大韓바이러스學會誌 : 第 29 卷 第 4 號 1999
J. Korean. Soc. Virology, Vol. 29, No. 4, 1999

Vero-E6 세포에서 한탄바이러스의 증식에 관한 전자현미경적 연구

고려대학교 의과대학 미생물학교실, 고려대학교 부설 바이러스병연구소

박 경 희 · 성 인 화*

=Abstract=

Electron Microscopic Study on the Replcation of Hantaan Virus in Vero-E6 Cells

Kyung Hee Park and Inwha Seong*

Department of Microbiology, Medical College, Korea University
Institute for Viral Diseases, Korea University

Results of the studies on the morphologic and molecular biologic characteristics of Hantaan virus (HTNV), one of the etiologic agents of Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), revealed that HTNV was a member of Family Bunyaviridae and its RNA divided into three segments. And the nucleotide sequences of these segments also were known and the differences in nucleotide sequences of HTNV from other members of genus Hantavirus were clearly evaluated. But the morphorgenesis, pathogenesis of HFRS and the replication time had not been clearly determined.

In this study, to estimate the replication time of HTNV in Vero E-6 cells, Vero cells were infected with HTNV 76/118 strain, and cells were harvested from two hours post-infection up to 24 hours at two hours-intervals. Harvested cells were treated with ordinary techniques for electron microscopy and immune-electron microscopy. And then thin sections were observed under transmission electron microscope. HTNV particles were not found in the cytoplasm and in the extracellular space between 2~8 hours after inoculation of virus, but virus particles were observed in extracellular space near the cell membrane of Vero-E6 cells 10 hours after infection. In immune electron microscopy, mature HTNV particles in extracellular spaces and immature virus labelled with gold particles in the cytoplasm of Vero E-6 cell 10 hours after infection of HTNV could be seen. This results suggest that the replication time of HTNV might be about 10 hours.

Key Words: Hantaanvirus, Vero-E6 cells, Replication

서 론

1951-1953년 한국동란 중 중부전선에 주둔하였던 유엔군 병사들에게서 고열, 출혈, 신부전을 동반하는 급성 열성질환 환자가 약 3,200명이 발생하여 일부 환자들이 쇼크 및 신부전 등으로 10~15%의 사망률을 나타내자 미국인들은 한국형 출

접수 : 1999년 9월 27일, 논문게재확정 : 2000년 1월 18일
책임저자 연락처: 박경희, 서울시 성북구 안암동 5가 126-1, 고려대학교 의과대학 미생물학교실, 고려대학교 부설 바이러스병연구소 Tel: 02) 920-6167, Fax: 02) 923-3645, e-mail: inwha@kuccnx.korea.ac.kr

혈열이란 이름으로 불렀으며 많은 학자들의 연구를 통하여 그 임상 상은 알려졌으나 원인 병원체를 규명하지는 못 하였다 [1, 15, 29, 31, 37]. 한국형 출혈열과 유사한 질병들이 그 이전에도 있었음을 기록을 통하여 볼 수 있다. 가장 오래된 기록은 중국의 의학서로 보이나 [27] 최초의 확실한 보고는 1913년 러시아의 블라디보스톡에서 발생한 경우였으며 1930년대에는 소련의 아므르강 지역에서 발생하여 소련학자들은 출혈성 신우신장염이라고 명명하였다 [4]. 그 이후 이차대전중인 1940년초 만주에 주둔하고 있던 일본군에서 만 여명의 출혈열 환자들이 발생하여 유행성 출혈열이란 이름으로 불리웠다 [30]. 이 출혈열의 병원체를 규명하고자 많은 사람들이 오랜 기간 노력하였으나 밝혀내지 못하였다. 1976년 한국의 출혈열 다발생 지역에서 채집된 등줄쥐의 폐조직과 신장조직에서 한국형 출혈열 환자의 회복기 혈청과 특이하게 반응하는 항원이 발견되어 'Korea antigen'으로 불리웠고 [19] 이 항원이 바이러스임이 밝혀져 신증후출혈열의 다발생지역에 있는 한탄강의 이름을 따서 한탄바이러스로 명명되었다 [14]. 그 이후 출혈열에 대한 연구가 진행됨에 따라 한탄바이러스를 항원으로 하는 혈청학적 진단법이 확립되어 한국에서 발생하는 한국형 출혈열 (Korean hemorrhagic fever), 러시아에서 발생하는 출혈성 신우신장염 (hemorrhagic nephrosonephritis), 중국과 일본에서 발생하는 유행성 출혈열 (epidemic hemorrhagic fever)과 스칸디나비아에서 발생하는 유행성 신장병증 (nephropathia epidemica)가 임상증상이 비슷하며 그 원인 바이러스들의 성상들도 유사함이 밝혀져 [3, 15, 17, 20, 21, 22] 1983년 세계보건기구는 이 질병들을 한타바이러스속 (genus Hantavirus)에 포함시켜 분류하고 신증후출혈열 (hemorrhagic fever with renal syndrome)이란 이름으로 부르기로 결정하였다 [44]. 한타바이러스 속으로 분류되는 바이러스들은 한탄바이러스를 비롯하여 서울바이러스, Puumala 바이러스, Prospect Hill바이러스를 비롯하여 32종이 알려져 있다. 한국에서는 매년 1,000명 이상의 환자가 발생하고 있고 중국에서는 매년 5만 내지 10만 명의 환자가 발생하고 있으며, 세계적으로 약 150,000명의 환자가 매년 발생하여 3~7%의 사망률을 나타내는 질병이지만 현재까지 대증적인 치료 외에는 효과적으로 출혈열 바이러스의 성장을 억제시킬 수 있는 항바이러스제가 개발되어 있지 않은 실정이다 [10, 17].

