

Tula 한타바이러스의 분자생물학적 특성분석 및 국내 밭쥐아과 설치류가 매개하는 새로운 한타바이러스

고려대학교 의과대학 미생물학교실, 바이러스병연구소, ²폴란드 우쯔의과대학,
³미국 하와이대학교 레트로바이러스 연구실

송진원* · 윤재경 · 김상현 · 김종현 · 이영은 · 송기준 · 백락주
R. Kordek² · P.P. Liberski² · R. Yanagihara³ · 이용주

=Abstract=

Microtine Rodent-Borne Hantavirus from Poland and Korea: Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis

Jin-Won Song*, Jae Kyung Yoon, Sang Hyun Kim, Jong Hun Kim,
Young Eun Lee, Ki-Joon Song, Luck Ju Baek, Radzislav Kordek²,
Pawel P. Liberski², Richard Yanagihara³, Yong-Ju Lee

Department of Microbiology, College of Medicine, Institute for Viral Diseases,
Korea University, Seoul 136-705, Korea; ²Medical Academy Lodz, Lodz, Poland;
³Retrovirology Research Laboratory, Pacific Biomedical Research Center,
University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii 96816, USA

Based on the geographic range and distribution of its rodent reservoir host, the European common vole (*Microtus arvalis*), Tula virus is likely to be widespread throughout Eurasia. Tula virus-infected voles have been captured in Central Russia, Austria, Czech and Slovak Republics, and the former Yugoslavia. Although serologic evidence for Hantaan (HTN) or Seoul (SEO) virus infection can be found in the vast majority of the more than 300 cases of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) occurring annually in Korea, approximately 4% of Korean patients with HFRS show a more than 4-fold higher antibody titer to Puumala (PUU) virus than to HTN or SEO virus by double-sandwich IgM ELISA, suggesting the existence of pathogenic Puumala-related hantaviruses in Korea. To further define the geographic distribution and genetic diversity of Tula virus in Eurasia and to investigate the existence of previously unrecognized *Microtus*-borne hantavirus in Korea, arvicolid rodents were captured in Lodz, Poland in 1995 and in Yunchon-kun, Kyungki-do during April to May, 1998. In addition, sera from 18 Korean HFRS patients who showed higher (or the same) antibody titer to Tula virus than HTN and SEO viruses were examined for hantavirus RNA by RT-PCR. Hantaviral sequences were not detected in any of the 18 patients or in 35 reed voles (*Microtus fortis*) in Korea. Alignment and comparison of a 208-nucleotide region of the S segment, amplified from lung tissues of two hantavirus-seropositive *M. arvalis* captured in Poland, revealed 80.8~83.2% sequence similarity,

접수 : 1998년 8월 30일

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비 유전공학연구 (과제번호 GE97-42) 연구지원에 의한 결과임.

*책임저자: 송진원, 서울시 성북구 안암동 5가 고려대학교 의과대학 미생물학교실. Tel.: (02) 920-6408, Fax.: (02) 923-3645, E-mail: jwsong@kucncx.korea.ac.kr

respectively, with Tula virus strains from Central Russia and the Czech and Slovak Republics. Phylogenetic analysis indicated that the newfound Tula virus strains from Poland were closely related to other Tula hantaviruses from Eurasia.

Key Words: Tula hantavirus, RT-PCR, *Microtus arvalis*, *Microtus fortis*

서 론

Tula 한타바이러스는 러시아의 Tula 지역에서 채집된 유라시아밭쥐 (*European common vole, Microtus arvalis*)로부터 염기서열이 밝혀진 이래 [1] Czech Republic과 Slovakia에서도 그 존재가 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)으로 알려졌었다 [2]. 최근 본 연구진은 Serbia-Yugoslavia의 *Pitymys subteraneus*로부터 Tula 바이러스를 찾아내어 한탄 (Hantaan, HTN), 서울 (Seoul, SEO), 푸말라 (Puumala, PUU), 벨그라드 (Belgrade, BGD) 바이러스 외에 Tula 바이러스도 유고슬라비아지역에 유행하고 있음을 발견하였다 [3]. Tula 바이러스의 염기서열은 중합효소연쇄반응을 이용하여 1994년에 밝혀졌지만 바이러스는 최근에도 각각 다른 두 연구진에 의해 분리되었다 [4, 5]. Tula 한타바이러스가 사람에서 병을 일으키는지는 현재까지 밝혀지지 않았다. 1996년 러시아의 Khabarovsk 지역에서 채집된 갈밭쥐 (*Microtus fortis*)로부터 Khabarovsk 바이러스가 분리된바 있는데 [6] 우리나라의 중북부지방에도 갈밭쥐가 서식하고 있고 또한 최근 수년간 고려대학교 바이러스병연구소에 급성열성질환으로 한타바이러스에 대한 항체검사가 의뢰된 환자의 혈청을 분석한 결과 한타바이러스에 항체양성자 중 일부가 한탄 바이러스와 서울 바이러스 보다 푸말라 바이러스에 높은 IgM 항체가를 보여 현재까지 국내에 알려져 있는 한탄 및 서울 바이러스 이외에 다른 혈청형의 새로운 한타바이러스가 존재하고 신증후출혈열을 일으키는 것으로 생각된다 [7].

따라서 본 연구진이 1995년에 폴란드에서 채집된 유라시아밭쥐 (*M. arvalis*)로부터 분리해낸 Tula 바이러스 Lodz 주의 S 분절 염기서열분석 및 계통학적 연구를 시행하였고 국내 신증후출혈열 환자 중 Tula 한타바이러스 감염자에 관한 연구 및 국내에서 갈밭쥐 (*M. fortis*)를 채집하여 한타바이러스에 대한 감염 여부를 조사하여 국내에 기존에 알려지지 않았던 Tula 한타바이러

스나 Khabarovsk-related 한타바이러스의 존재유무에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. Tula 한타바이러스 RNA 분리

Tula 바이러스가 감염된 유라시아밭쥐의 폐조직 및 Vero E6 세포를 RNAzol B (GIBCOBRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.) 용액 1.2 ml로 용해시킨 후 chloroform용액 (1/10 volume)을 첨가하여 vortex mixer에서 15초간 섞은 다음 얼음상자에서 5분간 방치한다. 4℃에서 15분간 원심분리하고 그 상층액을 새 tube에 옮기고 동량의 냉각된 isopropanol을 첨가한 후 4℃에서 45분간 방치한다. 위와 동일한 방법으로 원심분리시켜 total RNA 침전을 얻은 후 75% ethanol로 한차례 세척하고 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리한 증류수 30~45 µl로 녹여 사용한다.

