

## Maaji Virus의 Hamster 계대 및 적응

보령종합연구소 생명공학연구센터; <sup>1</sup>고려대학교 의과대학 미생물학교실,  
<sup>1</sup>고려대학교 바이러스병 연구소

김윤철 · 백우현 · 이평우<sup>1\*</sup>

=Abstract=

### Passage and Adaptation of Maaji Virus in Hamster

Yun-Cheol Kim, Woo-Hyun Paik and Pyung-Woo Lee<sup>1†</sup>

*Central Research Institute, Boryung Pharmaceutical Co., Ltd., Kunpo-si 435-050 Korea;*

*<sup>1</sup>Department of Microbiology College of Medicine, <sup>1</sup>Institute for Viral Diseases,  
Korea University, Seoul 136-705*

The methods that make Hantavirus grow consist of inoculation into the experimental animals and cultured cells. The cultured cells, such as Vero-E6 and A549 cells, have been usually used for isolation of the virus and the animals, such as mice and rats, are used for large scale preparation of the virus so far. Furthermore, the cell can be used to maintain the virus and assay the infectivity and the animals can be used for the experiment of viral pathogenicity and challenge for assessment of vaccine. Apodemus mice, the own natural host of the virus, has been used for challenge test of Hantaan virus. However it has been pointed out to difficult handling and breeding the animal in laboratory. Therefore, we attempted to establish a new animal model for challenge test at the time of isolation of Maaji virus which is a new hantavirus similar but distinct to Hantaan virus. In suckling hamster, the titer of Maaji virus and the lethality to mice of the virus were increased gradually in the titer and lethality through passage by intracerebral (IC) inoculation. We tried to re-adapt this brain virus to lung of weanling hamster. The brain passaged virus was inoculated into weanling hamster intramuscularly. Again, the titer of the virus in lung was also increased by continuous passage of this virus. This facts could regarded as adaptation to new environment in which the virus proliferates. To identity the virus passaged in hamster with Maaji virus, both of the virus passaged in hamster brain and lung were compared with Maaji virus (MAA-I) and Hantaan virus (HTN 76-118) by means of restriction fragment length polymorphism (RFLP) and single strand conformation polymorphism (SSCP). As a result, we conclude that Maaji virus could be adapted successfully to weanling hamster through this passage strategy. Utilizing this adapted Maaji virus strain, hamster model is able to be used for challenge test in hantaviral vaccinology and further experiments utilizing hamster system as a rather available and convenient lab animal are expected.

**Key Words:** Maaji virus, Hamster, Adaptation, Challenge test

---

\*Corresponding author

## 서 론

신증후 출혈열 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS) [1]의 원인체는 그 항원성 및 생물학적 성질을 다소 달리 하는 일단의 유사한 바이러스들에 의해 발생하며 그 발생 지역은 주로 아시아와 유럽 및 미주 지역을 포함하는 범 세계적인 발생 양상을 보인다. 고열 및 출혈과 함께 신부전증을 동반하는 심한 증상의 한국형 신증후 출혈열 (유행성 출혈열)의 원인체인 한탄 바이러스는 1976년 Lee와 Lee [2]에 의해 한국에서 신증후 출혈열의 원인체로서는 맨 처음 발견되었다. 이 업적 이후 그 동안 신비의 베일에 가려져 있던 신증후 출혈열의 원인체에 관한 많은 연구가 가능케 되었으며, 세계의 여러 곳에서 여러 연구팀들에 의해 각종 설치류와 환자의 혈액으로부터 유사한 바이러스들이 연속적으로 분리되는 계기가 마련되었다.

이 일단의 바이러스들은 혈청학적, 전자현미경적 [3,4], 및 분자생물학적 [5,6,7] 연구결과, 크기가 약 100nm인 구형의 RNA 바이러스로서 제반 특성상 번야바이러스 (bunyavirus)의 일종임이 밝혀지면서, 번야바이러스 과 (family *Bunyaviridae*) 내의 기존 4가지의 속과는 구별되는 새로운 속으로서의 한탄바이러스 속 (genus *Hantavirus*)으로 확립되었다.

현재 한탄바이러스 속의 바이러스들은 플라크 감소 중화시험 (plaque reduction neutralization test, PRNT) 및 감별 면역 형광항체법 (differential immunofluorescence, DIF) [8,9]으로 구분될 수 있는 항원성의 차이에 따라 적어도 4가지 종류의 그룹, 즉 혈청형 (serotype)으로 나눈다. 즉 한국산 등줄쥐 (*Apodemus agrarius coreae*)로 부터 최초로 분리된 한탄바이러스 (*Hantaan virus*)와 집쥐 (*Rattus rattus*)에서 분리되는 서울 바이러스 (Seoul virus) [10] 및 북유럽지역에서 서식하는 bank vole (*Clethrionomys glareolus*)에서 분리된 푸우말라 바이러스 (Puumala virus) [11], 그리고 미국의 Frederick, Maryland에서 채집한 meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*)에서 처음 분리된 프로스펙트힐 바이러스 (Prospect Hill virus) [12]의 4가지 혈청형이 그것이다. 그 외에도 태국의 Thailand (THAI) virus [13], 인도의 Thottapalayam virus [14], 유고슬라비아의 Belgrade virus [15] 그리고

미국의 Four Corners virus [16]가 기존의 한탄바이러스 혈청형과는 자연계 숙주도 다르며 바이러스 성질 또한 차이가 있는 새로운 종류의 바이러스들로 인식되고 있다.

