

## 한탄바이러스와 서울바이러스의 혈구응집반응

고려대학교 의과대학 미생물학교실

성인화 · 송기준 · 이호왕

—Abstract—

### Hemagglutination of Hantaan and Seoul Viruses

In-Wha Seong, Ki-Joon Song and Ho-Wang Lee

Department of Microbiology, Medical College, Korea University, Seoul, Korea

The hemagglutination activities of Hantaan virus and Seoul virus were demonstrated. The hemagglutinins were prepared by sucrose-acetone extraction method from suckling mouse brains infected with Hantaan and Seoul viruses. Hemagglutination of goose erythrocytes by these viral hemagglutinins was pH dependent in phosphate buffer system. Hantaan and Seoul viruses were distinguished by pH range of hemagglutination. 76/118 and 79/90 strains of Hantaan virus showed hemagglutination at the range of pH 5.75–6.4 and the optimal pH was 5.75 with the titer of 1 : 512 in 76/118 and 1 : 256 in 79/90. In contrast, KSNUSD 84/34 strain of Seoul virus revealed hemagglutination at the range of pH 6.2–6.4 and the optimal pH was 6.4 with the titer of 1 : 64.

**Key Words:** Hemagglutination, Hantaan Virus, Seoul Virus.

### 서 론

1976년 이와 이가 한국형 출혈열의 병원체인 한탄바이러스를 등 줄쥐에서 처음 발견한 이래<sup>1)</sup> 세계 여러 곳에서 신증후 출혈열을 일으키는 한탄바이러스 또는 이와 유사한 항원구조를 가진 많은 바이러스들이 분리되었다.<sup>2, 6, 9, 11, 14, 16, 17, 20, 21)</sup> 한탄바이러스는 전자현미경 하에서 직경이 약 95 nm이고 envelope를 가진 원형 또는 타원형의 형태를 나타내며<sup>16, 21)</sup> 분자 생물학적, 유전학적 연구에 의하면 분자량이  $4.5 \times 10^6$  이고 single-stranded, three-segmented, negativesense인 RNA genome을 갖고 있어<sup>22)</sup>, 한탄바이러스와 이와 유사한 항원구조를 가진 바이러스들이 Bunyaviridae에 속한다는 사실이 규명되었다.

이 Family Bunyaviridae에서 4종류의 Genus가 알려져 있었으나 한탄바이러스와 이와 유사한 항원구조는 가진 바이러스들은 생화학적 성상이나 항원구조가 특이하며 독특한 terminal sequence를 가진 RNA 구조등의 차이점에 의하여 Family Bunyaviridae의 새로운 Genus로 Hantavirus란 이름이 제시되고 있으며<sup>23)</sup> Hantavirus에는 한탄바이러스, 서

울바이러스, Puumala 바이러스 및 Proser Hill 바이러스등 4종의 혈청학적 특이성을 지닌 바이러스들이 포함되어 있다<sup>16)</sup>.

한국에서는 한국 동란시인 1951년 유엔군 병사에서 최초로 신증후 출혈열환자가 발견되었고<sup>24)</sup> 그후 비무장지대 인접지역이 다발성 지역으로 되어 있었으나 현재는 한반도 전역에서 매년 수백명의 환자가 발생하고 있으며 조기진단과 적절한 치료에 의하여 사망율은 약 4–7%로 감소되었다<sup>10)</sup>. 등줄쥐 이외에 집쥐와 실험용 흰쥐에서도 분리되는<sup>2, 6, 9, 11, 14, 16, 17, 20, 21)</sup>, Hantavirus 중에서 한국에서는 한탄바이러스와 서울바이러스 2종이 신증후 출혈열의 병원체로 밝혀져 있다. 그러나 현재 신증후 출혈열의 기본 진단방법으로 사용되고 있는 간접 형광항체 법으로는 이 2종류의 바이러스들에 의한 감염을 구분할 수 없다. 최근 Tsai 등은 한탄바이러스의 거위 적혈구에 대한 응집반응과 혈구응집 저지반응을 통한 신증후 출혈열의 혈청학적 진단법을 보고한 바 있다<sup>25)</sup>. 그러나 서울바이러스의 혈구응집반응과 혈구응집 저지반응으로 이 2종류의 바이러스에 대한 항체를 비교 분석한 보고는 없다.

본 연구는 Hantavirus의 혈구응집 저지항체반응을 개발하기에 앞서 한탄바이러스 및 서울바이러스

의 혈구응집능력을 연구한 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스

한탄바이러스에 속하는 76/118 strain 과 ROK 79/90 strain 을 사용하였다. 76/118 strain 은 동출취의 (*Apodemus agrarius coreae*) 폐 조직에서 분리되었으며 ROK 79/80 strain 은 한국군인 신증후 출혈열환자의 혈액에서 분리되었다<sup>15)</sup>. KSNUSD 84/34 strain 은 실험실용 흰쥐의 (*Splague dowley*) 폐 조직에서 분리되었다<sup>12)</sup>.

