大韓바이러스學會誌 : 第 30 卷 第 1 號 2000
J. Korean. Soc. Virology, Vol. 30, No. 1, 2000

흰넓적다리붉은쥐 유래 한타바이러스 분리 및 분자생물학적 특성 비교

고려대학교 의과대학 미생물학교실[1], 고려대학교 바이러스병연구소[1], 고려대학교 대학원[2]

송기준[1] · 윤형선[2] · 고은영[1] · 정기모[1] · 박광숙[1] · 이용주[1] · 송진원[1] · 백락주[1*]

=Abstract=

Isolation of *Apodemus peninsulae*-borne Hantavirus and Comparison of Molecular Biological Characteristics

Ki-Joon Song[1], Hyung Seon Yun[2], Eun Young Kho[1], Ki Mo Chung[1], Kwang Sook Park[1], Yong Ju Lee[1], Jin-Won Song[1] and Luck Ju Baek[1*]

[1]Department of Microbiology, College of Medicine, The Institute of Viral Diseases, [2]Graduate School, Korea University, Seoul 136-705, Korea

Two distinct hantaviruses have been isolated from *Apodemus agrarius* in 1976 and *Rattus norvegicus* in 1980 in Korea. Since our serosurveys conducted in 1994, a genetically distinct hantavirus from *Apodemus peninsulae* has been investigated. To isolate hantavirus from *A. peninsulae* captured in Korea, the lung homogenate of seropositive *A. peninsulae* inoculated Vero E6 cells. Viral antigen was detected in a progressively higher percentage of cells with subsequent passage after 80 days postinoculation. The new isolate from seropositive *Apodemus peninsulae* was designated Suchong virus after Suchong valley located in northeastern region of South Korea. Comparing with hantaan virus 76-118 strain, Suchong virus-1, 2, 3 and 4 showed the similarity of 71.0~91.8% at nucleotide and 90.9~94.8% at amino acid sequences in 231 nucleotides region of M segment, and the similarity of 75.1~81.0% at nucleotide and 97.5~100% at amino acid sequences in 237 nucleotides of S segment.

Key Words: Hantavirus, Suchong virus, *Apodemus peninsulae*

서 론

신증후출혈열 (Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)의 병원체로써 이 등 [7]에 의해 1976년 처음 분리된 한탄바이러스 (Hantaan virus)는 negative sense RNA 바이러스로 세분절 (Large, Medium, Small)로 된 genome을 가지고 있으며 [13], 분류학적으로 분야비리데 (Bunyaviridae)에 속한다 [9,18]. 한타바이러스속 (genus Hantavirus)은 생태학적 및 혈청학적으로 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)가 숙주인 한탄바이러스 (Hantaan virus, HTN), 집쥐 (*Rattus norvegicus*)가 숙주인 서울바이러스 (Seoul virus, SEO) [6,17], 대륙밭쥐 (*Clethrionomys glareolus*)가 숙주인 푸말라바이러스 (Puumala virus, PUU) [2,11], 갈밭쥐 (*Microtus pennsylvanicus*)가 숙주인 프로스펙트힐바이러스 (Prospect Hill virus, PH) [8]가 대표적인 혈청형으로 알려져 있으며 이 이외에도 *Bandicoda indica*를 숙주로 하는 Thailand virus (THAI) [19], 뾰족뒤쥐 (Shrewmouse)가 숙주인

접수 : 2000년 2월 23일, 논문게재확정 : 2000년 3월 20일

*; Corresponding author: Luck Ju Baek, Department of Microbiology, College of Medicine, The Institute of Viral Diseases, Korea University, Seoul 136-705, Korea. Tel.: (02)920-6168 Fax.: (02)923-3645 E-mail: baekmicr@mail.korea.ac.kr

