

진드기매개뇌염바이러스 ( tick-borne  
encephalitis virus ) 분리 및 *in vivo*  
에서의 분리주 병원성 분석

연세대학교 대학원

의과학과

윤 석 민

진드기매개뇌염바이러스 ( tick-borne  
encephalitis virus ) 분리 및 *in vivo*  
에서의 분리주 병원성 분석

지도교수 용 태 순

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2008년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

윤 석 민

# 윤석민의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2008년 6월

## 감사의 글

먼저 이 한 권의 논문이 완성되기까지 항상 관심과 배려로 지도해주신 용태순 지도교수님, 바쁘신 와중에서도 조언과 비평으로 논문을 심사해 주신 한명국 연구관님과 미생물학교실의 이재면 교수님께 진심으로 감사드립니다. 공부를 계속 할 수 있게 배려해주시고 격려해주신 주영란 팀장님, 지금은 비록 옆에 안 계시지만 같이 실험하면서 정말 많은 것을 배울 수 있었던 김수연 선생님을 비롯한 국립보건연구원 신경계바이러스팀 여러 선생님들과 팀원 여러분들, 보건원내에서 저에게 도움을 주신 많은 분들, 일일이 열거하면서 감사의 마음을 전하지는 못하지만, 진심으로 감사드립니다. 그리고 비록 학교에서 함께 보내는 시간은 적었지만, 많은 도움을 주신 이인용 박사님, 대학원 동기 성수를 비롯한 환경의생물학교실 여러 선생님들께도 감사의 인사를 드립니다. 마지막으로 항상 저를 믿고 지켜봐 주시는 사랑하는 부모님과 동생, 친구들에게도 깊은 감사와 고마움을 전합니다. 앞으로 더욱더 노력하는 모습으로 보답드릴 것을 약속드리며, 다시 한 번 모든 분들께 진심으로 감사드립니다.

윤 석 민 드림

# 차 례

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 재료	7
가. 검체	7
(1) 임상검체	7
(2) 숙주 및 매개체 검체	7
나. 세포 및 바이러스	7
2. 방법	11
가. TBEV 유전자 검출	11
(1) 검체로부터 바이러스 RNA의 추출	11
(2) RT-nested PCR	12
나. TBEV 분리 및 동정	13
(1) 바이러스 분리 실험	13
(2) 바이러스 분리확인 실험	13
(가) 뇌조직 처리	14
(나) TBEV 유전자 재확인	14
(다) 간접면역형광항체법을 이용한 바이러스의 혈청학적 동정	14

다. 국내분리주 전체 E 단백질유전자 염기서열 분석 . . . . .	15
(1) One-step RT-PCR . . . . .	15
(2) TA 클로닝 및 염기서열 분석 . . . . .	16
라. 계통유연관계 및 연역된 아미노산 서열 (deduced amino acid) 분석 . . . . .	17
마. <i>in vivo</i> 에서의 국내분리주 병원성 분석 . . . . .	18
(1) 국내분리주 및 표준주 바이러스 역가 측정 . . . . .	19
(2) 마우스모델을 이용한 국내분리주 병원성 분석 . . . . .	19
(가) Neuroinvasiveness와 neurovirulence 비교 . . . . .	19
(나) 마우스 뇌에서의 바이러스 역가 및 혈청에서의 중화항체가 변화 분석 . . . . .	20
(다) 통계 분석 . . . . .	21
III. 결과 . . . . .	22
1. 임상, 숙주 및 매개체 검체에서의 TBEV 유전자 검출 . . . . .	22
2. TBEV 분리 및 동정 . . . . .	23
3. 국내분리주의 전체 E 단백질 유전자 염기서열 및 연역된 아미노산 서열 분석 . . . . .	26
4. 국내분리주 계통유연관계 분석 . . . . .	34
5. 국내분리주 병원성 분석 . . . . .	35
가. Neuroinvasiveness와 neurovirulence 비교 . . . . .	35

나. 접종후 일별 마우스 뇌에서의 바이러스 역가 및 혈청 내 서의 중화항체가 변화 . . . . .	39
IV. 고찰 . . . . .	42
V. 결론 . . . . .	48
참고문헌 . . . . .	49
영문요약 . . . . .	57

## 그림 차례

Fig. 1. RT-nested PCR products of the E gene derived from cell culture fluids infected with TBEV Korean isolates . . . . .	24
Fig. 2. Indirect immunofluorescence assay for BHK-21 cells inoculated with TBEV Korean isolates . . . . .	25
Fig. 3. Results of RT-PCR and cloning of the complete E gene of TBEV . . . . .	28
Fig. 4. Comparison of the deduced amino acid sequences of five Korean isolates and prototype strains of TBEV . . . . .	32
Fig. 5. Phylogenetic tree illustrating the genetic relationship of TBEV prototype strains and five Korean isolates . . . . .	34
Fig. 6. Survival of adult mice subcutaneously inoculated with TBEV Korean isolates or prototype strains . . . . .	37
Fig. 7. Survival of adult mice intracerebrally inoculated	

with TBEV Korean isolates or prototype strains .....	38
Fig. 8. Replication of TBEV strains in mouse brain .....	40
Fig. 9. Developing patterns of anti-TBE neutralizing antibody titers in mice experimentally inoculated .....	41

## 표 차례

Table 1. Animal host samples collected per regions .....	9
Table 2. Tick samples collected and used in this study .....	10
Table 3. Oligonucleotide primers used for TBEV envelope gene detection by RT-nested PCR .....	12
Table 4. Oligonucleotide primers for amplification and sequencing of the complete envelope protein	

gene of Korean isolates . . . . .	17
Table 5. TBEV prototype strains compared with Korean isolates . . . . .	18
Table 6. Detection of TBEV from animal hosts by RT-nested PCR . . . . .	22
Table 7. Detection of TBEV from ticks by RT-nested PCR . . . . .	23
Table 8. Nucleotide and deduced amino acid identities (%) of five Korean isolates compared with prototype strains . . . . .	29
Table 9. Comparison of deduced amino acid differences of the E protein between five Korean isolates and other TBEV strains using <i>in vivo</i> virulence assay . . . . .	33

## 국문 요약

### 진드기매개뇌염바이러스 (tick-borne encephalitis virus) 분리 및 *in vivo*에서의 분리주 병원성 분석

진드기매개뇌염바이러스 (tick-borne encephalitis virus, TBEV)는 *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus에 속하는 바이러스로서 심각한 신경질환의 원인이 되는 주요 절지동물매개바이러스 (arboviruses) 중 하나이다. 이 바이러스에 의한 진드기매개뇌염 (tick-borne encephalitis, TBE)은 유럽, 러시아 및 아시아 등지에서 유행하며, 이 지역들에서 중요한 공중보건학상의 문제가 되고 있는 질병이다. 아직까지 국내에 TBEV에 의한 뇌염환자 발생사례는 없지만, 불명뇌염환자의 증가를 비롯한 우리나라와 인접한 아시아 국가들에서의 바이러스 분리 및 환자보고 사례, 국내 TBEV 매개체 서식 등으로 미루어 볼 때 국내에서도 TBE 발생가능성은 높다고 할 수 있다. 하지만 아직까지 관련연구가 수행되고 있지 않은 실정이다. 본 연구에서는 국내에서 확보한 임상, 숙주 및 매개체 검체를 이용하여 TBEV 감염여부를 조사하였다. TBEV 유전자가 검출된 검체를 대상으로 감수성 세포 및 ICR 마우스를 이용한 바이러스 분리를 시도하여 야생쥐 폐조직 검체로부터 5주의 TBEV를 분리하였다. TBEV 국내분리주의 분자유전학적 특성을 분석하고자 세포배양액으로부터 RT-PCR으로 전체 envelope (E) 유전자를 증폭한 후, 클로닝하여 염기서열을 분석하였다. 이를 기존에 보고된 TBEV 분리주와의 계통유연관계 및 연역된

아미노산 서열을 비교 분석한 결과 국내분리주 5주는 모두 Western 아형에 속했으며 (97%이상의 상동성), Western 아형에서만 특징적으로 나타나는 아미노산 서열이 잘 보존된 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 국내분리주는 TBEV 중 Western 아형의 특징을 가짐을 확인하였고, Sofjin-HO나 Neudoerfl 주와 비교해 E 단백질의 domain I, II, III에서 특정아미노산이 치환됨을 확인하였다.