2. Primers 및 Tula 바이러스 cDNA 합성

본 연구에서는 Tula 한타바이러스와 S 분절상의 핵단백 coding 부위의 2쌍의 primer를 사용하였다. S 분절의 cDNA 합성을 위해서 HTN S1 (5'-TAGTAGTAGACTCC-3')을 이용한 후 nested RT-PCR법의 일차 primer쌍으로 F993 (5'-TAGGTGCCTCCTACATG-3')과 R1275 (5'-CTGAGTTCAGGGTCCATATC-3')를, 이차 primer쌍으로는 F1012 (5'-ATTTACATTGCTGGATGGC-3')와 R1258 (5'-TATCATCACCCAGATGAAA-3')를 사용하였다.

cDNA 합성은 RNA template 10 µl에 primer 100 µM을 첨가하고 70℃에서 10분간 RNA를 denature 시키고 master mix용액 (20 unit RNase inhibitor (Perkin Elmer, Branchburg, NJ), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 250 µM dNTPs)에 200 units Superscript II RNase⁻ Reverse Transcriptase enzyme (GIBCOBRL)를 첨가하여 총 반응액 20 µl를 Thermal cycler (Perkin Elmer 480)를 이용하여 42℃에서 1시간 반응시켰다

3. 역전사-중합효소연쇄반응에 의한 Tula 바이러스 RNA 증폭

일차 중합효소연쇄반응은 cDNA template 5 μ l, 100 pmole outer primer 쌍, 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.5 unit AmpliTaq Polymerase (Perkin Elmer) 및 DEPC 처리된 증류수로 최종 반응액 100 μ l를 만든 후 mineral oil을 첨가하여 Thermal cycler에서 94 $^{\circ}$ C 5분간 가열한 후 94 $^{\circ}$ C 1분, 40 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1~3분 주기로 8회 증폭시킨 후 94 $^{\circ}$ C 1분, 45 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1~3분 주기로 35회 증폭시킨 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨다. 이차 중합효소연쇄반응 (nested PCR)은 일차 중합효소연쇄반응의 산물 DNA 5 μ l를 사용하여 동일한 주기로 증폭시킨 후 1.5% agarose gel상에서 247-bp 크기의 PCR 산물을 확인한 다음 pCRII plasmid vector를 이용하여 *E. coli*에서 대량으로 배양 (TA cloning kit, Invitrogen Corp., CA, USA)하고 QIAprep-spin Plasmid kit (QIAGEN Inc.)를 이용하여 plasmid DNA를 정제 후 dye primer cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 automated sequencer에서 바이러스의 염기서열을 결정한다.

4. Tula 한타바이러스의 유전학적 계통 분석

LaserGene program (DNASTAR, USA)을 사용하여 Poland에서 분리된 Tula 바이러스 Lodz 주의 상보 DNA의 염기서열을 기존의 Genbank에 등재되어있는 발취아과 설치류가 운반하는 한타바이러스들인 Tula 바이러스 T23주 (Z30945), PH 바이러스 PH-1주 (M34011), PUU Sotkamo 주 (X61035) 등과 염기서열을 비교분석하고 PAUP Verson 3.1 (Illinois Natural History Survey, USA)을 이용하여 이들 염기서열들의 유전학적 계통수를 작성, 분석한다.

5. 국내 갈밭쥐 (*Microtus fortis*) 채집 및 한타 바이러스에 대한 항체검사

경기도 연천군에서 1998년 4월과 5월에 각각 들쥐를 채집하였다. 야서 채집은 Sherman trap을 사용하였으며 혈청과 조직은 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 채집된 갈밭쥐의 한타바이러스에 대한 항체검사는 간접면역형광항체법을 이용하여 실시하였다. Tula, 한탄, 서울 및 푸말라 한타바이러스

항원슬라이드를 acetone으로 고정시킨 후 인산완충식염수 (PBS)로 1:32 로 희석된 들쥐 혈청 25 μ l를 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 인산완충식염수로 3회, 증류수로 1회 각각 세척하였다. 건조 후 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (ICN, Costa Mesa, CA)를 가하여 일차반응과 같은 방법으로 반응시킨 후 형광현미경 (100W, Zeiss Co., Germany)하에서 400배의 배율로 세포질의 특이 형광점을 관찰하여 한타바이러스에 대한 항체보유 유무를 판정하였다.

6. 국내 신증후출혈열 환자 중 Tula 한타바이러스 감염에 관한 연구

1997년 1월~12월에 고려대학교 바이러스병원 구소에 열성감염성질환이 의심되어 검사의뢰된 2100건의 환자혈청 중 간접면역형광항체법 상한탄 바이러스에 대한 항체가 양성으로 판명된 143건의 혈청을 대상으로 간접면역형광항체법으로 Tula, 푸말라 (K-27주), 서울 (80-39주) 및 한탄 바이러스 (76-118주)에 대하여 항체를 측정하였다. 검사의뢰된 혈청들은 대부분이 서울과 경기도 지역에 거주하는 환자들에서 채혈된 검체이었으며 일부 강원도, 충청남북도, 경상북도에 거주하는 환자들의 검체가 포함되었다.

Tula, 한탄, 서울 및 푸말라 한타바이러스 항원슬라이드에 인산완충식염수로 환자혈청을 1:32부터 4계단 희석하고 각 희석된 혈청 25 μ l를 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 FITC-conjugated goat anti-human IgG (ICN)를 가하여 반응시키고 형광현미경으로 한타바이러스에 대한 항체보유 유무를 판정하였다.

