

단일항체를 이용한 한국형출혈열의 병인성 연구*

가톨릭 의과대학 미생물학교실

김금용 · 김태규 · 유문간 · 임병욱

=Abstract=

Study on the Pathogenesis of Hantaan Virus with Monoclonal Antibodies

Gum-Ryong Kim, Tai-Gyu Kim, Mun-Gan Rhyu and Byung-Uk Lim

Department of Microbiology, Catholic Medical College, Seoul 135, Korea

Hantaan virus(HV) 76-118 strain was inoculated into suckling ICR mice by intra-nasal route with an inoculum of 10LD₅₀. Mortality was 65% at the 3rd week after inoculation, but declined to 35% at the 4th week. Infectivity was determined by the measuring immuno-fluorescent antibody in sera. The peak of infectivity was 80% at the 4th week after inoculation. Viremia was reached peak level of 1.7×10^4 PFU/ml by day 10. Immunofluorescent antibody and neutralizing antibody appeared by 2 weeks and 15-17 days respectively, but achieved similar titer by 35 days. By using a monoclonal antibody to HV 76-118, viral antigens were initially detected in inguinal and axillary lymph node by 2 days. Viral antigens in bone marrow and lung were delayed much more than in those of lymph node. These were similar with those of intra-peritoneal and intra-muscular route. Immune complex against IgG, IgM and C3 appeared by 16 days, 14 days, and 18 days respectively. The pattern of immunofluorescence in the basement membrane of glomeruli was diffuse membranous. Spotted pattern was also observed in the tissue stained with anti-mouse C3 antibody. By 20 days, control tissue was also shown immune complex in the glomeruli.

Key Words: Hantaan virus, pathogenesis, suckling mice, monoclonal antibody, lymph node, immune complex.

서 론

우리나라는 한국형 출혈열의 endemic area로 되어 있고, 도시와 농촌 구별없이 전지역에서 발생되고 있으며 환자수도 증가되는 추세를 보이고 있다. 한국형 출혈열의 원인 바이러스는 1976년 고려의대 이호왕·이평우 교수들에 의하여 분리되었고¹⁾ 1981년 French들이 시험관내 바이러스 증식법을 발표하였으며²⁾ 또 혈청학적 검색이 가능해짐으로서³⁾ 유럽·미국·중공·일본등 세계 각지역에서 교차반응을 일으키는 바이러스주들이 분리동정되었다⁴⁻⁹⁾. 자연계내 Hantavirus의 보유숙주동물도 Apodemus agrarius를 포함하여 집쥐 및 실험동물용 흰쥐등 많은 숙주동물들이 알려져 있어 바이러스의 전파나 감

*본 연구는 1985년도 동진-스미스클라인 알아이티 학술연구기금으로 수행되었음.

염이 점차 증가될 가능성이 높아지고 있다^{10, 11)}.

한국형출혈열바이러스에 대한 여러가지 혈청학적 검색법의 발전으로 항체는 쉽게 검색되고 있으며¹²⁾ Hantaviruses의 물리화학적 성상, 바이러스 핵산의 염기서열등도 비교적 상세히 알려져 있다¹³⁾. 그러나 Hantavirus에 의한 병인성은 감수성이 높은 실험동물을 찾지못하여 발견되지 못하고 있는 실정이다. 1983년 Kurata들이 suckling mice가 Hantaan virus 감염에 감수성이 높다는 보고를 한 이후 suckling mice를 이용한 병인성 연구들이 상당히 많이 진행되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. Hantaan virus 감염후 숙주체내에서의 증식성, 체내에서의 파급경로, 조직병변등에 대한 연구들이 발표되고 있으며^{15, 16)}, 세포성 면역능의 역할에 대한 보고도 있다¹⁷⁾. Suckling mouse model을 이용하여 chemotherapy나 immune spleen cell 또는 면역글로불린에 의한 passive immunization 실험들도 이루어져 ribavirin 등은 그 효

과가 어느정도 인정되고 있다^{15,16)}. 그러나 바이러스의 자연계내 생활환이나 감염경로 및 전파양식 등에 대해서는 확실하지 않다. 다만 호흡기감염의 가능성이 제시되고 있으나 증명되지는 못하고 있다.