한편 경기도 파주, 마지리에서 포획한 등줄쥐에서 분리된 마지바이러스 (Maaji virus) 또한 한탄바이러스와 자연계 숙주는 공유하지만 항원성 및 분자바이러스학적 수준에서는 분명한 차이를 나타내는 새로운 종류로 보고되고 있다 [17,18,19].

한탄바이러스의 생물학적 성질 중 숙주와의 관계에서 흥미있는 사실은 위에서 언급한 바처럼, 혈청형에 따라서 숙주역 (host range)이 분명히 다르다는 것이다. 한탄바이러스의 자연계 숙주는 야생 설치류임에는 공통이지만 혈청형에 따라 숙주역에서 종 특이성 (species specific)을 보인다. 즉 등줄쥐로 부터는 한탄바이러스가 분리되며 서울 바이러스는 분리되지 않는다. 이와 같은 사실은 한탄바이러스 혈청형에 따라 인식할 수 있는 종 특이적인 특정 수용체가 설치류 세포에 존재함을 의미한다.

한탄바이러스의 이런 성질로 해서 생쥐, 기니피그, 토끼, 햄스터 같은 유용한 실험동물에서 한탄바이러스를 배양하는 일은 용이하지 않다. 한탄바이러스의 경우, 신생마우스의 뇌내 접종을 통한 배양이 특수 목적을 위해 이뤄지고 있다. 즉 한탄바이러스를 생후 48시간내의 신생 (new born) 마우스 뇌내에 접종하면 2-3주 후에 심한 마비와 함께 뇌염으로 사망하며, 사망한 마우스의 뇌에는 한탄바이러스가 다량 증식한다 [20]. 이후 사망한 마우스의 뇌 부유액을 마우스 뇌내에 계속적으로 계대하면 역가가 점차로 증가되며, 계대가 계속될수록 마우스의 사망율이 증가하고 또한 마비가 나타나는 시간도 점차로 짧아져서 5-6일 이내에 마비가 나타난다. 이는 바이러스가 특정한 숙주 환경에 적응되어 가는 것으로 해석할 수 있다.

실험실 흰쥐 (rat)에서 또한 한탄바이러스의 배양이 성공적으로 이뤄졌다. Lee [21] 등은 한탄바이러스의 수차폐의 blind passage를 통해 쥐의 폐에서 높은 역가로 증식되는 흰쥐에 적응된 (rat adapted)한탄바이러스의 strain을 확립한 바 있다.

이처럼 현재 단지 한탄바이러스의 배양만을 위해 사용되는 실험동물은 생쥐와 쥐 정도이며, 아직까지 자연계 숙주인 등줄쥐를 포함한 많은 다른 실험동물에서 한탄바이러스에 의해 사람에서와 동일 소견의 질병을 일으키는 동물은 알려

져 있지 않다. 따라서 출혈 및 신부전 기전과 같은 중요한 한탄바이러스의 병원성 (pathogenesis) 연구를 위한 동물 model이나 백신 연구를 위한 적합한 동물 system은 아직 없다.

본 연구는 한탄바이러스 백신 개발에 있어서 백신의 감염 방어능 (potency)을 연구하기 위하여 challenge 시험에 이용될 동물 system을 확립하고자 하는 것이다. 따라서 이유기 (weanling) 햄스터에 마지바이러스를 challenge하기 위한 햄스터 system을 확립하기 위해 먼저, 신생 햄스터 뇌내 계대 배양 (brain passage)을 통해 햄스터의 뇌에 적응시켜 우선 신생 햄스터에서 증식하는 마지바이러스 주 (strain)를 확립하였으며 나아가 이 바이러스를 다시 이유기 햄스터의 근육내로 주사하여 수차례의 폐내 계대배양 (lung passage)으로 바이러스를 이유기 햄스터에 적응시키고자 하였다. 또한 이처럼 적응을 위한 동물 체내에서의 계대를 거듭하는 과정동안 일어날 수 있는 타종의 바이러스 감염 및 타 한탄바이러스 혈청형간의 교차오염을 성공적인 적응 결과로 잘못된 해석의 가능성을 배제하고 또한 계대과정에서 발생했을지도 모를 바이러스 자체의 유전적 변이를 확인하기 위해 각 뇌 및 폐 계대 그리고 신생 및 이유기 햄스터에서의 계대 등 계대 방식을 달리하여 증식시킨 바이러스들의 genomic RNA의 특정 염기 부위를 RT-PCR을 이용하여 증폭시킨 후, 이를 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 및 single strand conformation polymorphism (SSCP)으로 원형의 표준 마지바이러스와 비교, 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스 및 배양세포

경기도 파주군 마지리의 한국산 등줄쥐 (*Apodemus agrarius coreae*)에서 분리된 마지 바이러스 (Maaji virus) [17]와 한탄바이러스 (76-118주)로서 본 실험실에서 분리하여 -70℃에서 보관 중인 바이러스였다. 바이러스 증식과 계대에 사용된 세포는 Vero-E6 cell (CRL 158) (ATCC, Rockville, MD)이었으며, 세포의 배양과 유지에는 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 water-jacketed 37℃ incubator (Cell Star)에서 단층배양하였다. 바이러스의 배양은 passage 5~passage 15 사이의 양호한 상태의 세포로서 계대 후 70~80%의 단층이 형성된

세포에 접종한 다음 7~10일 간 배양하고 그 세포배양액을 취하여 표준 바이러스로서 햄스터 접종에 사용하였다.