많은 연구에도 불구하고 신증후출혈열의 발생기전이나 병인론은 아직 명확하게 규명되지 않았지만 [11, 12, 23-25, 39-41, 45, 46-51] 한타바이러스 속의 바이러스들이 혈청학적, 전자현미경적 [9, 28, 38, 42] 및 분자생물학적 연구에 의하여 RNA 바이러스이며 Bunyaviridae과의 바이러스임이 증명되었으며 [7, 32-35] 1986년 이후부터 한탄바이러스의 RNA가 L, M, S의 세 segments로 되어 있다는 것과 각 segments의 염기서열이 밝혀지기 시작하여 최근에는 한타바이러스 속에 속한 거의 모든 바이러스의 염기서열의 차이점들과 외피에 있는 구조물의 성상까지도 규명되어 있다 [6, 35, 37, 46]. 그러나 현재까지 한탄바이러스를 비롯한 한타바이러스 속의 어떤 바이러스도 그 바이러스의 증식에 소요되는 시간에 대한 것은 연구된 바 없다.

따라서 본 연구는 한타바이러스 속으로 분류되는 바이러스 중에서 신증후출혈열의 prototype 바이러스인 한탄바이러스가 세포 내에서 증식되어 세포 외로 방출되는데 소요되는 시간을 전자현미경법과 면역전자현미경법을 통하여 규명하고자 실시되었다.

재료 및 방법

1. 바이러스와 Vero-E6 세포에 바이러스 접종

한탄바이러스 76/118주를 Vero-E6세포에 5대 계대한 배양 상청액을 ($2x10^6$ FFU/ml)을 사용하였다. Vero-E6 세포 (ATTC1008, CRL1586) Monolayer (82mm x 90mm)에 배양 상청액 10 ml를 넣어 37℃에서 90분간 흡착시켰다.

2. 감염된 세포 처리

멸균된 인산완충식염수로 세척한 다음 트립신 처리하고 세척한 후 원심분리하여 얻은 세포들을 DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium) 30 ml에 부유하고 12-well plate (well 직경: 25 mm)의 각 well에 세포 부유액을 2.5 ml씩 가한 다음 37℃ 5% CO_2 incubator에 보관하였다.

Incubator에 보관한 plate는 감염시킨 시간부터 24시간까지 2시간 간격으로 각 well의 배양액을 제거하고 인산완충액으로 3회 세척한 다음 immune electron microscopy (IEM) 고정액 (20% paraformaldehyde 10 ml, 50% glutar-aldehyde 0.2 ml, phosphate buffer pH 7.4 90 ml) 2 ml를 가하였다.

