

국내 박쥐에서의 일본뇌염 바이러스 항체 조사

이재상 · 이연태

단국대학교 이공대학 미생물학과

박쥐 총 453수를 일본뇌염 바이러스에 대한 HI 항체가를 조사하였던 바 1:10이상 항체가 양성률은 453수 중 335수(74.0%)로 높은 양성률을 보였고 성별 항체보유율은 수컷이 70.0%(237수 중 166수)이고 암컷이 78.2%(216수 중 169수)로 암컷이 약간 높게 나타났다. 박쥐 종류별 일본뇌염 바이러스(Japanese Encephalitis Virus, JEV)에 대한 HI 항체양성률을 조사한 바 관박쥐(*Rhinolophus ferrumequinum*)는 75.0%(360수 중 270수)가 HI 항체를 보유하고 있었다. 긴가락박쥐(*Miniopterus schreibersii*)는 59.6%(57수 중 34수) 양성이고 안주애기박쥐(*Vespertilio superans*)는 87.5%(24수 중 21수)가 항체를 보였고 큰수염박쥐(*Myotis mystatinus*)도 수가 적어 비교가 어려우나 항체보유율은 83.3%(12수 중 10수)가 양성이었다. JEV(Nakayama strain)을 한국산 야생 박쥐 뇌내에 감염시켜서 뇌염바이러스가 박쥐 뇌내 세포에서 증식하는지 여부를 확인하였다. 박쥐 뇌세포에서 JEV항원과 바이러스의 감염입자를 전자 현미경으로 확인하였다.

KEY WORDS □ Seroepidemiologic, Japanese Encephalitis Virus, Korean bats

박쥐는 전세계에 분포되어 있으며 야행성 특수 포유동물로 박쥐에 대한 많은 연구가 시도되었으며, 1908년에 Brazil의 남부 Santa Catarina에서 박쥐에 물린 사람에게 광견병 증세가 나타났으며, 그 후 여러 연구자들이 박쥐로부터 광견병 바이러스를 분리보고한 바 있다(17, 21, 28).

한편, 박쥐의 혈청에서도 바이러스의 항체가 존재를 증명하였으며 박쥐로부터 직접 몇 종의 arbovirus를 분리하였다(13-14, 22, 29).

Ito와 Saito(20)는 일본뇌염 바이러스(Japanese Encephalitis Virus, JEV)를 박쥐에 주사하여 월동기 전을 연구한 바 있다. Miura와 Kitaoka(26)는 1963년부터 1965년까지 일본 북해도 지역에서 포획한 1459수의 박쥐로부터 일본뇌염 바이러스에 대한 항체 검출을 시도한 바 혈구응집저지 시험(Hemagglutination Inhibition; 이하 HI라 함) 항체를 증명하지 못하였으나 8%의 중화항체를 검출하였다. Sulkin 등(35)도 미국 텍사스 지역에서 포획한 야생박쥐에서 St. Louis Encephalitis Virus(SEV)를 분리하였다. 인간에게 어떤 경로로 질병을 전파하게 되므로 차별한 관심을 갖게 되었다(27, 34).

국내에서는 이 등(8)이 박쥐 84수에서 일본뇌염 바이러스의 중화 항체를 검출한 바 있고 박쥐가 광견병 바이러스, 일본뇌염 바이러스, SEV 및 Kaysanur for est disease virus(KFDV) 등을 보관하고 있음을 보고하였다.

따라서 본 연구는 일본뇌염 바이러스의 자연계 생활환경을 규명하고자 우리나라에 서식하는 야생박쥐 453수를 포획하여 일본뇌염 바이러스에 대한 항체양

성을 조사하였으며 JEV의 표준 균주인 Nakayama strain을 정상 박쥐의 뇌에 접종한 후 뇌 내의 증식을 간접면역 형광항체법(Indirect fluorescence antibody technique: IFA)과 전자현미경으로 관찰하였다.

재료 및 방법

박쥐 채집 및 채혈

한국 각 지역에서 생포한 박쥐를 마취시킨 후 1 ml 주사기로 심장에서 채혈하여 혈청을 불리시킨 다음 실험에 사용할 때까지 -20°C 냉장고에 보관했다.

