륙 21개 국가에서 얻은 175개 시료의 3개의 단일염기다형성 정보로부터 얻은 나균 단일염기다형성의 전세계적인 분포로부터 64개의 순열에서 단일염기다형성 유형 4개(1형, 2형, 3형 4형)가 발생하였다. 단일염기다형성 유형 개요와 한센병 환자의 지리학적 기원 간의 연관성이 존재하였는데, 1형은 아시아, 태평양 지역, 동아프리카 지역에서, 4형은 서아프리카, 카리브 지역에서, 3형은 유럽, 북아프리카, 및 아메리카 지역에서 주로 발견되었다. 2형은 제일 드물었는데 단지 에디오피아, 말라위, 네팔, 북인도, 뉴칼레도니아 지역에서만 발견되었다.

Sakamuri 등⁶⁾의 보고에 의하면 필리핀 세부지역에서 분리된 나균의 대부분은 단일염기다형성 1형이었다. 100예의 2003년에서 2004년 사이에 치료받지 않은 신환자 및 치료 시작한지 얼마 안 된 환자의 냉동 시료, 78예의 2006년에서 2007년 사이에 얻은 에탄놀 고정 시료, 5예의 1980년대 피부생검 조직에 대한 단일염기다형성 유형에 대한 연구에서 16%에서만 3형으로 확인되었다. 일본 본토에서 분리된 규주에서 염기 위치 14676, 164275, 및 2935685가 CTC인 단일염기다형성 3형이 흔하다고 Matsuoka 등⁴⁾은 보고하였다. 또한 한국, 인도네시아, 미얀마에서 분리된 규주에서는 1형(CGA), 2형(CTA) 및 3형(CTC) 등이 발견되었고, 4형(TTC)은 브라질 출신 일본인에게서 발견되었다. Phetsuksiri 등⁸⁾은 태국에서 분리된 85개의 임상시료를 분석하여 다른 아시아 분리규주와 비교하였

다. 미얀마에서는 1형과 3형이 널리 퍼져 있었으며, 일본, 한국, 인도네시아에서는 3형이 더 흔하였다. 태국에서는 발견되지 않은 2형을 제외하고 태국과 미얀마에서는 매우 비슷한 양상을 보였다. Matsuoka 등²⁵⁾은 멕시코 내에서의 한센병의 전파상황을 위한 지리학적 분포를 분석하기 위해 단일염기다형성 유형에 대한 분석을 실시하였다. 멕시코 서부 및 남서부에서 분리된 64예에 대한 분석을 실시하였다. 멕시코 서부 및 남서부에서 분리된 6예에서 단일염기다형성 1형이었고 13예가 2형, 45예가 3형이었다.

또한 멕시코 동부 해안지역에서 분리된 24예의 분석에서 19예가 단일염기다형성 3형이었고, 1예가 4형이었다. 유카탄 반도 지역에서 분리된 7예가 단일염기다형성 3형이었고, 4형이 1예이었다. Kuruwa 등⁷⁾은 인도에서 48예의 피부생검 시료에서 모두가 단일염기다형성 유형은 1형으로 확인되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 분석이 가능했던 53예에서 한국인 43예에서는 단일염기다형성 3형은 41예, 2형은 2예로, 인도네시아인 3예에서는 단일염기다형성 3형은 2예, 2형은 1예로, 네팔인 1예에서는 단일염기다형성 2형은 1예로, 필리핀인 2예에서는 단일염기다형성 1형은 2예로, 스리랑카인 3명에서는 단일염기다형성 1형은 3예로, 태국인 1예에서는 단일염기다형성 1형은 1예로 확인되었다. 내국인의 경우 Matsuoka 등⁴⁾의 보고와 유사한 소견이라고 사료되나, Monot 등²⁾의 결과와는 차이가 있어 이에 대한 향후 재평가가 필요하다고 사료된다(Fig. 9, 10).

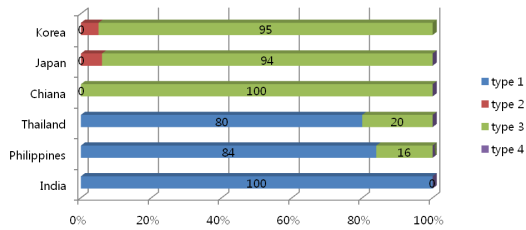


Fig. 9. Comparison of SNP of *M. leprae* isolated Korea and other Asian countries. Except Korea data, others for previous reports, below.