국내분리주의 E 단백질을 구성하는 3가지 domain의 특정 아미노산 치환이 병원성에 영향을 주는지 알아보기 위해 6주령 ICR 마우스를 이용하여 병원성을 표준주와 비교하였다. 그 결과 국내분리주 5주는 표준주인 Sofjin-HO나 Neudoerfl 주에 비하여 neuroinvasiveness와 neurovirulence가 낮았다.

본 연구를 통해서 국내 최초로 야생숙주동물 (야생쥐 폐조직)로부터 TBEV를 분리하였으며, 국내분리주의 낮은 병원성은 E 단백질의 특정아미노산 치환과 관련이 있는 것으로 사료된다. 특정아미노산 치환과 병원성의 관련성에 대하여는 향후 추가연구가 요구되며, 본 연구에서 분리된 TBEV 국내분리주의 E 단백질 유전자 및 병원성 분석은 TBEV 진단법 개선 및 백신개발을 위한 유용한 정보를 제공할 것이다.

---

핵심 되는 말 : 진드기매개뇌염바이러스, 분리주, Western 아형,  
E 단백질, 아미노산 치환, neuroinvasiveness, neurovirulence

# 진드기매개뇌염바이러스 (tick-borne encephalitis virus) 분리 및 *in vivo*에서의 분리주 병원성 분석

<지도교수 용 태 순>

연세대학교 대학원 의과학과

윤 석 민

## I. 서론

진드기매개뇌염바이러스 (tick-borne encephalitis virus, TBEV)에 의한 뇌염은 자연계에 존재하는 참진드기 (*Ixodid* ticks)에 의해 전파되어 사람에게 발병하는 질병이다. TBEV에 의한 뇌염은 1931년 오스트레일리아에서 최초로 발생하였으나 원인을 모르다가 1937년 러시아에서 Zilber에 의해 진드기에 의해 전파되는 질병으로 병원체가 이 바이러스 (Far-Eastern subtype)임이 밝혀졌다.<sup>1</sup> 이후, 1948년 유럽에서 TBEV가 분리되었으며 일본북부에서도 1993년부터 TBEV에 대한 혈청학적 보고와 바이러스 분리에 관한 연구가 계속 보고되어 왔다.<sup>1-4</sup>

현재는 많은 유럽국가들 (오스트리아, 발트제국, 체코, 헝가리 등)을 비롯하여 러시아, 아시아 등지에서 질병을 매개하는 참진드기가 분포하고 있으며 이 지역을 중심으로 TBEV에 의한 뇌염환자 발생 및 바이러스 분리 사례가 보고되고 있다.<sup>1,5-7</sup> 진드기매개뇌염 (tick-borne encephalitis, TBE)은 TBEV에 감염된 진드기가 사람이나 숙주로 알려진 조류, 사슴, 설치류, 양과 같은 동물을 물었을 때 전파되고 사람간의 직접적인 전파는 없다. 잠복기는 2~28일까지로 알려져 있으나, 일반적으로 7~14일로서 감염된 동

물의 유제품을 섭취하였을 경우에는 잠복기가 더 짧은 것으로 보고되어 있다.<sup>8</sup>

TBEV에 의한 뇌염은 임상경과에 따라 크게 2기로 나눌 수 있는데, 1기 (viremic phase)는 발병 후 4~14일 사이에 오는 발열기로 체온상승은 있지만 특이적인 뇌수막염 증세는 보이지 않는다. 발병환자의 약 70% 정도는 1기에서 회복되기도 하지만 환자의 20~30%는 2기 (neurologic phase)로 발전하게 되고 이 시기에는 뇌염 증세를 보이게 된다. 감염환자의 2/3가 1기에 확인되며 나머지 1/3은 2기가 시작되어 2기를 거칠 경우 영구적인 장애나 사망에 이르기도 하며 고령 환자의 경우 더 심한 경과와 높은 사망률을 나타낸다.<sup>1</sup>

TBE의 원인 병원체인 TBEV는 일본뇌염바이러스 (Japanese encephalitis virus, JEV), 뎅기바이러스 (Dengue virus), 황열바이러스 (Yellow fever virus), 웨스트나일바이러스 (West Nile virus) 등과 같이 *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus에 속하는 바이러스로서 심각한 신경질환의 원인이 되는 주요 절지동물매개바이러스 (arboviruses) 중에 하나이다.<sup>9</sup> TBEV는 (+) single strand RNA를 유전자로 가지고 있으며 크기는 약 11kb이다. 게놈은 하나의 긴 open reading frame (ORF)을 암호화하고 ORF는 긴 하나의 polyprotein이 번역되어져 동시(co-) 또는 후(post-) 번역과정을 거쳐 3개의 구조단백질 (structural protein)과 7개의 비구조단백질 (nonstructural protein, NS)이 만들어진다. 3개의 구조단백질은 5'말단에서부터 capsid (C), pre-membrane/membrane (prM/M), envelope (E) 순으로 암호화되어 있다.

또한 바이러스의 자가 복제에 필수적인 replicase로 구성된 7개의 비구조단백질은 NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 순으로 암호화되어 있다.<sup>10</sup> ORF이외에도 게놈의 양쪽에 바이러스의 복제, 번역, 게놈 packaging에 중요한 역할을 한다고 알려진 5', 3'-NCR (noncoding region)이 있

다.<sup>11-13</sup> 세 개의 구조단백질 중에서 특히 envelope (E) protein은 바이러스 입자의 주요 표면 당단백질로서, 세포수용체가 결합하고, 바이러스와 세포막의 융합을 중개하는 기능을 가지며, 중화항체와 protective immune response를 유도하는 주요 바이러스 항원으로 알려져 있다.<sup>14-16</sup> 또한 동물모델에서의 E protein의 특정 아미노산 치환은 neuroinvasiveness와 neurovirulence와 같은 병원성에 영향을 미치는 중요한 결정자 역할을 한다고 보고되어 있다.<sup>16-19</sup> TBEV는 현재까지 임상적인 증상, 지리적 위치, 항원성 및 계통유연관계 분석을 토대로 크게 Western, Far-Eastern, Siberian subtype의 세 가지 아형 (subtype)으로 분류된다.<sup>20,21</sup> 각 아형별 특징으로 먼저 Far-Eastern 아형은 Russian Spring-Summer Encephalitis (RSSE)라고도 불리며, 주요매개체가 *Ixodes persulcatus*인 아형으로 다른 아형에 비해 심각한 뇌염증상을 보이며 치사율은 약 ~30% 정도로 알려져 있다.<sup>1,15</sup> Western 아형의 경우는 Central European Encephalitis (CEE) 라고도 불리며, *Ixodes ricinus*가 주요매개체로 알려진 아형으로 Far-Eastern 아형보다는 약한 뇌염증상을 보이며 치사율은 약 1~5% 정도로 보고되고 있다.<sup>22</sup> 세 번째로 Siberian 아형은 러시아의 서시베리아지역에서 최초로 분리되어진 아형으로 Western 아형보다는 Far-Eastern 아형과 높은 상동성을 보이며 주요매개체는 *Ixodes persulcatus*로 Far-Eastern 아형과 비교해서 만성적인 감염을 일으키는 아형으로 알려져 있다.<sup>6</sup>

아직까지 우리나라에서 TBEV 분리보고 및 환자 발생사례는 없으나, 우리나라와 인접한 일본, 중국 등과 같은 아시아지역 국가들에서의 바이러스 분리 및 TBEV에 의한 뇌염환자 보고, 뇌염증상을 보이거나 원인을 알 수 없는 일부 불명뇌염환자의 TBEV 감염에 의한 발병가능성, 그리고 국제교류 및 기후변화로 인한 절지동물 매개질환 (arthropod-borne infectious diseases)의 확산<sup>26,27</sup> 등을 고려할 때 TBEV 매개체인 참진드기류가 국내에

도 서식하고 있으므로 TBEV의 존재 가능성은 매우 높다. 하지만 우리나라의 경우 관련연구가 전혀 수행되고 있지 않는 실정이다.