일본뇌염 바이러스 주

본 실험에 사용한 일본뇌염 바이러스는 국립보건원에서 영아 마우스 뇌 내로 계대배양(201대)한 JEV(Nakayama strain) 주를 분양받아 본 실험에서 ICR-JCR 영아 마우스에 3대 계대한 뇌조직을 채취하여 pH 7.2-7.4인 인산염완충용액(phosphate buffered saline, PBS)에 10% 유제로 만들어 -75°C 저온 냉장고(Ultra low temperature, Revco)에 보관하면서 사용했다(2).

혈구 응집 및 혈구 응집 억제 실험

일본뇌염 항원은 JEV(Nakayama strain) 주를 사용했으며 영아마우스에 감염시켜서 회수한 마우스 뇌 유체 바이러스를 Clarke와 Casals(15)법에 의해서 사용했다. 항원역가는 1:1,286이었다.

혈청 처리

혈구응집억제 시험용 혈청에서 비특이 물질을 제거하기 위한 방법은 Clark와 Casals법(15)을 따랐다(5, 7). 즉 박쥐의 혈청 0.1 ml을 취하여 특급 acetone

용액 0.9 m/에 혼합하여 1,000 rpm에서 15분간 원침한 뒤 침사 혈청 단백질을 회수하였다. 다시 인산염완충 (pH 7.7-7.4) 용액을 가하여 원액으로 만든 다음 건강한 침사 거위 적혈구(goose red blood cell) 한 방울을 첨가시켜서 4°C에서 30분간 반응시켰으며 1,000 rpm에서 10분간 원침한 상청액을 pH 9.0 ABS (albumin borate saline)로 희석하여 HI용 실험 재료로 사용했다(6).

거위 적혈구 제조

건강한 거위(goose) 2마리로부터 채혈하여 혈액을 Alserver용액과 혼합하여 4°C에 보관하면서 사용하였고 1주가 넘는 것은 사용하지 않았다.

혈구 표본 10 ml/을 취하여 1,000 rpm에서 10분간 원침하고 침사 적혈구를 3회 세척한 후 Virus adjust diluent(VAD)에 부유시켜서 spectrophotometer (Coleman junior)로 적혈구의 농도가 0.33%(O.D. 0.0490-0.750)되게 조정하여 사용했다(6).

혈구 응집 억제(HI) 실험

박쥐 혈청을 상기와 같이 acetone 및 거위 적혈구로 처리한 것을 ABS 용액으로 배수 희석한 다음 8 unit/ml/의 항원을 가하여 잘 혼합시킨 후 4°C 냉장고에서 18시간 방치한 후 다시 실온에서 30분간 방치했다. 여기에 준비된 0.33%의 거위 적혈구를 가하여 잘 혼합시킨 후 37°C에서 60분간 방치하였다가 대조군과 비교해서 판정했다.

전자현미경 관찰

일본뇌염 바이러스를 10% 유제로 만들어서 적혈구로 10⁻³가 되게 희석하여 박쥐를 ether로 마취시킨 후 뇌내로 0.03 ml/씩 암수 구별없이 각각 5마리씩 주사하여 사육하면서 1일 간격으로 마취시킨 후 뇌 조직, 폐장, 간장, 신장 등을 채취하여 즉시 고정시켰다 (1, 18).

조직을 초박절편(ultrathin section)하여 2.5% glutaraldehyde/0.1 M 인산염완충(pH 7.4) 용액(4°C)에서 2시간 고정하고 1% osmium tetroxide(OsO₄) 용액에서 다시 90분간 고정하였다. 그 후 ethanol 용액(30, 50, 70, 80, 95, 100%)에서 각각 20분 간격으로 탈수시킨 다음 propylene oxide로 20분간(2회) 치환시켰다. 그 후 Epon 812(Polyscience)에 24시간 포매시킨 후 37°C에서 2시간, 50°C에서 12시간, 60°C에서 48시간씩 중합시켰다. 이와 같은 순서를 거쳐서 완성된 불력을 1.2 μm 두께가 되게 반초박절편(semithin section)하여 toluidine blue로 염색하여 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

간접면역 형광항체법

JEV의 IFA는 Fluoresena Isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-Rabbit IgG(Cooper, USA)를 1:32로 희석하여 사용하였다.