Sakamuri R M et al. J Clin Microbiol. 2009 September;47(9):2844-2854.
 Weng X et al. J Clin Microbiol. 2007 June; 45(6):1728-1734.
 Phersuksiri B et al. Jpn Infect Dis 2012; 65(1):52-6.
 Matsuoka M et al. FEMS Microbiol Lett 2006 Aug;261(1):150-4
 Kuruwa S et al. J Clin Microbiol 2012 Apr;50(4):1406-11

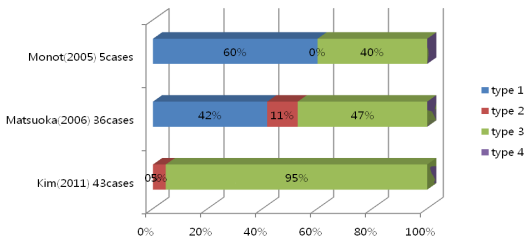


Fig. 10. Comparison of SNP report of *M. leprae* isolated Korea. Except our data, others for previous reports, below.

Monot MN, et al. Science 2005;308:1040- 1042
 Matsuoka M et al. FEMS Microbiol Lett 2006 Aug;261(1):150-4

Matsuoka 등⁴⁾은 5예의 분리 균주에서 계대 배양 후 평가에서 단일염기다형성은 변하지 않는다는 것이 발견되었고 보고하였다. 본 연구에서도 생검 조직 및 귀족저접 종법에 의해 얻은 균주에서 정제한 나균 DNA의 11중 27예에서 확인한 단일염기다

형성 유형 확인에서 모든 예에서 안정성을 확인하였다.

Sakamuri 등⁶⁾은 신속한 나균 DNA의 단일염기다형성 유형 분석을 위해 비교적 적은 비용이 드는 중합효소연쇄반응 후 제한효소 절편길이 다형성 기법(Polymerase Chain Reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)의 타당성 및 실용성을 확인하였다. 그래서 본 연구에서는 알려진 나균 단일염기다형성 1, 2, 3형 좌위(TN 균주 뉴클레오티드 위치 14676, 1642875, 및 2935685)에 대해 기존에 보고된 시발체로 증폭 후 PCR-RFLP를 시퀀싱과 함께 시행하였다.

그 결과, 77예의 중합효소 연쇄 반응 후 제한효소 절편길이 다형성 기법 및 시퀀싱 시행 후 단일염기다형성 좌위 3에서는 PCR-RFLP에서는 83.1%에서, 시퀀싱에서는 87.0%에서 확인이 가능했고, 단일염기다형성 좌위 2에서는 PCR-RFLP에서는 20.8%에서, 시퀀싱에서는 96.1%에서 확인이 가능했으며, 단일염기다형성 좌위 1에서는 PCR-RFLP에서는 87.0%에서, 시퀀싱에서는 98.7%에서 확인이 가능하였다. 단일염기다형성 유형은 PCR-RFLP에서는 61.0%에서, 시퀀싱에서는 77.9%에서 확인이 가능하였다. 물론 시퀀싱이 좀 더 나은 결과를 보여 주었지만, PCR 후 일단 RFLP 실시한 후 확인이 어려울 때 시퀀싱을 실시하는 것이 보다 신속하고 경제적인 것으로 사료된다. 연구자는 중합효소 연쇄 반응 후 제한효소 절편길이 다형성 기법, 시퀀싱, 및 Pyrosequencing 결과 비교를 분석하여 보았는데, 45예의 중합효소 연쇄 반응 후 제한효소 절편길이 다형성 기법, 시퀀싱, 및 Pyrosequencing 시행 후 단일염기다형성

좌위 3에서는 PCR-RFLP에서는 82.2%에서, 시퀀싱에서는 84.4%에서, Pyrosequencing에서는 86.7%에서, Pyrosequencing에서는 86.7%에서 확인이 가능했고, 단일염기다형성 좌위 2에서는 PCR-RFLP에서는 0%에서, 시퀀싱에서는 97.8%에서, Pyrosequencing에서는 35예(77.8%)에서 확인이 가능했으며, 단일염기다형성 좌위 1에서는 PCR-RFLP에서는 91.1%에서, 시퀀싱에서는 100%에서 확인이 가능하였다. 단일염기다형성 유형은 PCR-RFLP에서는 57.8%에서, 시퀀싱에서는 80.0%에서, Pyrosequencing에서는 80.0%에서 확인이 가능하였다. 단일염기다형성 좌위 2에서는 PCR-RFLP에서 예외적으로 결과가 나오지 않았던 시료 사용으로 전체 결과의 신뢰성이 낮기는 하지만, Pyrosequencing도 유용한 방법이라고 사료된다. 이에 대해서는 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

Sakamuri 등⁶⁾은 염기쌍나열반복의 변수(Variable Number Tandem Repeat, VNTR) 표지자들로 대부분의 1형 단일염기다형성으로부터 3형을 구분할 수 있다고 보고하였다. 독특하고 뚜렷한 대립 형질 양상이 3형에서 발견되었는데, 1형에 비교할 때 전형적인 축소가 있었다.