이에 저자들은 Hantaan virus 76-118 바이러스를 suckling mice에 흡입 접종시킨후 감염율과 사망율, 항체생성 및 부강내나 근육내 접종시 바이러스 항원의 uptake 또는 retention되는 부위를 단클론항체로 추적조사하고 면역복합체 형성을 알아보려고 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스

고려의대 이호왕 교수로부터 분양받은 한탄바이러스 76-118(HV 76-118)주를 Vero E-6세포(A TCC C 1008, CRL 1586)에 3회 계대증식시켜 바이러스 역가가 1.0×10^7 PFU/ml이 되게 조정하여 -70°C 에 보관하였다가 실험에 사용하였다³⁾.

2. 세포주

한탄바이러스의 증식 및 바이러스 역가측정을 위하여 ATCC로부터 Vero E-6를 구입하여 사용하였다. 세포배양액은 EMEM에 10%의 우태혈청(Gibco, Grand Island, New York), 4%의 L-glutamine(200mM, 100x; Gibco, Grand Island, New York), 1%의 non-essential amino acids (10mM; Bioproducts, Walkersville, Maryland) 및 1%의 페니실린-스트렙토마이신을 첨가하여 사용하였다.

3. HV 76-118에 대한 단클론 항체

10^7 PFU/ml의 HV 76-118에 Freund incomplete adjuvant (Difco Laboratories, Detroit Michigan)를 동량 혼합하여 생후 4주된 Balb/c 마우스에 근육내로 0.5ml씩 1주간격으로 4주간 면역한 다음 혈청항체가 1:2048 이상이 되는 마우스의 비장을 적출하여 비장세포부유액을 만들었다. 세포부유액 내 적혈구는 0.01 M NH₄Cl 용액을 처리하여 용혈시켜 제거한 다음 면역글로불린을 생성하지 않는 myeloma 세포 NS-1과 비장세포의 비가 10:1이 되게 조정하고 50% polyethylene glycol 4000(Merk, cat, No, 9727) 용액을 가하여 세포를 융합시켰다¹⁷⁾. 세포융합후 complete HAT media에 부유시켜 96 well tray(Costar tissue culture, cambridge Mass)에 100 μ l씩 분주하여 배양하고 1주일후 HT media로 대체하여 4주간 배양하면서 상층액을 회수하여 항체생성 여부를 간접면역형광항체법으로 검색하였다.

4. 실험동물

임신한 ICR 및 Balb/c 마우스로부터 생후 24시간 이내의 suckling mice를 획득하여 실험에 사용하였다. 10 LD₅₀ 또는 5 LD₅₀이 되게 조정한 바이러스 희석액을 마우스당 0.02ml씩 접종하였다^{15,16)}. 바이러스는 부강내, 근육내 및 비강내로 접종하였고 대조군에는 우태혈청이 2% 첨가된 Hank's balanced salt solution (이하 2% HBSS로 약함)을 동량 접종하였다. 바이러스 접종후 2일 간격으로 각 마우스의 체중을 달아 감염군과 대조군사이의 차이를 관찰하였고, 혈액, 골수, 임파절 및 폐를 채취하여 바이러스 항원의 분포, 항체가측정 및 비강내 접종시 감염율과 사망율을 관찰하였다.

5. 혈청내 바이러스 역가 측정

Suckling mice의 비강내로 바이러스를 흡입 접종시킨후 2일간격으로 혈액을 채취하여 혈청내 바이러스 역가를 측정하였다¹⁵⁾.

매번 2마리의 마우스로부터 혈액을 채취하여 혼합한 후 혈청을 분리하고 이를 0.001 M 인산완충액으로 10배 계단 희석하여 Vero E-6 세포단층에 감염시켜 플라크 형성값을 측정하였다. Vero E-6 세포단층은 12-well로 된 조직배양병(well 직경 22mm; Costar, Cambridge, Massachusetts)에 형성시켰고, 중첩배지는 세포배양액에 agarose(FMC, Marine Colloidal Div, Rockland, Maine)를 최종 0.3% 가 되게 첨가하여 사용하였다. 7일후 중첩배지에 neutral red (1:300; Gibco, Grand Island, New York)를 5%되게 첨가하여 3-4일 후 플라크수를 산정하였다.

