

국내 야생따쥐(*Crocidura lasiura*)의 Hantavirus 항체 보유실태 및 원인체 분리

김희선 · 강문일
전남대학교 수의과대학
(1993년 12월 1일 접수)

Hantavirus infection and isolation from wild shrews (*Crocidura lasiura*) in Korea

Hee-sun Kim · Mun-il Kang

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received Dec 1, 1993)

Abstract : Eleven shrews were caught from three areas of Korea. All of them were confirmed in the same species, *Crocidura lasiura*. All of sera from wild shrews were examined by indirect immunofluorescent test against Hantaan-related virus. The antibody to Hantaan-related virus was detected by 2 out of 11 shrews. Just 2 of 7 shrews from BG area were sero-positive for Hantaan-related virus antigen and none from other. All of sero-positive for Hantaan-related virus antigen belonged to male with antibody titer of 1:40 to 1:80. Two Hantaan-related viruses were isolated in vivo and in vitro.

Key words : *Crocidura lasiura*, Hantaan-related virus, antibody

서 론

Bunyaviridae의 Hantavirus¹에 속하는 여러 바이러스에 의하여 일어나는 유행성 출혈열은 야생설치류에 의하여 사람에게 전파된다². 야생설치류의 Hantavirus 감염에 대한 혈청학적 및 역학적인 조사가 국내³를 비롯 미국⁴, 소련⁵, 체코슬로바키아⁶, 노르웨이⁷, 벨지움⁸, 유고슬라비아⁹, 그리스¹⁰ 그리고 홍콩¹¹ 등에서 수행되었다. 그러나 현재까지의 보고로는 역학적인 조사나 원인체 분리를 통한 *Crocidura lasiura*의 유행성 출혈열 매개 여부는 확인되지 않고있다. 원인체를 분리하는 방법에 있어서 동물접종 방법과 Vero E6와 같은 조직배양 세포들이 이용되고 있다. 야생등줄쥐(*Apodemus agrarius coreae*)¹², 집쥐(*Rattus norvegicus*)¹³, 대륙발쥐류(*Clethrionomys glareolus*, *C. rufocanus*)¹⁴와 갈밭쥐류

(*Microtus pennsylvanicus*)¹⁵에서 유사한 항원 관계를 갖는 원인체가 분리되어 각각 Hantaan, Seoul, Puumala 그리고 Prospect Hill 바이러스라고 명명 되었다. 한편 국내에 분포하는 야생식충동물의 종을 구분하는데 있어서 외형, 색깔 및 두개골의 형태가 이용되어 오고 있다^{16,17,18}. 본 조사는 국내 세 지역에서 야생따쥐를 채집하여, 종을 분류하고 유행성 출혈열에 대한 항체 보유 여부를 조사하고 아울러 원인체를 분리 하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료채취 : 국내 3지역(BG, WG와 KS)에서 총 11마리의 야생따쥐를 채집하였다. 채집은 LeDUC et al¹⁰이

기술한 방법에 따라서 수행하였으며 필요한 재료를 채취하였다. 간단히 기술하면 Sherman live trap(H.B. Sherman Traps, Tallahassee, Fla)를 이용하여 야생따쥐를 생포 하기위해 땅콩버터와 조, 수수, 해바라기 씨앗을 혼합하여 유인하였다. 생포된 따쥐는 halothane(Halocarbon, USA)을 이용하여 마취한 후 심장에서 혈액을 채취하였다. 혈청은 야외에서 즉시 분리하여 실험실에서 Hantaan 바이러스에 대한 실험을 시행하기 전까지 -20℃상태로 운반 및 보관하였다.

종 구분 : 채집된 야생따쥐는 성을 확인하고 무게 및 외형을 측정한 다음 Jones과 Johnson¹⁶이 기술한 방법에 따라 종을 구분하였다.

간접형광항체검사 : 채집된 따쥐 혈청에서 Hanta 바이러스항체를 조사하기 위하여 LcDUC et al¹⁰이 기술한 방법에 따라서 항원을 제작하고, 간접형광항체법을 이용하여 항체를 관찰하였다. 이를 간단히 기술하면, Hantaan 바이러스(76-118주)를 감염시킨 Vero E6세포를 가지고 Spot 슬라이드를 제작한 후 항원으로 이용하였다. 혈청은 1:10부터 1:1,280배까지 계단 희석하여 검사하였으며, 최고 희석 배수의 역수를 항체가로 하였다. 희석배수 >= 1:20일 때 세포에서 형광이 관찰되면 양성으로 판정하였다(Fig 1,2)