또한 3형에서 높게 예견되는 2개의 좌위가 세부 주민 내에서 발견되었다. 이는 감염원 전파 중에 계통발생학적 관계성을 유지하는 VNTR 표지자 증에서 충분한 안정성을 있음을 의미한다. 특히 21-3 다양성의 감지는 연구 주민들에 대한 3형의 좋은 지표로 활용할 수 있다고 보고하였다. 이번 연구에서는 이에 대한 조사를 하지 못했으나, 향후 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

2001년부터 2010년 사이에 한국에서 분리된 시료에 대해 PCR-RFLP 및 시퀀싱을 통해 나균 DNA SNP 분석하였다. 대상 56예 중 2예에서는 분석에 성공하지 못했으며, 분석이 가능했던 내국인 43예에서 41예(95%)가 SNP 3형이었고, 2예에서 SNP 2형이었고, 외국인 10명에서는 SNP 1형이 6예, SNP 2형이 2예, SNP 3형이 2예로 확인되었다. 이는 그간의 보고와 차이점에 대한 향후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. World Health Organization. Global leprosy situation, 2010. Wkly. Epidemiol. Rec. 2010;85:337~348.
2. Monot MN, Honoré N, Garnier R, et al. On the origin of leprosy. Science 2005;308:1040-1042
3. Watson CL, Lockwood DNJ. Single Nucleotide Polymorphism Analysis of European Archaeological *M. leprae* DNA. PLoS ONE 2009;4(10): e7547
4. Matsuoka M, Lopez Roa RI, Budiawan T et al. Genotyping analysis of *Mycobacterium leprae* isolates from Japan and other Asian countries reveals a global transmission pattern of leprosy. FEMS Microbiol lett, 2006; 261:150~154.
5. Weng X, Wang Z, Liu J, et al. Identification and distribution of *Mycobacterium leprae* genotypes in a region of high leprosy prevalence in China: a 3-year molecular epidemiological study. J Clin Microbiol. 2007;45(6): 1728-34.

6. Sakamuri RM, Kimura M, Li W, et al. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. *J Clin Microbiol.* 2009;;47(9):2844-54.
7. Kuruwa S, Vissa V, Mistry N. Distribution of *Mycobacterium leprae* strains among cases in a rural and urban population of Maharashtra, India. *Clin Microbiol.* 2012;50(4):1406-11.
8. Phetsuksiri B, Srisungngam S, Rudeeaneksin J, et al. SNP genotypes of *Mycobacterium leprae* isolates in Thailand and their combination with *rpoT* and *TTC* genotyping for analysis of leprosy distribution and transmission. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(1):52-6.
9. Nakamura M. Elimination of contaminants in a homogenate of nude-mouse foot pad experimentally infected with *Mycobacterium leprae*. *Jpn. J. Lepr.* 1994;64:47-50.
10. Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol.* 2001;50(2):177~182
11. Wang HY, Whang JH, Kim JP, et al: Improved Detection of *Mycobacterium leprae* by One-tube Nested Polymerase Chain Reaction. *J. Exp. Bilomed. Sci.* 2007;13:319~324
12. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet.* 2004;363:9416:1209~1219
13. Cellona RV, Walsh GP, Fajardo TT, et al. Cross-sectional assessment of ELISA reactivity in leprosy patients, contacts, and normal population using the semisynthetic antigen natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in Cebu, the Philippines. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1993;61:192~198.
14. Van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1999;67:119~128.
15. Cardona-Castro NJ, Beltrán-Alzate, Manrique-Hernández R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2008;103:332~336.
16. Deps PD, Guedes BV, Filho JB, et al. Delay in the diagnosis of leprosy in the metropolitan region of Vitoria, Brazil. *Lepr. Rev.* 2006;77:41~47.
17. Tadesse Argaw, A., Shannon E.J, Assefa A, et al. A geospatial risk assessment model for leprosy in Ethiopia based on environmental thermal-hydrological regime analysis. *Geospat. Health* 2006;1:105~113.
18. Matsuoka M, Maeda S, Kai M, et al. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *Int J Leprosy* 2000; 68:121~128.
19. Shin YC, Lee H, Lee H, et al. Variable numbers of *TTC* repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4535~4538.
20. Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, et al. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of

- Mycobacterium leprae*. J Clin Microbiol 2004;42:1666~1672.
21. Zhang L, Budiawan T, Matsuoka M. Diversity of potential short tandem repeats in *Mycobacterium leprae* and application for molecular typing. J Clin Microbiol 2005;43:5221~5229.
 22. Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the basis of polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. J Clin Microbiol 2004; 42:741~745.
 23. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998;11:393(6685): 537-44.
 24. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature. 2001;22:409(6823): 1007-11.
 25. Matsuoka M, Gonzalez AV, Estrada I, et al. Various genotypes of *Mycobacterium leprae* from Mexico reveal distinct geographic distribution. Lepr Rev. 2009;80(3):322-6.