이에 본 연구에서는 국내에서 확보한 임상, 숙주 및 매개체 검체에서의 TBEV 감염여부를 조사하였으며, 숙주동물 (야생쥐) 검체로부터 TBEV를 분리하였다. 또한 분리된 TBEV 국내분리주의 전체 E protein 염기서열을 바탕으로 러시아, 일본 및 유럽의 다른 나라에서 기존에 분리된 바이러스 주와의 계통유연관계, 번역된 아미노산 서열 및 *in vivo*에서의 병원성 분석을 통해 국내분리주의 분자생물학적 특성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 가. 검체

##### (1) 임상검체

TBEV 유전자 검출 및 분리에는 질병관리본부 국립보건연구원 신경계 바이러스팀에 의뢰된 일본뇌염 진단의뢰검체 중 음성검체 (불명뇌염검체) 및 TBEV 진단의뢰검체를 포함한 총 627건의 혈청 또는 뇌척수액을 사용하였다.

##### (2) 숙주 및 매개체 검체

숙주검체는 총 4개도 (경기, 강원, 전북, 경남) 6지역 (동두천, 화성, 원주, 횡성, 구례, 합천)에서 채집한 TBEV의 숙주동물로 알려진 야생쥐, 사슴, 야생멧돼지, 조류의 장기 (비장, 간, 폐조직)를 이용하였고 (Table 1), 매개체인 참진드기 검체는 5개도 (경기, 강원, 전북, 경남, 제주) 12지역 (양평, 동두천, 전곡, 김포, 원주, 평창, 정선, 장수, 무주, 남원, 진해, 어승생)에서 flagging 또는 dragging 방법을 이용하여 직접 채집하거나 숙주동물에서 떼어낸 참진드기를 이용하였다 (Table 2).

#### 나. 세포 및 바이러스

TBEV 국내분리주 및 표준주의 증폭에는 BHK-21 (baby hamster kidney, ATCC No. CCL-81, Manassas, VA, USA) 세포를 사용하였다. BHK-21 세포는 Minimum essential medium (MEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 8% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, Grand

Island, NY, USA)과 페니실린 (100 IU/ml)/ 스트렙토마이신(100  $\mu$ g/ml) (P/S, GIBCO, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 세포를 계대하여 유지하였다. 본 연구에서 사용된 TBEV 표준주는 Neudoerfl 주 (Western 아형), Sofjin-HO 주와 Oshima 5-10 및 KH98-5 주 (Far-Eastern 아형) (Dr. Ikuo Takashima 제공, Hokkaido university, Sapporo, Japan)를 이용하였다. 각 바이러스는 생 후 24시간 이내의 영아 마우스 (ICR)에 뇌내 접종하여 5~7일 후 사지 마비 등의 증상을 보이는 마우스의 뇌를 무균적으로 적출하였다. 적출한 뇌는 10% FBS, 1% P/S가 포함된 멸균된 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4, SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 10% (w/v) 유체액을 만든 후 Precellys<sup>®</sup> 24 lyser/ homogenizer (Bertin Technologies, Saints, France)로 분쇄하였다. 이를 4°C, 10,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 취한 후 소량씩 분주하여 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

**Table 1.** Animal host samples collected per regions for detection of tick-borne encephalitis virus

Provinces	Regions	Animal hosts	Organ samples (No.)
Gyeonggi-do	Dongducheon	wild boars	spleen (7), liver (8)
		deers	liver (3)
		pheasants	liver (6)
		crows	lung (1), liver (1)
	magpie	liver (1)	
	Hwaseong	wild mice	lung (18)
Gangwon-do	Wonju	wild mice	spleen (42), lung (20)
	Hongseong	wild mice	spleen (16), lung (11)
Jeonllabuk-do	Gurye	wild mice	lung (9)
Gyeongsangnam-do	Hapcheon	wild mice	lung (52)

**Table 2.** Tick samples collected and used in this study

Provinces	Regions	Scientific names <sup>1)</sup>	Related hosts
Gyeonggi-do	Yangpyeong	<i>H.longicornis</i>	
		<i>H.flava</i>	
		<i>I.nipponensis</i>	
	Dongducheon	<i>H.longicornis</i>	dog, deer, wild boar
		<i>H.flava</i>	deer, wild boar
		<i>I.nipponensis</i>	wild boar
	Jeonkog	<i>H.japonica</i>	
<i>I.nipponensis</i>			
Gimpo	<i>H.flava</i>		
Gangwon-do	Wonju	<i>H.flava</i>	
	Pyeongchang	<i>H.longicornis</i>	
		<i>H.flava</i>	
		<i>I.nipponensis</i>	dog
	Jeongseon	<i>H.longicornis</i>	deer, wild boar
		<i>H.japonica</i>	wild boar
<i>I.nipponensis</i>			
Jeonllabuk-do	Jangsu	<i>H.flava</i>	raccoon dog
	Muju	<i>H.flava</i>	
	Namwon	<i>H.flava</i>	
Gyeongsangnam-do	Jinhae	<i>H.flava</i>	
Jeju-do	Eoseungseng	<i>H.longicornis</i>	dog, horse

<sup>1)</sup> *H*, *Hemaphysalis*; *I*, *Ixodes*

## 2. 방법

### 가. TBEV 유전자 검출

확보한 임상, 숙주 및 매개체 검체에서의 TBEV 유전자 검출은 RT-nested PCR (Reverse transcriptase - nested polymerase chain reaction)을 이용하였다. 먼저 각 검체로부터 바이러스 RNA를 추출하기 위해서 임상검체의 경우 혈청이나 뇌척수액을 이용하였다. 숙주동물 장기검체는 각 장기를 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO)과 페니실린 (100 IU/ml), 스트렙토마이신 (100  $\mu$ g/ml)이 포함된 멸균된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 유제하였으며, 진드기검체의 경우는 진드기 1~20 마리를 pooling하여 10% FBS (GIBCO)와 페니실린 (500 IU/ml), 스트렙토마이신 (500  $\mu$ g/ml)이 포함된 멸균된 PBS (pH 7.4)에 분쇄하였다. 유제 또는 분쇄한 장기와 진드기검체는 4°C, 10,000 rpm으로 20~30분간 원심 분리하였으며, 그 상층액으로부터 바이러스 RNA를 추출하였고, 나머지는 -70°C에 보관하였다.

#### (1) 검체로부터 바이러스 RNA의 추출

각 검체에서의 바이러스 RNA는 viral RNA extraction kit (iNtRON, Sungnam, KOREA)를 이용하여 제조사가 제시하는 방법에 따라 추출하였다. 요약하면 lysis buffer 250 $\mu$ l에 검체 유제액 150 $\mu$ l를 넣고 상온에서 10분간 반응시킨 후, binding buffer 350 $\mu$ l를 첨가하였다. spin column과 원심분리를 이용하여 검체의 RNA를 침전시킨 후, washing buffer 500 $\mu$ l로 세척한 다음, elution buffer 30-40 $\mu$ l에 녹여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 one-step RT-PCR에 사용하였고, 나머지는 -70°C에 보관하였다.

## (2) RT-nested PCR

위에서 기술한 방법으로 분리한 RNA를 이용, 검체에서의 TBEV 유전자를 검출하고자 RT-nested PCR을 수행하였다.<sup>5</sup> 먼저 Maxime RT-PCR PreMix Kit (iNtRON)를 이용하여 one-step RT-PCR를 수행한 후, 이를 주형으로 *i*-starMaster mix PCR Kit (iNtRON)로 nested PCR을 수행하여 E 단백질 유전자를 증폭하였다. TBEV의 E 단백질 유전자 증폭에 이용된 primer는 Table 3과 같다.