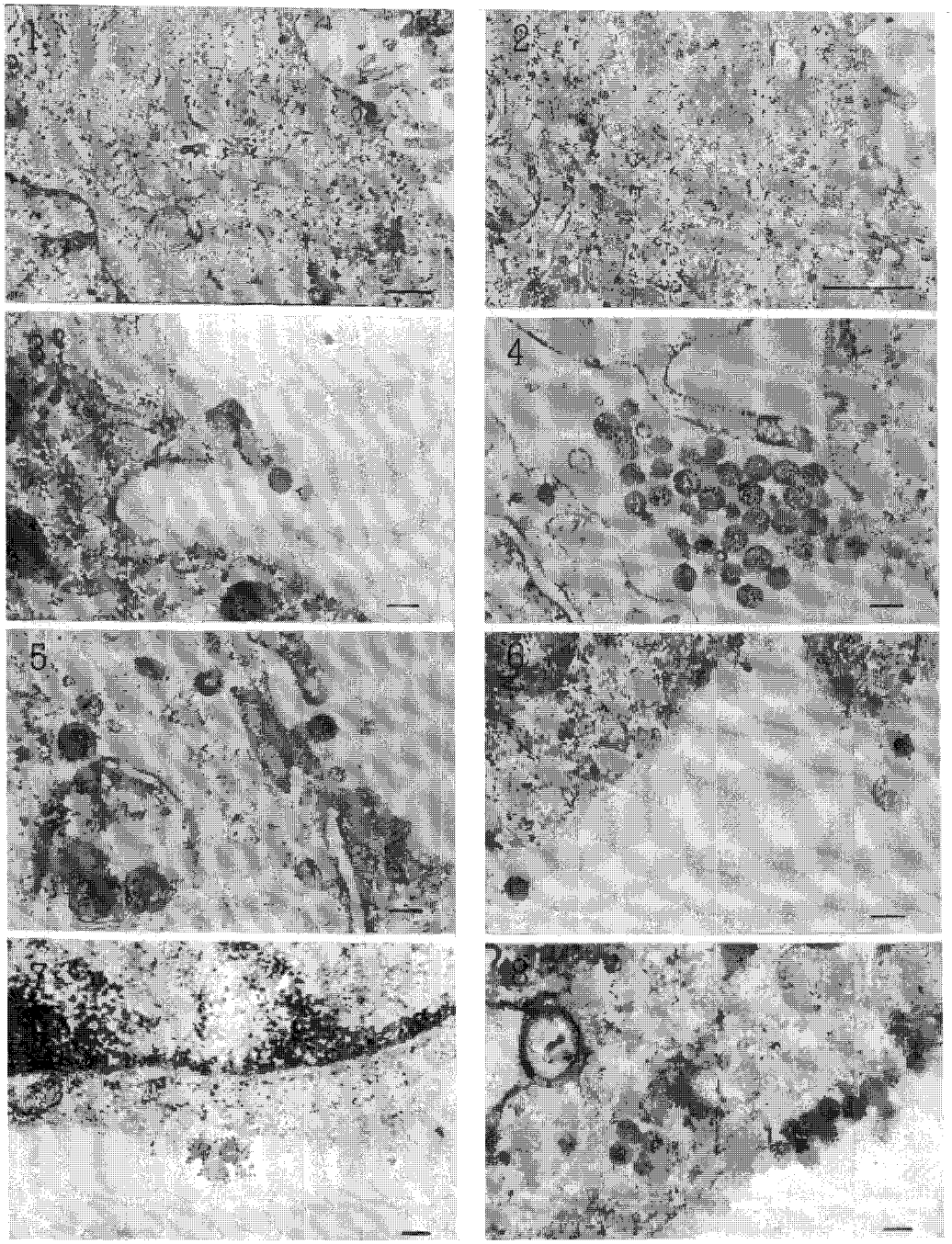

Figure 1. Vero-E6 cell, 6 hours post-infection (x 10,000, bar: 1 μm). **Figure 2.** Vero-E6 cell, 8 hours post-infection (x 20,000, bar: 0.5 μm). **Figure 3.** Hantaan virus particle in extracellular space (Vero-E6 cell, 10 hours post-infectionof HTNV x 35,000, bar: 100 nm). **Figure 4.** Hantaan virus particles in intercellular space (Vero-E6 cell, 14 hours post-infection, x 35,000, bar: 100 nm). **Figure 5.** Hantaan virus in extracellular space (Vero-E6 cell, 10 hours post-infection colloidal gold stain, x 35,000, bar: 100 nm). **Figure 6.** Hantaan virus particles in extracellular space (Vero-E6 cell 10 hours post-infection, colloidal gold stain, x 35,000, bar: 100 nm). **Figure 7.** Hantaan virus particles on cell membrane (Vero-E6 cell, 10 hours post-infection colloidal gold stain, x 30.000, bar: 100 nm). **Figure 8.** Hantaan virus particles on cell membrane (Vero-E6 cell, 12 hours post-infection, colloidal gold stain, x 30,000, bar: 100 nm).

