

Baculovirus에서 발현된 Norwalk Virus 캡시드 항원에 대한 국내인의 혈청학적 반응도

한양대학교 의과대학 미생물학교실

강신재 · 남기범 · 조양자 · 김경희

=Abstract=

Seroprevalence of Norwalk-Like Viruses (NLVs) in Seoul: Detection Using Baculovirus-Expressed Norwalk Virus Capsid Antigen

Shin-Jai Kang, Ki-Bum Nam, Yang-Ja Cho and Kyung-Hee Kim

Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine, Seoul 133-791, Korea

The present study was designed to estimate the seroprevalence of NLVs among diarrheagenic children and in healthy adults in Seoul and its vicinity with the use of an EIA and an Western blot (WB) based on recombinant Norwalk virus capsid protein (rNV) and crude virus preparations as antigen. Seroconversion was observed in 34 (83%) of 41 tested using the EIA and in 21 (54%) of 39 using the WB, suggesting that the NLVs with epitopes common to rNV are prevalent in Seoul area. Diarrheal children who were known to have been infected with several other strains of the NLVs showed no significant antibody response to the rNV. Infection with rNV occurred earlier in life: primary infections with rNV were common before the age of 6 months and over 91% of children had evidence of infection by that age by the EIA. Since the amount of the NLV antigens available for seroepidemiologic surveys is limited, we tried to detect NLV antibody by using crude virus preparations as antigen. One crude virus preparation of a child whose stool yielded genetically distinct NLV revealed the presence of the plural number of bands upon SDS-PAGE, but precipitated only one band (62 kDa) after the WB with a serum (collected 10 days after the onset of symptoms) of another diarrheal child. The WB assay we present in this report revealed that the NLVs are prevalent among Korean population and that the sera contained antibody to a single major structural protein, with molecular sizes of 58 to 62 kDa, compatible with the sizes reported for the Norwalk virus and Snow Mountain agent proteins, respectively. When the results of the WB were compared with those obtained by the EIA, the EIA antibody assay was sensitive enough to detect an antibody rise of as much as 4096-fold but not as specific as the WB. The WB assay presented in this paper will provide a powerful tool to elucidate not only antigenic structures of the NLVs but also seroepidemiology of the NLV infection. The availability of an unlimited source of antigen will enable a large scale serologic studies that will greatly increase our understanding of the role of NLVs in human enteric illness.

Key Words: Calicivirus, capsid protein, Norwalk virus, baculovirus, gastroenteritis

*본 연구의 일부는 1997년도 한양대 교내 연구비 및 1996년도 교육부 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었음.

서 론

겨울철 구토질환 ('winter vomiting disease')의 유발체로 지목되었던 Norwalk virus [1]를 prototype으로 하는 '사람 caliciviruses (HuCVs)'는 최근 세계적으로 집단식중독과 자주 연관되어 [2], 식중독에 의한 바이러스성 집단장염의 90%를 차지하고 있다 [3]. 유사질환에서 수집된 변 검체들의 전자현미경적 관찰에서 prototype과 형태학적으로 유사하였던 Snow Mountain agent [4], Hawaii agent [5], Taunton agent [6]등은 생물학적으로도 Norwalk virus와 비슷하여 Norwalk-like virus (NLV)로 불리우며 [2], 최근 지놈이 규명되면서 50여종류의 NLV들이 *Caliciviridae*과로 분류되고 있다 [2,4,5~7]. 국내에서 흔한 집단식중독의 원인체로 아직 NLV들이 거명된 적은 없으나, 김 등[8]의 연구에서 소아군의 산발적 장염에서의 RT-PCR에 의한 NLV의 검출율은 9%였으며 이들의 1/3가량이 장염 원인체로 잘 알려진 rotaviruses, adenoviruses, astroviruses와 함께 검출되었다. 이는 국내에 NLV-유발 장염이 흔하지만 이를 구체적으로 찾지 않는한 다른 장염 바이러스에 가려져 장염 원인체로 부각되지 않고 있음을 의미하는 자료였다.