바이러스분리 : 실험동물(Sprague Dawley, SD랫트)과 조직배양세포를 이용한²⁰ 바이러스의 분리 및 확인은 전자들이 기술한 방법을 변형하여 수행하였다. 간단히 기술하면, 채집된 야생따쥐에서 혈액을 채취한 후 폐를 제외한 각종 장기는(간, 신장, 비장) -70℃ 상태로 보관하였다. 신선한 폐는 MEM 배지를(무혈청, PH 7.0)이용하여 10% 유제를 만든 다음 즉시로 3주일령의 이유된 SD랫트의 복강내로 0.45ml씩 접종하였다. 접종 15일 경과 후, 접종된 랫트를 halothane 마취한 다음 혈청을 분리하여 항체가를 측정하고 폐는 SD랫트에 6대 까지 재접종하였다. 계대후 채취한 폐는 동결 절편하여 간접형광항체법을 이용하여 항원의 존재를 확인하였다. 조직배양을 이용한 바이러스의 분리는 폐 유제액을 완전하게 단층이 형성된 Vero E6 세포에 접종하여 매번 계대마다 14일이 경과하였을때, 간접형광항체법을 이용하여 바이러스의 세포질내 증식 여부를 확인하였다(Fig 3,4)

결 과

총 열 한마리의 야생따쥐를 국내 세 지역에서 채집하였다(Table 1). 채집된 열한마리 가운데 2마리가 유행

성 출혈열 바이러스항원에 반응하였다. BG 지역에서 채집된 일곱마리 가운데 2마리가 항체를 소유하고 있었으며, 그외의 WG과 KS 지역에서 채집된 따쥐에서는 항체가 관찰되지 않았다. 항체 양상을 나타내는 따쥐들은 각각 1:40과 1:80의 항체가를 소유하고 있었다.

채집된 야생따쥐는 모두 *Crocidura lasiura*에 속하였다. 채집된 따쥐의 폐 유제액을 SD랫트에 접종하여 계대하고, 매번 계대후 항체가를 측정하여 결과를 Table 2에 나타내었다. 야외 분리된 BG-1주는 1대 계대에서 1:40의 항체가를, 2대와 3대에서 각 1:80, 4대에서 1:160 그리고 5대 계대에서 1:80의 항체가를 나타내었다. BG-2주는 1대에서 1:20의 항체가를, 2대에서 1:80 그리고 3,4,5대에서 1:40의 항체가를 나타내었다. 그 이외의 지역에서 채집된 야생따쥐의 폐로 접종된 SD랫트에서는 항체가 관찰되지 않았다. 매번 계대시에 채취한 SD랫트 폐를 동결 절편한 후에 항원의 존재 여부를 관찰하였는 바 1대에서 부터 형광을 관찰할 수 있었다. 동결 절편 조직에서 형광은 슛컷 야생따쥐로부터 폐를 채취하여 만든 유제액을 접종한 SD랫트에서 관찰되었다.

Table 3은 조직배양세포를 이용한 바이러스 분리 결과를 나타낸 것이다. BG-1주는 4대까지 세포질에서 형광항체 반응에 대하여 음성반응을 나타냈으나, 5대에서 부터 양성반응을 보였다. BG-2주는 4대에서 부터 양성반응을 나타내었다. 바이러스에 감염된 세포는 간접형광항체법을 이용하여 조사하였을 때 세포질에서 과립상의 형광이 관찰되었다.

고 찰

유행성 출혈열은 Bunyaviridae의 Hantavirus에 속한 여러 바이러스에 의하여 원인이 되는 질병으로 야생 설치류에 의하여 사람에게 전염된다. 최근의 혈청학적인 조사는 야생동물 뿐만 아니라 돼지¹¹와 고양이¹ 같은 가축도 이들 질병의 전파과정에 관여할 수 있다고 보고하였다. Lee et al¹²은 국내 야생 설치류를 채집하여 항체 보유상황을 조사한 바, 52마리의 *Crocidura lasiura*에서 모두 음성의 결과를 보고하였다. 소련에서 환자 발생에 대한 역학조사와 더불어 야외 채집된 설치류의 항원 보유상황을 보고하였는데 *Clethrionomys spp.*의 폐에서 항원이 관찰되었다⁵. 체코슬로바키아에서⁶ *Apodemus spp.*, *Clethrionomys spp.*폐에서 항원을 검출하였다. Traavik et al⁷은 노르웨이에서 유행성 출혈열에 대하여 역학조사를 하여 *Clethrionomys spp.*가 주요 매개체임