7. 신증후출혈열 환자의 혈액내에서 역전사-중합효소연쇄반응에 의한 Tula 한타바이러스 검출

환자 혈청 또는 말초단핵세포구로부터 RNAzol B (GIBCOBRL) 용액을 사용하여 total RNA 침전을 얻은 후 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리한 증류수 30~45 μ l로 녹여 사용한다. 이후 역전사-중합효소연쇄반응은 기존에 발표된 Tula 및 Khabarovsk 바이러스 특이 primer set를 사용하여 위와 동일한 주기로 증폭시킨 후 증폭 산물을 1.5% agarose gel상에서 전기영동하여 한타바이러스 PCR 산물을 확인했다.

결 과

1. Tula 한타바이러스의 S 분절 염기서열 특성

본 연구에서 밝혀진 2주의 폴란드 Tula 한타바이러스 Lodz-1과 Lodz-2주의 S분절 208-bp 염기서열을 분석한 결과 폴란드에 분포하는 Tula 바이러스의 염기서열의 유형은 한 종류로 Lodz-1과 Lodz-2주의 염기서열은 동일하였으며 Lodz-1주와 러시아, 체코 및 유고슬라비아에서 분리된 Tula 바이러스들과 염기서열과 비교한 결과 분리주 상호간에는 35~40개의 변이를 보여 80.8~83.2%의 동질성을 보였다 (Table 1). 한편 폴란드에 분포하는 Tula 바이러스에만 존재하는 특이한 변이로 18개가 관찰되었는데 이들 18개 모두 세 번째 염기 (3rd position)의 변이로 대부분 아미노산 변화를 유발하지 못한 silent mutation이었고 56% (10/18)는 transition, 44% (8/18)는 transversion이었다.

2. Tula 한타바이러스의 deduced 아미노산서열 특성

새로이 분석된 2주의 폴란드 Tula 한타바이러스 Lodz-1과 Lodz-2주의 염기서열에서 유래된 69개의 아미노산서열을 기존의 러시아, 체코 및 유고슬라비아에서 분리된 Tula 바이러스 아미노산서열과 비교정렬하여 Figure 1와 같은 결과를 얻었다. 폴란드에 분포하는 한타 바이러스의 아

Table 1. Nucleotide and amino acid sequence similarity of the 208-nucleotide region of the S segment between Tula virus Lodz-1 strain and other hantaviruses (%)

Virus strain (Country)	S segment	
	208 nt	69 aa
TUL Lodz-2 (Poland)	100	100
TUL T23 (Russia)	83.2	100
TUL M5286 (Czech)	80.8	98.6
TUL C3454 (Yugoslavia)	82.7	98.6
PH PH-1 (U.S.A.)	73.6	88.4
PUU Sotkamo (Finland)	79.3	92.8
SN NMH10 (U.S.A.)	70.2	82.6
SEO HR80-39 (Korea)	73.6	84.1
HTN 76-118 (Korea)	71.2	84.1

미노산서열의 유형은 한 종류이었으며 러시아 Tula 바이러스와는 동일한 서열을 나타냈으며, 체코 및 유고슬라비아에서 분리된 Tula 바이러스와는 S분절 60위치의 Threonine이 Methionine으로 (Thr→Met) 변했었다.

3. Tula 한타바이러스의 계통분석

PAUP법에 따라 폴란드 Lodz-1 및 Lodz-2주와 러시아, 체코 및 유고슬라비아에서 분리된 Tula 바이러스주들의 S분절상의 208-bp 염기서열에 근거하여 Figure 2와 같은 계통수를 작성하였다. 계통수는 mid-portion rooting에 의해 작성하였으며 각 branch의 하단에는 bootstrap의 확률을 퍼센트로 표시하였고 상단에는 염기 변화 갯수를 표시하였다. 각 branch의 길이는 염기의 변화 갯수에 비례하여 표시되었으며 염기서열에 의한 계통수는 1000 resampling에 의한 bootstrap의 확률을 표시하였다.

염기서열에 의해 작성된 계통수에 따르면 폴란드에 분포하고 있는 Tula 바이러스주들과 러시

Table 2. Immunofluorescence (IF) antibody titers of Korean Hemorrhagic fever with renal syndrome patients against hantaviruses

Code No.	IF antibody titers against			
	HTNV	SEOV	PUUV	TULV
KHF97-374	-	32	-	128
KHF97-964	-	-	128	128
KHF97-1630	32	-	32	128
KHF97-1647	128	-	32	128
KHF97-1667	32	-	32	32
KHF97-1893	32	32	-	32
KHF97-166	8192	2048	128	512
KHF97-501	8192	8192	2048	8192
KHF97-599	512	128	512	128
KHF97-1532	128	-	-	32
KHF97-1562	128	-	128	32
KHF97-1587	32	128	32	32
KHF97-1589	512	128	32	32
KHF97-1612	512	-	-	128
KHF97-1664	512	32	128	128
KHF97-1686	128	-	32	32
KHF97-1820	512	128	-	128
KHF97-1861	128	32	-	32

Majority	E	L	G	A	F	F	S	I	L	Q	D	M	R	N	T	I	M	A	S	K	T	V	G	T	A	E	E	K	L	K	K	K
										10											20											30
HTN/76-118	S	R	.
PH/PH-1	A
PUU/Sotkamo
PUU/TOB
SEO/80-39	D	.	.	R	.	.
SEO/SR11	D	.	.	R	.	.
SN/NM-H10	A	S	.	.	.	S	
TUL/Lodz-1
TUL/Lodz-2
TUL/T23
TUL/M5286
TUL/M5293
TUL/T53
TUL/C3454

Majority	S	S	F	Y	Q	S	Y	L	R	R	T	Q	S	M	G	I	Q	L	D	Q	R	I	I	L	L	F	M	M	E	W	G	S	D	I	V	N	H		
HTN/76-118	G	V	.	.	.	V	A	.	.	K	E	A	.	D	N	.		
PH/PH-1	A	M	Y	.	I	.	.	.	N	E	V		
PUU/Sotkamo	L	.	.	K	E	M	.	D	.	.	.		
PUU/TOB	Y	.	L	.	.	E	E	M	.	D	.	.	.		
SEO/80-39	V	M	.	V	A	.	.	K	E	A	.	D	N	.		
SEO/SR11	V	M	.	V	A	.	.	K	E	A	.	D	N	.		
SN/NM-H10	A	K	.	I	.	Y	.	S	H	.	R	E	A	.	.	.		
TUL/Lodz-1	
TUL/Lodz-2	
TUL/T23	
TUL/M5286	T	
TUL/M5293	T	
TUL/T53	
TUL/C3454	T	

Decoration 'Decoration #1': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.