HuCVs는 직경이 25~35 nm가량되는 20면체 내에 7.6 kb의 한줄짜리 positive-sense RNA 지놈을 가진 조그마한 바이러스로 3개의 open reading frame (ORF)을 표지한다. ORF1은 RNA-dependent RNA polymerase와 같은 비구조 단백을 만들고, ORF2는 capsid 단백을 표지하며 [2,9,10], ORF3의 기능은 아직 알려지지 않았다. 이들은 세포배양에 자라지 않으며 변 검체내의 바이러스량도 매우 낮다. 따라서 이들 NLV들의 항원성 평가에는 환자 회복기 혈청을 사용하는 면역전자현미경적 관찰이 요구된다 [11~13]. 이에 따라 NLV들은 Norwalk, Hawaii, Snow Mountain, Taunton virus 각각을 혈청형 1, 2, 3, 4로 하는 4종류의 혈청형으로 분류된다 [2,4~6]. Jiang 등 [14]은 혈청형 1인 prototype Norwalk virus의 capsid 유전자를 baculovirus expression system에서 발현시킨 virus-like particle (rNV, recombinant capsid protein)을 사용하여 효소면역측정법 (enzyme immunoassay, EIA)을 개발하였으나 NLV capsid의 항원성이 다양하여 rNV로 면역된 혈청으로는

NLV 항원형 일부만을 검출할 수 있었다 [2,8, 14~17]. 또한 ORF2 5'-end 부위의 안정된 이차구조로 인하여 타 혈청형들의 ORF2 증폭에 많은 어려움이 있는바 현재까지 이 부위의 염기서열이 알려지지있는 NLV는 단 3주뿐이다 [2,10].

따라서 본 연구에서는 rNV를 사용하여 서울의 장염 유발 소아들 회복기 및 건강한 청년기 혈청내의 rNV에 항체 분포를 평가하고, rNV 또는 전회 [8,18]의 연구에서 유전자형이 규명된 NLV-함유 변 검체를 부분 정제한 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)하고 연구대상 혈청으로 immunoblot (Western blot, WB)하여 국내인 혈청의 NLV 단백질에 대한 노출범위를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

본 연구에서 사용된 항혈청은 바이러스성 급성장염으로 서울 소재 종합병원에 입원한 소아환자들의 혈청 (증상후 3~14일)과 건강한 청년들로부터 얻어진 것들이다. 총 45명으로 6개월 미만이 11명, 6~24개월이 12명, 24개월~15세 미만이 4명, 청년층 (22~25세)이 18명이었다. 또한 실험상의 양성 및 음성혈청으로는 rNV (Eastern Virginia Medical School, Norfolk, Virginia의 Dr. Jason Jiang 제공)를 토끼에 면역시킨 혈청 및 면역전 혈청을 각각 사용하였다. 혈청들이 노출된 항원적 다양성을 판단하기 위하여 rNV 대신 전회 [8,18]의 연구에서 RNA polymerase region의 염기서열을 토대로 한 dendrogram중 Norwalk-like와 Snow Mountain-like 유전자군을 함유한 변 검체를 정제후 위 동일 혈청들과의 WB에 사용하였다.

2. rNV EIA [14]

96 microtiter plate (Dynatech, Chantilly, VA)를 한 well당 100 μ l (1 μ g/ml in 0.01M PBS, pH 7.2)의 rNV로 씌우고 실온에서 4시간 보관하였다. 각 well을 200 μ l의 0.05% Tween 20-PBS (이하 모든 세척액 상동)로 씻고 200 μ l씩의 5% skim milk (in 0.01M PBS)를 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 일주야 보관하였다. 200 μ l씩의 세척액으로 두번 씻고 1% skim milk-PBS로 희석된 (1: 64를 일단 검사한 후 양성이면 1: 9600까지 2 배수씩 희석하고, 음성이면

1: 16, 1: 32로 재검사하였다. 사람 혈청 100 μ l을 두개씩의 well에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 보관하였다. 다시 6번 씻고 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG, M, A (Cappel Organon Teknika Corp., West Chester, PA)을 1% skim milk-PBS로 1: 5,000 희석하여 그 희석액을 well당 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 보관한 후 다시 6번 씻었다. 2,2-azino-di [3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate]) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 100 μ l씩을 넣고 30분후에 A414에서 OD값을 측정하였다.