**Table 3.** Oligonucleotide primers used for TBEV envelope gene detection by RT-nested PCR

Primer name	Polarity	Sequence (5'→ 3')	Size (bp)
For one-step RT-PCR			
TBE 913 (F)	sense	TGC ACA CAY YTG GAA AAC AGG GA	825
TBE 1738 (R)	antisense	TGG CCA CTT TTC AGG TGG TAC TTG	
For nested PCR			
TBE 1192 (F)	sense	CAG AGT GAT CGA GGC TGG GGY AA	477
TBE 1669 (R)	antisense	AAC ACT CCA GTC TGG TCT CCR AGG TTG TA	

One-step RT-PCR은 총 반응액이 20 $\mu$ l가 되도록 RT-PCR PreMixture에 template RNA 5-10 $\mu$ l, primer-TBE 913 (F) (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ l, primer-TBE 1738 (R) (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ l, DNase/ RNase free distilled water (GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 첨가하여 45 $^{\circ}$ C에서 30분, 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 52 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 조건으로 25

cycles 반응 후 72°C에서도 5분의 반응조건으로 GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, Lincoln, CA, USA) 이용하여 실시하였다. Nested PCR은 총 반응액이 20 $\mu$ l가 되도록 PCR mixture에 template DNA 1-5 $\mu$ l, primer-TBE 1192 (F) (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ l, primer-TBE 1669 (R) (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ l, *i*-starMaster mix Solution을 첨가하여 마찬가지로 GeneAmp® PCR system 9700을 이용, 94°C에서 2분간 반응한 다음 94°C에서 20초, 62°C에서 10초, 68°C에서 20초의 조건으로 30 cycles 반응 후 72°C에서 5분간 유지하였다. 이렇게 얻어진 PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 SYBR Safe™ DNA gel stain (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA)로 염색하여 확인하였다.

#### 나. TBEV 바이러스 분리 및 동정

확보한 임상, 숙주 및 매개체 검체에서 TBEV 유전자가 검출된 검체를 대상으로 바이러스 분리를 시도하였다. TBEV 유전자가 검출된 임상검체의 경우 확인된 혈청이나 뇌척수액을, 숙주 및 매개체 검체의 경우에는 앞서 기술한 방법에 따라 유제한 후 원심 분리하여 얻은 상층액을 사용하였다.

##### (1) 바이러스 분리실험

임상, 숙주 및 매개체 검체를 생후 24시간 이내의 영아 마우스(ICR, KCDC, KOREA)의 뇌내로 20 $\mu$ l씩 접종 후, 20일 동안 관찰하였다. 관찰기간동안 사지 마비 등의 증상을 보이는 마우스는 무균적으로 뇌를 적출하여 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

##### (2) 바이러스 분리확인 실험

### (가) 뇌조직 처리

적출한 마우스 뇌에 10% FBS와 1% P/S이 포함된 멸균된 PBS (pH 7.4)를 10% (w/v) 뇌유제액이 되게 첨가한 다음 분쇄 후, 4°C, 10,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 취해 소량 분주하여 분리확인 실험에 이용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

### (나) TBEV 유전자 재확인

보관된 10% 뇌유제액을 T-25 플라스크 (Corning, NY, USA)에 단층 배양한 BHK-21 cell (ATCC No. CCL-10)에 감염시킨 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 세포병변 (cytopathic effect)이 나타날 때까지 배양하였다. 보통 96시간 배양 후 얻은 세포배양액을 이용하였으며, 앞서 기술한 RT-nested PCR방법으로 TBEV 유전자를 재확인하였다.

### (다) 간접면역형광항체법을 이용한 바이러스의 혈청학적 동정

보관된 10% 뇌유제액을 마찬가지로 단층 배양된 BHK-21 cell에 감염시킨 후, 감염된 세포를 0.5% Trypsin-EDTA (GIBCO, Grand Island, NY, USA)로 처리하여 탈착시킨 다음 5% FBS와 1% P/S를 포함한 MEM (GIBCO)으로 세포수가  $1 \times 10^6$  cells/ml되게 부유시키고, 24 well 슬라이드에 well당  $20 \mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 이를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 36시간 배양한 후 상층액을 걷어내고 80% 아세톤으로 20분간 고정하여 만든 항원슬라이드는 항원성 확인 전까지 -70°C에 보관하였다. 만들어진 항원슬라이드의 항원성 확인에는 간접면역형광항체법 (Indirect immunofluorescence assay, IFA)을 이용하였다. 방법은 항원슬라이드에 먼저 정제한 표준주 (Neudoerfl 주)를 토끼에 접종하여 제조한 고도면역된 다클론항체 (Rabbit hyperimmune antiserum against

TBEV-Neudoerfl strain) (JENO Biotech, Chuncheonsi, KOREA)를 1:1,000으로 PBS에 희석하여 각 well에 20 $\mu$ l씩 넣어주고 습도가 유지되는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 PBS로 10분간 2회 세척하고, 이차 항체인 FITC-conjugated AffiniPure goat-anti rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)를 0.0001% Evans Blue에 1:300으로 희석시켜 각 well에 20 $\mu$ l씩 넣어주고 습도가 유지되는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 30분간 재반응 시켰다. 반응이 끝나면 다시 PBS로 10분간 2회 세척한 다음 mounting medium (Light Diagnostics<sup>TM</sup>, West Murray, Utah, USA)을 떨어뜨려 cover glass를 덮어 형광현미경 (Axioskop2 plus, ZEISS, Switzerland) 하에서 관찰하였다 ( $\times$  400). Evans Blue를 이용한 대조염색 (negative staining)을 통해 세포질에서 바이러스 특이적인 형광이 관찰되면 TBEV 양성으로 판정하였다.

#### 다. 국내분리주 전체 E 단백질 유전자 염기서열 분석

분리된 국내분리주의 전체 E 단백질 염기서열을 바탕으로 기존에 보고되었던 분리주와의 계통유연관계 및 번역된 전체 E 단백질 아미노산서열을 분석하였다.

##### (1) One-step RT-PCR

각 분리주의 10% 마우스 뇌유체액을 BHK-21 cell에 감염시켜 얻은 세포 배양액으로부터 앞서 설명한 viral RNA 추출 방법으로 RNA를 추출하였다. 전체 E 단백질 유전자에 특이적인 primer를 제작하여 (Table 4), Maxime RT-PCR PreMix Kit (iNtRON)를 이용한 one-step RT-PCR 방법으로 약 1,488bp의 전체 E 유전자를 증폭하였다. One-step RT-PCR은 총 반응액이 20  $\mu$ l가 되도록 RT-PCR PreMixture에 template RNA 3 $\mu$ l, primer-Neud

(E-full)-F (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ l, primer-Neud (E-full)-R (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ l, DNase/ RNase free distilled water (GIBCO)를 첨가하여 45 $^{\circ}$ C에서 30분, 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 57 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초의 조건으로 30 cycles 반응 후 72 $^{\circ}$ C에서도 5분의 반응조건으로 GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 (Applied Biosystem) 이용하여 실시하였다.

## (2) TA 클로닝 및 염기서열 분석

One-step RT-PCR로 증폭된 각 분리주의 유전자 산물 (약 1.5Kb)을 Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 제조사가 제시한 방법에 따라 이용하여 정제한 후, 유전자 산물을 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 3:1의 비율로 (molar ratio) 넣어 준 후, 실온에서 1시간 방치한 다음 ECOS<sup>™</sup> Competent cell (DH5 $\alpha$ , Yestern Biotech, Taiwan)에 형질 전환시켰다. 형질 전환된 *E. coli* 에서 플라스미드를 PureLink<sup>™</sup> Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 분리한 후 제한효소 *EcoRI* (New England Biolabs, County Road Ipswich, MA, USA)으로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 절단하여 insert DNA를 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. 클로닝된 각 분리주의 플라스미드 DNA에 대한 염기서열 분석은 (주) Macrogen (Seoul, KOREA)에 의뢰하였으며 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 반응 한 후 ABI 3730xl sequencer (Applied Biosystem)를 이용하여 확인하였으며, insert DNA에 대해 5'과 3' 양쪽 모두 동시에 수행하였다. 염기서열 분석에 이용된 primer는 Table 4와 같으며, 확인된 국내분리주 전체 E 단백질 유전자 염기서열은 DNASTAR (ver 5.06, Madison, WI, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 염기서열 분석에는 각 분리주당 최소 2~3개 이상의 독립적인 clone를 이용하였다.