을 확인하였다. 벨지움⁶에서 채집한 야생 식충동물에 속하는 *Sorex spp.*에서 항원을 확인하였을 뿐 *Crocidura spp.*에서는 확인을 하지 못하였다. Gligic et al⁹은 유고슬라비아에서 본 질병에 감염된 환자와 야생 설치류에서 항체 분포를 조사하였는데 *Apodemus spp.*, *Clethrionomys spp.*, *Microtus spp.*, *Pitymys spp.*, *Sorex spp.*에서 항원을 검출하였으나 *Crocidura spp.*에서는 검출하지 못하였다. LeDUC et al¹⁰은 그리이스의 *Rattus spp.*에서 뿐만 아니라 우점종 야생설치류인 *Apodemus flavicollis*에서 항체를 검출하였으나 따쥐류에서는 관찰하지 못하였다. LeDUC et al²²은 남극지역을 제외한 세계 각 지역으로부터 모아진 식충동물(*Bandicota spp.*)를 포함한 야생동물의 혈청에서 본 질병에 대한 항체를 관찰하고 넓은 지역적 분포를 확인하였다. 미국에서 Yanagihara⁴는 우점종인 *Rattus spp.*, *Microtus spp.*, *Mus spp.*와 같은 야생설치류의 유행성 출혈열에 대한 항체 보유상황을 지역별, 연도별로 조사하였다. 이상의 보고들이 나타내는 바는, 야생설치류 가운데 *Crocidura lasiura*에 의한 질병전파 가능성에 대하여서만 언급하고 있을 뿐 확인이 되지않고 있다. 본 조사에서 비록 적은 수이나 두마리의 야생 *Crocidura lasiura*.

Table 1. Immunofluorescent antibody to Hantaan related virus in wild shrews in Korea

Areas	No of tested	No of positive
BG	7	2
WG	3	0
KS	1	0
Total	11	2

Table 2. Immunofluorescent antibody to Hantaan related virus in SD rats after inoculated with field inoculum according to passage levels

Animals	Species	Sex	Passage levels				
			1	2	3	4	5
BG-1	<i>C. lasiura</i>	M	1:40	1:80	1:80	1:160	1:80
BG-2	<i>C. lasiura</i>	M	1:20	1:80	1:40	1:40	1:40
BG-3	<i>C. lasiura</i>	F	0	0	0	0	0
BG-4	<i>C. lasiura</i>	F	0	0	0	0	0
BG-5	<i>C. lasiura</i>	F	0	0	0	0	0
BG-6	<i>C. lasiura</i>	F	0	0	0	0	0
BG-7	<i>C. lasiura</i>	F	0	0	0	0	0
WG-1	<i>C. lasiura</i>	F	0	0	0	0	0
WG-2	<i>C. lasiura</i>	F	0	0	0	0	0
WG-3	<i>C. lasiura</i>	F	0	0	0	0	0
KS-1	<i>C. lasiura</i>	F	0	0	0	0	0

에서 항체 존재가 확인되므로써 따쥐도 본 질병의 전파에 관여함을 확인하였다. 더욱 지역을 확대하여 역학조사를 시행한다면 한층 정확한 야생 *Crocidura lasiura*와 본 질병과의 관계가 구명될 것으로 사료된다. Lee et al¹²에 의하여 야생등줄쥐(*Apodemus agrarius*)의 폐에서 병원체를 확인하고 조직배양세포를 이용하여 분리²⁰한 이후로, Lee et al¹³에 의하여 집쥐류(*Rattus spp.*), Yanagihara et al⁴에 의하여 대륙밭쥐류(*Clethrionomys glareorus*)에서 바이러스를 분리하였다. Lee et al¹³과 Groen et al²³은 조직배양법을 이용하여 *Clethrionomys glareolus*로부터 Hantaan 바이러스(76-118주)와 항원학적으로 다른 병원체를 분리하였다. Lee et al¹³은 갈밭쥐류(*Microtus pennsylvanicus*)의 폐에서 항원을 검출하고 동물접종법을 이용하여 바이러스를 분리하였다. Lee et al¹⁵이 미국에서 채집된 야생설치류에서 항체의 분포를 조사하고, *Microtus pennsylvanicus*로부터 분리한 Propect Hill 바이러스에 대하여 항원학적, 물리 화학적 성상을 보고하였다. 본 조사는 채집된 야생 *Crocidura lasiura*의 폐 유제액을 SD랫트에 직접 접종하고 계대하므로써 Hanta바이러스를 분리하였다. 조직배양을 통해 분리한 바이러스에 대한 항원학적, 물리 화학적 특성에 대해서는 현재 조사중이다.