3. 바이러스 부분정제

NLV들의 항원이 량적으로 매우 제한되어 있으므로 본 연구에서는 전회 [18]의 연구에서 유전자군이 규명된 NLV-양성 변 검체 추출액과 anti-rNV와의 작용 양상을 관찰하기 위하여 이들 검체들을 Hayashi [19]의 방법에 따라 부분 정제하였다. 대상 검체들은 전회 [18]의 연구에서 Southampton virus와 96% 및 98%의 염기 및 아미노산 서열을 공유하여 Norwalk virus 유전자군으로 판명되었던 HuCV1819/92/KR, NV와의 염기 및 아미노산 유사도가 각각 62%와 65%였으며, Snow Mountain agent와의 염기 및 아미노산 유사도는 69%, 71%로 지놈변이가 높은 분리주로 판명된 HuCV1170/90/KR 및 HuCV/1858/92/Korea (Snow Mountain agent 유전자군)들을 함유하였다.

변 검체를 TN buffer (0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.02% Na₃N)로 10% 희석한 후 동량의 trichlorotrifluoroethane (Sigma)으로 homogenier (4 $^{\circ}$ C)에서 1분간 잘 섞었다. 이를 1,500g에서 10분간 원심분리후 상층액을 곧바로 다시 3,000g에서 30분간 원심분리하였다. 그 상층액을 초원심분리기 (SW 41 rotor; Beckman Instruments Inc., Somerset, NJ)로 100,000g에서 2시간 30분 원심분리 (4 $^{\circ}$ C)하였다. Virus pellet를 멸균된 3차 증류수로 녹여 WB assay의 시료로 사용하였다.

4. SDS-PAGE

본 실험에서 사용한 SDS-PAGE는 Laemmli [20]의 방법을 변형하여 사용하였다. 멸균된 3차 증류수로 약 1/20 희석한 rNV (0.25mg/ml) 및 위의 3항에서 부분 정제된 바이러스액을 전기영동용 5X sample buffer (60mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1%

bromophenol blue, pH 6.8)에 넣고 100 $^{\circ}$ C에서 2~10분간 끓여 변성시킨 후, 전기영동을 하기 전까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. Polyacrylamide gel은 discontinuous linear slab gel (5% stacking, 12.5% separating gel)로 Mighty Small SE245 electrophoresis system (Hofer Scientific Instrument, San Francisco, CA)을 이용하여 100V (constant voltage)로 전기영동하였다. Coomassie Blue R-250 stain 용액 (0.1% Coomassie Blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 gel을 30분간 염색한 후, 10% methanol/10% glacial acetic acid용액에서 탈염색하였다. 단백질 분자량 측정 시료로 mid-range protein molecular weight markers (Promega, Madison, WI) 가 사용되었다.

5. Western blot (immunoblot)

rNV (2.5 mg/ml) 및 부분 정제된 변 검체 추출액을 멸균된 3차 증류수로 희석하여 SDS와 2-mercaptoethanol이 함유된 sample buffer (pH 6.8)에 100 $^{\circ}$ C에서 6분간 변성시켰다. 그 후 변형된 Laemmli [20] 방법을 이용하여 12.5%의 discontinuous slab gel를 이용하여 100V에서 전기영동하였다. 그 후 gel을 nitrocellulose membrane (Sigma)에 30V로 4 $^{\circ}$ C에서 electroblotting apparatus (X Cell II, Novex, San Diego, CA)를 이용하여 transfer buffer (15.6mM Tris, 120mM glycine, pH 8)내에서 약 1시간 30분동안 electroblotting시켰다. 분자량 측정용 시료는 다른 NC membrane에 전이시킨 후 amido black (Sigma)으로 염색하였다. 그 후 NC membrane을 3% BSA/TBS (3% bovine serum albumin, 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5)용액에 약 2시간 동안 담구워 전이되지 않은 다른 부분을 차단하였다. 다시 TBS 용액으로 3회 세척후 rNV에 대한 다가 토끼혈청 (rabbit anti-rNV), 환자의 혈청을 0.5% BSA/TBS로 2배수로 1/100까지 희석하여 상온에서 약 1시간 30분 가량 회전하면서 반응시켰다. 그 후 TBS용액으로 3회 세척후 horseradish peroxidase가 결합된 anti-human immunoglobulin (Sigma)을 0.5% BSA/TBS 용액으로 1/3,000~1/5,000희석하여 1시간 동안 회전하며 반응시켰다. TBS용액으로 3회 세척후 chloronaphthol (Sigma)을 기질로 하여 발색시켰다. 띠가 확연히 관찰되면 깨끗한 증류수로 세척하여 발색과정을 중단시켰다.