토타팔리얌바이러스 (Thottapalayam virus, TPM) [20], 노랑텍쥐 (*Apodemus flavicolis*)가 숙주인 벨그레이드바이러스 (Belgrade virus, BGD) [4], 사슴쥐 (*Peromyscus maniculatus*)를 숙주로 하는 신놈브레바이러스 (Sin Nombre virus, SN) [3,10], 흰발생쥐 (*Peromyscus leucopus*)를 숙주로 하는 뉴욕바이러스 (New York virus, NY) [12,14,16] 등이 알려져 있다. 한타바이러스는 일반적으로 종 특이성이 있는 것으로 알려져 왔으나 미국에서는 같은 지역내 종이 다른 야생들쥐도 Sin Nombre 바이러스의 숙주동물로 밝혀지고 있다 [5,12]. 다시 말해서 개체의 종이 다르다 해도 같은 지역의 야서는 동일한 바이러스의 숙주동물일 수 있다는 것이다. 국내에서는 신증후출혈열이 한탄바이러스나 서울바이러스에 의해 발생한다고 보고되어 있으나, 최근 연구에 의하면 두 가지 바이러스 외에도 다른 혈청형의 바이러스가 있을 것으로 추정되고 있다. 국내에 서식하고 있는 야생들쥐는 13종이 있으며, 한탄바이러스의 숙주인 등줄쥐는 논, 밭, 그리고 고도가 낮은 야산에서 볼 수 있는 가장 흔한 들쥐로서 약 75%를 차지하고 있다. 흰넓적다리붉은쥐 (*Apodemus peninsulae*) [19]는 등줄쥐와 같은 붉은쥐속에 속하나 주로 해발이 높은 산림지역에서 서식하는 특성이 있으며, 서식밀도도 비교적 높고 우리나라 전역에 분포하고 있다. 최근 보고에 의하면 흰넓적다리붉은쥐도 한탄바이러스에 대한 항체보유율이 높기 때문에 한탄바이러스와 혈청학적으로 유사한 바이러스를 보유하고 있을 것으로 생각해 왔다 [15]. 본 연구는 국내 여러 산림지역에서 야생들쥐를 채집하여 5가지 한타바이러스에 대한 항체검사를 실시하였고 우리나라에서 두 번째로 개체수가 많은 흰넓적다리붉은쥐를 대상으로 항체양성인 흰넓적다리붉은쥐의 폐장조직을 갈아 조직배양세포를 이용하여 바이러스 분리를 시도하였다. 분리한 바이러스의 M 분절 일부와 S 분절 일부의 유전자 염기서열과 아미노산서열을 한탄바이러스의 원형인 76-118주와 비교분석하여 흰넓적다리붉은쥐가 새로운 한타바이러스의 숙주동물인지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 야생들쥐 채집

흰넓적다리붉은쥐를 비롯한 각종 야생들쥐는 경기도 (연천군, 광덕산), 강원도 (점봉산, 가리산, 가칠봉, 북암령, 한석산, 계방산, 화악산), 충남 (가야산), 충북 (월악산), 전북 (덕유산, 대덕산), 경북 (조령산)의 해발 500미터 이상 높은 산악지대에서 채집하였다. 1일 평균 100개의 Sherman trap을 일정간격으로 설치하여 각종 야생들쥐를 채집하였다. 채집시기는 1995년 7월부터 1998년 11월까지 수시로 실시하였으며 생포한 야생들쥐는 동물실험실로 이송하여 무균동물실 Biosafty level-3에서 혈청과 각종장기를 채취하여 검사 시까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

2. 혈청검사용 항원 제작

항원용 슬라이드를 제작하기 위하여 정상 Vero E6 세포를 T-75 플라스크에서 2일간 배양한 다음 5가지 대표적인 한타바이러스 즉 한탄바이러스, 서울바이러스, 푸말라바이러스, 프로스펙트힐바이러스, 뉴욕바이러스를 각각 일정량 접종하였다. 그리고 7일 내지 14일 동안 CO_2 배양기에서 증식시킨 후 세포내 바이러스 증식을 간접형광항체법 (IFA)으로 확인하고 10 well spotted slide glass에 감염세포 일정량을 부착하여 항원 슬라이드를 만든 후 -70℃에 보관하였다.

3. 야생들쥐의 항체검사

각각의 항원 슬라이드는 냉 아세톤으로 7분간 고정하였다. 1:16으로 희석한 각 들쥐의 혈청 25 μl를 항원에 가한 후, 37℃에서 30분간 1차 반응시킨 다음 PBS에 담구어 60회, 증류수에서 30회 가볍게 흔들어 세척하였다. Cleanbench에서 슬라이드를 건조한 후 16 unit로 희석한 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG를 25 μl씩 가하여 같은 방법으로 2차 반응시킨 후 세척하고 포매하여 형광현미경 (Zeiss Axioscope, Germany)하에서 세포질내에 특이 형광반점을 관찰하여 한타바이러스에 대한 항체양성으로 판정하였다. 양성 혈청은 4배 계단 희석하여 반응시킨 후 특이형광반점이 보이는 혈청의 최고희석배수를 항체가로 정하였다.