야생식충동물을 포함한 야생동물의 종을 구분하는데 있어서는 과거로부터 외부 형상과 두개골의 형태를 이용하는 방법이 이용되어 왔다. Kuroda¹⁶는 국내에 분포하는 야생식충동물(식충목, 따쥐과)을 외형과 두개골의 형태를 이용하여 6종의 *Crocidura spp.*를 보고하였다. Won과 Woo¹⁷와 Woon²⁴은 제주도, 서울, 전주 그리고

Table 3. Serial passage of field samples in Vero E6

Isolates	Passage level				
	1	2	3	4	5
BG-1	-	-	-	-	+
BG-2	-	-	-	+	+

울릉도등 국내에 분포하는 따쥐과의 식충동물물 외형과 두개골의 형태에 따라서 종을 구분하였는데 2종의 *Sorex spp.*와 6종의 *Crocidura spp.*를 보고하였다. Won과 Woo¹⁷와 Jone과 Johnson¹⁸은 서울, 군산, 부산 등 국내 각 지역에서 채집된 *Crocidura spp.*를 약 6 종으로 분류하여 보고하였다. Corbet¹⁹은 외형, 두개골 형태 그리고 치아의 종에 따른 차이를 이용하여 분류하고 소련, 일본, 한국을 포함한 아시아 북부 지역에 분포하는 14종의 *Crocidura spp.*를 보고하였다. 본 실험에서는 국내 세 지역에 한정하여 야생따쥐를 채집하고 종을 분류

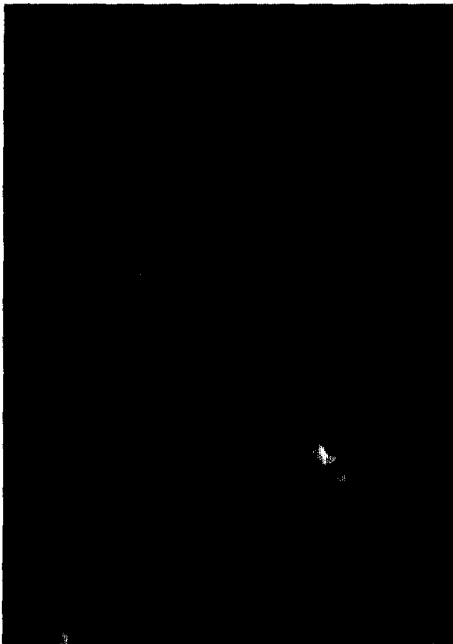
하였다. 단지 한 종만이 본 조사에서 채집되었는데 전자들의 보고가 서울을 중심으로 한 북쪽 지방²⁴, 목포, 부산¹⁷ 등으로부터 채집된 것으로 보아서 *Crocidura spp.*는 전국적인 분포임을 알 수 있다.

결 론

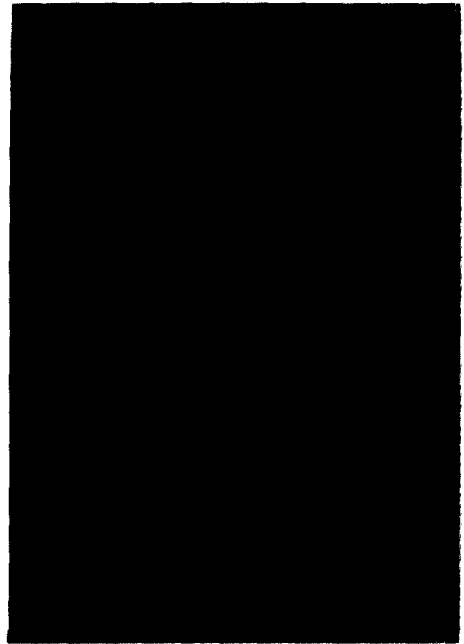
국내 세 지역(BG, WG와 KS)에서 11마리의 야생따쥐를 채집하였다. 채집된 야생따쥐류는 모두 같은 종인 *Crocidura lasiura*에 속하였다. 간접형광항체법을 이용해 열 한마리의 *Crocidura lasiura* 가운데 두마리에서 유행성 출혈열에 대한 항체를 검출하였다. 항체가는 1:40과 1:80이었으며, 두 주의 Hantavirus가 분리되었다. 분리된 바이러스에 대한 항원학적, 물리 화학적 성상에 대한 조사가 현재 진행중이다.