6. 조직내 바이러스 항원 검색

ICR 및 Balb/c suckling mice에 HV 76-118을 10 LD₅₀값으로 접종하고 2일 간격으로 골수, 서혜부 임파절, 액와 임파절 및 폐를 채취하여 polyethylene glycol compound (Tissue-Tek II, Miles Laboratories, Naperville, IL)에 매몰시켜 -70°C 에 보관하였다가 각 조직을 -20°C 에서 4 μ m의 두께로 조직표본을 만들어 (AO Histo Stat 975C, U. S.A) 4 $^\circ\text{C}$ acetone으로 고정한 후 HV 76-118에 대한 마우스 항원형과 단클론 항체(83002-01, B01BB08)를 가하여 30분동안 반응시킨후 FITC-labeled goat anti-mouse IgG (Cappel Laboratories West Chester, PA)로 간접면역 형광항체법으로 형광현미경(Nikon Model MBA 114 AC, Japan)하에서 바이러스항원을 검색하였다¹⁸⁾.

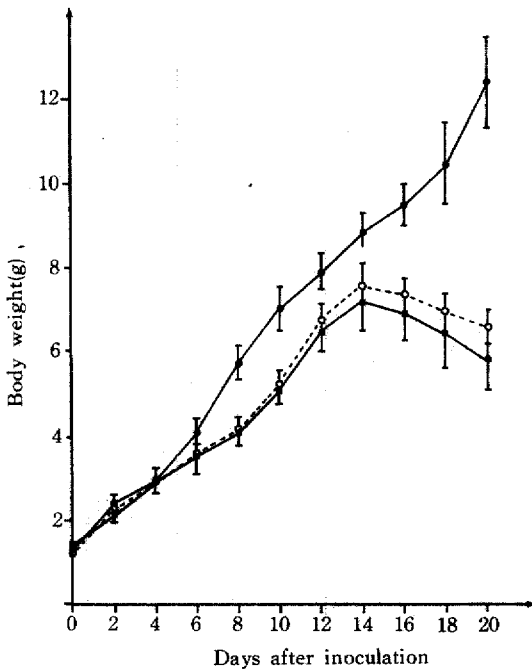


Fig. 1. Comparison of body weight between control and HV-infected suckling mice. All inocular were 0.02ml/mouse; mouse age \leq 24 hr. 20 mice/inoculation route used for each determination. Each points represents a mean value \pm S.D.

7. 항체가측정

ICR suckling mice에 HV 76-118을 5LD₅₀ 값을 비강내로 흡입접종하고 1주간격으로 매주 5마리의 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청내 형광항체역가와 중화항체역가를 Peters들의 방법에 따라 측정하였다¹¹⁾.

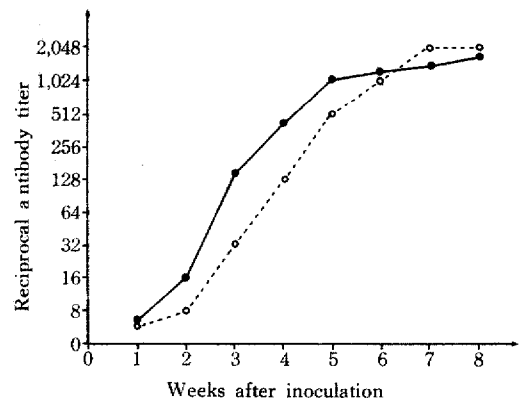


Fig. 2. Immunofluorescent antibody (●—●) and neutralizing antibody responses (○---○) in suckling mice infected with HV by intra-nasal route. Determinations of neutralizing antibody titer were made on sera pooled from 3 animals in infected with 5LD₅₀ of HV. Each point of immunofluorescent antibody indicates the geometric mean titer from 5 animals.

개체혈청의 형광항체가는 HV 76-118로 감염시킨 Vero E-6 세포의 spot slide를 이용하여 FITC-labeled goat antimouse IgG (Cappel Laboratories, West Chester, PA)로 간접 면역형광항체법으로 측정된 다음 geometric mean값으로 표시하였다. 중화항체가는 혈청을 2배 계단희석한 다음 일정량의 바이러스 희석액(1000PFU/ml)을 동량 첨가하여 4°C에서 18시간 방치하였다가 플라크형성법과 동일한 방법으로 잔존 바이러스의 역가를 측정하였다¹¹⁾. 플라크 형성값이 대조 well과 비교하여 80% 이상 감소된 역가를 중화항체가의 endpoint로 정하였다.