### 2. 햄스터 내 바이러스 계대 및 배양

마지바이러스의 계대를 위해 신생 (newborn) 및 이유기 (weanling age)의 햄스터 (syrian hamster)를 사용하였다. 신생 햄스터는 건강한 임신 어미를 구입 (주식회사 대한실험동물센터, 충북 음성)한 다음 동물실에서 보살피며 새끼를 낳을 때까지 사육하였다. 새끼가 태어나면 생후 48시간 이내의 신생 햄스터 (new born)에 뇌내접종법 (intra-cerebral inoculation, IC)으로 표준 바이러스를 0.02ml씩 접종하고 7-14일 후에 뇌를 채취하였다. 이때 전형적인 하지 마비 여부를 관찰하였다. 채취된 뇌의 일부는 PBS로 10% suspension을 만들어 신생 햄스터에 다시 뇌내접종하여 계대하였다. 나머지의 brain suspension은 면역효소 측정법 (ELISA)에 의한 바이러스의 역가 측정을 통해 증식여부를 조사하였으며, 또한 채취된 뇌의 나머지 부분은 냉동 절편으로 만들어 간접면역형광항체법으로 바이러스의 증식 여부를 관찰하였다. 바이러스의 햄스터 뇌내 증식이 확인되면 수차례 더 계대 후, 이유기 햄스터에 근육내 접종법 (intramuscular inoculation, IM)으로 0.1ml씩 접종한 다음, 2-3 주 후 폐내에서의 바이러스의 증식을 간접면역형광항체법으로 검사하였다.

### 3. 간접면역형광항체법 (indirect immunofluorescence assay, IFA)

채취한 뇌 및 폐조직은 cryostat에서 냉동절편을 만들어 slide 상에 붙인 뒤 cold acetone으로 10분간 고정시켰다. 이 조직편에 anti-Maaji virus rat serum (1:200)을 가한 후 37℃에서 30분간 반응시키고, 인산완충 식염수 (phosphate buffered saline, PBS, PH 7.4)로 세척하였다. 건조 후 FITC-conjugated goat anti-rat IgG (Kpl, USA) (1:1000)를 가하여 일차 반응과 동일한 방법으로 반응시킨 다음, 세척, 건조하여 형광현미경 (100W, Zeiss Co, Germany)으로 400배 배율로 조직내의 특이 형광을 관찰하였다.

### 4. 면역효소측정법 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

뇌 및 폐내 계대시 바이러스 증식에 따른 조직 내 바이러스 항원가 (antigen titer)의 변화 추이를 면역효소측정법으로 조사하고자 IgM-sandwich법 [22]으로 시행하였다. 인산완충식염수 (PH7.4)로 희석한 (1:500) goat anti-human IgM (Kpl, USA)을 96-well polyvinyl U plate에 4℃, 12-24시간동안 방치하여 coating하고, washing solution (0.1% tween 20 in PBS)으로 3회 세척 후에 신증후출혈열 환자 혈청을 가해 37℃에서 30분간 반응시켰다. 동일한 방법으로 세척한 후, 바이러스 감염 조직액을 1:2-1:8000까지 2-fold로 dilution buffer (0.1% tween 20 and 2% BSA in PBS)로 희석하여 상기 plate의 well에 100μl씩 분주하고 37℃에서 45-60분간 반응시켰다. 같은 방법으로 세척한 후, 희석된 anti-Hantaan rabbit 혈청 (1:2000)을 가하여 반응시키고 다시 세척한 다음 peroxydase conjugated anti-rabbit Igs (Kpl, USA) (1:1000)를 100μl씩 가하여 반응시켰다. 세척 후에 ABTS 기질용액 (Kpl, USA) 100μl을 가하여 발색시킨 다음 ELISA reader를 사용하여 414nm에서 O.D.값을 측정하였다.

## 5. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)

### 1) Primers

동물 계대시 일어날 수 있는 타종의 바이러스에의 교차 오염 여부 및 나아가 계대를 통하여 일어날 수 있는 바이러스 염기 서열의 변화를 관찰하기 위해 여러 한탄바이러스 중에서 한탄 및 마지바이러스의 핵산만을 특이적으로 인지하여 증폭시키는 primer쌍으로서 H270과 H583를 사용하였다 [23]. 이렇게 하여 증폭되는 부위는 비교적 염기 서열의 변이가 많이 일어나는 것으로 알려진 당단백질 coding 부위로서, 이의 제한효소 분석을 통해 그 양상을 비교하고자 하였다.

### 2) 바이러스 RNA의 분리

표준 마지바이러스 및 한탄바이러스를 Vero-E6 세포 (T-25 cm<sup>2</sup>)에 감염시켜 8-12일간 배양한 다음 간접면역형광항체법으로 바이러스의 증식 여부를 확인한 후 배양액을 수합, 저속원침한 상층액으로부터, 그리고 뇌와 폐내 계대 바이러스는 햄스터 뇌와 폐내에서 계대 후에 채취한 뇌와 폐를 PBS에 10% suspension으로부터 RNA를 분리하였다.