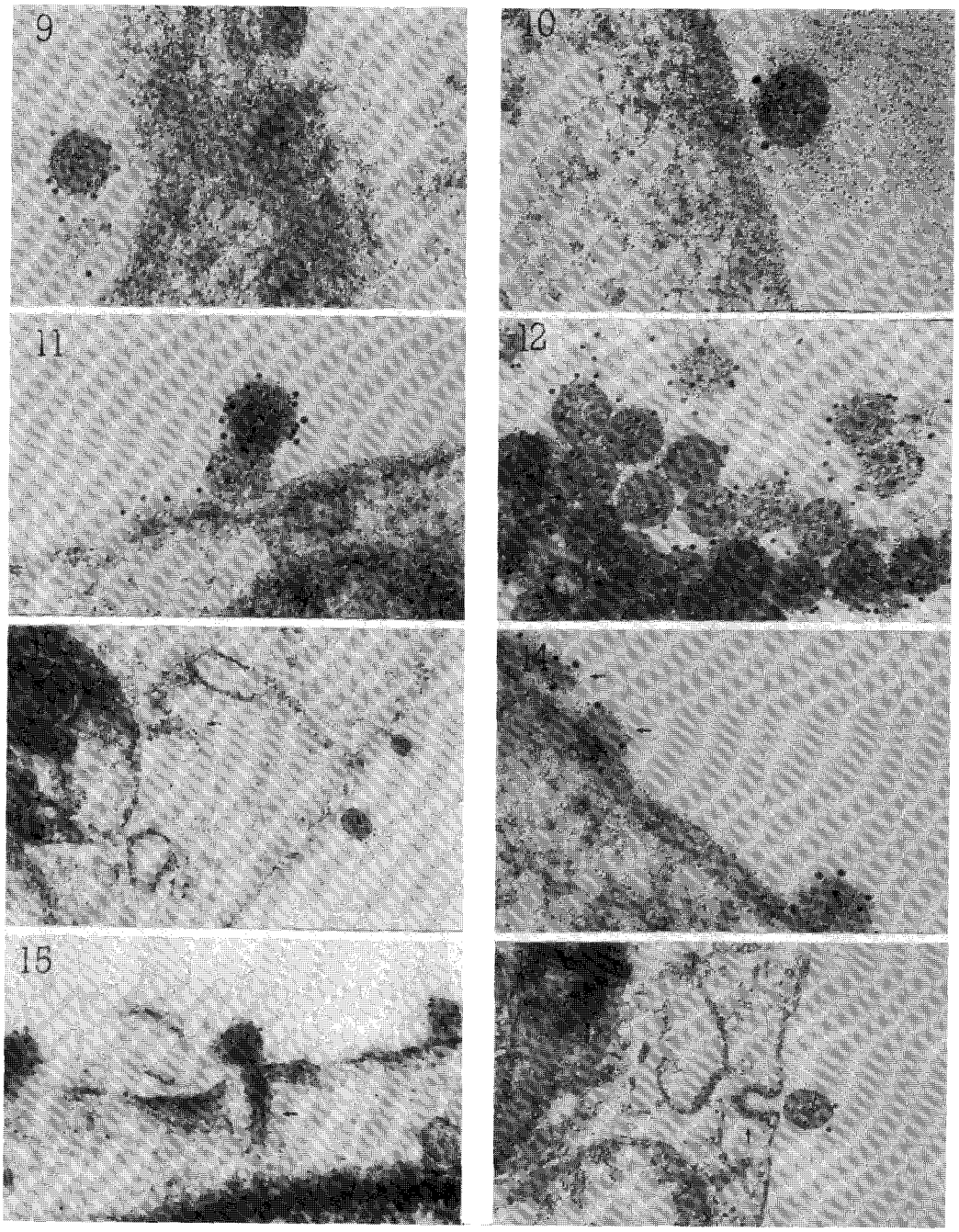

Figure 9. Hantaan virus particles on cell membrane (Vero-E6 cell, 12 hours post-infection, gold particle: 10 nm, x 70.000). **Figure 10.** Hantaan virus with gold particles (Vero-E6 cell, 12 hours post-infection, gold particle: 10 nm, x 100,000). **Figure 11.** Virions on the cell membrane of Vero cell (12 hours post-infection, gold particle: 10 nm, x 80,000). **Figure 12.** Virions with gold particles in intercellular space (Vero-E6 cell 18 hours post-infetion, gold particle: 10 nm, x 70,000). **Figure 13.** Immature virus particles (Vero-E6 cell, 10 hours post-infection colloidal gold stain, x 35,000, bar: 100 nm). **Figure 14.** Virus-associated protein (arrow) (Vero-E6 cell 12 hours post-infection, colloidal gold stain, x 80,000, bar: 100 nm). **Figure 15.** Tubular structure connecting Hantaan virus (arrow) (Vero-E6 cell, 12 hours post-infection, colloidal gold stain, x 50,000, bar: 100 nm). **Figure 16.** Hantaan virus virion and invagination of cell membrane (Vero-E6 cell, 12 hours post-infection, colloidal gold stain, x 60.000, bar: 100 nm).

3. 전자현미경 시료 제작 및 관찰

각 well의 고정액을 제거한 후 인산완충액 (pH 7.4)으로 3회 세척한 다음 세포들을 긁어내어 인산완충액에 부유하고 conical tube에 넣어 2,000 rpm에 15분간 원심분리한 다음 세포덩어리를 약 1 m^3 크기로 잘라 2% glutaraldehyde 용액에 넣어 1시간 동안 고정하였고 인산완충액으로 세척한 후 1% osmium tetradoxide 용액에 넣어 후 고정하였다. 0.5% uranyl acetate 용액으로 1시간 염색한 후 탈수과정을 거쳐 Epon 812에 포매하였다. 면역전자현미경용 시료 제작을 위하여 IEM 고정액으로 고정한 세포를 세척하고 1% bovine albumin 인산완충액으로 30분간 안정화시켰으며 한탄바이러스의 항원에 대한 다클론 항체 (from Pathology Division, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases)를 가하여 실온에서 2시간 반응시킨 다음 세척하고 colloidal gold reagent (Protein A-Gold reagent, 10 nm in DM, Jansen Life Science Products)를 가하여 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척 후 통상 방법대로 2% glutaraldehyde와 1% Osmium tetra oxide 용액으로 고정하고 세척, 탈수하여 Epon 812에 포매하였다. Ultramicrotome (LKB)으로 초박절편한 것을 5% uranyl acetate와 Reynold's lead citrate 염색한 후 투과전자현미경 (JEOL)으로 관찰하였다.

결 과

한탄바이러스를 접종한 후 2, 4, 6, 8시간이 경과한 세포에서는 colloidal gold 염색을 한 것이나 염색하지 않은 모든 세포에서 한탄바이러스 입자를 전혀 관찰할 수 없었고 (Figure 1, 2), 접종 후 10시간 경과한 세포에서부터 한탄바이러스 입자가 관찰되기 시작하였는데, 구형의 바이러스 입자는 이중막으로 된 외피를 가지고 있었으며 외피 밖에 돌기들을 갖고 있는 전형적인 한탄바이러스로 이미 세포 밖으로 배출되어 있었고 세포질 내에서는 바이러스 입자를 관찰할 수 없었다 (Figure 3). 접종 후 14시간이 경과한 세포에서는 많은 수의 바이러스 입자들이 intercellular space에서 관찰되었고 24시간이 경과한 세포에서는 보다 많은 바이러스들이 관찰되었다 (Figure 4).