Table 1. Chronology and distribution by inoculation route of viral antigen in the bone marrow, lymph nodes and lung of HV-infected ICR suckling mice

Route Day	Organ	Bone marrow		Inguinal lymph node		Axillary lymph node		Lung	
		1P(%)	1M(%)	1P(%)	1M(%)	1P(%)	1M(%)	1P(%)	1M(%)
0		0	0	0	0	0	0	0	0
2		0	0	50.0	16.7	33.3	16.7	0	0
4		0	0	66.7	33.3	50.0	50.0	0	0
6		0	0	10.	66.7	83.3	66.7	16.7	0
8		0	0	83.3	83.3	83.3	83.3	33.3	16.7
10		33.3	16.7	100.0	83.3	100.0	100.0	83.3	50.0
12		66.7	33.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
14		83.3	83.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
16		100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
18		100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
20		100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Table 2. Chronology and distribution by inoculation route of viral antigen in the bone marrow, lymph-nodes and lung of HV-infected Balb/C suckling mice

Day	Route	Organ		Inguinal lymph node		Axillary lymph node		Lung	
		Bone marrow							
		1P(%)	1M(%)	1P(%)	1M(%)	1P(%)	1M(%)	1P(%)	1M(%)
0		0	0	0	0	0	0	0	0
2		0	0	33.3	33.3	16.7	50.0	0	0
4		0	0	50.0	50.0	33.3	50.0	0	0
6		0	0	66.7	83.3	50.0	66.7	0	0
8		0	16.7	83.3	100.0	66.7	100.0	33.3	16.7
10		16.7	33.3	83.3	100.0	83.3	100.0	83.3	33.3
12		66.7	66.7	83.3	100.0	83.3	100.0	100.0	83.3
14		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
16		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
18		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
20		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

IgM 역가는 생후 24시간 이내의 ICR 마우스에 HV 76-118을 10LD₅₀ 값을 근육내 접종하고 2일간격으로 혈액을 채취하여 spot slid 상에서 FITC-labeled goat anti-mouse IgM(Cappel Laboratories, West Chester, PA)으로 간접면역형광방법으로 측정하였다.

8. 신장조직내 면역복합체 검색

생후 24시간 이내의 ICR suckling mice에 10LD₅₀의 HV 76-118를 접종하고 2일간격으로 신장조직을 채취하여 조직표본을 만든 다음(재료 및 방법 5참조) 4°C acetone으로 고정하여 FITC-labeled anti-mouse IgG, IgM, C₃(Cappel Laboratories, West Chester, PA)를 각각 따로 처리하여 직접형광방법으로 신장조직내 침착된 IgG, IgM 및 C₃면역복합체를 검색하였다. 대조군은 2% HBSS를 동량 접종하였고 매번 작군마다 5마리의 마우스로부터 신장조직을 채취하였다.

성 적

1. 감염군과 대조군의 체중 비교

생후 24시간 이내의 ICR suckling mice를 20마리씩 3군으로 나누어 10LD₅₀의 HV 76-118을 제 1군은 복강내로, 제 2군은 근육내로 마우스당 0.02 ml씩을 접종하고 제 3군은 대조군으로 2% HBSS를 접종한 다음 2일 간격으로 각군의 마우스 체중을 달아 평균값을 구하여 비교한 바 그림 1과 같은 성적을 얻었다. 감염후 8일경부터 대조군에 비하여 감염군은 체중 증가정도가 둔화되기 시작하여 감염후 14일경부터 감소하여 20일경에는 대조군보다

50% 이상의 체중감소를 보였다. 접종부위간에는 차이가 없었다.

2. 조직내 바이러스 항원 분포

ICR 및 Balb/c suckling mice에 복강내 및 근육내로 바이러스를 접종하고 2일 간격으로 골수, 서혜부 임파절, 액와 임파절 및 폐조직 표본을 만들어 감염후 항원분포를 시간적으로 조사한 바 표 1과 2와 같다. 골수와 폐에서는 감염후 8일경 이후부터 검색되기 시작하는데 비하여 임파절에서는 감염후 2일경부터 바이러스항원이 검색되기 시작하였다. 접종부위간에는 차이가 없었고 임파절 표본에서의 바이러스항원 검색율은 16%~50%였고 감염후 6일경에는 66% 이상이었다. 바이러스항원 양성인 세포수의 비율은 3~10%였다. 마우스종에 따른 바이러스항원 분포성이나 검색율에 차이는 없었다.