결과 및 성적

1. rNV 항체 분포

rNV-EIA로 검사된 41개의 혈청중 83%인 34개가 rNV에 대한 항체 양성이었으며, 그 역가는 1/16-1/4096이었다. 이 중 급성 장염으로 입원한 소아군 (<15세) 혈청에서의 항체 양성률은 74%, 22-25세 사이의 청년층 혈청에서의 양성률은 94%였다 (Table 1). 소아군의 동일 혈청 검체들의 96%에서 rotavirus에 대한 항체가 탐지되었으며, 65%에서 adenovirus hexon에 대한 항체가 관찰됨으로 rNV에 대한 항체 빈도는 rotavirus 다음으로 두번째로 이들 바이러스항원 분리율과 비례하였다 [8,18,21,23]. 연령에 따른 anti-rNV 분포는 생후 6개월까지 91%의 양성률을 보임으로 국내 소아들은 생후 6개월전에 NLV에 처음 노출되는 것으로 보인다. 22~25세의 건강한 청년층에서도 94%의 높은 빈도를 보이는 것으로 볼 때 지역사회에서의 NLV 분포가 예상보다 높은 것으로 사료된다.

반면, WB로 분석된 39명의 혈청중 21 (54%) 명이 1/10~1/40에서 양성을 나타내었다. 본 연구에서의 EIA와 WB의 민감도와 특이도는 각 94% 대 60%, 33% 대 83%였다.

2. rNV 및 변 검체내 NLV의 protein profile 및 WB 분석

rNV (0.25 mg/ml per lane)는 SDS-PAGE상 약 67, 60, 55 kDa의 단백질 띠를 나타내었으며 rabbit anti-rNV (1/500 - 1/50,000) 및 면역전 토끼혈청을 사용한 WB 결과, 전자에서 60 kDa의 띠가 관찰되었고 후자에서는 동일띠가 관찰되지 않았다 (Fig. 1).

Jiang [14] 등의 baculovirus expression system에 의해 발현시킨 NV capsid는 약 58 kDa정도의 분

자량을 가지고 있었으나 본 연구에서는 60 kDa으로 약간의 차이를 보였는데 이는 SDS-PAGE 조건의 차이에 의해 생긴 것으로 사료된다. 또한 WB로 분석된 39명의 혈청중 SMA 유전자군의 HuCV로 감염된 환자들을 포함한 21명이 (54%) 이 1/10 - 1/40에서 60 kDa의 띠를 나타내었다 (Fig. 1).

NLV들의 항원이 량적으로 매우 제한되어 있으므로 본 연구에서는 전회 [8,18]의 연구에서 유전자군이 규명된 NLV-양성 변 검체를 항원으로 사용하기 위하여 부분 정제하였다. HuCV/1819/92/Korea (Norwalk virus 유전자군)를 함유하는 변 검체는 SDS-PAGE상 58, 32 kDa의 단백질 띠 (Fig. 2A, lane 1)를 비롯한 여러 비특이 단백질 띠들을,

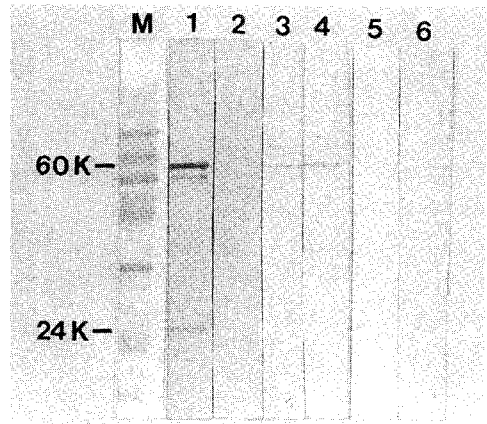


Fig. 1. Strips blotted with rNV (0.25mg/ml) were treated with rabbit anti-rNV immunoglobulin (lane 1), rabbit preimmune sera (lane 2), and convalescent-phase sera from diarrheal children (lanes 3~6). Sixty kDa protein bands were demonstrated with sera 3, 4, and 6. Numbers at left indicate molecular sizes (in kilodaltons) of standard proteins, 97.4K - 14.4K, (mid-range protein molecular weight markers (Promega, Madison, WI).