Colloidal gold염색한 세포에서도 마찬가지로 10시간 경과한 세포에서부터 이중막으로 된 외피 밖에 있는 돌기들에 gold 입자들이 결합되어 있는 한탄바이러스 입자들을 관찰할 수 있었고 바이러스의 크기는 대개 100~120 nm 정도였다 (Figure 5-12). 10시간이 경과한 다른 세포에서 세포질 내에 colloidal gold 입자와 결합되어 있는 미성숙 바이러스들 (Figure 13)과 virus-associated protein으로 보이는 구조물이 관찰되었으며 이와 비슷한 구조물이 세포 밖에서도 관찰되었다 (Figure 14). 접종 후 12시간이 경과한 세포에서 세포막에 붙어 있는 바이러스 입자와 연결된 관 같은 구조물이 관찰되었고 (Figure 15) 또 다른 세포에서는 세포막이 함입되어 있고, 바로 그 옆 세포밖 공간으로 나와 있는 한탄바이러스를 관찰할 수 있었는데 이는 한탄바이러스의 morphogenesis 과정중 budding 시에 생기는 것으로 보여진다 (Figure 15, 16).

세포질 내에서 Hung 등 [9]이 한탄바이러스를 Vero-E6세포에 접종한 후 12일에 채취한 세포에서 발견하였다고 보고된 inclusion body는 찾아 볼 수 없었다.

고 찰

한탄바이러스는 Family Bunyaviridae에 속한 RNA바이러스인데 Buntaviridae에는 genus Bunyavirus, genus Hantavirus, genus Nairovirus, genus Phlebovirus 및 genus Tospovirus 등이 있으며, 각 genus의 prototype 바이러스들은 Bunyamwera, Hantaan, Crimean-Congo hemorrhagic fever, sandfly fever Naples 및 Uukuniemi이다. Bunyaviridae과에 속한 바이러스들의 대부분은 절족동물에서 분리되거나 절족동물을 통하여 전파되지만 한타바이러스 속의 바이러스들은 설치류의 배설물내로 배출된 바이러스가 공기중에 분말상태로 있다가 호흡기를 통하여 전파된다. 한탄바이러스는 서울바이러스, Puumala바이러스, Prospect Hill바이러스와 같이 genus Hantavirus에 속한 바이러스이다. 한타바이러스 속의 바이러스들은 지질 용매에 예민한 외피를 가지고 있으며 90~120 nm 크기의 구형 바이러스로 외피 안쪽에 세 개의 분절로 나누어진 RNA를 갖고 있는 nucleocapsid를 가지고 있다. 한탄바이러스의 형태를 처음으로 관찰한 McCormick 등 [28]과 White 등 [43]으로, McCormick 등은 한탄바이러스 76-118주를 A549세포에 접종한 다음 7일에서 10일까지의 배양 상청액을 합친 것을, White 등은 바이러스 접종 후 12일간 배양한 세포

를 드라이아이스 내에 얼렸다가 녹인 것에 배양 상청액을 합한 것을 음성 염색하여 전자현미경하에서 Bunyaviridae에 속한 바이러스와 유사한 바이러스를 관찰하였고 Hung [9]은 한탄바이러스 Chen strain을 접종한 A549 세포를 10일간 배양한 다음 간접 형광항체법으로 바이러스의 증식을 확인한 다음 Protein A-Gold를 사용하는 면역전자현미경 술기를 통하여 세포내에서 한탄바이러스를 관찰하였으며 Seong등 [38]은 거위혈구와 응집반응을 일으킨 한탄바이러스를 통상적인 전자현미경법과 Protein A-gold를 사용하는 면역전자현미경법으로 관찰하였다.