### 2. 혈구응집소의 제조

생후 1-2일 된 albino mice 의 뇌에 한탄바이러스 및 서울바이러스를 뇌내에 0.02 ml 씩 접종한 후 매일 mice 의 상태를 관찰하였다. 접종 14일 후 일부 mice 의 뇌를 무균적으로 채취하여 Tsai 등이 보고한 대로<sup>16)</sup> 간접 형광항체법에 의하여 바이러스의 증식을 확인한 후 mice 의 뇌를 동일한 방법으로 채취하여 Clarke 과 Casals 의 방법에 따라<sup>17)</sup> sucrose-acetone 처리를 하였다. 처리된 바이러스 항원을 생리적 식염수로 부유액을 만든 후 Ardoin 과 Clarke 의 방법으로<sup>18)</sup>, 15분간 sonication 한 후 (Fisher model-300) 10,000 rpm 에서 30분간 원심침전하여 얻은 상층액을 -60°C 에 보관하여 응집소로 사용하였다. 이상의 모든 처리과정은 4°C 나 ice bath 에서 시행하였다.

### 3. 적혈구

거위 적혈구를 Alsever 용액에 채취하여 4°C 에 보관하면서 사용하였으며 2주일을 초과하지 않았다. 적혈구는 10배 이상의 0.85% 생리적 식염수로 3회 세척후 1,500 rpm 에 15분간 원심침전후 0.5% 부유액으로 만들어 사용하였다.

### 4. 원층 용액

Clarke 과 Casals 의 방법에 따라<sup>17)</sup> 최종 pH 가 5.75 부터 7.4 의 범위가 되도록 0.15 M NaCl-0.2 M phosphate 로 조성된 adjusting diluent 와 pH 9.0 인 borate saline 을 사용하였다.

### 5. 혈구응집반응

Standard microtiter 법을 사용하여 응집소와 혈구를 혼합한 후 실온에 30분간 방치후 혈구응집 결과를 판독하였다.

## 성 적

### 1. 한탄바이러스의 혈구응집 최적 pH

76/118 strain 과 ROK 79/90 strain 의 혈구응집 반응을 일으키는 pH 범위와 최적 혈구응집 pH 는 동일하였으며 76/118 strain 의 혈구응집소의 역가는 ROK 79/90 strain 의 역가보다 2배가 높았다. (Table I, II).

한탄바이러스의 혈구응집반응이 일어나는 pH 범위는 pH 5.75 에서 6.4 사이이며 최적 혈구응집 pH 는 5.75 로써 이 pH 에서 혈구응집소의 최고역가는 76/118 strain 이 1 : 512 ROK 79/70 strain 이 1 : 256 이었다. pH 가 6.0, 6.2, 6.4 로 상승함에 따라 혈구응집소의 역가는 감소하였으며 pH 6.6 이상에서는 혈구응집반응이 일어나지 않았다.

### 2. 서울바이러스의 혈구응집 최적 pH

KSNUSD 84/34 strain 은 한탄바이러스와는 달리 pH 6.2 에서 6.6 의 범위에서 혈구응집반응을 일으켰으며 최적 혈구응집 pH 는 pH 6.4 로써 이 pH 에서 혈구응집소의 최고역가는 1 : 64 이었으며 pH 6.0 이하와 pH 6.8 이상에서는 혈구응집반응이 일어나지 않았다 (Table III).

Table 1. Hemagglutination activity of the strain 76/118 of Hantaan virus to goose erythrocytes in phosphate buffer

Final pH	Dilution of hemagglutinin										
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	Control
5.75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6.0	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6.4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Table 2.** Hemagglutination activity of the strain ROK 79/90 of Hantaan virus to goose erythrocytes in phosphate buffer

Final pH	Dilution of hemagglutinin										
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Control
5.75	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6.0	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6.2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6.4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Table 3.** Hemagglutination activity of the KSNUSD 84/34 strain of Seoul virus to goose erythrocytes in phosphate buffer

Final pH	Dilution of hemagglutinin										
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Control
5.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6.4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6.6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

이상의 결과로 혈구응집반응이 일어나는 pH의 범위와 최적 혈구응집 pH의 차이에 의해 한탄바이러스와 서울바이러스를 구분할 수 있었다.