**Table 4.** Oligonucleotide primers for amplification and sequencing of the complete E protein gene of Korean isolates

Primer name	Sequence (5'→ 3')	Positions <sup>1)</sup>	Application
Neud (E-full)-F	TCG CGT TGC ACA CAC TTG GAA A	973-994	amplification
Neud (E-full)-R	CGC CCC CAC TCC AAG GGT CAT	2440-2460	amplification
Neud (E-full)-seq	TTT CTT CAG AGA AAA CCA TTT TGA	1472-1495	sequencing
T7 primer	AAT ACG ACT CAC TAT AG	·	sequencing
SP6 primer	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	·	sequencing

<sup>1)</sup> Sequence of TBEV strain Neudoerfl (GenBank accession number : U27495)

#### 라. 계통유연관계 및 번역된 아미노산 서열 분석

확인된 국내분리주의 전체 E 단백질 유전자 및 번역된 아미노산 서열을 이용, 계통유연관계 분석을 통한 subtyping 및 아미노산 서열을 비교, 분석하였다. 계통유연관계 분석에는 MEGA(ver 4.0, Tempe, AZ, USA) 프로그램의 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means)법을 사용, bootstrap confidence intervals는 1,000회 반복하도록 설정하여 phylogenetic tree를 그렸다.<sup>23</sup> 국내분리주의 전체 E 단백질 유전자 염기서열과 비교할 기존 분리주들의 염기서열은 GenBank를 이용하였으며 (Table 5), MEGA (ver 4.0) 프로그램의 Clustal W 방법을 사용하여 정렬하였다.<sup>24</sup>

**Table 5.** TBEV prototype strains used for comparison with Korean TBEV isolates

Strains	Source of virus	Geographical origin	Year of isolation	GenBank accession No.
Oshima 5-10	Dog blood	Hokkaido, Japan	1995	AB001026
KH98-2	<i>I.persulcatus</i>	Khabarovsk, Russia	1998	AB022295
KH98-5	<i>I.persulcatus</i>	Khabarovsk, Russia	1998	AB022296
KH98-10	<i>I.persulcatus</i>	Khabarovsk, Russia	1998	AB022297
Sofjin-HO	Human brain	Primorsky, Russia	1937	AB022703
Vasilchenko	Human blood	Novosibirsk, Russia	1961	M97369
Aina	Human CSF	Irkutsk, Russia	1963	AF091006
IR99-2m3	<i>I.persulcatus</i>	Irkutsk, Russia	1999	AB049350
Neudoerfl	<i>I.ricinus</i>	Neudoerfl, Austria	1971	U27495
Hypr	Human blood	Brno, Czech	1953	U39292
VL99-m11	<i>I.persulcatus</i>	Vladivostok, Russia	1999	AB049345
Absettarov	Human blood	St.petersburg, Russia	1951	AF091005
Kem I	<i>I.ricinus</i>	Tatabanya, Hungary	1952	AF091011

또한 계통유연관계 분석에 이용한 국내분리주 및 기존분리주와의 상동성 비교 및 연역된 아미노산 서열 비교는 DNASTAR (ver 5.06) 프로그램의 Clustal W 방법으로 정렬한 후 비교, 분석하였다.

#### 마. *in vivo* 에서의 국내분리주 병원성 분석

마우스에서 국내분리주의 neuroinvasiveness, neurovirulence를 표준주 4주와 비교하였다. 또한 접종후 일별로 마우스 뇌, 혈청에서의 TBEV 역가와 중화항체가 변화를 각각 측정하였다.

### (1) 국내분리주 및 표준주 바이러스 역가 측정

병원성실험에 이용할 국내분리주와 표준주의 바이러스 역가를 Plaque assay로 측정하였다. 요약하면 BHK-21 cell을 6 well plate에  $3 \times 10^5$  cells/well로 분주한 다음 24시간 배양하였다. 접종액은 각 분리주 및 표준주를 감염시켜 얻은 세포배양액을 MEM (GIBCO)을 이용하여 10배로 단계 희석하여 준비하였다. 단계 희석한 접종액을 duplicate로 배양한 BHK-21 cell에 200  $\mu$ l/well 접종한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 10분 간격으로 한번씩 plate를 흔들어주면서 1시간동안 감염시켰다. 1시간 후 PBS로 세포층을 세척한 다음 미리 준비한 2×MEM (GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS, 1% P/S, 0.5% Agar 및 3차 증류수가 첨가된 Agar overlay solution을 well 당 5ml씩 넣어주고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4~5일 배양후 10% formalin solution (37% formaldehyde solution 125ml, PBS 375ml)로 고정한다. 다음, 1% crystal violet (Methanol 350ml, 3차 증류수 150ml, crystal violet 5g)으로 염색 후 plaque수를 계수하여 바이러스 역가 [PFU (Plaque Forming Unit)/ml]를 측정하였다.

### (2) 마우스 모델을 이용한 국내분리주 병원성 분석

국내분리주의 병원성 분석은 6주령 마우스 (ICR, KCDC, KOREA)를 이용하여 비교하였다.

#### (가) Neuroinvasiveness와 neurovirulence 비교

본 실험에는 국내분리주 (KrM 93, 213, 215, 216, 219 주) 및 표준주 (Neudoerfl, KH98-5, Oshima 5-10, Sofjin-HO 주)의 neuroinvasiveness와 neurovirulence를 비교하였다. 바이러스 역가를 측정한 국내분리주 및 표준주를 각각 8마리를 한 그룹으로 하여 neuroinvasiveness 비교는 멸균된 PBS

(pH 7.4)를 이용해서 희석한 후 마리당 10,000 PFU / 50 $\mu$ l의 바이러스 역가로 피하접종 (subcutaneous inoculation)하였으며, neurovirulence 비교는 마리당 10 PFU / 20 $\mu$ l [멸균된 PBS (pH 7.4)를 이용해서 희석]의 바이러스 역가로 뇌내접종 (intracranial inoculation)한 후, 접종 후 28일 동안 관찰하면서 마우스의 생존율, 평균생존기간을 측정하였다.<sup>9,19</sup>

### (나) 마우스 뇌에서의 바이러스 역가 및 혈청에서의 중화항체가 변화 분석

접종 후 일별 마우스 뇌, 혈청에서의 바이러스 역가변화와 중화항체가 변화를 각각 조사하였다. 본 실험에서는 국내분리주인 KrM 213과 표준주인 Neudoerfl (Western 아형), Sofjin-HO (Far-Eastern 아형)주를 이용하였다. 접종방법 및 접종량은 병원성 실험과정과 동일하며, 접종 후 하루간격으로 무작위로 3마리의 마우스의 뇌, 혈청을 적출 및 채취하여 사용하기 전까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 먼저 마우스 뇌에서의 바이러스 역가 변화는 적출한 마우스의 뇌를 이용, 20% (w/v) 뇌유제액을 만든 후 앞서 기술한 plaque assay로 측정하였으며, 마우스 혈청 내에서의 중화항체가 변화는 플라크감소중화항체시험법 (Plaque reduction neutralization test, PRNT)을 이용하여 확인하였다.<sup>3,44</sup>

방법을 요약하면 실험에 사용할 혈청을 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 불활성화시킨 후, MEM (GIBCO)을 이용하여 1:5 ~ 1:2,560 까지 희석한 다음 동량의 바이러스 (2,000 PFU/ml)와 섞어 (혈청:바이러스 = 1:1) 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 중화반응시켰다. 이후 중화반응액을 사용하여 각 well당 100 $\mu$ l씩 접종하였으며 이후 과정은 앞서 기술한 plaque assay 방법과 동일하다. 중화항체가의 결정은 plaque를 계수하여 대조군 (바이러스만 접종한 well)에서의 plaque 수와 비교, 50%를 감소시킨 혈청의 희석배수 (PRNT<sub>50</sub>)를 계산하여 정하였

고, 혈청 중화항체 역가가 1:10 이상인 경우를 양성으로 판정하였다.

#### (다) 통계 분석

국내분리주 및 표준주를 각각 피하 또는 뇌내 접종한 후의 평균생존기간 분석에는 통계 프로그램 SigmaStat (ver 3.5, Systat software, CA, USA)를 이용하여 One-way ANOVA와 Tukey test를 이용해 통계적 검증을 하였으며, 결과는 평균±표준편차로 표시하였고 P값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의하다고 하였다.

### III. 결과

#### 1. 임상, 숙주 및 매개체 검체에서의 TBEV 유전자 검출

확보된 임상, 숙주 및 매개체 검체에서의 TBEV 유전자 검출을 위해 TBEV E 단백 유전자를 표적으로 RT-nested PCR을 수행한 결과 임상검체의 경우 총 627건의 혈청 또는 뇌척수액 검체 중 17건에서 TBEV 유전자를 검출하여 약 2.7%의 양성율을 나타내었고, 총 195 건의 숙주동물 장기검체 (야생쥐, 조류, 멧돼지, 사슴의 비장, 폐, 간조직) 중 11건 (5.6%)에서 TBEV 유전자가 검출되었다 (Table 6).