3. 비강내 접종시 viremia

생후 24시간 이내의 ICR suckling mice에 10LD₅₀를 10배 농축하여 2μl씩을 각 마우스의 비강내로 흡입시켜 접종한 다음 2일 간격으로 2마리씩의 마우스로부터 혈청을 분리하여 혼합한 시료로 플라크 형성능을 측정하여 혈청내 바이러스 역가를 측정한 결과 표 3과 같다. 감염후 6일경부터 1.5 × 10²PFU/ml의 바이러스가 측정되기 시작하여 10일경에 1.7 × 10⁴PFU/ml로 최고치에 이른 후 점차 감소하여 14일경 이후부터는 검출되지 않았다.

4. 비강내 접종시 감염율과 사망률

Viremia 측정시와 동일한 방법으로 바이러스를 비강내로 흡입 접종시킨후 1주 간격으로 감염율과 사망율을 조사한 바 표 4와 같다. 대조군에는 2% HBSS를 동량 흡입시켰다. 감염율은 각 마우스의 혈청을 분리하여 형광항체를 측정하여 결정하였다. 감염후 2주경에 35%의 감염율과 15%의 사망율을 나타냈으며 감염후 3주경에 65%의 감염율과 40%의 사망율을 보였다. 4주경에는 감염율은 80%인데 비하여 사망율 35%로 다소 감소되었다. 4주 이상 경과시까지 생존한 마우스에서는 사망율이 0였고 접종후 5일 이내 사망한 예는 사망율 산정에서 제외시켰다.

5. 형광항체가 및 중화항체가

5LD₅₀의 바이러스를 흡입접종시킨후 8주간 관찰하면서 1주 간격으로 혈청을 채취하여 형광항체와 중화항체를 측정한 바 그림 2와 같은 성적을 얻었다. 형광항체는 감염후 2주경부터 검출되기 시작하여 5주경에는 1:1024로 증가하였으며 그이후에는 매우 서서히 상승하였고 중화항체는 형광항체가 보다 다소 늦게 검출되어 감염후 6주경에 1:1024 이상으로 증가되었다.

Table 3. Serum viremia in HV-infected suckling mice by intranasal route

Day after inoculation	PFU/ml
4	ND*
6	1.5×10 ⁸
8	2.4×10 ⁸
10	1.7×10 ⁸
14	1.0×10 ⁸
16	ND

Virus titers were obtained by direct plaque assay of serum. Each titer represents a pooled specimen from 2 animals infected with 10LD₅₀ of HV.

*not detectable

Table 5. Detection of immune complex in the kidney of HV-infected ICR suckling mice

Day	Antibodies	Infected mice				Control			
		Ag	IgG	IgM	C ₃	Ag	IgG	IgM	C ₃
12		+	-	-	-	-	-	-	-
14		++	-	+	-	-	-	-	-
16		+++	+	++	-	-	-	-	-
18		++++	+	++	+	-	±	+	±
20		++++	++	+++	++	-	-	+	+

4μm sections were cut, and fixed in cold acetone. Each sections was stained for direct immunofluorescence with FITC-labeled goat antimouse IgG, IgM and C₃. Mice were infected with 10LD₅₀ by intraperitoneal route.

6. 면역복합체 검색

FITC-labeled goat anti-mouse IgG, IgM 및 C₃를 이용하여 감염된 마우스의 신장조직내 면역복합체를 직접 형광항체법으로 조사한 바 표5와 같은 성적을 얻었다. 신장조직에서 HV76-118 항원은 감염후 12일경부터 검출되기 시작하여 시간이 경과할수록 증가되어 전조직에서 관찰되었다. IgG면역복합체는 감염된 마우스의 사구체에서 16일경부터 검출되기 시작하였으며 양상은 diffuse membranous 한 양상을 보였고, IgM면역복합체는 14일경부터 검출되어 그 수가 점차 증가되었으며 형광의 양상은 IgG면역복합체와 비슷하였다. C₃면역복합체는 18일경부터 검출되었고 spotty한 양상을 나타냈다. 2% HBSS를 접종한 대조군에서도 생후 18일경부터는 소수의 사구체에서 면역복합체가 관찰되었으나, 형광의 강도는 매우 약했다.

Table 4. Infectivity and mortality in suckling mice infected with Hantaan virus by intra-nasal route

Week after inoculation	Infectivity(%)*	Mortality(%)
1	0/20 (0%)	0/20 (0%)
2	7/20 (35.0%)	3/20 (15.0%)
3	13/20 (65.0%)	8/20 (40.0%)
4	16/20 (80.0%)	7/20 (35.0%)
Diluent control	0/20 (0%)	0/20 (0%)

*10LD₅₀ of HV was inhaled into suckling mice with the micro-syringe

*infectivity was determined by the detection of immunofluorescent antibody in sera.