Figure 1. Alignment and comparison of deduced amino acid sequence of the 69 amino acids region of the nucleocapsid-encoding S genomic segment of hantaviruses. Comparison is made between Tula (TUL) virus Lodz-1 and Lodz-2 strains isolated from *Microtus arvalis* captured in Lodz, Poland in 1995 and other TUL strains from Russia (T23 and T53), Serbia-Yugoslavia (C3454), and the Czech (M5286 and M5293) Republics, as well as other hantaviruses, including Hantaan (HTN/76-118), Seoul (SEO/80-39 and SR11), Puumala (PUU/Sotkamo and Tobetsu) and Prospect Hill (PH/PH-1), Sin Nombre (SN/NM-H10) viruses.

아에 분포하고 있는 Tula 바이러스주들은 각기 독자적으로 진화한 양상으로 명확하게 구분되었다. 폴란드 Tula 바이러스주들은 100%의 확률로 한 그룹을 형성하였으며 러시아의 Tula 바이러

스들 보다는 유고슬라비아 및 체코의 Tula 바이러스들과 유전학적으로 가까웠으며 모든 Tula 바이러스들은 동일한 조상으로부터 유래된 것을 알 수 있다.

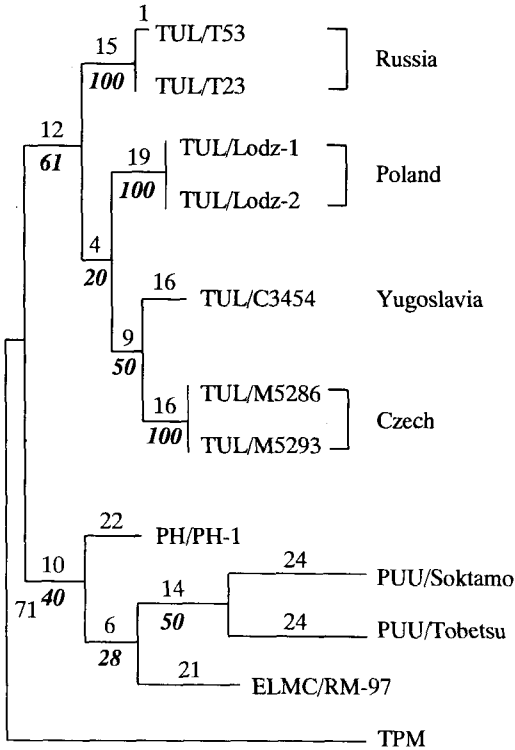


Figure 2. A majority-rule consensus phylogenetic tree, rooted at the midpoint, generated by the maximum parsimony method using PAUP, based on the 208-bps region of the S segment of Tula (TUL) virus Lodz-1 and Lodz-2 strains harbored by *Microtus arvalis* from Lodz, Poland, and TUL virus Cacak strain by *Pitymys subterraneus* from Cacak, Serbia-Yugoslavia (C3454), and by *M. arvalis* and *M. rossiaemerdionalis* in Russia (T23 and T53) and Czech Republic (M5286 and M5293), showing phylogenetic clustering according to their geographic origin. The phylogenetic positions of Puumala (PUU/Soktamo and Tobetsu strains) virus, Prospect Hill (PH) virus, El Moro Canyon (ELMC) virus, Thotapalayam (TPM) virus are also shown. Branch lengths are proportional to the number of nucleotide substitutions, while vertical distances are for clarity. The numbers in italics at each node are bootstrap probabilities (expressed as percentages), as determined for 1,000 iterations by PAUP version 3.1.1.

4. 국내 갈밭쥐 (*M. fortis*)의 한타바이러스 감염

1998년 4월과 5월에 채집된 갈밭쥐는 모두 35수였으며 간접면역형광항체법으로 1:32 희석배수에서 Tula, 한탄, 서울 및 푸말라 바이러스 등 4종의 한타바이러스에 대한 항체검사 결과 한수에서는 Tula 바이러스에 +/- 였고 나머지 모두 음성이었다. 역전사-중합효소연쇄반응법으로

Tula 바이러스에 항체가 1:32희석배수에서 +/- 였던 갈밭쥐의 폐조직으로부터 Tula 바이러스 RNA 유전자를 조사한 결과 Tula 한타바이러스는 증폭되지 않았다.

5. 신증후출혈열 항체양성자 중 Tula 한타바이러스 감염자 조사

간접면역형광항체법으로 한탄 바이러스에 대한 항체양성으로 판명된 143명의 혈청을 대상으로 Tula, 푸말라, 서울 및 한탄 바이러스에 대하여 항체를 측정된 결과 6명에서는 Tula 바이러스에 대한 항체가 가장 높았으며 12명에서는 Tula 바이러스에 대한 항체와 한탄, 서울 또는 푸말라 바이러스에 대한 항체가 같거나 항체간의 차이가 4배 이내 였다 (Table 2). 위의 18명의 혈청을 대상으로 역전사-중합효소연쇄반응법으로 Tula 바이러스 RNA 유전자를 조사한 결과 Tula 한타바이러스는 18명 중 한명도 증폭되지 않았다.