Table 1. Norwalk-like virus antibody assay by EIA and by Western Blot (WB)

	No. of seropositive / No. of sample tested (%)					
	Age group					
	<1m	1~6m	6~24m	2~15y	22~25y	Total
EIA	1/1 (100)	9/10 (90)	7/12 (58)	0/0 (0)	17/18 (94)	34/41 (83)
WB	1/1 (100)	2/5 (40)	3/12 (25)	2/4 (50)	13/17 (77)	21/39 (54)

Note. m, month; y, year.

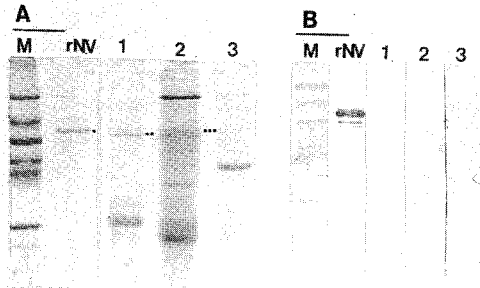


Fig. 2. Profiles of rNV particles and three isolates. **A.** SDS-PAGE patterns of rNV particles (rNV) and crude virus preparations of the isolates (1-3) stained by Coomassie blue: lane rNV with a 60 kDa (one dot); lane 1, HuCV/1819/92/Korea (Norwalk virus genogroup) showing a 58 kDa band (two dot); lane 2, HuCV/1858/92/Korea (SMA genogroup) revealing a 62 kDa (three dots); and lane 3, HuCV/1170/90/Korea (genetically distinct) also showing a 62 kDa. **B.** rNV and the isolates shown in **A** were immunoblotted and none reacted with rabbit anti-rNV. M, standard proteins.

HuCV/1858/92/Korea (SMA 유전자군) 역시 97, 62, 32 kDa 등을 비롯한 여러 단백 띠 (Fig. 2A, lane 2) 를 나타내었으나 rabbit anti-rNV를 사용한 WB상 띠가 전혀 관찰되지 않았다 (Fig. 2B). 또한 214 검체를 대상으로 한 rNV 항원 탐지 EIA에서 유일하게 양성을 나타내었으나, 염기서열 분석결과 지놈 변이가 높아 어느 유전자군에도 딱히 해당되지 않던 HuCV/1170/90/Korea [8,18]에서도 SDS-PAGE상 97, 60, 41 kDa 등의 단백질 및 소수의 단백질 띠가 관찰되었으나 rabbit anti-rNV를 사용한 WB 결과 띠가 관찰되지 않았다. 그러나 소아환자의 회복기 혈청과의 WB에서 62 kDa 크기의 띠가 관찰되었다.

따라서 본 연구에서 사용된 WB assay는 NLV들의 항원 구조를 밝힐 수 있을뿐만 아니라 NLV 감염의 역학조사에도 유용할 것으로 사료되었다.

고 찰

세계적인 분포도를 나타내는 급성장염/설사는 유아 사망율을 높이는데 크게 기여해왔으며 국내에서는 호흡기 감염 다음으로 두번째의 높은 빈도를 나타내는데 원인은 근래 대부분이 바이러스성으로 보고되고 있다 [22,23]. 원인을 밝히지 못한 폭발적인 또는 산발적인 급성장염 발발

로 어려움이 많은 국내에서 오염된 물이나 어패류 등의 음식을 감염원으로 하는 NLV가 많을 것은 예상이 되어 왔으며 장염/설사로 서울지역의 종합병원에 입원한 소아 환자들 (5세이하)의 변검체에서 rotavirus 및 adenovirus 40/41의 검출율이 각각 43%, 5%인 배경에서 HuCV출현율이 RNA polymerase region에서 선택된 primer를 사용한 RT-PCR [24]에서 10%로 adenovirus 40/41을 증가하는 것으로 보고되었다 [8,21]. 그런데도 불구하고 anti-rNV sera를 사용한 EIA에서 장염 소아 검체 214개중 0.5%만이 양성을 나타낸 것으로 볼 때 항원적/유전적으로 색다른 HuCVs의 국내 분포가 시사되었었다.