**Table 6.** Detection of TBEV from animal hosts by RT-nested PCR

Animal hosts	No. positives / No. samples (%)	Prevalence (%)
Wild mice	7/168 (4.2)	3.6
Wild boars	2/15 (13.3)	1
Deers	0/3 (0)	0
Pheasants	2/6 (33.3)	1
Crows	0/2 (0)	0
Magpies	0/1 (0)	0
Total	11/195	5.6

세 번째로 이용된 검체인 매개체, 즉 참진드기 검체는 성충(adult)과 3령(nymph)을 모두 포함하여 총 2속 4종 2460개체를 채집하였다. 이들 개체들을 종별, 발생별로 1~20마리씩 pooling하여 TBEV 유전자를 확인한 결

과 총 197 pools 중 12 pools에서 TBEV 유전자를 검출하여 0.4%의 감염률을 나타내었다. 확보된 진드기 검체에서의 TBEV에 대한 유전자 확인 결과 우점종으로 가장 많은 수를 확보한 *Haemaphysalis longicornis*에 비해 적은 수를 확보한 *Ixodes nipponensis*에서 높은 감염률 (1.6%)을 나타내었다 (Table 7).

**Table 7.** Detection of TBEV from ticks by RT-nested PCR

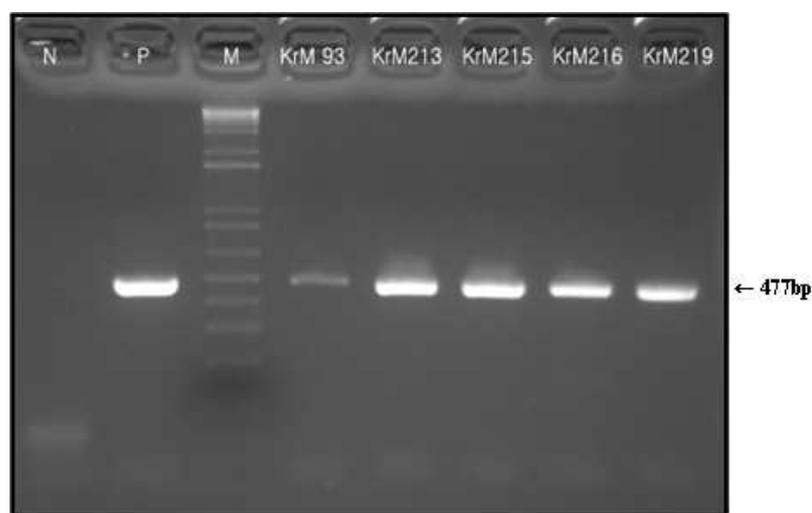
Developmental states	<i>Haemaphysalis H. flava</i>	<i>H. japonica</i>	<i>Ixodes nipponensis</i>	Total	
	<i>longicornis</i>				
	No. positives / No. pools / No. individuals				
Nymph	1/16/288	1/8/68	0/0/0	0/0/0	2/24/356
Adult male	2/63/841	1/14/205	0/4/56	1/13/121	4/94/1,223
Adult female	1/51/585	2/14/179	1/6/51	2/8/66	6/79/881
Total (%) <sup>1)</sup>	4/130/1,714 (0.2)	4/36/452 (0.8)	1/10/107 (0.9)	3/21/187 (1.6)	12/197/2,460 (0.4)

<sup>1)</sup> Value in parentheses are percent positive, they were analyzed by the minimum infection rate (no. of detection positive pools / no. of examined ticks in pools x 100).

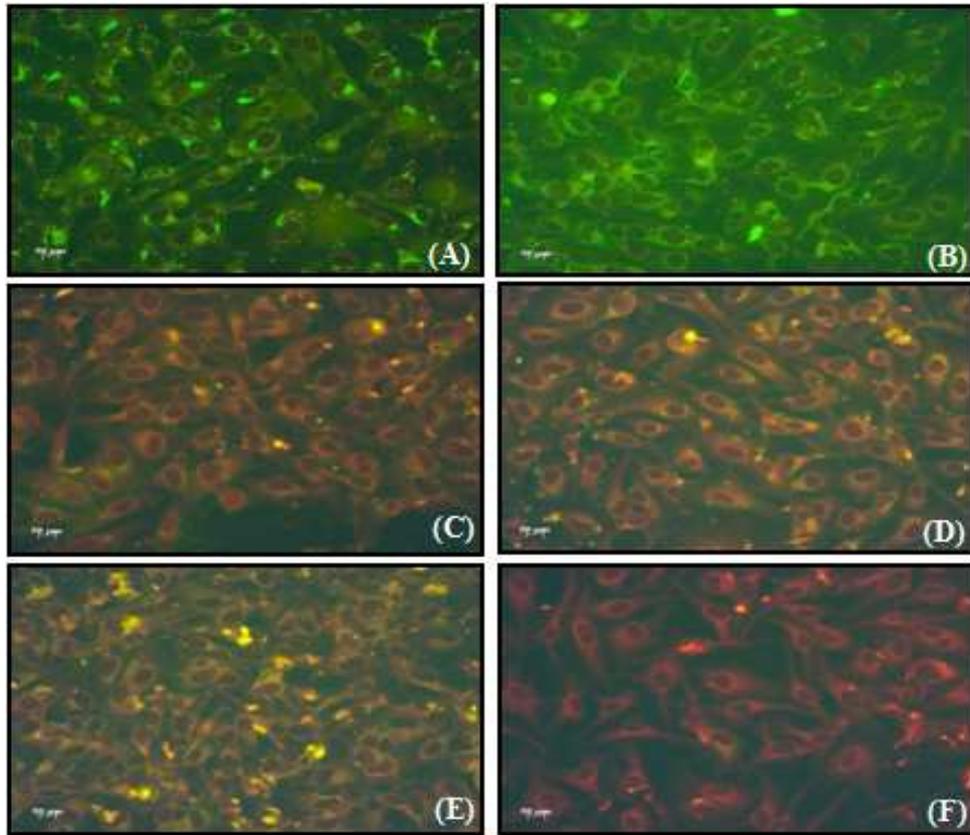
## 2. TBEV 분리 및 동정

임상, 숙주 및 매개체 검체로부터 TBEV 유전자가 검출된 검체를 대상으로 생후 24시간 이내의 영아 마우스 (ICR)를 이용한 바이러스 분리실험 결과 숙주검체 중 야생쥐 (등줄쥐, *Apodemus agrarius*) 폐조직 검체에서 총 5주의 바이러스를 분리하였다. 분리된 5주는 모두 검체를 마우스에 접종 후 6~7일경에 임상 증상을 나타냈으며, 증상을 보인 마우스의 뇌를 적

출하고 분쇄하여 만든 10% 뇌유제액 또는 10% 뇌유제액을 감염시켜 얻은 세포배양 상층액으로부터 유전자를 재확인하였고 (Fig. 1), 감염된 세포를 이용해서 만든 항원슬라이드로부터 간접면역형광항체법으로 바이러스를 동정하였다 (Fig. 2). 분리한 바이러스는 KrM 93, KrM 213, KrM 215, KrM 216, KrM 219라고 명명하였다.



**Fig. 1.** RT-nested PCR products of the E gene derived from cell culture fluids infected TBEV Korean isolates. [lane P, positive control (Neudoerfl strain); lane N, negative control (distilled water); lane M, 1 kb DNA ladder; Size, 477 bp; lanes KrM 93, KrM 213, KrM 215, KrM 216 and KrM 219, TBEV Korean isolates]



**Fig. 2.** Indirect immunofluorescence assay for BHK-21 cells inoculated with TBEV isolates KrM 93 (A), KrM 213 (B), KrM 215 (C), KrM 216 (D), KrM 219 (E) and negative control (uninfected normal cells) (F). We used rabbit-anti TBEV hyperimmune serum (1:1,000) and FITC-conjugated AffiniPure goat-anti rabbit IgG (1:300 in 0.0001% Evans blue) as 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> antibodies, respectively. Cells were visualized using a ZEISS fluorescence microscope with FITC filter. Magnification 400 x.