고찰

최근 수년간 고려대학교 의과대학 미생물학교실, 바이러스병연구소에 검사가 의뢰된 급성 출혈성 질환 환자 5330명 중 12% (649명)가 간접면역형광항체법에 의해 한탄 바이러스에 항체양성으로 밝혀졌다 [7]. 한탄 및 서울 바이러스 외에 현재까지 국내에 그 존재가 보고되지 않은 푸말라 바이러스에 ELISA법으로 4배이상 높은 IgM 항체를 보이는 환자가 항체양성자의 약 4%나 되어 국내에서 발생하고있는 신증후출혈환자 중 일부는 기존에 국내에서 알려진 한탄 바이러스와 서울 바이러스 외에 다른 종류의 한타바이러스에 의해 발생하고 있을 가능성이 매우 높다. 또한 1994년에 러시아의 Tula지역의 유라시아밭쥐 (*M. arvalis*, *M. rossiaemerdionalis*)로부터 Tula 바이러스가 [1], 일본의 북해도의 대륙밭쥐 (*Clethrionomys rufocanus*)로부터 푸말라 바이러스의 일종인 Tobetsu 주가 역전사-중합효소연쇄반응으로 확인되었고 [8], 최근에는 한반도와 매우 인접한 러시아의 극동지역에서 채집된 갈밭쥐 (*M. fortis*)로부터 Khabarovsk (KBR) 바이러스가 분리되었다 [6]. 갈밭쥐는 몸통길이가 118~162 mm, 꼬리길이 40~69 mm로 몸 윗면은 갈색, 아랫면은 흐린 백색이다. 풀밭, 밭주변, 강기슭, 산림기

습의 습지대에 주로 서식하며 주로 낮에 활동하고 시베리아, 만주, 우리나라 중북부 지방에 분포한다 [9].

인수공통 전염병의 재유행 또는 집단발생은 병원체의 돌연변이에 의한 것보다 환경적 요인과 생태계의 변화가 주된 원인이다. 즉 사람들이 기존에 존재하고 있었던 병원체에 노출됨으로써 발생하는데 이는 사람들이 전에는 살지 않았던 새로운 지역으로 이주하거나 생태계의 변화로 자연계 숙주의 증가 등을 통해 새로운 병원체에 노출될 기회가 증가되면서 발생한다. 임상증상과 Sin Nombre 바이러스에 대한 IgG 항체가 증가 등의 증거로 미루어보아 1959년 유타 주에서 발생했던 38세된 남자가 가장 오래된 환자임이 밝혀졌는데 이처럼 한타바이러스에 의한 질환이 오래 전부터 북미 대륙에 존재하고 있었음에도 최근에서야 폭발한 이유는 El Nino 현상으로 6년간의 가뭄 뒤에 1993년 겨울과 봄에 매우 많은 양의 비가 미국 남서부에 내려 한타바이러스의 숙주인 사슴쥐 집단이 10배 가량 증가되었고 설치류들 간에 바이러스가 전파될 확률과 음식을 구하기 위해 쥐들이 주택 내로 침입하여 사람들과 접촉할 기회가 많아져 쥐들의 배설물에 포함된 바이러스가 호홉기를 통하여 사람에게 전파되어 나타난 것으로 추정되고 있다 [10, 11].

한타바이러스는 Bunyaviridae과의 다른 숙인 Bunyavirus, Nairovirus, Phlebovirus, Uukuvirus와 마찬가지로 envelope로 싸여 있고 표면돌기 (surface projection)를 가진 약 100 nm크기의 구형입자로서 [12, 13] 각각 2.7×10^3 , 1.2×10^3 및 0.6×10^3 KD 크기의 Large (L), Medium (M), Small (S)의 3개의 분절로된 RNA genome을 갖고 있으며 이들 각 분절로부터 유래된 transcriptase와 G1, G2 glycoprotein 및 nucleoprotein으로 바이러스가 구성되는 공통점을 갖고 있다 [14, 15, 16]. 그러나 한타바이러스는 항원성과 polypeptide의 전기영동양상 및 3'말단의 염기서열 (3'AUCAUCAUCU-GAGG) 등이 다른 속과는 전혀 다른 양상을 보이고 있다 [13]. 한탄 바이러스는 등줄쥐 (*A. agrarius*)와 흰넓적다리붉은쥐 (*A. peninsulae*)가 자연계 숙주로 주로 한국, 중국 등 극동지역에서 중증의 신증후출혈열을 일으키며, 서울 바이러스는 집쥐 (*Rattus norvegicus*)와 실험실용 흰쥐 (laboratory rat)를 숙주로 하며 전세계적으로 분포하며 경증의 신증후출혈열을 일으키는 것으로 알려져 있다

[17, 18]. 푸말라 바이러스는 스칸디나비아와 동유럽지역에서 발생하는 유행성 신장질환 (Nephropathia epidemica)의 원인균으로 대륙밭쥐 (bank vole, *Clethrionomys glareolus*)가 주된 숙주로 알려져 있으며 [19], Prospect Hill (PH) 바이러스는 갈밭쥐 (meadow vole, *M. pennsylvanicus*)를 숙주로 하며 [20] 벨그레이드/도브라바 바이러스는 노란턱쥐 (Yellow neck mice, *Apodemus flavicollis*)를 숙주로 한다 [21]. Thailand (THAI) 바이러스는 주머니쥐 (*Bandicota indica*)를 숙주로 하고 [22], Thottapalayam (TPM) 바이러스는 뽕쪽뒤쥐 (musk shrew, *Suncus murinus*)를 숙주로 하는데, TPM 바이러스 역시 현재까지 사람에게 대한 병원성 유무가 확실히 규명되지 않고 있다 [23].