따라서 본 연구에서는 서울의 장염 유발 소아들의 혈청 (증상 발현후 3~14일 된) 및 건강한 청년들의 혈청에 rNV에 대한 항체 분포를 조사하였는데 역시 rotavirus에 대한 항체를 다음으로 높게 관찰되었다. 연령에 따른 연구대상에서의 rNV 항체 분포는 생후 6개월까지의 장염환자에서의 91%의 높은 양성률을 보였으며, 22~25세의 건강한 청년층에서도 94%의 높은 빈도를 보였다. 이 자료는 국내 소아군이 rotavirus에 노출되는 주된 시기로 알려진 영/유아기에 NLV에도 노출됨을 의미하며 지역사회 청년층에서의 높은 양성률은 NLV가 국내에 토착화되어 있음을 의미하는 것이다. 미국, 영국, 일본내에서의 연구보고들 [2,16,17]에 의하면 rotavirus는 36개월까지 90%이상의 항체 생성률을 보이거나 Norwalk virus의 항체 생성은 소아기동안은 거의 없다가 성인이 되서야 상승하여 50세까지의 연구대상의 50%만이 항체 양성이었으며, 소아군에서의 항체 보유율이 높은 것으로 알려진 Finland의 경우에도, 2세미만에서 49%의 양성률이 보고되었다.

rNV의 SDS-PAGE 결과, 그림 1의 Coomassie blue에 의하여 염색되어진 gel내에서 약 67, 60, 55, 50, 41 kDa정도의 단백 띠를 관찰할 수 있었다. 일반적인 NLV의 특징은 다른 animal virus가 여러 개의 구조 단백질로 이루어져 있는 것과는 달리 단 하나의 주된 구조 단백질로 되어 있다 [19]. 본 연구에서도 여러 단백 띠들중 약 60 kDa의 단백 띠만이 WB상 관찰되었는데, 이 단백 띠가 비리온내의 immunodominant한 단백질로 볼 수 있으며, 이외의 단백 띠들은 expression vector내에서 유도된 융합단백들이거나 60 kDa의 cleavage product로 보여진다. Jiang [14] 등의 baculovirus

expression system에 의해 발현시킨 NV capsid는 약 58 kDa정도의 분자량을 가지고 있었으나 본 연구에서는 60 kDa으로 약간의 차이를 보였는데 이는 SDS-PAGE 조건의 차이에 의해 생긴 것으로 사료된다. Hayashi [19]등이 발표한 SRSV의 WB 실험에서도 거의 동일한 크기 (63 kDa)의 단백질이 관찰되었다. 또한 본 연구에서 EIA로 양성반응을 보인 환자들이 WB상에서 rNV의 전기영동에서 관찰된 5개의 단백질 중 60 kDa의 단백질이 확인되었는데 이들 중에는 NV와 66%의 아미노산 homology를 가진 SMA 유전자군으로 감염된 환자의 혈청들도 포함되어 있다. 최근 Parker등 [25]의 연구에서도 NLV들에 대한 혈청반응에 'one-way cross-reaction'이 유발되어 Norwalk virus에 감염된 환자의 혈청은 recombinant Mexico virus와 반응하지 않으나, Snow Mountain agent나 그 유사 바이러스들에 감염된 환자 혈청은 Norwalk virus와 반응함이 관찰되었다. 따라서 본 연구의 rNV WB에서 양성반응을 보인 연구대상들의 혈청들은 실제 Norwalk virus 및 Snow Mountain Agent 유사군에 노출되었음을 의미하는 것이겠다.

한동 [18]이 RNA polymerase의 염기서열을 토대로 한 dendrogram중 Norwalk virus 유전자군과 Snow Mountain Agent 유전자군으로 보이는 변검체에서 추출된 바이러스액 각각이 60 kDa의 rNV보다 약간 가볍거나 무거운 58 kDa 및 62 kDa의 분자량을 보였으나 immunoblotting 하여보니 양쪽이 모두 음성이었다. 이는 변검체에 존재하는 바이러스가 Norwalk virus와 다른 capsid 조성을 가진 NLV이기 때문일 가능성을 제시하였으나 이를 본 연구에서 규명할 수는 없었다. 또한 214 검체를 대상으로 한 rNV 항원 탐지 EIA에서 유일하게 양성을 나타내었으나 [8], 염기서열 분석 결과 지능 변이가 높아 어느 유전자군에도 해당되지 않던 HuCV/1170/90/KR [18]에서는 관찰된 60 kDa의 단백질이 rNV post-sera와는 반응하지 않았으나 다른 장염소아의 회복기 혈청과의 WB에서는 양성을 나타내어 이 분리주의 capsid 부위의 항원성이 rNV 또는 Snow Mountain Agent와 구별됨을 제시하는 결과로 현재 염기서열 규명이 진행중이다. 따라서 본 연구에서 사용된 WB assay는 NLV들의 항원구조를 밝힐 수 있을 뿐만 아니라 NLV 감염의 역학조사에도 유용할 것으로 사료되었다.