4. 한타바이러스 분리

강원도 홍천군의 계방산과 인제군의 가칠봉, 전북 무주군의 덕유산과 대덕산에서 채집한 흰넓적다리붉은쥐의 폐 조직 0.5 g에 각각 2.5 ml DMEM (Dulbacco's modified eagle's medium) 배지를 첨가하고 homogenizer (Heidolph RZR 2041)를 이용하여 600 rpm에서 5분간 갈고, 4℃ 냉장원심분리

기에서 3,000 rpm으로 20분간 원심분리 후 상층액을 10% 용액으로 조정하고 T-25 플라스크에서 배양한 정상 Vero E6 세포에 0.5 ml 접종하였다. 90분간 흡착 후, 4 ml의 5% DMEM 배지를 첨가하고 CO_2 배양기에서 2주일 동안 배양하였다. 바이러스 분리는 매 2주일 간격으로 계대배양한 세포의 일부를 수확하여 간접형광항체법과 RT-PCR법으로 바이러스 증식 유무를 확인하였다.

5. Viral RNA 분리 및 RT-PCR

항체양성인 흰넓적다리붉은쥐의 폐 조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR법으로 바이러스 존재여부를 확인하였다. 폐 조직 300 mg에 Trizol LS (Gibco BRL) 용액 750 µl를 넣어 조직분쇄기로 조직을 잘게 분쇄한 후 제조사의 사용설명서에 따라 RNA를 추출하여 DEPC가 처리된 물에 녹였다. 추출한 RNA 8 µl와 0.1 µM primer를 잘 섞은 후 70℃에서 10분간 가열한 뒤 급냉시켜 RNA와 primer를 annealing시킨 후, 20 unit RNase inhibitor, Superscript II reverse transcriptase (GIBCO BRL Grand Island, N.Y., USA) 5 unit, 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 250 µM dNTP 혼합물을 넣은 후, 42℃에서 50분간 반응시켜 cDNA를 합성한 후 다시 70℃에서 15분간 가열하여 효소들의 활성을 제거하였다. 일차 PCR은 cDNA 산물 2.5 µl, 50 nM 일차 primer 한 쌍, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP 혼합물, 0.02 unit Dynazyme Taq polymerase (Finzyme OY, Finland)를 잘 섞은 후 DNA amplifier (Sanyo Mir-D40)에서 94℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 3분을 주기로 33회 반복 반응시켜 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA는 Wizard purification system (Promega)을 이용하여 정제하였으며 사용된 primer는 hantaan virus 76-118 strain의 염기서열에 근거하여 합성하였다.

M 절편의 G2 단백질 유전자의 아미노말단 부위의 231 bp를 PCR하기 위해 사용한 primer는 일차 PCR에는 G2F1 (5'-TGGGCTGCAAGTGC-3')과 G2-2 (5'-ACATGCTGTACA GCTGTGCC-3')를, 2차 PCR에서는 G2-1 (5'-TGGGCTGCAAGTGCATCAG-AG-3')과 G2-4 (5'-ATGGATTACAACCCCAGCTCG-3')를 사용하였다. S 절편의 일부를 PCR하기 위해 사용한 primer는 대부분의 hantavirus에서 변이가 심하지 않은 부위를 선택하여 합성하였다. S 절편에 대한 cDNA를 만들기 위하여 S 절편의 5'말단에서 priming하는 OSV 844 primer (5'-CCGAT-GTCCACCAACATG-3')를, 1차 PCR에서는 OSV 844와 함께 OSV 845 (5'-CTTAGCTCGGGATCCAT (A+G)TC-3')를 사용하였다. PCR로 얻어진 생성물들을 확인하기 위하여 1% agarose gel을 통하여 크기를 확인한 다음 Wizard gel elution kit (Promega)를 사용하여 DNA 단편들을 gel에서 추출한 다음 30 µl의 물에 녹였다.

6. 염기서열 분석

조직에서 증폭된 PCR 산물의 염기서열 분석은 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)를 이용하여 반응시킨 후, 4% polyacrylamide sequencing gel에서 3,000 V로 전기영동하고 ABI PRISM™377 DNA Sequencer로 염기서열을 판독하였다. LaserGene program (DNASTAR, Madison, WI)을 사용하여 기존의 한타바이러스와 염기서열의 차이를 확인하였고, 이 염기서열로 아미노산서열을 추정하여 단백질 수준에서의 차이점 또한 확인하였다.