Bunyaviridae에 속한 바이러스들의 복제과정은 첫째, 바이러스 단백과 숙주세포의 수용체 사이의 상호작용에 의하여 이루어지는 흡착이고, 둘째는 virion의 endocytosis, 바이러스 외피와 endosomal membranes와의 융합에 의한 침투와 탈외피이고. 셋째, 일차 전사로 viral-complemtary mRNA species와 Host-cell-derived primer들 및 virion-associated polymerase의 합성이 이루어지는 단계이며, 넷째, mRNA의 일차 L, S, M segments의 번역이 이루어지는 단계이다. 다섯째, genomic RNA의 template로 작용할 viral-complementary RNA의 합성과 encapsidation이 이루어지는 단계이며, 여섯째, genome의 복제가 이루어지는 단계이고, 일곱째, 이차 전사가 일어나는 단계로 mRNA가 대량으로 합성된다. 여덟 번째, 번역과 RNA 복제가 계속되는 단계이다. 아홉 번째, 형태발생단계로 Golgi cisternae 속으로의 발아과정이 있다. 마지막으로 열 번째 단계로 cytoplasmic vesicles이 세포막과 융합되고 바이러스 입자가 배출된다 [36]. 이처럼 Bunyaviridae에 속한 바이러스의 복제과정이 밝혀졌지만 각각의 단계에 소요되는 시간에 관하여는 현재까지 밝혀진 바가 없어 전체 소요되는 시간을 알 수 없다. 이제까지 알려진 중요한 바이러스들의 eclipse period를 보면 Poliovirus가 1~2시간으로 가장 짧고 Togavirus와 Vesicular stomatitis virus가 2시간이고, Reovirus는 3시간, Influenza-virus와 Herpes simplex virus는 3~5시간, Poxvirus가 4시간, Adenovirus가 8~10시간이며 Polyomavirus가 12~14시간으로 가장 길며 이 시간들은 대개 동위원소를 사용하여 측정한 것이다. 증식에 소요되는 대략의 전체시간인 one-step growth cycle의 duration은 바이러스의 종류에 따라 eclipse period에 차이가 있는 것처럼 차이가 있어 Poliovirus가 6~8시간으로 가장 짧고, 가장 긴 것은 Polyomavirus와 Adenovirus로 48시간이며 그 다음이 Herpes simplex virus로 24~36시간, Influenzavirus는 18~36시간, Reovirus는 15시간, Togavirus가 10시간, Vesicular stomatitis virus가 8~10시간이다 [26, 43].

본 연구에서는 Vero-E6세포에 한탄바이러스 76/118 strain을 접종한 후 2~24시간 동안 두 시간 간격으로 세포를 채취하여 한탄바이러스의 증식을 조사하였는데 접종 후 8시간까지는 한탄바이러스 입자가 관찰되지 않았으나 10시간에는 한탄바이러스 virion이 이미 세포 밖으로 배출되어 있음을 확인할 수 있어서 한탄바이러스 76/118 strain은 vero세포에서의 증식에 필요한 시간이 8~10시간이 소요됨을 알 수 있었는데 이는 Rhabdovirus에 속한 vesicular stomatitis 바이러스의 증식시간과 같은 시간이며 Togavirus에 속한 Sindbis 바이러스와도 비슷한 시간이다. Anderson과 Smith [1]는 한탄바이러스와 같이 Bunyaviridae에 속한 바이러스의 하나인 Rift valley fever바이러스를 rat의 간세포에 접종하여 morphogenesis를 연구하는 과정에서 Rift valley fever 바이러스가 접종 후 5~6시간이면 배양액 내에 나타나고 15~16시간에 바이러스의 역가가 최고치에 달한다고 보고하였는데 방법에 의한 차이도 있지만 한탄바이러스보다는 증식시간이 매우 짧은 것 같다. Hung Tao [9]는 한탄바이러스를 접종한 Vero세포를 12일 후에 채취하여 thin section 및 colloidal gold를 사용한 면역전자현미경법을 통하여 관찰한 결과 한탄바이러스가 Golgi vesicle내로 배출되며 세포질 내에는 virus-associated protein, virus-associated granules와 크기와 모양이 여러 가지인 inclusion body들을 관찰하였고 세포막 등에 결합되어 있는 viral antigen layer들을 관찰하였다고 보고하였으나 본 연구에서는 그러한 것들을 관찰할 수 없었으며 한탄바이러스를 접종한 Vero세포에서 12시간만에 바이러스와 연결된 filamentous structure는 Hung Tao가 관찰한 Hantaan virus-associated protein과 유사한 것으로 생각된다. 과거에는 DNA바이러스나 RNA바이러스의 핵산의 복제에 소요되는 시간을 측정하기 위하여 동위원소들을 사용하였으며 최근에는 중합효소연쇄반응을 이용하여 핵산의 복제에 소요되는 시간을 측정할 수 있으나 이 방법들로는 바이러스가 숙주세포에 흡착된 후 완전히 성숙한 바이러스 입자가 만들어질 때까지 소요되는 시간을 측정할 수 없으므로 전자현미경법을 사용해야

한다고 생각하며 최근에 개발된 bioscope이나 nanoscope을 사용하면 되지만 워낙 고가의 장비이며 국내에 널리 보급이 되지 않은 상태여서 사용할 수 없었으며 앞으로 이 장비를 이용한다면 보다 쉽게 이 문제를 해결할 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

한탄바이러스의 증식에 소요되는 기간을 규명하기 위하여 한탄바이러스 76/118 strain을 Vero세포에 접종한 후 2~24시간 동안 2시간 간격으로 세포들을 채취하여 통상적인 투과현미경법과 면역전자현미경법으로 한탄바이러스의 증식여부를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 한탄바이러스를 접종한 Vero-E6세포에서 접종 후 2~8시간 사이에는 Vero-E6세포 내 및 세포 밖 공간에서 한탄바이러스 입자를 관찰할 수 없었다.

2. 접종 후 10 시간 된 Vero-E6세포에서 세포 밖으로 배출된 한탄바이러스 입자를 관찰할 수 있어서 전자현미경학적으로 한탄바이러스의 Vero세포에서의 증식에 소요되는 시간은 약 10시간 정도임을 알 수 있었다.