일본뇌염 바이러스에 대한 IgG 정제

일본뇌염 바이러스에 대한 면역 한국산 백색 토끼의 수컷(650 mg ± 50 mg) 5마리를 선택하여 10% 유제로 된 JEV(Nakayama strain)을 10⁻³으로 희석하여 토끼

1마리당 1 ml/씩 정맥(초회)으로 주사하고 2차 면역부터는 복강내로 주사했다. 면역은 주당 2회로 총 6회 면역시키고 최후 면역시킨 후 1주일 후에 채혈하여 HI 항체가가 1:160인 것을 확인하고 채혈했다.

면역된 토끼 혈청의 IgG 정제는 면역 혈청을 ammonium sulfate로 포화시켜 혈청 단백질을 침전시켰다. Sephadex-6 50 column에서 탈염색시킨 후 DEAE cellulose column을 사용하여 정제한 것을 spectrophotometer(Beckman)에서 O.D. 값을 측정하였다.

일본뇌염 바이러스에 대한 간접면역 형광항체법

간접면역 형광항체법은 이(12)와 이 및 Dalrymple (23) 방법을 따랐다. 즉 박쥐 장조직을 Cryotome (Yamato, Japan)을 사용하여 4 μm 되게 박절하였다. 이 절편을 슬라이드에 올려놓고 찬 acetone으로 7-10분간 고정시키고 다시 찬 인산염완충용액으로 세척하여서 다시 찬 증류수로 세척하였다. 여기에 정제시킨 JEV IgG를 가하여 30분간 반응시킨 후 인산염완충 용액으로 수세하였다. 여기에 다시 1:32로 희석한 FITC Conjugated goat anti-rabbit IgG(Cooper)으로 세척한 다음 mounting medium인 무형광 P.V.A. (M.M.) 71-24 powder 15.0 gm과 증류수 100 ml/를 혼합하여 만든 배지에 덮개유리를 덮고 마운트해서 형광현미경으로 관찰하여 촬영했다.

결과 및 고찰

일본뇌염 바이러스에 대한 혈구응집 억제항체

한국 산야 동굴에서 포획한 박쥐 총 453수에 대한 종별 특정지역과 혈구응집 억제항체 보유율과 형광항체법으로 조사한 바 Table 1과 같다. 즉, 박쥐의 74.0%(453수 중 335수)가 HI항체를 보유하였다. 이 중 수컷이 70.0%(237수 중 166수)가 양성이었고 암컷은 78.2%(216수 중 169수)가 양성이었다. 따라서 많은 박쥐가 1:10 내지 1:40의 항체를 나타냈으며 수컷보다 암컷의 항체량이 높게 나타났음을 알 수 있다.

지역별 채집 박쥐 항체 보유

Table 2에서 보는 바와 같이 도별로 포획된 박쥐에서의 항체분포는 충남 74.2%(62수 중 46수)가 양

Table 1. Hemagglutination inhibition antibody titers to Japanese encephalitis virus by the sex

Sex	HI titer			No. of positive (%)
	10	20	40	
Male	94	58	14	166/237 (70.0)*
Female	103	61	5	169/216 (78.2)*
Total	197	119	19	335/453 (74.0)

*P<0.05

Table 2. Hemagglutination inhibition antibody titers to Japanese encephalitis virus in the wild bats by trapping area*

Province	Sex	HI titer			No. of positive (%)
		10	20	40	
Chungnam	M	19	9	0	
	F	11	6	1	
Kangwon	M	17	8	2	
	F	17	15	2	
Chunbuk	M	58	41	12	
	F	75	40	2	
Total				335/453 (74.0)	

*P<0.05

Table 3. Hemagglutination inhibition antibody titers to Japanese encephalitis virus by the species of the wild bats