### 고 찰

신증후 출혈열은 한국<sup>10)</sup>, 일본<sup>20)</sup>, 중국<sup>7)</sup>, 스칸디나비아<sup>20)</sup>, 소련<sup>20)</sup> 및 동구라파 여러 나라에서<sup>2, 10, 20)</sup> 발생됨이 보고되었으며 Genus Hantavirus에 속하는 여러 바이러스들이 신증후 출혈열 환자나 설치류에서 최근 분리되었다.<sup>3, 5, 9, 11, 14, 16, 17, 20, 21)</sup> 이러한 여러 바이러스들을 Monoclonal 항체를 이용한 형광항체법<sup>8)</sup>, Immune Adherence Hemagglutination Test (IHAT)<sup>22, 23)</sup>, Double Sandwich ELISA<sup>9)</sup> 및 간접형광항체법과 plaque reduction neutralization test<sup>13)</sup> 등의 방법을 사용하여 혈청학적인 분류를 하고 있으나 이런 방법들을 간단한 간별진단방법으로 사용하기에는 여러가지 문제점이 있다.

최근 Tsai 등이 한탄바이러스 76/118 strain의 거위 적혈구에 대한 응집반응과 혈구응집 저지반응을 통한 신증후 출혈열의 혈청학적 진단법을 보고한바 있으나 서울바이러스의 혈구응집반응과 혈구응집저지반응으로 한탄 및 서울바이러스에 의한 감염의 감별은 최초로 시행된 것이며 본 실험의 결과와 Tsai

등이 보고한 결과와는 몇가지 차이점을 보이고 있다. Tsai 등은 한탄바이러스 76/118 strain의 혈구응집반응이 일어나는 pH 범위가 pH 5.75에서 6.4사이이며 최적 혈구응집 pH는 6.0과 6.2로써 이 pH에서 혈구응집소의 최고역가는 1:16이라고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 76/118 strain의 혈구응집반응이 일어나는 pH 범위는 Tsai 등의 결과와 거의 동일하였으나 최적 혈구응집 pH가 5.75이었고 이 pH에서 혈구응집소의 최고역가가 1:512로 Tsai 등이 보고한 최고역가보다 32배나 높았다. 이러한 차이점의 원인은 아직 문제점으로 남아있으며 Clarke와 Casals의 방법에 따른 buffer system으로는 pH 5.75 미만에서의 혈구응집반응은 시행할 수 없었다. 본 실험의 결과 혈구응집반응이 일어나는 pH 범위와 최적혈구응집 pH의 차이에 의해 한탄바이러스와 서울바이러스를 구분할 수 있었으며 신증후 출혈열 환자 혈청중의 항체를 이용하여 한탄 및 서울바이러스에 의한 감염을 간별하기 위한 혈구응집 저지반응을 시행하기에 충분한 혈구응집소의 역가를 구할 수 있었다.

### 결 론

한탄바이러스와 서울바이러스의 혈구응집반응의

결과는 다음과 같다.

1. 한탄바이러스 76/118 strain과 ROK79/90 strain은 pH 5.5-6.4 범위내에서 혈구응집반응이 일어났으며 최적 혈구응집 pH는 5.75이었다.

2. 서울바이러스 KSNUSD 84/34 strain은 pH 6.2-6.6 범위내에서 혈구응집반응이 일어났으며 최적 혈구응집 pH는 6.4이었다.