### 3. 국내분리주의 전체 E 단백질 유전자 염기서열 및 연역된 아미노산 서열 (deduced amino acid) 분석

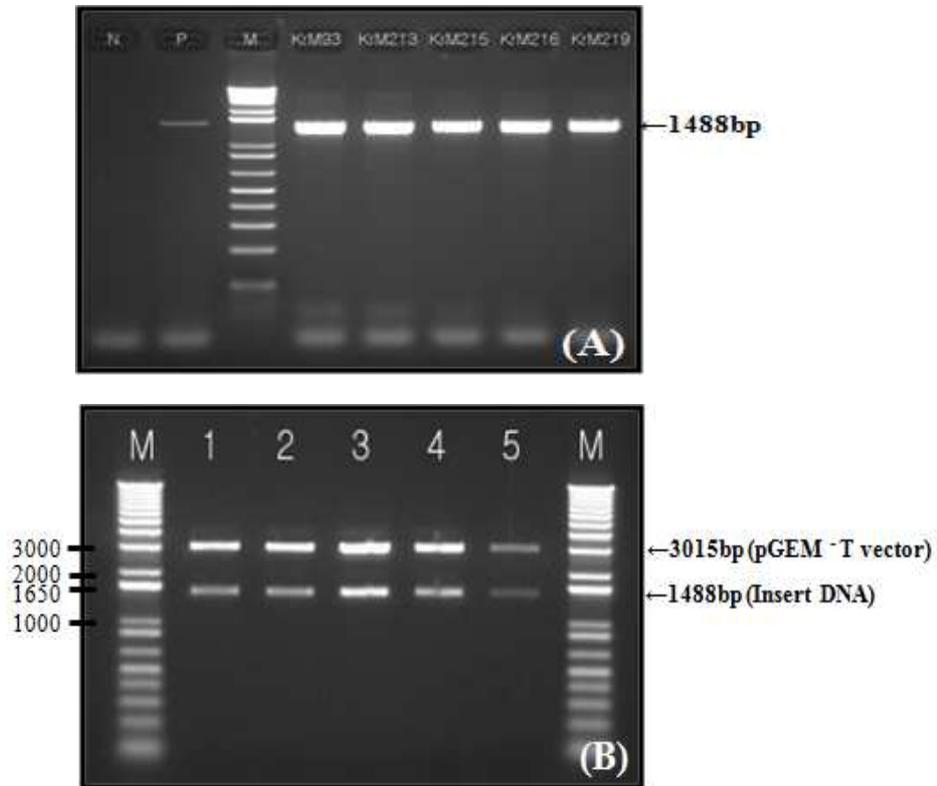
분리 및 동정된 국내분리주 5주의 전체 E 단백질 유전자 염기서열 및 연역된 아미노산 서열은 각 분리주의 전체 E 단백질 유전자 증폭 후 TA 클로닝을 거쳐 확인하였다 (Fig. 3). 확인된 전체 E 단백질 유전자 염기서열 및 연역된 아미노산 서열은 GenBank에 등재하였다 (KrM 93, EU276109; KrM 213, EU276110; KrM 215, EU276111; KrM 216, EU276112; KrM 219, EU276113).

이렇게 확인된 전체 E 단백질 유전자 염기서열을 기존에 보고된 분리주들 (Table 5)의 전체 E 단백질 염기서열과 비교한 결과 5주의 국내분리주는 각각 Western 아형과 97.1~98.1%, Far-Eastern 아형과 84.1~84.9%, Siberian 아형과 85.0~85.6%의 상동성을 나타냈으며, 연역된 아미노산 서열 비교 역시 Western 아형과 98.2~99.2%, Far-Eastern 아형과 94.6~95.4%, Siberian 아형과 95.2~95.8%의 상동성을 보여 염기서열과 연역된 아미노산 서열 모두 국내분리주는 Western 아형과 높은 상동성을 보임을 확인하였다 (Table 8).

또한 국내분리주 5주와 상동성 비교에 이용된 기존분리주 13주의 연역된 아미노산 서열을 정렬하여 비교한 결과 국내분리주 5주 모두 tick-specific hexapeptide로 알려진 EHLPTA (아미노산 207~212번)서열이 보존된 것을 확인하였고, Flavivirus type specific hypervariable domain으로 알려진 E 단백질의 231~234번 아미노산서열 (GAQN)도 본 연구에서 비교한 기존 Western, Far-Eastern 아형에 속하는 분리주들과 일치하였다 (Fig. 8). 게다가 연역된 아미노산 정렬 결과 Western 아형에 속하는 분리주에서만 특징적으로 나타나는 아미노산 서열 (Signature amino acid)을 국내분리주 5주도 모두 가지고 있음을 확인 할 수 있었으며, 그 특징적인 아미노산 위치 및 서열은 다음과 같다 [47(Ala), 88(Gly), 115(Ala), 178(Glu), 206(Val), 267(Ala), 277(Glu), 317(Ala), 407(Lys), 426(Ala), 431(Ser), 433(Ile), 437(Val)].

특히 206, 317번 아미노산의 경우는 각 아형마다 특징적인 아미노산 서열을 나타내었다 (Fig. 8).

다음으로 국내분리주 5주와 표준주 4주의 E 단백질에서의 아미노산 치환을 비교해 본 결과 총 37군데에서 하나 이상의 아미노산이 치환됨을 확인하였고 E 단백질을 구성하고 있는 각 domain별<sup>42</sup> 아미노산 치환을 비교해본 결과 domain I (1~51번, 137~189번, 285-302번 아미노산)에서 6 positions (47, 153, 167, 178, 181, 292번), domain II (52~136번, 190~284번 아미노산)에서 14 positions (52, 83, 88, 115, 120, 122, 198, 201, 204, 206, 239, 244, 267, 277번) domain III(303~395번 아미노산)의 경우 3 positions (307, 317, 331번)에서 아미노산 치환을 확인하였고, 같은 방법으로 국내분리주 5주에서 나타난 아미노산 치환을 비교해 본 결과 domain I에서 2 positions (181, 292번), domain II에서 8 positions (83, 122, 198, 201, 204, 239, 244, 277번)에서 아미노산 치환을 확인하였다 (Table 9).



**Figure 3.** Results of RT-PCR and cloning of the complete E gene of TBEV (A) RT-PCR products of the complete E protein gene derived from culture fluid infected Korean isolates [ lane P, positive control (Neudoerfl strain); lane N, negative control (distilled water); lane M, 1 Kb DNA ladder; lanes KrM 93, KrM 213, KrM 215, KrM 216 and KrM 219, TBEV Korean isolates ]. (B) Identification of insert DNA (1,488bp) by double digests with *EcoRI* (lane M, 1Kb DNA ladder; lane 1, KrM 93 plasmid DNA; lane 2, KrM 213 plasmid DNA; lane 3, KrM 215 plasmid DNA; lane 4, KrM 216 plasmid DNA; lane 5, KrM 219 plasmid DNA).