결 과

1. 야생들쥐의 한타바이러스 감염율

1995년 7월부터 1998년 11월까지 채집한 야서는 식충목에 속하는 땃쥐 47마리도 포함하여 8종 1,148마리였다. 5가지 한타바이러스 항원을 사용하여 항체검사를 실시한 결과 등줄쥐는 602마리중 70마리 (11.6%), 흰넓적다리붉은쥐는 268마리중 39마리 (14.6%), 땃쥐 (*Crocidura laciura*)는 47마리중 4마리 (8.5%)가 한탄바이러스에 대해 항체양성이었으며, 특이하게 대륙밭쥐 (*Eothenomys regulus*)는 184마리중 20마리 (10.9%)가 푸말라바이러스에 대해 항체양성이었다. 갈밭쥐 (*Microtus fortis*), 멧밭쥐 (*Micromis minutus*), 생쥐 (*Mus musculus*), 비단털쥐 (*Cricetulus triton*)에서는 한타바이러스 감염을 증명할 수 없었다 (Table 1).

2. 채집지역별 흰넓적다리붉은쥐의 한탄바이러스 감염

Table 2에서 보는 바와 같이 흰넓적다리붉은쥐의 한탄바이러스에 대한 도별 감염율은 전북이 54마리중 12마리 (22.2%)가 양성으로 양성율이 가장 높았고, 강원도는 191마리중 25마리 (13.1%)가

Table 1. Seroprevalence of hantavirus infection in indigenous wild rodents in Korea, 1995-1998

Species	No. of antibody positive / No. of serum tested to				
	HTNV	SEOV	PUUV	PHV	NYV
Apodemus agrarius	70/602	36/602	33/602	12/602	12/602
Apodemus peninsulae	39/268	27/268	23/268	18/268	16/268
Eothenomys regulus	17/184	14/184	20/184	16/184	15/184
Microtus fortis	0/35	0/35	0/35	0/35	0/35
Micromys minutus	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Mus musculus	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Cricetulus triton	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
*Crocidura laciura**	4/47	4/47	1/47	0/47	0/47

HTNV: Prototype hantaan virus strain 76-118, SEOV: Seoul virus strain HR 80-39,
PUUV: Puumala virus strain Hällnäs B-1, PHV: Prospect Hill virus strain 405
NYV: New York virus isolated from *Peromyscus leucopus*, *: Nonrodent species

Table 2. Serologic survey of *Apodemus peninsulae* for hantavirus infection in Korea, 1995-1998

Area	Date of collection	No. of antibody positive / No. of serum tested to				
		HTNV	SEOV	PUUV	PHV	NYV
Kangwon-do Hongchon-gun	Jul. 1995 - Nov. 1998	18/117	9/117	11/117	10/117	10/117
Inje-gun	Jun. 1997 - Oct. 1998	7/61	6/61	3/61	1/61	3/61
Whachon-gun	Aug. 1998 - Oct. 1998	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13
Kyunggi-do Yonchon-gun	Nov. 1995	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Gapyung-gun	May 1998 - Sep. 1998	0/22	0/22	0/22	0/22	0/22
Chungbuk-do Umsung-gun	Oct. 1996	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Chungnam-do Yesan-gun	Mar. 1997	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Chunbuk-do Muju-gun	Oct. 1996 - Oct. 1998	12/54	10/54	7/54	5/54	1/54
Kyungbuk-do Munkyung-gun	Oct. 1998	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8

양성으로 비교적 높았다. 경기도는 24마리중 2마리 (8.3%)로 비교적 낮은 항체양성율을 나타내었다. 충남, 충북, 경북의 흰넓적다리붉은쥐는 모두 음성이었으나 채집수가 적어 통계적 의의는 없었다.

Table 3. Serological cross-reactivity of *Apodemus peninsulae* sera to hantaviruses by IFA

Code No.		IFA titers against				
		HTNV	SEOV	PUUV	PHV	NYV
A. peninsulae	95-1	256	256	256	256	16
	95-2	1,024	1,024	256	64	256
	95-1-29	–	–	16	–	–
	95-1-33	256	256	256	16	64
	95-1-34	–	–	16	16	–
	95-1-36	256	256	16	64	16
	95-1-49	16	–	–	–	–
	95-1-107	16	–	–	–	–
	95-2-5	16	–	–	16	–
	95-2-16	16	–	–	–	–
	95-2-19	64	–	16	256	64
	95-2-27	16	–	–	–	–
	95-2-28	–	–	–	64	16
	95-2-29	16	–	–	–	–
	95-2-47	–	–	64	–	16
	95-2-51	1,024	1,024	64	–	64
	95-2-55	256	256	64	256	16
	95-2-61	64	–	–	–	–
	95-2-104	4,096	4,096	64	4,096	1,024
	95-2-108	64	64	–	–	–
	97-6	16	–	–	–	–
	97-7	16	16	–	–	–
	97-17	256	64	16	–	–
	97-37	16	16	–	–	–
	97-43	1,024	256	64	16	256
	97-45	1,024	64	64	16	64
	97-53	16	–	–	–	–
	97-58	64	64	–	–	–
	97-59	256	64	–	–	–
	97-60	16	–	–	–	–
	97-74	1,024	256	16	16	64
	97-79	256	64	16	–	256
	97-82	64	64	–	–	16
	98-29	256	64	1,024	64	16
	98-31	16	–	–	–	–
	98-36	256	64	–	–	–
	98-38	4,096	1,024	1,024	–	–