RNA의 분리는 Chirgwin의 방법을 변형하여 사

용하였다 [24]. 위의 각 sample 150μl에 GIT buffer [6M guanidine isothiocyanate, 27.5mM Na-citrate (pH 7.0), 0.75% sarkosyl, 150mM b-mercaptoethanol, 1.5μg/ml yeast t-RNA] 300μl를 넣고 잘 섞은 다음, 1/10 volume의 2M Na-acetate (pH 4.0)를 가하고 phenol-chloroform을 처리하여, 얼음에 15분간 채워 두었다. 그 후 원심분리하여 상층액을 분리, 채취하고 여기에 400μl의 isopropanol을 첨가하여 -70℃에서 2시간 이상 정치시킨 다음 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 이 RNA 침전물은 70% ethanol로 세척하여 vacuum dryer로 건조시키고 50μl의 diethyl-pyrocabonate를 처리한 증류수 (DEPC-H<sub>2</sub>O)로 채현탁하여 RNA templates로 사용하였다.

### 3) cDNA의 합성

DNA 합성을 위한 primer로는 위의 primer pair 중에서 downstream primer (H583)를 사용하였다. 100μl volume당 RNA template 10μl, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM dNTP (Pharmacia LKB), 100 pmol primer, 10 unit의 RNase inhibitor (RNasin, Promega), AMV reverse transcriptase (2unit) (GIBCO, BRL)의 조성으로 37℃에서 2시간 반응시켜 reverse transcription시켰으며, 잔여 RNA, RTase, primer 등은 10N NaOH 5μl를 넣고 94℃에서 5분간 가열, 제거한 다음 PCR templates로 사용하였다 [25].

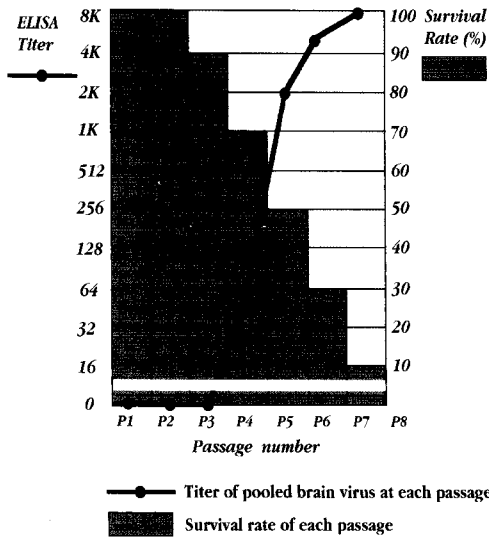
### 4) 중합효소연쇄반응 (PCR)

위에서 합성한 각 바이러스의 cDNA를 templates로 하여 총 100μl reaction volume당 50mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25℃), 0.1% Triton X-100, 1mM~3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM dNTP, primer 50pmol, 1 ml template, 2.5 unit Taq DNA polymerase (Promega)의 조성으로 해서 PCR을 수행하였다. PCR은 94℃ 40sec, 55℃ 40sec, 72℃ 2min 30sec를 한 주기로 Twin Block power cycler (Elicomp, USA)를 사용하여 30회의 thermal cycling 실시 후, 별도로 72℃에서 10분간 핵산중합반응을 더 실시하였다. 이어서 2% Nusieve GTG 1:3 agarose (FMC) 상에서 전기영동하여 증폭 여부를 관찰하였다.

## 6. PCR 생성물의 비교 분석

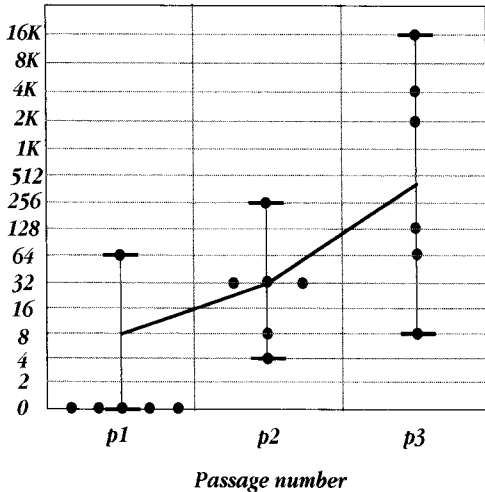
### 1) Prestriction profile length polymorphism (RFLP)

이렇게 증폭된 각 cDNA들은 제한효소분석에



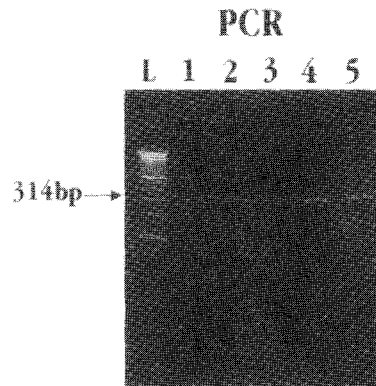
**Fig. 1.** Brain passage of Maaji virus. Using cell cultured Maaji virus, the Maaji virus was inoculated into suckling hamster intracerebrally. After 1~2 weeks, the brains were harvested and assayed by ELISA for testing the virus titers.

**ELISA titer**



**Fig. 2.** Lung passage of Maaji virus adapted in suckling hamster brain. Using Maaji virus of brain passage 7, the virus was inoculated into weanling hamster intramuscularly. After 4 weeks, the lungs were harvested and assayed by ELISA for testing the virus titers.