1993년 미국의 Four corners 지역에서 집단 발생한 한타바이러스 폐증후군은 [24] 발열 ($>39^\circ\text{C}$), 근육통, 오한 등의 증상을 보이는 발열기 (febrile phase, 평균 4~5일)를 시작으로 하는데 두통, 오심, 복통 등을 자주 동반한다. 이어 호홉곤란, 과호홉 및 저산소혈증 등의 증상을 나타내는 폐부종기 (pulmonary edema)를 거쳐 심근억제 (myocardial depression) 및 속이 나타나며 생존자의 경우에는 빠르고 후유증 없이 완전하게 회복된다. 1993년 집단발생 이래 1998년 3월까지 미국내 29개 주에서 178명의 한타바이러스 폐증후군 환자가 발생하여 이중 44%가 사망하였는데 병원체는 Four corners (FC), Muerto Canyon (MC), Convict creek (CC) 바이러스 및 Sin Nombre (SN) 바이러스 등 다양한 이름으로 알려진 한타바이러스가 사슴쥐로부터 분리되었고 [25], 1994년 New York 주의 Shelter Island의 흰발생쥐 (whited-footed mice, *Peromyscus leucopus*)로부터 New York (NY) 바이러스가 분리되었다 [26]. 그리고 Florida 주의 목화쥐 (cotton rat, *Sigmodon hispidus*)로부터 Black creek canal (BCC) 바이러스가 분리되었고 [27] 쌀쥐 (rice rat, *Oryzomys palustris*)로부터 Bayou (BAY) 바이러스 [28]가 분리되었다. 그외에 바이러스가 분리되지는 않았지만 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)으로 염기서열이 밝혀진 한타바이러스들로는 미국추수쥐 (western harvest mouse, *Reithrodontomys megalotis*)를 숙주로 하는 El Moro Canyon (ELMC) 바이러스 [29], 멕시코추수쥐 (*Rithrodontomys mexicanus*)를 숙주로 하는 Rio Segundo (RIOS) 바이러스 [30], West virginia의 사슴쥐 (Cloudland deer mouse, *Peromy-*

scus maniculatus nubiterrae)를 숙주로 하는 Monongahela (MON) 바이러스 [31] 등이 북미대륙에서 발견되고 있다. 남미에서는 브라질, 아르헨티나, 파라과이, 칠레 및 우루과이 등에서 한타바이러스 폐증후군 환자가 확인되었는데 아르헨티나의 El Bolson에서 1995년에 한타바이러스에 감염되어 사망한 환자의 폐와 간 조직으로부터 역전사-중합효소연쇄반응법으로 북미대륙에서 한타바이러스 폐증후군을 일으키는 한타바이러스들과 유사한 바이러스가 증폭되어 Andes (AND) 바이러스로 명명되었고 [32] *Oligoryzomys longicaudatus* (long-tailed pigmy rice rat)가 숙주로 밝혀졌고, 파라과이와이의 *Calomys Laucha* (Vesper mouse)를 숙주로 하는 Laguna Negra (LN) 바이러스, 아르헨티나의 *Oligoryzomys flavescens* (Pigmy rice rat)를 숙주로 하는 Lechiguanas (LCH) 바이러스, 아르헨티나의 *Akodon azarae* (grass field mouse)를 숙주로 하는 Pergamino (PGM) 바이러스, 아르헨티나의 *Bolomys obscurus* (dark field mouse)를 숙주로 하는 Maciel (MCL) 바이러스 등이 남미대륙에서 발견되고 있다 [33]. 즉 최근 5~6년간 최소한 10개 이상의 새로운 혈청형의 한타바이러스들이 발견되고 있는 실정이다.

최근 한타바이러스에 대한 연구는 새로운 혈청형의 바이러스 규명과 진단법의 개발, 병인성에 대한 연구 및 치료약의 개발과 예방백신의 개선 등 다양하게 진행되고 있으며 분자유전학적인 접근방법이 이들 연구의 근간을 구성하고 있다. 1986년 Schmaljohn 등 [14]에 의해 한탄 바이러스의 S분절에 대한 염기서열이 최초로 보고된 이래 한타바이러스 속의 여러 혈청형에 대한 염기서열이 지속적으로 규명되었으며 염기서열에 따른 각 바이러스의 계통수 분석은 기존의 혈청학적인 분류와 일치하였다. 이러한 염기서열 분석 결과를 보면 여러 한타바이러스들은 각기 독자적으로 진화하여 각 지역적인 특성을 나타내고 있으며 그 숙주동물과 밀접하게 연관되어 있는 것을 알 수 있다. 한타바이러스의 숙주동물들은 Thottapalayam 바이러스의 숙주인 식충목에 속하는 집뿔쥐를 제외하고는 전부 쥐과 (*Muridae*)에 포함된다. 쥐과에는 15개의 아과가 분류되고 있으며 현재까지 한타바이러스는 쥐아과 (*Murinae*), 발쥐아과 (*Arvicolinae*), 아메리카쥐아과 (*Sigmodontinae*)의 3개 아과에서 확인되었다. 한타바이러스 염기서열에 따라 작성된 계통수 상에서 구

대륙에 분포하는 쥐아과를 숙주동물로 하는 한타바이러스들과 신대륙에 분포하는 아메리카쥐아과를 숙주동물로 하는 한타바이러스들, 그리고 구대륙 및 신대륙에 모두 분포하는 발쥐아과를 숙주동물로 하는 한타바이러스들은 각기 다른 계통그룹으로 명확하게 구분된다. 즉 구대륙 유래의 쥐아과를 숙주로 하는 한탄, 서울, Belgrade 바이러스 및 Thailand 바이러스들이 독자적인 계통그룹을 형성하고 있으며, 신대륙의 한타바이러스를 대표하는 Sin Nombre 바이러스를 포함하는 아메리카쥐아과에서 분리된 새로운 한타바이러스들이 또다른 독자적인 계통그룹을 형성하고, 구대륙 및 신대륙에 모두 분포하는 발쥐아과에서 유래한 푸말라 바이러스, 프로스펙트힐 바이러스 등은 구대륙 및 신대륙의 지역적 특성에 관계없이 같은 발쥐아과 유래 바이러스들이 또다른 독자적인 계통그룹을 형성한다. 이러한 양상은 한타바이러스의 조상형 바이러스가 쥐과의 조상형 쥐의 종분화에 병행하여 분화하였고 따라서 현재와 같은 분포 및 여러종으로 발견되는 것으로 추정된다. 이러한 한타바이러스의 독자적인 진화과정은 국내에서 유행하고 있는 한탄 바이러스 및 서울 바이러스의 염기서열에 따른 계통분석 결과에서도 잘 나타난다. 먼저 구대륙의 쥐아과의 대표적인 종의 하나인 등줄쥐를 숙주로 하는 한탄 바이러스의 염기서열 분석에 따른 계통수상에서 우리나라 중부지역에 분포하고 있는 한탄 바이러스들은 중국에서 분리된 한탄 바이러스들과 명확하게 구분되어 같은 한탄 바이러스 내에서도 지역적 분포에 따른 독자적인 진화양상을 보여주고 있으며, 한타바이러스 중에서 유일하게 전세계적으로 분포하고 있는 서울 바이러스의 계통분석에서는 한탄 바이러스의 계통분석 결과와는 달리 지역적 장애 보다는 원래 구대륙 유래인 집쥐가 인류의 이동에 따라 구대륙에서 신대륙으로 이주하였고 현재에도 각종 운송수단에 편승하여 전세계적으로 이동하고 있는 집쥐의 분포, 전파경로, 생활상 등과 보다 밀접한 연관성을 나타내고 있다 [11, 33, 34].