Species	HI titer			No. of positive (%)	
	10	20	40	No. of examined	(%)
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	169	90	11	270/360	(75.0)
<i>Miniopterus schreibersii</i>	14	16	4	34/57	(59.6)
<i>Vespertilio superans</i>	10	9	2	21/24	(87.5)
<i>Myotis mystatinus cilis</i>	4	4	2	10/12	(83.3)
Total				335/453 (74.0)	

*P<0.05

성이었다. 강원도에서 포획된 박쥐에서는 72.6%(84수 중 61수)가 양성이었다. 전북에서 잡은 박쥐는 74.3%(307수 중 228수)가 HI항체 양성이었다.

즉, 각각의 지역에서 잡은 박쥐의 HI항체 양성률은 지역간에 차이 없이 유사한 항체가를 보유하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 지역간 차이는 유의성이 없었다 (p>0.05).

박쥐의 종류별 혈구응집억제 항체 분포

박쥐의 종별 일본뇌염 바이러스에 대한 HI항체 양성률을 조사한 것이 Table 3에 제시되었으며, 관박쥐(*Rhinolophus ferrumequinum*) 75.0%(360수 중 270수)가 HI항체를 보유하고 있었다. 긴가락박쥐(*Miniopterus schreibersii*)는 59.6%(57수 중 34수)가 양성이고 안주애기박쥐(*Vespertilio superans*)는 87.5%(24수 중 21수)가 항체가를 보였으며 안주애기박쥐가 87.5%로 일본뇌염 항체가의 높은 보유률을 보였으나 낮은 항체가를 보인 박쥐는 긴가락박쥐로 나타났다.

큰수염박쥐(*Myotis mystatinus*)도 수가 적어 비교가 어려우나 항체보유률은 83.3%(12수 중 10수)가 양성이었다.

따라서 이상의 결과를 종합해 볼 때 한국산 박쥐는



Fig. 1. Indirect immunofluorescent micrograph showing bright JE viral antigen in the brain of bats 5 days after infection(X400).



Fig. 2. Electronmicrophotograph showing JE virus in the axon of the bat's brain(X50,000). Note the JE virus particles(arrows) in the cytoplasm of glial cells

MI: mitochondria, LY: lysosomes, GA: golgi apparatus, ER: endoplasmic reticulum.

종류별 항체보유률의 차이점은 있으나(P<0.05) 어떤 종류나 다같이 1:10이상의 일본뇌염 HI 항체를 보유하고 있음을 알 수 있었다.

박쥐 뇌내 JEV 항원 검출과 전자현미경 관찰

박쥐 뇌에 일본뇌염 바이러스(JEV) 항원의 존재를 확인하고자 박쥐 뇌내 JEV(Nakayama strain)을 10⁻³로 희석한 유제를 뇌내로 0.03 ml 주사하고 사육하면서 2일째와 5일째에 뇌조직을 채취하여 뇌내 JEV 항원을 간접면역 형광항체법으로 검출한 바 Fig. 1과 같이 뇌조직 내에 JEV의 항원이 분포되어 있었음이 입증되었다. 따라서 같은 방법으로 JEV(Nakayama strain)을 한국산 야생박쥐 뇌내에 주사하여 48-72시간 지난 후 뇌내 조직을 고정 박절한 후 전자현미경으로 박쥐 뇌세포 내에서 증식된 바이러스 존재 여부를 관찰한 바 Fig. 2와 같이 JEV 감염 입자가 세포질에서 다양한 형태로 산재하고 있는 것이 관찰되

었다.

Smadel(30)과 Sulkin 등(34)은 박쥐가 어떤 arbovirus를 매개할 것이라는 가정하에서 박쥐를 대상으로 바이러스 보유유무를 연구하기 시작했다.

감염 바이러스는 박쥐 체내에서 불현성 감염으로 증식하여 자연계에 바이러스 보유처로서 역할을 할 것으로 생각되어(34) 박쥐에서의 각종 바이러스의 역학적 기전을 규명하는 연구가 많이 실시되었다. 뇌염 바이러스에 감염된 박쥐는 지방조직, 신장, 뇌조직 등에서 바이러스는 증명되나 뇌염증상이 없음을 시사했다(17, 19, 32).