앞서 GeneClean kit (Bio 101, La jolla, CA., USA) 를 이용하여 정제하였다. 정제된 각 바이러스의 PCR 생성물들은 여러 제한효소 (Taq I, Alu I, Rsa I)로 37℃에서 2시간 동안 digestion시킨 다



**Fig. 3.** PCR amplification of hamster adapted Maaji virus from brain passage 4, brain passage 7 in new born hamsters and lung passage 3 in weanling hamster. Using Hantaan specific primer (270~583 of M segment), viruses of each passage were amplified by RT-PCR. All were amplified successfully showing 314bp sized PCR products which are predicted at priming site. L: 100bp ladder (Gibco,BRL), 1: brain passage 4, 2: brain passage 7, 3: lung passage 3, 4: standard Maaji virus (Maa-I), 5: Hantaan virus (76-118).

음, 4% Nusieve GTG 1:3 agarose gel 전기영동을 실시하여 제한단편 (restriction fragments)의 수 및 크기를 비교, 분석하였다.

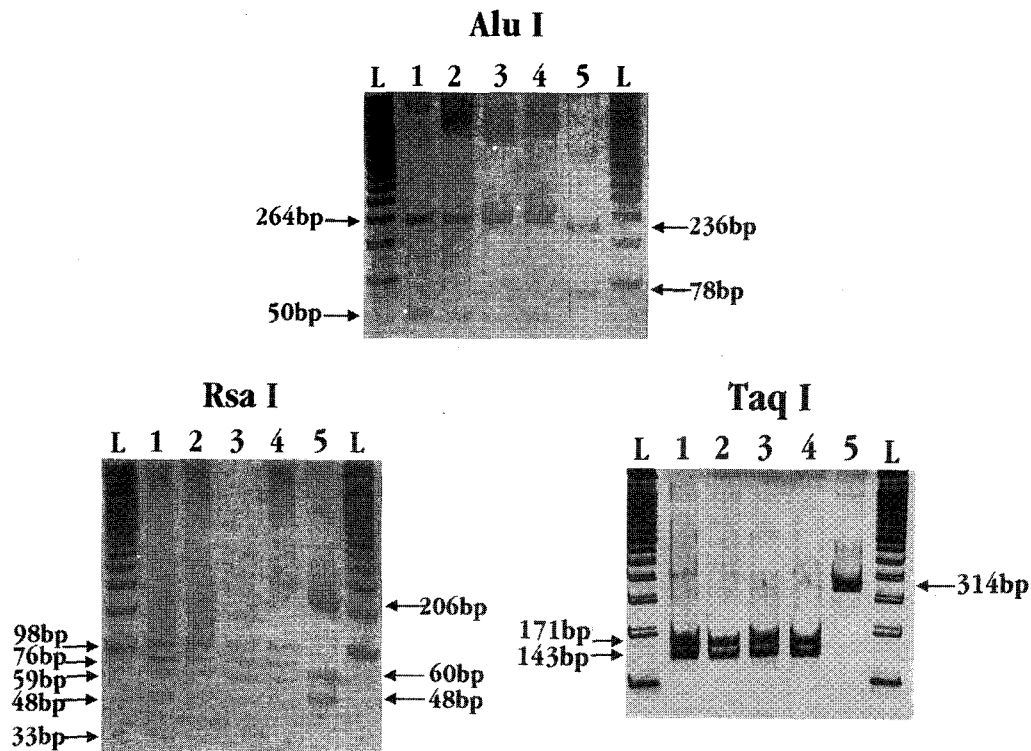
**2) Single strand conformation polymorphism (SSCP)**

위의 PCR 반응으로 얻은 생성물은 위에서 처럼 정제한 후 denaturation solution (95% formamide, 20mM EDTA, 0.05% Bromophenol Blue, 0.05% Xylene Cyanol FF)으로 100℃에서 10분간 denaturation 시켰다. 그 후 이를 6% polyacrylamide gel 에서 TBE buffer로 전기영동장치 (Novex, USA)를 사용하여 200V로 전기영동하고 이어서 gel silver staining하여 band pattern을 관찰하였다 [26].

**성 적**

**1. 신생 및 이유기 햄스터에서의 마지바이러스의 증식 및 적응 양상**

신생 햄스터에서 뇌내 계대의 각 계대별로 면역효소측정법에 의해 역가를 비교해 보면 계대가 거듭될수록 점차로 역가가 증가하는 양상을 보였다. Fig. 1에서 보듯이 계대가 계속되면서 제 7대 계대에서 그 역가가 8,000으로서 가장 높은 역가를 관찰할 수 있었다. 갑작스런 역가의 증가



**Fig. 4.** Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of cDNAs from viruses from brain passage 4, brain passage 7 in new born hamster, lung passage 3 in weanling hamster. Using Hantaan specific primer (270~583 of M segment), viruses of each passage were amplified by RT-PCR. The PCR products were digested with Alu I, Rsa I, Taq I and electrophoresised, silver stained. L: 100bp ladder (Gibco,BRL), 1: brain passage 4, 2: brain passage 7, 3: lung passage 3, 4: standard Maaji virus (Maa-I), 5: Hantaan virus (76-118).