쥐아과의 설치류를 숙주로 하는 한타바이러스에서는 밝혀지지 않았지만 프로스펙트힐, 푸말라, Sin Nombre 및 Tula 한타바이러스 폐증후군과 연관된 한타바이러스 등 아메리카쥐아과와 발쥐아과 설치류를 숙주로 하는 한타바이러스 등에서 이론적으로 존재하는 이차 ORF (open read-

ing frame)에 의한 NSx (nonstructural protein)의 실제 존재 여부와 그 기능 및 바이러스의 진화과정을 밝혀내기 위해서 자연계에서 한타바이러스의 quasispecies에 대한 연구도 진행 중이다. 그리고 최근 자연계 및 실험실에서 서로 다른 SN 바이러스 주들 (CC107주와 NMR11주) 사이에 유전자 재편성 (genetic reassortment)이 일어남이 보고된 바 있는데 [35] 국내에 존재하는 한탄, 서울 바이러스 및 서로 다른 혈청형의 한타바이러스들 간에도 이와 같은 현상이 일어나는지 여부와 한타바이러스의 세포내 침입과정과 receptor의 존재 역시 연구되어야 한다. 그리고 본 연구에서는 한국에서 갈밭쥐가 매개하는 새로운 한타바이러스나 Tula 바이러스 감염 환자를 찾아내지 못했지만 자연계 숙주와 혈청학적 증거 등을 볼 때 그 존재가 확실하므로 이에 대한 보다 광범위하고 장기간의 연구가 시급한 실정이다.

결 론

본 연구진이 폴란드에서 채집된 유라시아밭쥐 (*Microtus arvalis*)로부터 분리한 Tula 바이러스 Lodz 주의 S 분절 염기서열을 역전사-중합효소연쇄반응으로 증폭하여 계통수 분석을 통해 Tula 한타바이러스의 유전자 다양성 및 진화에 대해 연구하였고 국내 신증후출혈열 환자 중 Tula 한타바이러스 감염자 존재 및 국내 갈밭쥐 (*M. fortis*)의 Tula 혹은 Khabarovsk 한타바이러스에 대한 감염 여부를 조사하였다.

1. 폴란드 Tula 한타바이러스 Lodz-1과 Lodz-2주의 S분절의 유형은 한 종류로 Lodz-1과 Lodz-2주의 염기서열은 동일하였으며 Lodz-1주와 러시아, 체코 및 유고슬라비아의 Tula 바이러스들과 80.8~83.2%의 동질성을 보였다.

2. 폴란드 Tula 바이러스에만 존재하는 18개의 변이가 관찰되었는데 모두 세 번째 염기 (3rd position)의 변이로 silent mutation이었고, 56% (10/18)는 transition, 44% (8/18)는 transversion이었다.

3. 폴란드 Tula 바이러스주들은 러시아에 분포하고 있는 Tula 바이러스주들은 각기 독자적으로 진화한 양상으로 명확하게 구분되었으며 러시아의 Tula 바이러스들 보다는 유고슬라비아 및 체코의 Tula 바이러스들과 계통학적으로 더 가까웠으며 모든 Tula 바이러스들은 동일한 조상으로부터 유래된 것을 알 수 있다.

4. 1998년 국내 채집된 갈밭쥐 35수를 간접면역형광항체법으로 한타바이러스에 대한 항체를 조사한 결과 모두 음성이었다.

5. 간접면역형광항체법으로 Tula 바이러스에 대한 항체가 가장 높거나 Tula 바이러스외에 한탄, 서울 또는 푸말라 바이러스에 대한 가장 높은 항체가와 Tula 바이러스에 대한 항체가 간의 차이가 4배 이내였던 18명의 혈청을 대상으로 역전사-중합효소연쇄반응법으로 Tula 바이러스 RNA 유전자를 조사한 결과 Tula 한타바이러스는 18명 중 한명도 증폭되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Plyusnin A, Vapalahti O, Lankinen H, Levaslaiho H, Apekina N, Myasnikov Y, Kallio-Kokko H, Henttonen H, Lundkvist A, Brummer-Korvenkontio M: Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *J Virol* **68**: 7833-9, 1994.
2. Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A: Hantavirus: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* **77**: 2677-2687, 1996.
3. Song J-W, Gligic A, Yanagihara R: Genetic analysis of hantaviral sequences amplified from tissues of *Pitymys subterraneus* captured in the Cacak region of Serbia-Yugoslavia. 45th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, Maryland, December 1-5, 1996.
4. Vapalahti O, Lundkvist A, Kukkonen SKJ, Cheng Y, Gilljam M, Kanerva M, Manni T, Pejcoch M, Niemimaa J, Kaikusalo A, Henttonen H, Vaheri A, Plyusnin A: Isolation and characterization of Tula virus, a distinct serotype in the genus Hantavirus, family Bunyviridae. *J Gen Virol* **77**: 3063-3067, 1996.
5. Song J-W, Lee, YJ, Baek LJ, Song KJ, Skrok A, Markowski J, Bratosiewicz J, Kordek R, Liberski PP, Yanagihara R: Characterization of Tula hantavirus isolated from *Microtus arvalis* captured in Poland. The 4th International Conference on HFRS and Hantaviruses, Atlanta, Georgia, USA, abstract 78 pp, March 5-7, 1998.
6. Horling J, Chizhikov V, Lundkvist A, Jons-