고 찰

Hantavirus의 병인성을 보다 정확하게 규명하기 위해서는 원숭이와 같은 고등동물을 이용한 실험 model이 개발되어야 하나 현재까지는 감염은 성립되거나 불현성 감염증만 나타나어 병인성연구가 진전되지 못하고 있다. Tsai들과 Kurata들이 suckling mice가 Hantaan virus 감염에 감수성이 높다고 보고한 이후, suckling mice를 이용한 실험성적들이 보고되고 있다¹⁴⁻¹⁶. 이외 wild rat나 실험실 rat에 바이러스를 감염시켜 병인성을 관찰한 보고들도 많이 있으나^{21, 22}, 대부분이 불현성 감염을 나타내기 때문에 suckling mice model을 이용하는 편이 보다 효과적이다.

생후 24시간내 suckling mice에 HV76-118 바이러스를 접종하면 육안적으로 관찰이 가능한 여러 가지 증상이 나타나는 장점이 있다. 이외 HV76-118을 suckling mice의 복강내나 근육내로 접종하였을 때 감염군은 접종후 8일경부터 체중이 감소되어 20일경에는 50%이상의 체중감소를 보이고 12일 경에는 육안적으로도 감염여부를 구별할 수 있다. 접종 후 16일경에는 양측양하지가 마비되어 여타 arborvirus 감염때와 비슷한 증상을 보였다^{15, 16}. 바이러스 접종 후 서혜부 임파절, 액와 임파절, 골수 및 폐조직내에서의 바이러스 항원을 검색한 바 폐, 뇌, 간 및 신장에서 보다 2-4일 빠르게 임파절에서 바이러스 항원이 검색되었다. 골수에서는 폐나 뇌에서 비슷한 시기에 항원이 검색되었고 마우스종간에는 차이가 없었다(표 1, 2). 임파절내에서 초기에는 3~5%의 세포에서만 바이러스 항원이 검색되고 주로 paracortical area에 분포하고 있었으며 시일이 경과함에 따라 약간 증가되는(5-10%) 경향을 보였으나 큰 차이는 없었다. 이러한 소견은 폐, 뇌, 신장에서 보이는 소견과는 매우 다르다^{15, 16}. 즉 폐 뇌, 신장에서는 시일이 경과할수록 바이러스 항원 양이 증가되고 전 조직에서 관찰되며 바이러스의 감염정도 증가된 점과는 대조적이다. 임파절에서의 바이러스 감염도는 측정할 수 없었다. 임파절 내에서 HV76-118이 증식되지는 않는것 같고 다만 바이러스항원이 retention되는 상태를 유지하는 것 같다.

10LD₅₀의 바이러스를 suckling mice에 흡입 접종시 접종후 4주경에 감염율이 80%로 복강내나 근육내 접종시 보다 낮았으며 사망율도 3주경 40%로 매우 낮았다. 이는 흡입접종시 바이러스가 충분히 접종되지 못하였을 가능성이 크고 접종에 요하는 시간도 길어 바이러스가 불활화되었을 가능성도 있

다. 그러나 호흡에 의한 흡입 접종시에도 감염이 되며, 충분한 양의 바이러스가 접종되면 복강이나 근육내 접종시와 같은 감염 경로를 밝음을 알 수 있었다^{15, 16}. 흡입접종시 viremia는 접종 후 10일경 1.7×10^4 PFU/ml로 최고치에 달하여 뇌내나 복강내 및 근육내 접종시 보다 낮았으며 최고치에 달하는 시일도 2일 정도 지연되었으나 피하접종시보다는 빨랐다^{15, 16}. Viremia가 검출되는 시기는 접종 후 6일경으로 비슷하였다^{15, 16}. 형광항체나 중화항체는 근육내, 뇌내 및 복강내 접종시와 비슷한 양상을 보였고 비강내 흡입 접종시에도 중화항체가 늦게 검출된 점은 같았다¹⁵. 형광항체가 최고치에 도달하는 시기는 5일정도 늦으나 중화항체는 거의 시기적 차이가 없이 최고치에 도달하였다.