NLV들의 지능이 파악되기 시작하면서 RT-PCR로 positive-strand RNA virus들의 RNA polymerase region에 공통되는 GLPSG와 YGDD 아미노산 motif를 탐지하는 분자생물학적인 방법이 사용되기 시작하였으며 [8,11], 이에 따라 NLV들은 Norwalk virus 유전자군, Snow Mountain Agent 유전자군, 동볼주와 유사한 Sapporo 유전자군의 세가지 유전자군으로 분류된다. 국내에는 3가지의 유전자군 모두와 이에 해당되지 않는 특이군이 함께 출현하고 있다 [18]. 그러나 replicase에 의한 동일 유전자형이라도 capsid의 성격에 따라 항원형에 차이가 있으며 또한 이 부위의 항원성이 다양하여 rNV로는 NLVs 일부를 검출할 수 있다. 따라서 진단을 위하여서는 NLVs에 해당되는 분리주들 각각의 재조합 virus-like particle을 만들어야 되는 상황이나 RNA polymerase와 ORF2 5'-end 부위의 안정된 이차구조로 인하여 ORF2의 증폭에 많은 어려움이 있어 현재까지 이 부위의 염기서열이 알려져있는 NLV는 단 3주뿐인 실정이다.

따라서 국내분리주들의 분류 및 진단시약/예방백신 개발은 국내 분리주들의 지속적인 지능서열 규명으로 유전학적 변종을 찾아내어 이의 항원 발현을 시도하여 봄과 동시에 conserved region인 replicase의 발현도 검토하여 볼 필요성이 제시된다.

결론

Norwalk-like virus (NLV)의 국내 소아 장염에서의 검출률은 10%에 이르지만 rotavirus나 adenovirus 등 다른 장염 바이러스에 가려진 장염 원인으로 부각되지 않고 있다.

NLV는 세포배양되지 않고 검체내의 바이러스량도 매우 낮아 이들의 항원성 평가에는 환자 회복기 혈청을 사용하는 면역전자현미경적 관찰이 요구되며 이에 따라 4종류의 혈청형으로 분류된다. 혈청형 1인 Norwalk virus의 capsid 유전자를 baculovirus expression system에서 발현시킨 rNV-사용 EIA가 개발되었으나 항원성이 다양하여 NLV 일부를 검출할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 rNV를 사용하여 서울의 장염 유발 소아들 및 건강한 청년기 혈청내의 rNV에 대한 항체 분포를 평가하고, rNV 또는 유전자형이 규명된 NLV-함유 변검체의 부분 정제

액을 SDS-PAGE/WB하여 국내인 혈청의 NLV 단백질에 대한 노출범위를 관찰하였다.

rNV-EIA로 검사된 41개의 혈청중 83%가 항체 양성이었으며, 그 역가는 1/16 - 1/4,096이었다. 이 중 급성장염으로 입원한 소아군 (<15세)에서의 항체 양성률은 74%, 22~25세 사이의 청년층에서의 양성률은 94%였다. 연령에 따른 anti-rNV 분포는 생후 6개월까지 91%의 양성률을 보임으로 국내소아들이 일찍 NLV에 노출됨이 관찰되었다. 청년층에서도 94%의 높은 빈도를 보여 지역사회에서의 NLV 분포가 예상보다 높았다.