3. 면역전자현미경 술기를 통하여 한탄바이러스를 접종한 후 10시간 이후부터 Vero세포 내외에서 미성숙 및 성숙한 한탄바이러스 입자를 관찰할 수 있었다.

4. 한탄바이러스를 접종한 Vero세포 내에서 한탄바이러스와 관련된 inclusion body는 찾아볼 수 없었다.

참 고 문 헌

1) **Anderson GW, Smith JF:** Immunoelectron Microscopy of Rift Valley Fever Viral Morphogenesis in Primary Rat Hepatocytes. *Virology* **161:** 91-100, 1987.

2) **Andrew R:** Epidemic hemorrhagic fever: 40 cases from Korea. *Brit Med J* **1:** 1063-1068, 1953.

3) **Brimmer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, Von Binsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Blon N, Lahdvirta J:** Nephropathia epidemica infection. *J Infect Dis* **141:** 131-134, 1980.

4) **Casals J, Henderson BE, Hoogstraal H, Johnson KM, Shelokov A:** A review of Soviet viral hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **122:** 437-453, 1970.

5) **Cosgriff TM, Lewis RM:** Mechanisms of disease in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Kidney International* 40 suppl **35:** 72-79, 1991.

6) **Dantas JR, Okuno Jr Y, Assada H, Tamura M, Takahashi M, Tanishita O, Takahashi Y, Kurata T, Yamanishi K:** Characterization of glycoproteins of viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) using monoclonal antibodies. *Virol* **151:** 374-384, 1986.

7) **Elliott JH, Kiley MP, McCormick JB:** Hantaan virus: Identification of virion proteins. *J Gen Virol* **65:** 1285-1297, 1984.

8) **Hung T, Chou ZY, Zhao TX, Xia SM, Hang CS:** Morphology and morphogenesis of viruses of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). I. Some peculiar aspects of morphogenesis of various strains of HFRS virus. *Intervirol* **155:** 633-643, 1986.

9) **Hung Tao:** Part III. Ultrastructural Pathology of HFRS Virus Infected Cells and Morphogenesis of HFRS Virus. Atlas of Hemorrrhagic Fever with Reanal Syndrome. pp 66-71, Science Press, 1988.

10) **Jin AW, Chen Zy:** Advances in research on immunopathogenesis in viral hemorrhagic fevers. *Jiangsu Med J* **7:** 380-382, 1981.

11) **Jiang YP:** A preliminary report on hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *China Med J* **96:** 265-268, 1983.

12) **Jokinen EJ, Lahdvirta J, Collan Y:** Nephropathia epidemica: Immuno-histochemical study of pathogenesis. *Clin Nephrol* **9:** 1-5, 1978.

13) **Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM:** The virus mutiplication cycle. Zinsser Microbiology. 19th ed. p 667-835, East Norwalk, Appleton and Lange, 1988.

14) **Karabatsos N:** International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates, Hantaan virus. Am Sco Trop Med Hyg San Antonio Texas USA pp.445-446, 1985.

15) **Karz S, Leedham CHL, Kessler WH:** Medical management of hemorrhagic fever. *JAMA* **150:** 1353-1366, 1952.

16) **Kitamura T, Morita C, Komatsu T, Sugiyama K, Oya A, Hashimoto N, 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.

17) **LeDuc JW, Smith GA, Chiled JE, Pinheiro FP, Naiztegui JI, Niklasson B, Antoniades A, Robinson DW, Shortridge KF, Wooster MT, Elwell MR, Liberty PLT, Koech D, Rosa EST, Rosen L:** Global survey of antibody to Hantaan related viruses among peridomestic rodents. *Bull WHO* **64:** 139-144, 1986.

18) **LeDuc JW, Smith CA, Johnson KM:** Hantaan-like viruses from domestic rats captured in the United States. *Am J Trop Med Hyg* **33:** 992-998, 1984.

19) **Lee HW, Lee PW:** Korean hemorrhagic fever. I. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Kor J Intern Med* **19:** 371-384, 1976.

20) **Lee HW, Lee PW, Lahdvirta J, Brummer-Korvenkontio M:** Aetiologic relation between Korean hemorrhagic fever and Nephropathia epidemica. *Lancet* (*London*) **1:** 186-187, 1979.

21) **Lee HW, Lee PW, Tamura T, Okuno Y:** Etiologic relation between Korean hemorrhagic fever and epidemic hemorrhagic fever in Japan. *Biken J* **22:** 41-45, 1979.

22) **Lee PW, Amyx HL, Gajdusek DC, Yanagihara RT, Goldgaber D, Gibbs CJ, Jr:** New hemorrhagic fever with renal syndrome related virus in indigenous wild rodents in Unites States. *Lancet* **2:** 1405-1407, 1982.

23) **Liu DS:** A preliminary study on the immunological pathogenesis of epidemic hemorrhagic fever. *Chinese Med J* **61:** 33-35, 1981.

24) **Liu ZX, Luo HJ:** Determination of immune complexes in patients with epidemic hemorrhagic fever. *Chinese J Epidemiol* **1:** 36, 1980.

25) **Luo DD, Wang XH, Jin WE, Fan JZ:** Determination and analysis of specificity of circulating immune complexes in epidemic hemorrhagic fever. *Chinese J Infect Dis* **3:** 86-88, 1985.