- son M, Ivanov L, Dekonenko A, Niklasson B, Dzagurova T, Peters CJ, Tkachenko E, Nichol ST: Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *J Gen Virol* 77: 687-94, 1996.
7. Song J-W, Baek LJ, Kim SH, Kim SY, Lee YJ, Song KJ: Seroepidemiologic Analysis of Acute Febrile Illness During 1994-1995 in Korea. *Kor J of Infect Dis* 30: 385-391, 1998.
 8. Kariwa H, Yoshizumi S, Arikawa J, Yoshimatsu K, Takahashi K, Takashima I, Hashimoto N: Evidence for the existence of Puumala-related virus among *Clethrionomys rufocanus* in Hokkaido, Japan. *Am J Trop Med Hyg* 53: 222-227, 1995.
 9. Yoon MH: Wild animals. p. 77-78. Daewon press, Inc., Seoul, 1994.
 10. Song J-W: New world hantaviruses: Molecular evolution and phylogenetic relationships of the causative agents of hantavirus pulmonary syndrome. *Kor J of Infect Dis* 29: 81-91, 1997.
 11. Stone R: The mouse-pinson nut connection. *Science* 262: 833, 1993.
 12. Elliott LH, Kiley MP, McCormick JB: Hantaan virus: Identification of virion proteins. *J Gen Virol* 65: 1285-1293, 1984.
 13. Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, LeDuc JW, Lee HW, von Bonsdorff CH, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Tsai TF, Regnery HL, Goldgaber D, Lee PW: Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science* 227: 1041-1044, 1985.
 14. Schmaljohn CS, Jennings G, Hay J, Dalrymple JM: Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology* 155: 633-643, 1986.
 15. Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymple JM: Hantaanvirus M RNA: coding strategy nucleotide sequence and gene order. *Virology* 157: 31-39, 1987.
 16. Schmaljohn CS: Nucleotide sequence of the L genome segment of Hantaan virus. *Nucleic Acids Res* 18: 6728, 1990.
 17. Lee HW, Lee PW, Johnson KM: Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137: 298-308, 1978.
 18. Lee HW, Baek LJ, Johnson KM: Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever from wild urban rats, *J Infect Dis* 146: 638-644, 1982.
 19. Burmmer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, Von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Blom N, Laehdevirta J: Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* 141: 131-134, 1980.
 20. Lee PW, Amyx HL, Gajdusek DC, Yanagihara R, Goldgaber D, Gibbs CJ Jr: New hemorrhagic fever with renal syndrome-related virus in indigenous wild rodents in United States. *Lancet* ii: 1405, 1982.
 21. Glic A, Dimkovic N, Xiao SY, Buckle GJ, Jovanovic D, Velimirovic D, Stojanovic R, Obradovic M, Diglisic G, Micic J, Asher DM, LeDuc JW, Yanagihara R, Gajdusek DC: Belgrade virus: a new Hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J Infect Dis* 166: 113-120, 1992.
 22. Elwell MR, Ward GS, Tingpalapong M, LeDuc JW: Serologic evidence of Hantaan-like virus in rodents and man in Thailand. *Southeast Asian J of Trop Med and Public Heal* 16: 349-354, 1985.
 23. Carey DE, Reuben R, Panicker KN, Shope RE, Myers RM: Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from shrew in India. *Indian J of Med Res* 59: 1758-1760, 1971.
 24. Centers for Disease Control and Prevention: Outbreak of acute illness-southwestern United States, 1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 42: 421-424, 1993.
 25. Elliott LH, Ksiazek TG, Rollin PE: Isolation of the causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 51: 102-8, 1994.
 26. Song J-W, Baek LJ, Gajdusek DC, Yanagihara R, Gavrilovskaya I, Luft BJ, Mackow ER, Hjelle B: Isolation of pathogenic hantavirus from white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Lancet* 344: 1637, 1994.

27. **Ravkov EV, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST:** Genetic and serologic analysis of Black Creek Canal virus and its association with human disease and *Sigmodon hispidus* infection. *Virology* **210**: 482-9, 1995.
28. **Morzunov SP, Feldmann H, Spiropoulou CF:** A newly recognized virus associated with a fatal case of hantavirus pulmonary syndrome in Louisiana. *J Virol* **69**: 1980-3, 1995.
29. **Hjelle B, Chavez-Giles F, Torrez-Martinez N:** Genetic identification of a novel hantavirus of the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis*. *J Virol* **68**: 6751-4, 1994.
30. **Hjelle B, Anderson B, Torrez-Martinez N, Song W, Gannon WL, Yates TL:** Prevalence and geographic genetic variation of hantaviruses of New World harvest mice (*Reithrodontomys*): identification of a divergent genotype from a Costa Rican *Reithrodontomys mexicanus*. *Virology* **207**: 452-9, 1995.
31. **Song J-W, Baek LJ, Nagle JW, Schlitter D, Yanagihara R:** Genetic and phylogenetic analyses of hantaviral sequences amplified from archival tissues of deer mice (*Peromyscus maniculatus nubiterrae*) captured in the eastern United States. *Arch Virology* **141**: 959-67, 1996.
32. **Lopez N, Padula P, Rossi C, Lazaro ME, Franze-Fernandez MT:** Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology* **220**: 223-6, 1996.
33. **Song J-W:** Hantavirus pulmonary syndrome: An emerging zoonosis in the New World. *J of the Kor Soc for Chemotherapy* **16**: 75-83, 1998.
34. **Morzunov SP, Rowe JE, Ksiazek TG, Peters CJ, St. Jeor SC, Nichol S:** Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. *J Virol* **72**: 57-64, 1998.
35. **Rodriguez LL, Owens JH, Peters CJ, Nichol ST:** genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* **242**: 99-106, 1998.