### 참 고 문 헌

- 1) Ardoin P and Clarke DH: The use of sonication and of calciumphosphate chromatography for preparation of group C arbovirus hemagglutinins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **16**: 357-363, 1967.
- 2) Borda I, Barla-Sxabo L and Xsomber O: Recent data to the occurrence of infectious hemorrhagic nephrosonephritis in Hungary. *Orv. Hetil.* **97**: 720, 1956.
- 3) Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Blom N and Lahdevirta J: Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank vole and serologic diagnosis of human infection. *J. Infect. Dis.* **141**: 131-134, 1980.
- 4) Clarke DH and Casals J: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 561-573, 1958.
- 5) Franko MC, Gibbs CJ Jr, Lee PW and Gajdusek DC: Monoclonal antibodies specific for Hantaan virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 4149-4153, 1983.
- 6) Goldgaber D, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr and Svedmyr A: Definition of three serotypes of Hantaviruses by a double sandwich ELISA with biotin-avidin amplification system. *J. Gen. Virol.* **66**: 1733-1740, 1985.
- 7) Ishii S et al: Studies on Song-go fever. *Jpn. Army Med. J.* **355**: 1755-1759, 1942.
- 8) Kitamura T, Morita C, Komatsu T, Sugiyama K, Arikawa J, Shiga S, Takeda H, Akao Y, Imaizumi K, Oya A, Hashimoto N and Urasawa, S: Isolation of virus causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) through a cell culture system. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **36**: 17-25, 1983.
- 9) LeDuc JW Smith, CA and Johnson KM: Hantaan-like viruses from domestic rats captured in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**: 992-998, 1984.
- 10) Lee HW: Korean hemorrhagic fever. *Progress. Med. Virol.* **28**: 96-113, 1982.
- 11) Lee HW, Baek LJ and Johnson KM: Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korea hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J. Infect. Dis.* **146**: 638-644, 1983.
- 12) Lee HW, Baek LJ and Ju YK: The isolation of Seoul-like virus from laboratory rat (not pressed).
- 13) Lee HW and Lee PW: Korean hemorrhagic fever I. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Korean J. Intern. Med.* **19**: 371-384, 1976.
- 14) Lee HW and Lee PW: Korean hemorrhagic fever II. Isolation of the etiologic agent. *Korean J. Virol.* **7**: 19, 1977.
- 15) Lee HW, Lee PW and Baek LJ: The isolation of Hantaan-like virus from HFRS patient (not pressed).
- 16) Lee HW, Lee PW and Johnson KM: Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* **137**: 298-308, 1978.
- 17) Lee PW, Amyx HL, Gajdusek DC, Yanagihara RT, Goldgaber D and Gibbs CJ Jr: New hemorrhagic fever with renal syndrome related virus in indigenous wild rodents in United States. *Lancet* **2**: 1405, 1982.
- 18) Lee PW, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC and Yanagihara R: Serotypic classification of Hantaviruses by the indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests. *J. Clin. Micro.* **22**: 940-944, 1985.
- 19) McCormick JB, Palmer EL, Sasso DR, Kiley MP: Morphological identification of the agent of Korean hemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of Bunyaviridae. *Lancet.* **1**: 756-768, 1982.
- 20) Myhrman G: Nephropathia epidemica: a new infectious disease in northern Scandinavia. *Acta Med. Scand.* **140**: 52-56, 1951.
- 21) Schmaljohn CS and Dalrymple JM: Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virology.* **131**: 482-491

- 1983.
- 22) Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, Le-Duc JW, Lee HW, von Bonsdorff C-H, Brummer-Korwenkontio M, Vaheri A, Tsai TF, Regnery HL, Goldgaber D and Lee PW: Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science*. **277**: 1041-1044, 1985.
  - 23) Schmaljohn CS, Hasty SE, Harrison SA and Dalrymple JM: Characterization of Hantaan virions, The prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Infect. Dis.* **148**: 1005-1012, 1983.
  - 24) Smadel JE: Epidemic hemorrhagic fever. *Amer J. Pub. Health.* **43**: 1327-1330, 1951.
  - 25) Smorodintsev AA, Altschuler IS, Dunaevskii MI, Kakhreise KA, Neustroev VD and Churilov AU: Etiology and clinics of hemorrhagic nephrosonephritis. *Moscow Medgiz.* **26-47**, 1944.
  - 26) Sugiyama K, Matsuura Y, Morita C, Morikawa S, Komatsu T, Shiga S, Akao Y and Kitamura T: Determination by immune adherence HA of the antigenic relationship between Rattus and Apodemus-borne viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Infect. Dis.* **149**: 472, 1984.
  - 27) Sugiyama K, Matsuura Y, Morita C, Shiga S, Akao Y, Komatsu T and Kitamura T: An immune adherence assay for discrimination between etiologic agents of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Infect. Dis.* **149**: 67-73, 1984.
  - 28) Sugiyama K, Matsuura Y, Morita C, Shiga S, Komatsu T, Morikawa S and Kitamura T: Isolation of a virus related to hemorrhagic fever with renal syndrome from urban rats in a nonendemic area. *J. Infect. Dis.* **149**: 473, 1984.
  - 29) Tamura M: Occurrences of epidemic hemorrhagic fever in Osaka city: First cases found in Japan with characteristic feature of marked proteinuria. *Biken J.* **7**: 79-94, 1964.
  - 30) Trencseni T and Keleti B: Haemorrhagic nephrosonephritis in Hungary and Europe. *Orv Hetil.* **100**: 1872, 1959.
  - 31) Tsai TF, Bauer SP, Sasso DR, Whitfield SG, McCormick JB, Caraway TC, McFarland L, Bradford H and Kurata T: Serological and virological evidence of a Hantaan virus-related enzootic in the United States. *J. Infect. Dis.* (in press, 1986).
  - 32) Tsai TF, Tang YW, Hu SL, Ye KL, Chen GL and Xu ZY: Hemagglutination-inhibiting antibody in hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Infect. Dis.* **150**: 895-898, 1984.
  - 33) Verbeev P and Gubev E: Haemorrhagic nephrosonephritis in Bulgaria. *J. Hyg. Epidem. (Praha)*, **2**: 136, 1963.
  - 34) White JD, Shirey FG, French GR, Huggins JW and Brand OM: Hantaan virus, aetiological agent of Korean hemorrhagic fever, has Bunyaviridae-like morphology. *Lancet.* **1**: 768-771, 1982.