HV76-118 접종시 mouse의 사망원인은 아직 확실하지 않고 다만 병리조직학적 소견상으로 meningoencephalitis와 thalamus에 매칭상 necrosis가 확인되었을 뿐이다¹⁶. 기타 장기에서는 일반 바이러스 감염시와 대동소이한 소견이 보여 사인을 확정짓기가 어렵고 최근에 면역복합체에 의한 병인론이 제시되고 있어 이를 확인하여보고자 항 마우스 IgG, IgM 및 C3 항체를 이용하여 감염군의 신장조직내 사구체에서 이를 면역복합체를 직접형광항체법으로 검색한 바 면역복합체가 사구체내 기저막에서 확인할 수 있었고 그 형광양상도 달랐다. 감염군에 있어서의 혈청내 HV76-118에 대한 IgM 항체는 감염 후 7일경 1:64로 최고치를 보였다(성적은 제시하지 않음). 면역복합체 검사시 바이러스 항원이 양성인 조직만을 대상으로 하였으며 IgM 면역복합체가 빨리 검출되었고 IgG, C3 순이었다. 그러나 대조군의 마우스 사구체에서도 생후 20일경에는 면역복합체가 검출되었다. 정상마우스에서도 대부분이 사구체 또는 혈청에서 면역복합체가 검출된다는 보고들이 있어^{23, 24} HV76-118 감염시 면역복합체에 의한 병인론은 규명하기 어려울 것으로 본다. 본 실험에서는 혈청내 면역복합체나 C3 농도는 측정하지 않았다.

감염후 바이러스의 일차증식부위로 reticuloendothelial system을 고려할 수 있으나 이에 대하여서는 더 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되며 면역복합체에 의한 병인론기전은 매우 복잡하고 정밀한 실험계가 소요됨으로 이를 규명하기는 매우 어렵다.

결 론

생후 24시간 이내의 ICR 및 Balb/c suckling mice에 HV76-118 바이러스를 감염시켜 골수, 임파

질 및 폐조직에서의 바이러스항원 분포 및 IgG, IgM, C3에 대한 항체를 이용하여 사구체내의 면역 복합체 형성등을 직접 및 간접 면역형광항체법으로 비교 조사하고 비강내로 흡입 접종시의 감염율과 사망율, 형광항체가와 중화항체가 측정 및 Vero E-6세포단층에서의 플라크 형성능에 의한 viremia를 측정한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HV 76-118을 suckling mice에 감염시켰을 때 감염군의 체중증가가 감염후 8일부터 현저히 둔화되어 20일경에는 대조군에 비하여 50% 이상 감소되었고 탈수상태에 빠졌다. 바이러스의 접종경로간에는 차이가 없었다.

2. 바이러스항원은 임파절에서 감염후 2일경부터 검색되기 시작하여 6일경에는 66%의 항원 양성율을 보였으며 이는 폐조직에서보다 검색율은 4배 이상 높았고 검색시기는 2일 이상 빨랐다.

3. 비강내로 흡입접종시 6일경부터 viremia가 시작하여 10일경 1.7×10^4 PFU/ml로 최고치에 달하였으며 감염율과 사망율은 3주경 65%, 40%를 각각 나타냈다. 4주경에는 감염율이 80%로 증가되었으나 사망율은 감소하였다.

4. 형광항체는 감염후 2주경부터 검색되기 시작하여 5주경에는 1:1024로 증가하여 그 이후부터는 서서히 증가되었고, 중화항체는 형광항체보다 다소 늦게 검색되어 6주경에 1:1024가 되었다.

5. 사구체내 IgG면역복합체는 감염후 16일경부터 검색되었으며, IgM면역복합체는 14일경부터 검색되어 검색율이 증가되는 경향을 보이고 형광양상은 diffuse membranous하였다. C3면역복합체는 18일경부터 검색되었으며 양상은 spotty하였다. 대조군에서도 20일경부터 면역복합체들이 검색되었다.

주: 본 실험을 수행하는데 여러가지로 도와주신 고려의대 이호왕·이평우 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Lee HW and Lee PW: Korean hemorrhagic fever. I. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Korean J. Intern Med.* 19: 371, 1976.
- 2) Lee HW, Lee PW and Johnson KM: Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Inf. Dis.* 137:298, 1978.
- 3) French GR, Foulke RS, Brand OA, Eddy GA, Lee HW and Lee PW: Korean hemorrhagic

fever: Propagation of the etiologic agent in a cell line of human origin. *Science* 211: 1046, 1981.