26) **Luria SE, James E, Damell Jr, Davis Baltimore, Allan Campbell:** Animal virus multiplication: The RNA viruses. General Virilogy. 3rd ed. p 303-321, Canada, John Wiley and Sons, Inc. 1978.

27) **Mayer CF:** Epidemic hemorrhagic fever of the Far East or endemic hemorrhagic nephrosonephritis; a Short outline of the disease, with supplemental data on the result of experimental inoculations of human volunteers. *Mil Surg* **110:** 276-284, 1952.

28) **McCormick JB, Sasso DR, Palmer EL, Kiley MP:** Morphological identification of the agent of Korean haemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the Bunyavirirdae. *Lancet* (*London*) **1:** 765-768, 1982.

29) **McNinch JH:** Far east command conferece on epidemic hemorrhagic fever. *Ann Int Med* **38:** 53-60, 1953.

30) **Nakazawa E:** Epidemic hemorrhagic fever in manchuria. Japan Izishinobo (No.2280): 61-65, 1966.

31) **Powell GM:** Clinical manifestations of epidemic hemorrhagic fever. *JAMA* **151:** 1261-1264, 1953.

32) **Schmaljohn CS, Dalrymple JM:** Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virol* **131:** 482-491, 1983.

33) **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.

34) **Schmaljohn CS, Hasty SE, Harrison SA, Dalrymple JM:** Characterization of Hantaan virions. The prototype virus of hemmorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect DIS* **148:** 1005-1012, 1983.

35) **Schmaljohn CS, Jennings G, Hay J, Dalrymple JM:** Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virol* **155:** 633-643, 1986.

36) **Schmaljohn CS, Patterson JL:** Bunyaviridae and their replication. Part II: Replication of

Bunyaviridae. In: Bernard N Fields, David M Knipe et al. Virology. 2nd ed. p 1175-1194, Raven press, Ltd., New York. 1990.

37) **Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymple JM:** Hantaanvirus M RNA: coding strategy nucleotide sequence and gene order. *Virol* **157:** 31-39, 1987.

38) **Seong I, Lee HW, White JD:** Electronmicrocsopic and Immene Electromicroscopic Observation of Hemagglutinated Hantaanviruses. *J Kor Soc Virol* **18(2):** 171-179, 1988.

39) **Smadel JE:** Epidemic hemorrhagic fever: *Am J Publ Hlth* **43:** 1327-1330, 1951.

40) **Tang JH:** Determination of immune complexes in blood and urine of patients with epidemic hemorrhagic fever and a further discussion of the role of immune complexes in immunopathogenesis. *Jiangsu Med J* **12:** 12-15, 1980.

41) **Wang JR:** Pathogenesis of epidemic hemorrhagic fever. *Shanghai Med J* **4:** 5-8, 1981.

42) **Wang JR, Yang PZ, Wu Q, Tao S, Xu ZY, Dai ZY:** The role of immune complexes, complement activation of immunopathologic injury in the pathogenesis of epidemic hemorrhagic fever. *Chinese Med J* **99:** 21-26, 1986.

43) **White JD, Shirey FG, French GR, Huggins JW, Brand OM, Lee HW:** Hantaan virus, aetiologic agent of Korean jaemorrhagic fever, has Bunyaviridae-like morphology. *Lancet (London)* **1:** 768-771, 1982.

44) **World Health Organization:** Hemorrhagic fever with renal syndrome: Memorandum of a WHO meeting. *Bull WHO* **61:** 269-275, 1983.

45) **Xie ZM, Li SF:** Hemorrhagic mechanisms in epidemic hemorrhagic fever. *Chinese J Intern Med* **6:** 452-457, 1978.

46) **Yamanishi K, Dantas Jr JR, Takahashi M, Yamanouchi T, Damae K, Takahashi Y, Tanishita O:** Antigenic differences between two viruses, isolated in Japan and Korea, that cause hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Virol* **52:** 231-237, 1984.

47) **Yan DY, Gu XS, Wang DQ, Yang SH:** Studis on immunopathogenesis in epidemic hemorrhagic fever. *J Immunol* **127:** 1064-1067, 1981.

48) **Yanagihara R, Silverman DJ, Gajdusek DC:** Experimental infection of vascular endothelial cells with hantaviruses. (abstract) Proceedings of the 1st International conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Seoul, Korea, p.49, 4-6 May 1989.

49) **Yang PZ:** Measurement of platelet function and detectiion of specific immune complexes on platelet surfaces in epidemic hemorrhagic fever. *Shanghai Med J* **7:** 275-278, 1984.

50) **Zhang XL. Wang XH, Liu SZ, Jin WE, Xiong KJ, Luo Dd:** Detection of viral antigen in various organs in 14 fatal cases of epidemic hemorrhagic fever. *Chinese J Intern Med* **26:** 461-463, 1987.

51) **Zhu P, Yang WS, Zhang WB, Wang GY, Chen LB:** Propagation and replication of hantaan virus in human endothelial cells in vitro. (abstract) Proceedings of the 1st International Symposium of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Wuban. Peoples Republic of China. p.97, 31 October-November 1988.