Legends for figures

- Fig 1. Immunofluorescent antibody to Hantaan virus(76-118 strain) with positive reaction.
- Fig 2. Immunofluorescent antibody to Hantaan virus(76-118 strain) with negative reaction.
- Fig 3. Fluorescent reaction of field isolates(Hantavirus) in Vero E6, positive.
- Fig 4. Fluorescent reaction of field isolates(Hantavirus) in Vero E6, negative.



①



②

③

참고 문헌

1. White JD, Shirey FG, French GR, et al. Hantaan virus, aetiological agent of Korean haemorrhagic fever, has Bunyaviridae-like morphology. *Lancet* 1982; 768-771.
2. Tsai TF. Hemorrhagic fever with renal syndrome: Mode of transmission to humans. *Lab Ani Sci* 1987; 37(4):428-430.
3. Lee HW. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Rev Inf Dis* 1989;11(4):864-876.
4. Yanagihara R. Hantavirus infection in the United States: Epizootiology and epidemiology. *Reviews of Infectious Diseases* 1990;12(3):449-457.
5. Chumakov MP, Gavrilovskaya IN, Boiko VA, et al. Detection of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus in the lung of bank voles *Clethrionomys glareolus* and redbacked voles *Clethrionomys rutilus* trapped in HFRS foci in the European part of U.S.S.R., and serodiagnosis of this infection in man. *Arch of Virol* 1981;69:295-300.
6. Gresikova M, Rajcani J, Sekeyova M, et al. Haemorrhagic fever virus with renal syndrome in small rodents in Czechoslovakia. *Acta Virol* 1984;28:416-421.



④

7. Traavik T, Sommer A, Mehl R, et al. Nephropathia epidemica in Norway: antigen and antibodies in rodent reservoirs and antibodies in selected human populations. *J Hyg Camb* 1984;93:139-146.
8. Verhagen R, Groen GVD, Rompaey JV, et al. Occurrence and distribution of hantavirus in wild living mammals in Belgium. *Acta Virol* 1986;31:43-52.
9. Gligic A, Obradovic M, Stojanovic R, et al. Epidemic hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia, 1986. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41(1):102-108.
10. LeDUC JW, Antoniadis A, Siamopoulos K. Epidemiological investigations following an outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome in Greece. *AM J Trop Med Hyg* 1986;35(3):654-659.
11. Shortridge KF, Lee HW, LeDUC JW, et al. Serological evidence of hantaan-related viruses in Hong Kong. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1987;81:400-402.
12. Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Inf Dis* 1978;137(3):298-308.
13. Lee HW, Baek LJ, Johnson KM. Isolation of hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Inf Dis* 1982; 145(5):638-644.

14. Yanagihara R, Svedmyr A, Amyx HL, et al. Isolation and propagation of nephropathia epidemic virus in bank voles. *Scand J Infec Dis* 1984;16:225-228.
15. Lee PW, Amyx HL, Yanagihara R, et al. Partial characterization of prospect hill virus isolated from meadow voles in the United States. *J Inf Dis* 1985; 152(4):826-829.
16. Kuroda N. Korean mammals preserved in the collection of Marquis Yamashina. *J Mamm* 1934;15:229-239.
17. Won PO, Woo HC. A distributional list of the Korean birds and mammals. *Forest Experiment Station, Institute of Agriculture Seoul, Korea* 1985:88-90.
18. Jones JK, Johnson D. Review of the insectivores of Korea. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History* 1960;9(22):549-578.
19. Corbet GB. The mammals of the palaeartic region: a taxonomic review. *British Museum (Natural History), Cornell University Press, London* 1978.
20. French GR, Foulke GS, Brand OA, et al. Propagation of the ethiological agent of korean hemorrhagic fever on a cultured continuous cell line of human origin. *Science* 1981;211:1046-1048.
21. Xu ZY, Tang YW, Kan LY, et al. Cats-source of protection or infection? A case-control study of hemorrhagic fever with renal syndrom. *Am J Epi* 1987;126: 942-948.
22. LeDUC JW, Smith GA, Childs JE, et al. Global survey of antibody to hantaan-related viruses and among peridomestic rodents. *Bulletin of the World Health Organization* 1986;64(1)139-144.
23. Groen GVD, Beelaert G, Hoofd G, et al. Partial characterization of a hantavirus isolated from a *Clethrionomys glareolus* captured in Belgium. *Acta Virol* 1987;31:180-184.
24. Woon PH. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korean mammals. Samhwa, Korea 1967.