continued

98-43	4,096	256	1,024	–	–
98-46	64	16	1,024	64	–
98-47	4,096	25	–	–	–
98-50	1,024	256	4,096	64	–
98-51	1,024	64	4,096	64	–
98-53	256	64	256	16	–

*IFA antibody titers are expressed as reciprocals of highest serum dilution yielding positive reaction

```
Majority          LTPVWNDNAHGVGSVPMHTDLELDFSLTSSSKYTYRRKLTNPLEEAQSIDLHIEIEEQTIGVDVHALGHWFDGRLNL

HTN 76-118[G2aa]  .............................................................................  77
SCV-1[G2aa]       .V.I.......................A.........R.......T..V.....L......................  77
SCV-2[G2aa]       .V.I.......................A.........R.......T..V.....L......................  77
SCV-3[G2aa]       .....KC................................................K...................H.  77
SCV-4[G2aa]       .....KC................................................K...................H.  77
```

Figure 1. Alignment and comparison of amino acid of the coding region (position 1,997~2,227) of the M segment from HTN 76-118 and SCV-1, 2, 3, 4 strain.

3. 흰넓적다리붉은쥐 혈청의 한타바이러스에 대한 교차반응 및 항체가

채집한 총 268마리의 흰넓적다리붉은쥐 중 43마리의 혈청에서 5가지 한타바이러스중 한 종류 이상의 바이러스에 항체양성을 나타내었다. 한탄바이러스에 대한 항체가가 1:1,024 이상으로 높은 혈청의 경우 대부분은 다른 바이러스들과 교차반응을 보였다. 4개의 혈청은 푸말라바이러스, 프로스펙트힐바이러스, 뉴욕바이러스에만 반응하였으나 항체가는 매우 낮았다. 한탄바이러스에 대한 항체가는 1:16부터 1:4,096까지 다양하게 분포하였으나 다른 한타바이러스에 대한 항체가는 비교적 낮았다 (Table 3).

4. 조직배양세포를 이용한 한타바이러스 분리

강원도 홍천군 계방산에서 채집한 흰넓적다리붉은쥐 (*A. peninsulae* 97-45)의 폐 조직을 Vero E6 세포에 접종한 후 매 2주일 간격으로 배양하면서 세포의 일부를 수확하여 바이러스 증식 유무를 간접형광항체법으로 확인한 결과 5대 계대배양(80일) 후에 바이러스 증식을 IFA와 RT-PCR법으로 처음으로 확인하였으며 7대 계대배양에서는 IFA법으로 90% 이상의 세포에서 바이러스 감염을 증명하고 바이러스를 분리하였다. 분리한 바이러스는 흰넓적다리붉은쥐를 채집한 계방산 수청골의 이름을 따서 수청바이러스-1 (Suchong virus-1)이라고 명명하였다. 강원도 점봉산, 전북 덕유산, 전북 대덕산에서 채집한 흰넓적다리붉은쥐에서 분리한 바이러스는 각각 수청바이러스-2, 수청바이러스-3, 수청바이러스-4로 명명하였다.

5. 바이러스 M 부분절편의 RT-PCR 및 Sequencing

흰넓적다리붉은쥐의 폐 조직에서 한탄바이러스 genomic RNA 존재 여부를 확인하기 위하여 기존에 밝혀진 한탄바이러스 76-118 strain의 염기서열에 근거하여 primer를 합성하였다. 다수의 들쥐 폐 조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR 방법으로 바이러스의 M 및 S 절편의 일부분을 증폭함으로써 바이러스가 감염된 들쥐를 선별하였다. G1, G2 envelope glycoprotein을 coding하고 있는 M 절편은 다른 절편에 비하여 변이가 심한 것으로 알려져 있으므로, 본 실험에서는 M 절편에서 G2 protein의 아미노말단 부위를 coding하고 있는 231 bp를 G2F1 primer를 사용한 reverse transcription으로 cDNA를 만들고 이를 template로 하여 G2F1 primer와 G2-2 primer를 이용하여 1차 PCR을 하고 이 1차 PCR 산물을 template로 하여 G2-1 primer와 G2-4 primer를 이용하여 2차 PCR을 하였다. 다수의 시료를 가지고 실시한 결과 수청바이러스-1, 2, 3, 4에서 PCR 양성으로 231 bp 산물을 얻을 수 있었다 (Figure 1).

```
Majority        IAGIAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTSEEKLRKKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVLFMVAWGKEAVDNFHLGD

HTN 76-118[Naa] ...............................................................................  79
SCV-1[Naa]      ...............................................................................  79
SCV-2[Naa]      .....................K.........................................................  79
SCV-3[Naa]      V..................................R...........................................  79
SCV-4[Naa]      V..................................R...........................................  79
```