는 관찰되지 않았으며, 따라서 점진적인 적응 양상을 보였다.

또한 이유기 햄스터에서의 폐내 계대 역시 점진적인 바이러스 역가를 보여 계대를 더해갈수록 이유기 햄스터 폐 내에서의 바이러스의 증식률이 점차 높아져서 3대 계대에서는 16,000의 역가를 나타내었다 (Fig. 2).

## 2. 뇌내 계대를 통한 신생 햄스터의 치사를 증가

바이러스의 뇌내 계대를 거듭하면 치사에 이르기까지 걸리는 시간이 점차적으로 단축되고 치사를 또한 높아짐을 알 수 있었다 (Fig. 1). 즉 처음 계대 시에는 죽는 개체가 없으나 계대가 거듭될수록 치사률이 증가하여 제7대 계대에서는 90% 이상의 치사률을 나타내었으며 치사에 이르는 시간도 14일 이상에서 약 7일로 단축되었다.

또한 신생 햄스터의 치사률은 뇌내 증식 바이

러스의 역가의 증가와 더불어 증가하는 양상을 나타내었다 (Fig. 1).

## 3. 중합효소연쇄반응에 의한 뇌, 폐 및 세포 계대 바이러스 cDNA의 증폭

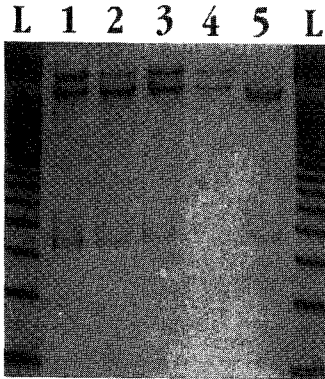
세포 계대 표준 마지바이러스와 한탄바이러스 그리고 뇌 및 폐 계대 바이러스로부터의 cDNA는 중합효소연쇄반응을 통하여 모두 증폭되었으며, 증폭된 cDNA의 크기는 priming site에서 예상할 수 있었던 바처럼 약 314 base pair였다 (Fig. 3).

## 4. PCR 생성물의 비교 분석

위의 증폭된 뇌 및 폐 계대 바이러스로부터의 cDNA는 제한효소 처리와 SSCP의 결과를 표준 한탄 및 마지바이러스의 그것과 비교함으로써 적응된 바이러스가 틀림없는 마지바이러스임을

# SSCP

## 고찰



**Fig. 5.** Single strand conformation polymorphism (SSCP) of cDNAs of viruses from brain passage 4, brain passage 7 in new born hamster, lung passage 3 in weanling hamster. Using Hantaan specific primer (270~583 of M segment), viruses of each passage were amplified by RT-PCR. The PCR products were heated with denaturation buffer to make single strand and electrophoresised, silver stained. L: 100bp ladder (Gibco,BRL), 1: brain passage 4, 2: brain passage 7, 3: lung passage 3, 4: standard Maaji virus (Maa-I), 5: Hantaan virus (76-118).

입증하고자 하였다.

### 1) Restriction profile length polymorphism (RFLP)

증폭된 뇌 및 폐내 계대 바이러스의 cDNA는 표준 마지바이러스와 한탄바이러스의 cDNA와 함께 제한효소 Taq I, Alu I 및 Rsa I 을 처리한 결과, Fig 4에서 보는 바처럼 한탄 및 마지바이러스는 기지의 염기서열로부터 예상되는 크기의 digests에 의한 서로 다른 restriction profiles을 나타내었다. 뇌 및 폐 계대 바이러스는 마지바이러스와 동일한 그러나 한탄바이러스와는 다른 profiles를 나타냄으로서 햄스터에서 증식하는 바이러스는 마지바이러스임이 증명되었다.

### 2) SSCP에 의한 마지바이러스의 증명

한탄바이러스와 표준 마지바이러스의 migration patterns는 Fig. 5에서 보는 바처럼 서로 분명히 달랐으며, 또한 이와 비교된 뇌 및 폐내 계대 바이러스의 SSCP pattern들은 마지바이러스의 그것과 동일하였다. 따라서 이 결과는 위의 RFLP의 결과와 더불어 햄스터에 성공적으로 계대, 적응된 계대에 성공적으로 바이러스가 마지바이러스임이 재입증되었다.

현재 확립되어있는 한탄바이러스속(屬)에는 적어도 한탄, 서울, 푸우말라 및 프로스펙트힐 바이러스의 네가지 혈청형이 존재한다. 이들은 서로 유사하지만 분명히 다른 혈청학적, 분자생물학적인 특성과 아울러 생물학적 특성을 지닌다. 또한 자연계에서의 이들 한탄바이러스의 숙주는 각 혈청형에 따라 서로 그 종을 달리한다.