- 4) Lee PW, Clarence JG, Gajdusek DC and Yanagihara R: Serotypic classification of Hantaviruses by indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests. *J. Clin. Microbiol.* 22:940, 1985.
- 5) Goldgaber D, Gibbs CJ, Gajdusek DC and Svedmyr A: Definition of three serotypes of Hantaviruses by a double sandwich ELISA with biotin-avidin amplification system. *J. Gen. Virol.* 66:1733, 1985.
- 6) Lee PW, Goldgaber D, Gibbs CJ, Gajdusek DC, Yanagihara RT, Svedmyr A, Hlaca D, Vesenjak-Hirjan J and Gligic A: Other serotypes of hemorrhagic fever with renal syndrome viruses in Europe. *Lancet* ii: 1405, 1982.
- 7) LeDuc JW, Smith GA and Johnson KM: Hantaa-like viruses from domestic rats captured in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33:992, 1984.
- 8) Lee PW, Amyx HL, Yanagihara R, Gajdusek DC, Goldgaber D and Gibbs CJ: Partial characterization of Prospect Hill virus isolated from meadow voles in the United States. *J. Infect. Dis.* 152:826, 1985.
- 9) Kitamura T, Morita C, Komatsu T, Sugiyama K, Arikawa J, Shiga S, Takeda H, Akao Y, Imaizumi K, Oya A, Hashimoto N and Urasawa S: Isolation of virus causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) through a cell culture system. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 36:17, 1983.
- 10) Whang YW and Lee HW: Epidemiologic study of Korean hemorrhagic fever. *Korea Univ. Med. J.* 17:137, 1980.
- 11) Lee HW, French GR, Lee PW, Baek LJ, Tsuchiya K and Foulko RS: Observations on natural and laboratory infection of rodents with the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30:477, 1981.
- 12) Sugiyama K, Matsura Y, Morita C, Shiga S, Akao Y, Komatsu T and Kitamura T: An immune adherence assay for discrimination be-

- tween etiologic agents of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Infect. Dis.* **149**: 67, 1984.
- 13) Schmaljohn CS and Dalrymple JM: Analysis of Hantaan virus RNA: Evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virology* **131**:482,1983.
 - 14) Kurata T, Tsai T, Bauer SP and McCormick JB: Immunofluorescence studies of disseminated Hantaan virus infection of suckling mice *Infect. Immun.* **41**:391, 1983.
 - 15) Kim GR and McKee KT Jr: Pathogenesis of Hantaan virus infection in suckling mice: Clinical, virologic, and serologic observations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**:388, 1985.
 - 16) McKee KT, Kim GR, Green DE and Peters CJ: Hantaan virus infection in suckling mice: Virologic and pathologic correlations. *J. Med. Virol.* **17**:107, 1985.
 - 17) Nakamura T, Yanagihara R, Gibbs CJ and Gajdusek DC: Immune spleen cell mediated protection against fatal Hantaan virus infection in infant mice. *J. Infect. Dis.* **151**: 691, 1985.
 - 18) Lee PW, Amyx HL, Salazar A, Reiner B, Gibbs CJ and Gajdusek DC: Chemotherapy and passive immunization of experimental Hantaan virus infections in laboratory rats. *Proc. Ist Intern. Symp. Pub. Hoal. Asia and Pacific Basin* **70**, 1985.
 - 19) Huggins JW, Kim GR, Brand OM and McKee KT: Ribavirin therapy for Hantaan virus infection in suckling mice. *J. Infect. Dis.* **153**:489, 1986.
 - 20) Schreier M, Kohler G, Hengartner H, Berek C, Trucco M and Forn L: Hybridoma technique. *Cold Spring Harbor Laboratory*: **1**, 1980.
 - 21) Lee PW, Amyx HL, Gibbs CJ, Gajdusek DC and Lee HW: Propagation of Korean hemorrhagic fever virus in laboratory rats. *Infect. Immun.* **31**:334, 1981.
 - 22) Yanagihara R, Amyx HL and Gajdusek DC: Experimental infection with Puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in Bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *J. Virol.* **55**:34, 1985.
 - 23) Linder E, Pasternack A and Edgington TS: Pathology and immunology of age associated disease of mice and evidence for an autologous immune complex pathogenesis of the associated renal disease. *Clin Immunol. Immunopathol* **1**:104, 1972.
 - 24) Lambert PH, Dixon FJ, Zubler RH, Agnello V, Cambiase C, Casal P, Clarke J et al: A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complex in serum. *J. Clin. Lab. Immunol.* **1**: 1, 1978.