Figure 2. Alignment and comparison of amino acid of the coding region (position 1000-1236) of the S segment from HTN 76-118 and SCV-1, 2, 3, 4 strain.

Table 4. Nucleotide and amino acid sequence homologies of 231 nucleotide G2 glycoprotein-encoding M segment and of 237 nucleotide of S segment between hantaan virus 76-118 and Suchong virus-1, 2, 3, 4 strain

Virus strain	M segment		S segment	
	231 nt	77 aa	237 nt	79 aa
HTNV 76-118	100	100	100	100
SCV-1	71.0	90.9	81.0	100
SCV-2	71.0	90.9	80.6	98.7
SCV-3	91.8	94.8	75.5	97.5
SCV-4	74.5	94.8	75.1	97.5

6. 바이러스 S 부분절편의 RT-PCR 및 Sequencing

S 절편의 염기서열을 분석하기 위하여 흰넓적다리붉은쥐의 폐장 조직에서 RNA를 분리하고 한탄바이러스 76-118주의 염기서열에 근거하여 만든 primer OSV 844를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA로부터 primer OSV 844와 OSV 845를 사용하여 237 bp 크기의 PCR 단편들을 얻을 수 있었다 (Figure 2).

7. 염기서열 및 아미노산서열 분석

항체양성인 4개의 폐 조직에서 증폭된 DNA는 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit를 이용하여 반응시킨 후, ABI PRISM™377 DNA Sequencer로 염기서열을 판독하였다. LaserGene program (DNASTAR, Madison, WI)을 사용하여 기존의 한탄바이러스 76-118 strain과 염기서열의 차이와 이 염기서열로 아미노산서열을 추정하여 단백질 수준에서의 차이를 확인하였다. 1차 PCR로 얻은 M 절편 mRNA 1,991~2,227 bp사이를 sequencing한 결과를 한탄바이러스 76-118 strain과 비교하여 볼때 흰넓적다리붉은쥐의 염기서열은 71.0~91.8%가 아미노산 (Figure 1)은 90.9~94.8%의 동질성을 보였다. S 절편의 경우 mRNA 993~1,274 bp를 sequencing한 결과 염기서열은 75.1~81.0%, 아미노산 (Figure 2)은 97.5~100%의 동질성을 보였다 (Table 4).

고 찰

신증후출혈열 일명 유행성출혈열의 병원체는 1976년 이 등 [7]에 의해 최초로 분리되었고 한탄강의 이름을 따서 한탄바이러스라고 명명하였다. 분류학적으로 분야비리데과 [13] (family Bunyaviridae)에 속하는 한타바이러스속 (genus Hantavirus)은 한탄바이러스를 비롯한 16가지 혈청형의 바이러스들이 여러 종의 들쥐에서 분리 보고되고 있다. 외피를 가지고 있는 한타바이러스는 약 100 nm의 구형입자이며 유전자는 nucleocapsid 단백질로 싸인 음극성의 외가닥 RNA 분자로 크기에 따라 대 (L), 중 (M), 소 (S) 3개의 절편으로 구성되어 있다. L 절편은 중합효소 (RNA-dependent RNA polymerase)를, M 절편은 두 종류의 당단백질 (envelope glycoprotein G1, G2)을, S 절편은 nucleocapsid 단백질을 코딩하는 것으로 밝혀져 있다. 1993년부터 미국에서 발생하고 있는 폐렴성출혈열 [10]의 원인바이러스인 신놈브레바이러스와 뉴욕바이러스는 신대륙에서 서식하는 미국 서부의 사슴쥐와 흰발생쥐에서 분리되었다. 이들 바이러스는 기존에 알려져 있는 숙주와 병원성이 다른