우리나라 및 중국을 포함하는 동아시아 지역과 극동 소련지역에서 신증후 출혈열을 일으키는 바이러스인 한탄바이러스는 자연계에서 등줄쥐 (*Apodemus agrarius coreae*)를 숙주로 해서 증식한다. 그러므로 바이러스의 배양을 위한 실험동물이 확립되기 이전에는 실험 동물화시킨 등줄쥐를 이용하여 바이러스의 배양이 이루어졌다. 그 후 한탄바이러스의 배양에 생후 48시간 이내의 신생 (new born)마우스의 뇌 내에 바이러스를 직접 접종하는 방법이 확립되었다. 이 배양계에서 마우스는 2-3주 후에 심한 마비와 함께 뇌염으로 사망하며, 사망한 마우스의 뇌에는 다량의 바이러스가 증식함이 보고된 바 있다 [20]. 이때, 계속되는 뇌내 계대는 점진적인 ELISA 역가의 증가를 유발해서 세포에서 배양하던 바이러스의 마우스의 뇌내 접종 초기의 역가는 미미하였으나 거듭된 계대의 결과, 높은 ELISA역가(8.000 이상)를 나타내었다. 이같은 현상은 계대가 거듭되면서 마우스의 뇌내 환경에서 자랄 수 있는 바이러스 집단내에서 선택 (selection)의 결과, 마우스의 뇌내에서의 증식이 잘 일어날 수 있는 바이러스 주 (strain)로 적응 (adaptation)된 것으로 해석할 수 있다.

마지바이러스는 바이러스학적 성질에 있어 한탄바이러스와 매우 유사하지만 nucleocapsid protein (NP)에 대한 반응성으로는 오히려 Prospect Hill 바이러스와 유사성을 나타낸다 [17]. Prospect Hill 바이러스는 Puumala 바이러스와는 항원성 및 여러 바이러스학적 성질이 매우 유사한바, *in vivo* 배양계에 있어서 Puumala 바이러스는 Mongolian gerbil을 이용하여 배양이 가능하며 [27] 또한 햄스터에서도 증식된다 [29]. 따라서 마지바이러스의 실험동물에서 뇌 증식 양상이 Puumala 바이러스의 그것과 유사할지도 모른다는 가정 하에 실험동물로서 잘 알려져 있으며 이용

이 편리한 햄스터를 선택하였고, 먼저 신생 햄스터를 거쳐 이유기 (weanling age)로의 전환을 통해 이유기 햄스터에서의 적응 (adaptation)을 시도하였다.

한탄 바이러스의 신생 마우스 증식계에서 나타나는 특징 중 하나는, 감염 마우스의 뇌 부유액을 젓빨이 마우스의 뇌내에 접종하여 계대를 계속하면 마비나 사망하기 까지 소요되는 기간이 점차 짧아지고, 마비 및 사망하는 개체수도 점차 늘어나는 현상이다. 마지바이러스의 햄스터 증식계에서의 특징 또한 신생 마우스 증식계와 동일한 것으로 나타났다. 이외에도 마지바이러스는 *in vitro*에서의 배양은 다른 한탄바이러스들과 마찬가지로 African green monkey kidney에서 유래한 Vero E-6 세포를 이용하여 가능하다. 따라서 이 세포는 한탄바이러스와 더불어 마지바이러스의 분리 및 증식을 위한 *in vitro* 배양제로서 사용된다 [28].

숙주내 바이러스의 증식성에 관한 모종의 변화는 바이러스가 변화된 숙주환경 내에서의 생존과 증식을 위해서 점차 특정 숙주의 생물학적 환경에 적응하여 나가는 것으로 해석된다. 즉 계속적인 동물 체내에서의 바이러스의 계대가 자연상태에서는 숙주로 역할하지 않는 어떤 실험동물에서 증식하도록 증식성을 변화시켜 특수 환경에 적응된 바이러스 주 (strain)로서의 어떤 변화를 제공해주는 것으로 보인다. 이러한 현상을 통해 마우스에서와 마찬가지로 햄스터에 적응시킨 마지바이러스주의 확립이 가능하였으리라 여겨진다.

백신 candidate의 challenge 시험을 위해서는 면역학적 기능이 미성숙한 suckling age의 동물보다는 면역학적 기능을 포함한 각종 생리적 기능이 성숙한 상태의 이유기의 동물이 필수적으로 요구된다. 그러므로 이유기 햄스터에서 적응하여 잘 증식하는 마지바이러스 주의 확립은 신증후출혈열의 백신으로서의 마지바이러스 백신의 개발을 위한 바람직한 challenge system이 확립되었다는 점에서 매우 중요하다 할 것이다.

## 결 론

본 연구는 신증후출혈열의 예방백신으로서 한탄바이러스 백신 개발을 위해 백신의 효능 평가를 위한 challenge 시험에 적합한 이유기

(weanling age)의 실험동물 system을 확립하고자 하는 것이다. 따라서 잘 알려진 실험동물 중의 하나인 햄스터에서 증식하는 마지바이러스 주 (strain)를 확립하기 위하여 먼저 표준 마지바이러스를 신생 (new born) 햄스터에서 뇌내 계대 배양 (brain passage)를 통해 바이러스를 신생 햄스터의 뇌에 적응시킨 다음, 이 바이러스를 다시 이유기 햄스터의 근육내로 주사로 뇌내 계대 배양 (lung passage)을 하였다. 뇌 및 폐에서의 바이러스의 증식 모두 계대의 초기에서는 매우 낮은 역가의 바이러스가 검출되었으나 계대가 거듭되면서 점차 높은 역가를 나타내어 최종 이유기 햄스터에서는 높은 증식률을 나타내었다. 치사를 또한 계대가 계속되면서 증가하여 신생 햄스터에서 7대 이후에서는 100%의 치사율을 나타내었으며 치사에 걸리는 시간도 일주일 이상 단축되었다. 이처럼 이유기 햄스터에서 적응, 증식하는 바이러스 주는 표준 마지바이러스에서 유래된 자손 (progeny) 바이러스임을 증명하기 위하여 뇌 및 폐 계대 바이러스의 G2 glycoprotein coding 부위인 M분절 RNA의 270-583 부위를 역전사 중합효소연쇄반응법 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 증폭시킨 후, restriction profile length polymorphism (RFLP) 시험으로 그 profile을 표준 한탄 및 마지바이러스의 그것과 비교하였다. 또한 single strand conformation polymorphism (SSCP) 시험으로 표준 마지바이러스와의 동질성을 비교한 결과 이유기 햄스터에서 최종 계대시 증식하는 바이러스는 마지바이러스임이 입증되었다.