1977년에 일본에서 Miura와 Kitaoka가(26) 박쥐의 일본뇌염 항체양성률을 조사한 결과 11.1%(106수)의 HI 항체양성률을 관찰했다.

지자의 조사에서는 국내에서 포획한 박쥐 453수 중에서 74.0%(335수)라는 높은 HI 항체양성률이 증명되어 일본과 한국간의 큰 차이를 보였으며 본 실험을 통하여 한국에서 포획한 4종의 박쥐 뇌조직에서 일본뇌염 바이러스의 증식여부를 확인했고 박쥐의 혈청에서 74.0% HI 항체양성률을 검출한 바 박쥐가 일본뇌염 바이러스의 숙주임을 확인했다.

참 고 문 헌

- 김영곤, 1988. 한탄바이러스 감염 마우스 조직의 광학 및 전자현미경적 연구. 단국대학교 석사학위 논문.
- 김영호, 백승복, 장경식, 1967. 일본뇌염 역학조사 연구. 국립보건원보. 55-72.
- 박희상, 전중휘, 1988. 가을에 유행 발생하는 서족 관련 발열성 감염증, 특히 부산, 경남지역 발생현황, 감염. 20. 247-267.
- 서준석, 조해월, 홍영해, 1983. 일본뇌염 바이러스의 자연계 생활환경 및 생태에 관한 연구. 국립보건원, 20. 119-123.
- 염병진, 이연태, 1986. 한국 일부지역 주민에 대한 일본뇌염 바이러스의 적혈구 응집 저지 항체에 관한 연구. 대한바이러스학회지, 15. 1-9.
- 일본 생물학적 제재 기준 해설편, 1986.
- 이문호, 1986. 한국형 출혈열. 서울대학교 출판부.
- 이연태, 이윤일, 김경숙, 김명숙, 이종훈, 1973. 박쥐 혈청의 일본뇌염 바이러스에 대한 중화 항체. 중앙의학, 25. 345-348.
- 이연태, 이종훈, 1977. 한국인의 일본뇌염 바이러스에 대한 면역체(HI) 보유율. 대한미생물학회지, 12. 51-56.
- 이연태, 1988. 일본뇌염과 그 질환. 단국대학교 미생물학회지, 3. 6-18.
- 이연태, 조규봉, 강필원, 홍승희, 박철희, 임병진, 1989. 1987년 일부 한국인의 일본뇌염 바이러스에 대한 HI 항원분포. 대한바이러스학회지, 19. 41-47.
- 이종훈, 1968. 형광항체법. 최신의학, 11. 127-149.
- Berge, T.O., 1975. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 2nd ed., pp. 1-789.
- Bulivan, T.D. and J.E. Grimes, 1954. Recovery of rabies virus from colonial bats on Texas, Public Health Report. 69, 766-768.
- Clark, D.H. and J. Cassals, 1956. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne virus. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 7. 561-573.
- Colonel, K.F. and V.C. Burns, 1956. Insectivorous bats naturally infected with rabies in southwestern nited States. Amer. J. Public Health., 46. 1089-1097.
- Courter, R.D., 1954. Bat rabies. Public Health Report., 69, 9-16.
- Dohny, A.L., 1978. Vector transmission of scrub typhus and control of vector mites. Malaysian J. Path., 1. 15-18.
- Hetten, B.A. and R. Allen, 1968. Immune response in Chiroptera to bacteriophage. 174. J. Immunol., 101. 141-150.
- Ito, T. and S. Saito, 1952. Susceptibility of bats to Japanese B encephalitis virus. Jap. J. Bacteriol., 7: 617-622.
- Kent, J.R. and S.M. Finegold, 1960. Human rabies transmitted by the bite of a bat. New England J. Med., 294. 136-141.
- Leonard, L.L. and S.E. Sulkin, 1968. Bat immunoglobulins formed in response to experimental Japanese B encephalitis virus infection. J. Immunol., 101. 1168-1175.
- Lee, H.W. and J.M. Dalrymple, 1989. Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome. WHO collaborating center for virus reference and research.
- Lee, H.W. and P.W. Lee, 1977. Korean hemorrhagic fever. III. Natural reservoir, Kor. J. Virol., 7: 31.
- Middlebrooks, B.L. and R. Allen, 1969. Studies of arthropod borne virus infection in Chiroptera. V. Characteristics of line of Japanese B encephalitis virus enveloped by serial passage in Biog Brown Bats(Eptesicus f. fuscus) maintained at different environmental temperatures. Am. J. Trop. Med. Hyg., 18. 115-122.
- Miura, T. and T. Kitaoka, 1970. Studies of arthropod-borne virus infection in Chiroptera. VI. Serologic evidence of natural JEV infection in bats. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19. 88-93.
- Parr, K.M. and K.R.P. Singh, 1965. Demonstration of antibodies against the virus of Krasnur Forest Disease(KFD) in the frugivorous bat in Rouseffus leschenaulti near Poona. Indian. J. Med. Res., 53. 956-961.
- Sheperd, R.C. and M.C. William, 1964. Studies on virus in East African bats(Chiroptera). 1. Hemagglutination inhibition and Circulation of Arboviruses Zoons. Res., 3. 125-139.
- Sims, R.A. and R. Allen, 1963. Studies on the pathogenesis of rabies in insectivorous bats. III. Influence of the Gravid State. J. Inf. Dis., 112. 17-27.
- Smadel, J.E., 1953. Epidemic hemorrhagic fever.