것으로 증명되었으며, 현재 230여명의 환자가 발생하여 약 50%의 사망률을 보이고 있다. 한타바이러스에 전파경로는 감염된 야생들쥐의 소변과 대변 그리고 타액을 통해 분비되며, 호흡기를 통하여 감염되는 것으로 알고 있었으나, 1996년 남미에서 발생한 신증후출혈열은 22명의 입원 환자중 12명은 사망하였는데 사망자중 6명은 환자의 보호자나 의사로 사람-사람의 전파경로로 접촉감염이 일어난 것으로 밝혀졌다. 원인 바이러스는 안데스산맥에서 채집한 쌀쥐 (*Oligoryzomus longicaudatus*)에서 바이러스를 분리하여 안데스바이러스 (Andes virus)라고 명명하였다. 이 바이러스는 지금까지 알려진 한타바이러스의 전파경로와 달리 두가지의 경로를 통하여 전파가 이루어지는 것으로 밝혀졌다. 또한 안데스바이러스는 *O. microtis*에서 분리한 Rio Mamore 바이러스와 유사한 것으로 밝혀지고 있다.

국내에 서식하고 있는 설치목 (order Rodentia)에는 쥐과 (family Muridae), 다람쥐과 (family Sciuridae), 비단털쥐과 (family Cricetidae), 뛰는쥐과 (family Dipodidae)에 속하는 14속 18종이 알려져 있다. 쥐과의 최우점종은 등줄쥐이며, 두번째로 흔한 흰넓적다리붉은쥐는 해발 500미터 이상의 산림지역에서 흔히 볼 수 있다. 흰넓적다리붉은쥐에 대한 한타바이러스 감염에 대한 혈청학적 연구는 이미 보고되었으나 바이러스의 분리나 유전학적 연구는 없었다. 본 연구에서 흰넓적다리붉은쥐에서 바이러스를 분리하여 채집장소인 강원도 홍천군 계방산의 수청골의 이름을 따서 수청바이러스 (Suchong virus)라고 명명하였으며 현재까지 4주를 분리하였다. 그리고 이들 바이러스의 유전학적 특성을 규명하기 위하여 M 분절의 염기서열과 아미노산서열을 국내에서 알려져 있는 한탄바이러스 HTNV 76-118주와 비교 분석하였다. 즉 M 절편의 일부를 sequencing한 결과 76-118 strain과 염기서열 수준에서는 총 231 bp 중 8.2~29.0% 차이를 보였고 아미노산 수준에서는 5.2~9.1%의 차이를 나타내었다. 그리고 S 절편을 sequencing한 결과 76-118 strain과 염기서열 수준에서는 237 bp 중 19.0% 내지 24.9%의 차이를 보였고 아미노산 수준에서는 1.3% 내지 2.5%의 차이를 나타내었다. 분자생물학적으로 새로운 바이러스의 인정 기준은 원형 바이러스의 염기서열과 15% 혹은 아미노산서열과 5% 이상 차이가 있을 때 인정한다. 따라서 흰넓적다리붉은쥐에서 분리한 수청바이러스들은 국내에서 분리된 한탄바이러스와 상당한 차이가 있기 때문에 흰넓적다리붉은쥐가 새로운 한타바이러스의 숙주동물임을 처음으로 증명한 것이다.

결 론

1. 채집한 야생들쥐의 한탄바이러스에 대한 항체양성율은 등줄쥐는 11.6%, 흰넓적다리붉은쥐는 14.6%, 땃쥐는 8.5%를 나타내었으며, 대륙밭쥐는 푸말라바이러스에 대하여 10.9%의 양성율을 보였다. 항체가는 1:16부터 1:4,096까지 다양하게 분포하였으며 항체가가 높은 혈청은 서울바이러스와 일부는 푸말라바이러스, 프로스펙트힐바이러스, 뉴욕바이러스와도 교차반응이 있었다.

2. Vero E6 세포를 이용하여 흰넓적다리붉은쥐의 폐 조직으로부터 4주의 한타바이러스를 분리하여 각각을 수청바이러스-1, 2, 3, 4 라고 명명하였으며, 국내에 분포하고 있는 새로운 혈청형의 수청바이러스의 숙주동물은 흰넓적다리붉은쥐라는 것을 증명하였다.