## 참 고 문 헌

1. World Health Organization: Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Memorandum from a WHO meeting*. Bull WHO 61:269-275, 1983.
2. Lee HW and Lee PW: Korean hemorrhagic fever. I. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Kor J Intern Med* 19:371-383, 1976.
3. McCormick JB, Sasso DR, Palmer EL and Kiley MP: Morphological identification of the agent of Korean hemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the Bunyaviridae. *Lancet* 1:765-786, 1982.
4. White JD, Shirey FG, French GR, Huggins JW,



- Brand OM and Lee HW: Hantaan virus, a etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, has Bunyaviridae-like morphology. *Lancet* 1: 768-771, 1982.
5. Schmaljohn CS and Dalrymple JM: Analysis of Hantaan virus RNA: Evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virology* 131:482-491, 1983.
  6. Elliott LH, Kiley MP and McCormick JB: Hantaan virus: Identification of virion proteins. *J. Gen. Virol* 65:1285-1293, 1984.
  7. Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, LeDuc JW, Lee HW, von Bonsdorff CH, Brummer-Korvenkontio 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* 227:1041-1044, 1985.
  8. Lee PW, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Yanagihara RT: Serotypic classification of hantaviruses by the indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests. *J Clinical Microbiol* 22:940-944, 1985.
  9. Lee PW, Lee HW: Serotypic classification of hantaviruses by the indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests. *J Kor Soc Virol* 16:29-37, 1986.
  10. Lee HW, Back LJ and Johnson KM: Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever from wild urban rats. *J Infect Dis* 146:638-644, 1982.
  11. Burmmer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, Von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Dker-Blom N and Laehdevirta J: Nephropathia epidemica: Detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* 141:131-134, 1980.
  12. Lee PW, Amyx HL, Gajdusek DC, Yanagihara R, 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.
  13. Elwell MR, Ward GS, Thigpalapong M and Leduc JW: Serologic evidence of Hantaan-like virus in rodents and man in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 16:349-352, 1985.
  14. Carey DE, Reuben R, Panicker KN, Shope RE and Myers RM: Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from shrew in India. *Indian Journal of Medical Research* 59: 1758-1760, 1971.
  15. Gligic' 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 and Gajdusek DC: Belgrade virus: a new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J Infect Dis* 166:113-120, 1992.
  16. Hughes JM, Peters CJ, Cohen ML and Mahy BWJ: Hantavirus pulmonary syndrome: An emerging infectious disease. *Science* 262:850-851, 1993.
  17. Lee PW, Jeong DH and Kim YC: Maaji virus: I. Identification and antigenic characterization of new hantavirus isolated from Apodemus mice (*Apodemus agrarius coreae*) in Korea. *J Kor Soc Virol* 22:192-196, 1992.
  18. Lee PW, Chung DH and Kim YC: Maaji virus: II. Molecular characterization of a new hantavirus isolated from Apodemus mice (*Apodemus agrarius coreae*) in Korea. *J Kor Soc Virol* 22:197-205, 1992.
  19. Lee PW and Chung DH: Nucleotide sequence analysis of Maaji viral cDNA amplified by Hantaan virus specific primers. *J Kor Virol* 23: 57-67, 1993.
  20. Tsai TF, Bauer S, McCormick JB and Kurata T: Intracerebral inoculation of suckling mice with Hantaan virus. *Lancet* 2:503-504, 1982.
  21. Lee PW, Amyx HL, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC and Lee HW: Propagation of Korean hemorrhagic virus in laboratory rats. *Infection and Immunity* 31:334-338, 1981.
  22. Meegan JM and LeDuc JW: Enzyme immunoassay. Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome. In: Lee HW, Dalrymple JM (eds.) WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research (HFRS). Institute for Viral Diseases, Korea university, Seoul. pp. 83-87, 1989.

23. Lee PW, Jeong DH and Song SW: Detection and serotypic differentiation of hantaviruses using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *J Kor Soc Microbiol* 29:79-83, 1994.
  24. Choczynski P and Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156, 1987.
  25. Puthavathana P, Dobbs M, Baek LJ, Chu YK, Lee HW and Kang CY: Comparison of nucleotide sequences among hantaviruses belonging to the same serotype: an analysis of amplified DNA by thermal cycle sequencing. *Virus Research* 30:161-169, 1993.
  26. MacPherson MJ, Quirke P and Taylor GR: PCR: a practical approach: IRL press. New York. 67-83, 1991.
  27. Yanagihara R, Goldgaber D and Gajdusek C: Propagation of nephropathia epidemica virus in monglian gerbils. *J Virol* 53:973-975, 1985.
  28. 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.
-