rNV (0.25mg/ml)를 항원으로 WB로 분석된 혈청 검체의 54%가 1/10 - 1/40에서 60 kDa의 띠를 나타내었는데 이들 혈청 중 일부는 SMA 유전자군에 감염된 환자들의 혈청이었다. 유전자가 특이한 NLV-함유 검체 부유액은 rabbit anti-rNV과는 반응하지 않았으나 소아환자의 혈청 (증상 발현 10일 후)과의 WB에서는 62 kDa의 띠를 보였다. 따라서 본 연구에서 사용된 WB assay는 NLV들의 항원구조를 밝힐 수 있을뿐만 아니라 NLV 감염의 역학조사에도 유용할 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Adler JL, Zickl R: Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 119: 668 - 673, 1969.
2. Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM: Norwalk group of viruses, p. 783 - 810. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B and Straus SE (ed.), *Virology*. Lippincott-Raven Press Ltd., New York. 1996.
3. PHLS Working Party on Viral Gastroenteritis: Foodborne viral gastroenteritis (with a brief comment on hepatitis A). *PHLS Microbiol Dig* 5: 69 - 75, 1990.
4. Dolin R., Riechman RC, Roessner KD, Tralka TS, Schooley RT, Gary W, Morens D: Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 146: 184 - 189, 1982.
5. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle

- associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virology* 10: 1975 - 1981, 1972.
6. Caul EO, Ashley C, Peter JVS: "Norwalk"-like particles in epidemic gastroenteritis in the UK. *Lancet* 2: 1292, 1979.
7. Cubitt, WD, Bradley D, Cater M, Chiba S, Estes M, Saif L, Schaffer F, Smith A, Studdert M, Thiel HJ: *Caliciviridae*. In *Classification and Nomenclature of Viruses*. Sixth Report of the international Committee on the Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* in press.
8. Kim, Kyung H, Xiang, X: Norwalk-like viruses, a common cause of sporadic acute gastroenteritis in Korean children. *J Kor Soc Microbiol* 31: 227 - 235, 1997.
9. Jiang X, Graham D, Wang K, Estes M: Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250: 1580 - 1583, 1990.
10. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes M: Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195: 1 - 11, 1993.
11. Lewis D: Norwalk agent and other small~round structured viruses in the U.K. *J Infect* 23: 220 - 222, 1991.
12. Lewis DC: Three serotypes of Norwalk-like virus demonstrated by solid~phase immune electron microscopy. *J Med Virol* 30: 77 - 81, 1990.
13. Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, Kapikian AZ, Chanock RM: Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 129: 709 - 714, 1974.
14. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK: Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66: 6527 - 6532, 1992.
15. Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ, Estes MK: A comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observation. *J Clin Microbiol* 31: 2185 - 2191, 1993.

16. Gray JJ, Jiang X, Morgan-Capner P, Desseberger U, Estes MK: Prevalence of antibodies to Norwalk virus in England: detection by enzyme-linked immunosorbent assay using baculovirus-expressed Norwalk capsid antigen. *J Clin Microbiol* 31: 1022 – 1025, 1993.
17. Numata K, Nakata S, Jiang X, Estes MK, Chiba S: Epidemiological study on Norwalk virus infection in Japan and Southeast Asia using enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed Norwalk virus capsid protein. *J Clin Microbiol* 32: 121 – 126, 1994.
18. Han, Dong P, Kim, Ji A, Yang, Jai M, Kim, Kyung H: Human Caliciviruses in Korea: a new prevalent group defined by RNA-dependent RNA polymerase diversity. *J Kor Soc Virol* 27: 1 – 8, 1997.
19. Hayashi Y, Ando T, Utagawa E, Sekine S, Okada S, Yabuuchi K, Miki T, Ohashi M: Western blot (immunoblot) assay of small, round-structured virus associated with an acute gastroenteritis outbreak in Tokyo. *J Clin Microbiol* 27: 1728 – 1733, 1989.
20. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 – 685, 1970.
21. Kim, Kyung H: Small, round-structured virus in Seoul: Determination of its importance and direct sequencing of a genome. *J Kor Soc Virol* 25: 23 – 30, 1995.
22. Kim K, Yang J, Joo S, Cho Y, Glass RI: Importance of rotavirus and adenovirus types 40 and 41 in acute gastroenteritis in Korean children. *J Clin Microbiol* 28: 2279 – 2284, 1990.
23. Kim K, Suh I, Kim J, Kim CW, Cho Y: Etiology of childhood diarrhea in Korea. *J Clin Microbiol* 27: 1192 – 1196, 1989.
24. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK: Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 2529 – 2534, 1992.
25. Parker SP, Cubitt WD, Jiang X: Enzyme immunoassay using baculovirus-expressed human calicivirus (Mexico) for the measurement of IgG responses and determining its seroprevalence in London U.K. *J of Med Virology* 46: 194 – 200, 1995.