3. 수청바이러스와 한탄바이러스 76-118주와 분자생물학적 특성을 비교한 결과 수청바이러스 M 절편의 mRNA 1,991-2,227 사이를 sequencing한 결과 76-118주와 염기서열 수준에서 총 231 bp 중 수청바이러스-1, 2, 3, 4는 각각 29.0%, 29.0%, 8.2%, 25.5%의 차이를 보였으며, 아미노산의 경우 각각 9.1%, 9.1%, 5.2%, 5.2%의 차이를 보였다. S 절편에서 mRNA 993-1,274 사이 237 bp의 염기서열을 Sequencing 하여 한탄바이러스 76-118주와 비교한 결과 수청바이러스-1, 2, 3, 4는 각각 19.0%, 19.4%, 24.5%, 24.9%의 차이를 나타내었다. 또한 아미노산 수준에서는 각각 0%, 1.3%, 2.5%, 2.5% 차이를 보였다.

감사의 글

"이 논문은 (1997, 1998)년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음"

참 고 문 헌

1) **Baek LJ, Kang JI, Song KJ, Song JW, Lee YJ:** Study on hantavirus infection of wild rodents in Korea. *J Kor Infec Dis* **29:** 487-497, 1997.

2) **Burmmer-Korvenkonitio 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 Infec Dis* **141:** 131-134, 1980.

3) **Feldmann H, Sanchez A, Morzunov S, Spiropoulou CF, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST:** Utilization of autopsy RNA for the synthesis of the nucleocapsid antigen of a newly recognized virus associated with hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Res* **30:** 351-367, 1993.

4) **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, Gajdusek DC:** Belgrade Virus. A new hantanvirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J lnfec Dis* **166:** 113-120, 1992.

5) **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 (*Reithrodonthomys*): identification of a divergent genotype from a Costa Rican *Reithrodonthomys mexicanus. Virol* **207:** 452-459, 1995.

6) **Lee HW, Baek LJ, Johnson KM:** Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever from wild urban rats. *J Infec Dis* **146:** 638-644, 1982.

7) **Lee HW, Lee PW, Johnson KM:** Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infec Dis* **137:** 298-308, 1978.

8) **Lee PW, Amyx HL, Gajdusek DC, Yanagihara R, Goldgaber D, Gibbs CJ Jr:** New hemorrhagic fever with renal syndrom-related virus in indigenous wild rodents in United States. *Lancet* **ii:** 1405, 1982.

9) **McCormick JB, Sasso DR, Palmer EL, Kiley MP:** Morphological identification of the agent of Korean hemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the Bunyaviridae. *Lancet* **i:** 765-768, 1982.

10) **Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann HSA, Childs J, Zaki S, Peters CJ:** Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* **262:** 914-917, 1993.

11) **Plyusnin A, Vapalahti O, Lankinen H, Lehvaslaiho H, Apekina N, Myasnikov Y, Kallio-Kokko H, Henttonen H, Lundkvist A, Brummer-Korvenkontio M, Gavrilovskaya I, Vaheri A:** Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *Virol* **68:** 7833-7839, 1994.

12) **Rollin PE, Ksiazek TG, Elliott LH, Ravkov EV, Martin ML, Morzunov S, Livingstone W, Monroe M, Glass G, Ruo S, Khan AS, Childs JE, Nichol ST, Peters CJ:** Isolation of Black Creek Canal virus, a new hantavirus from *Sigmodon hispidus* in Florida. *J Med Virol* **46:** 35-39, 1995.

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

14) **Song JW, 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.

15) **Song K, Baek LJ, Lee HW:** Comparative study serologic diagnostic tests against Hantaan virus. *J Korean Soc Virol* **21:** 87-103, 1991.

16) **Song JW, Baek LJ, Nagle JW, Schlitter D, Yanagihara R:** Genetic and phylogenetic analysis of hantaviral sequences amplfied from archival tissues of deer mice (*Peromyscus maniculatus* nubiterrae) captured in the eastern United States. *Arch Virol* **141:** 959-967, 1996.

17) **Sugiyama K, Matsuura Y, Morita C, Morikawa S, Komatsu T, Shiga S, Akao Y, Kitamura T:** Determination by immune adherence hemagglutination of the antigenic relationship between Rattus- and Apodemus-borne viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* **149:** 472-473, 1984.

18) **White JD, Shirey FG, French GR, Huggins JW, Brand OM, Lee HW:** Hantaan virus, aetiologic agent of Korean hemorrhagic fever, has Bunyaviridae-like morphology. *Lancet* **I:** 768-

771, 1982.

19) **Xiao SY, Chu YK, Knauert FK, Lofts R, Dalrymple JM, Leduc JW:** Comparison of hantavirus isolates using a genus reactive primer pair polymerase chain reaction. *J Gen Virol* **73:** 567-573, 1992.

20) **Xiao SY, LeDuc JW, Chu YK, Schmaljohn CS:** Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Virol* **198:** 205-217, 1994.