- Am. J. Pub. Health*, **43**, 1327-1330.
31. Sulkin, S.E. and R. Allen, 1964. Studies of arthropod-borne virus infection in Chiroptera. I. Susceptibility of insectivorous species to experimental infection with Japanese B and St. Louis encephalitis viruses in Osaka City: First cases found in Japan with characteristic feature of marketed proteinuria. *Biken J.*, **7**, 79-84.
 32. Sulkin, S.E., R. Allen and R. Sims, 1966. Studies of arthropo-borne virus infections in Chiroptera III. Influence of environmental temperature. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **15**, 406-417.
 33. Sulkin, S.E. and P.H. Krutzsch, 1959. Studies on the pathogenesis of rabies in insectivorous bats. I. role of brown adipose tissue. *J. Exp. Med.*, **110**, 369-387.
 34. Sulkin, S.E., R. Sims and R. Allen, 1964. Studies of arthropod-borne virus infections in Chiroptera. II. Experiments with JEV and St. Louis encephalitis virus in the Gravid Bat. *Am. J. Med. Hyg.*, **13**, 475-481.
 35. Sulkin, S.E., R.A. Sims and R. Allen, 1966. Isolation of St. Louis encephalitis virus from bat. (*Tadarida mexicana*) in Texas. *Science*, **152**, 223-225.

(Received February 11, 1992)

(Accepted March 3, 1992)

ABSTRACT: Detection of Antibodies in Korean Bats to Japanese Encephalitis Virus

Lee, Jae-Sang and Yun-Tai Lee (Department of Microbiology, College of Science and Engineering, Dan-Kook University, Seoul, Korea)

A total of 453 wild bats inhabiting in Korea were captured and the IgG antibodies against Japanese Encephalitis Virus (JEV) were detected by the hemagglutination inhibition test. 355 of the 453 blood sera showed positive reaction to JEV with titers of 10 up to 40. Positive rates of male and female bats were 70.0% and 78.2%, respectively. Positive rates according to area were 74.2% in Chungnam, 72.6% in Kangwon and 74.3% in Chungbuk, the results of which indicated no difference in area. Whereas positive rates according to bats species were 87.5% for *Vespertilio superans*, followed by 83.3% for *Myotis mystatinums cilis*, 75.0% for *Rhinolophs ferumguienum* and 59.6% for *Miniopterus schreibersii*. It was found by indirect immunofluorescence and electron microscope techniques that the virus particles of JEV could infect the brain of a Korean wild bats and proliferate in the brain cells.