**Table 8.** Nucleotide and deduced amino acid identities (%) of five Korean isolates compared with prototype strains

	Korean isolates					Western subtype				Far-Eastern subtype						Siberian subtype		
	KrM 93	KrM 213	KrM 215	KrM 216	KrM 219	Neud	KeM I	Hypr	Abs	Oshi	KH98-2	KH98-5	KH98-10	Sof	VL99	Aina	Vs	IR99
KrM 93	-	99.3	99.4	99.3	99.3	97.7	97.5	97.2	98.1	84.2	84.3	84.1	84.3	84.5	84.7	85.1	85.0	85.5
KrM 213	98.6	-	99.5	99.5	99.6	97.8	97.6	97.2	98.2	84.2	84.3	84.1	84.3	84.5	84.9	85.2	85.1	85.6
KrM 215	99.0	99.2	-	99.5	99.5	97.9	97.7	97.2	98.3	84.3	84.3	84.1	84.3	84.5	84.9	85.1	85.1	85.6
KrM 216	98.2	98.8	98.8	-	99.5	97.8	97.6	97.1	98.1	84.1	84.3	84.1	84.2	84.4	84.8	85.0	84.9	85.4
KrM 219	98.4	99.0	99.0	98.6	-	97.8	97.6	97.2	98.2	84.2	84.3	84.1	84.3	84.5	84.9	85.1	85.0	85.5
Neud	98.8	99.0	99.0	98.6	99.0	-	98.2	98.3	98.7	84.3	84.1	83.8	83.9	84.3	84.6	85.0	84.9	85.5
KeM I	98.4	98.6	98.6	98.2	98.6	99.2	-	97.6	98.8	84.1	83.8	83.5	83.7	83.9	84.3	84.7	84.7	85.3
Hypr	98.6	98.8	98.8	98.4	98.8	99.4	99.0	-	98.1	84.2	84.0	83.7	83.9	84.3	84.4	84.9	84.9	85.1
Abs	99.0	99.2	99.2	98.8	99.2	99.8	99.4	99.6	-	84.1	84.1	83.9	84.0	84.3	84.7	85.1	85.0	85.5
Oshi	95.0	95.2	95.2	95.0	95.4	95.8	95.8	95.6	96.0	-	95.7	95.6	95.7	95.7	95.8	84.8	84.8	85.1
KH98-2	94.6	94.8	94.8	94.6	95.0	95.4	95.4	95.2	95.6	98.8	-	98.8	98.9	97.7	97.8	84.7	84.7	85.0
KH98-5	94.6	94.8	94.8	94.8	95.0	95.4	95.4	95.2	95.6	98.8	99.2	-	99.5	97.6	97.5	84.6	84.6	84.9
KH98-10	95.0	95.2	95.2	95.0	95.4	95.8	95.8	95.6	96.0	99.2	99.6	99.6	-	97.6	97.7	84.7	84.7	85.0
Sof	95.0	95.2	95.2	95.0	95.4	95.8	95.8	95.6	96.0	99.2	99.2	99.6	99.6	-	98.1	84.7	84.7	85.0
VL99	95.2	95.4	95.4	95.2	95.6	96.0	96.0	95.8	96.2	99.4	99.4	99.4	98.8	99.8	-	84.8	84.8	85.1
Aina	95.4	95.6	95.6	95.4	95.8	96.2	95.8	96.0	96.4	97.2	96.8	96.8	97.2	97.2	97.4	-	99.9	96.4
Vs	95.4	95.6	95.6	95.4	95.8	96.2	95.8	96.0	96.4	97.2	96.8	96.8	97.2	97.2	97.4	100.0	-	96.3
IR99	95.2	95.6	95.4	95.2	95.6	96.0	95.6	95.8	96.2	97.0	96.6	96.6	97.0	97.0	97.2	99.0	99.0	-

\* Nucleotide identities above, right and deduced amino acid identities down, left.







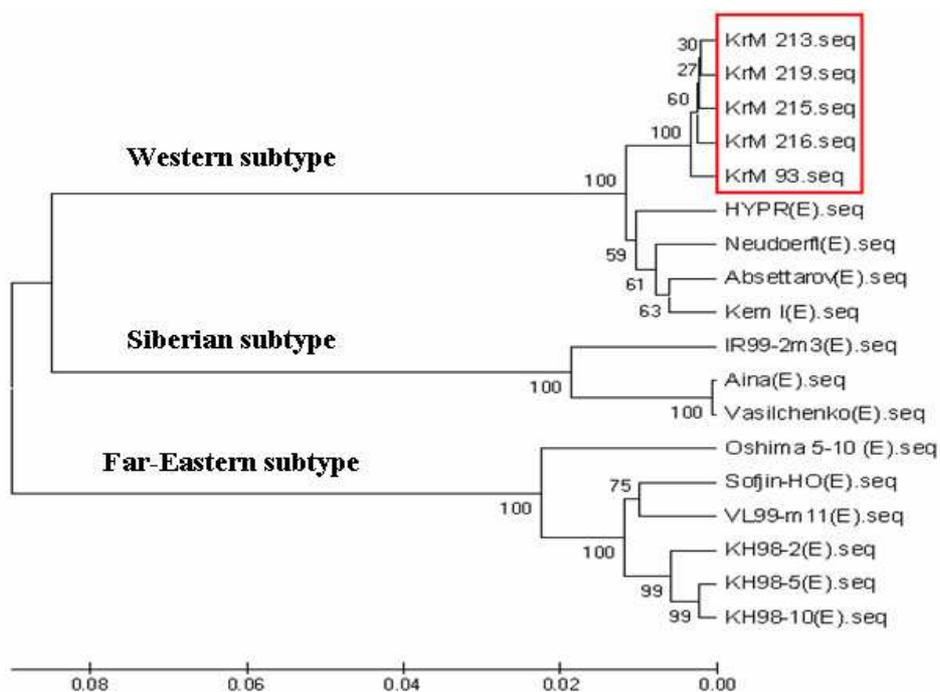
**Table 9.** Comparison of deduced amino acid differences of the E protein between five Korean isolates and other TBEV strains using *in vivo* virulence assay. Gray shade areas indicate amino acid changes in five Korean isolates and red letters show that the single amino acid change.

Position <sup>1)</sup>	Amino acid changes									
	TBEV Korean isolates					Neud	Oshima 5-10	KH 98-5	Sofjin-HO	
	KrM 93	KrM 213	KrM 215	KrM 216	KrM 219					
E-47	A	A	A	A	A	A	S	S	S	
E-52	S	S	S	S	G	N	N	N	N	
E-83	A	V	A	A	A	A	A	A	A	
E-88	G	G	G	G	G	G	S	S	S	
E-115	A	A	A	A	A	T	T	T	T	
E-120	A	A	A	A	A	S	S	S	S	
E-122	G	E	E	E	E	E	E	E	E	
E-153	A	A	A	A	A	A	A	V	V	
E-167	V	V	V	V	V	I	V	V	V	
E-178	E	E	E	E	E	E	D	D	D	
E-181	D	D	G	D	D	D	D	D	D	
E-198	D	V	V	V	V	V	V	V	V	
E-201	E	K	K	K	K	E	E	E	E	
E-204	K	K	K	E	K	K	K	R	K	
E-206	V	V	V	V	V	V	S	S	S	
E-239	K	E	K	E	E	E	E	E	E	
E-244	F	F	F	F	L	F	F	F	F	
E-267	A	A	A	A	A	A	S	S	S	
E-277	E	E	E	G	E	E	D	D	D	
E-292	V	V	V	A	V	V	V	V	V	
E-307	C	C	C	C	C	C	V	C	C	
E-317	A	A	A	A	A	A	I	I	I	
E-331	T	T	T	T	T	T	A	A	A	
E-407	K	K	K	K	K	K	R	R	R	
E-426	A	A	A	A	A	T	T	T	T	
E-430	P	L	L	L	L	L	L	L	L	
E-431	S	S	S	S	G	S	T	T	T	
E-433	I	I	I	I	I	I	V	V	V	
E-437	V	V	V	V	V	V	L	L	L	
E-448	I	I	I	I	I	I	L	L	L	
E-452	V	V	V	M	V	V	V	V	V	
E-458	I	I	I	I	I	I	L	L	L	
E-460	L	L	L	L	L	L	V	V	V	
E-462	V	V	V	V	V	V	M	V	V	
E-463	A	A	A	A	A	A	A	V	V	
E-471	M	M	M	M	M	M	M	V	M	
E-473	N	I	N	N	N	N	N	N	N	

<sup>1)</sup> Position numbers are counts from the first amino acid of E protein

#### 4. 국내분리주 계통유연관계 분석

전체 E 단백질 염기서열을 바탕으로 앞서 상동성 비교에 이용하였던 기존 분리주와 국내분리주 사이의 계통유연관계를 알아보기 위해 phylogenetic tree를 그려보았다. 그 결과 지금까지 알려진 TBEV의 3가지 아형(Western subtype, Far-Eastern subtype, Siberian subtype)으로 구분되었으며, 국내분리주 5주는 모두 Western 아형에 속하였다.



**Fig. 5.** Phylogenetic tree illustrating the genetic relationship of prototype strains and TBEV Korean isolates (KrM 93, KrM 213, KrM 215, KrM 216 and KrM 219) in red square. The reliability of the trees was tested by bootstrap re-sampling analysis (1000 replications). The scale bar indicates the number of synonymous substitution per site. Numbers at the nodes indicate percentage bootstrap support.

## 5. 국내분리주 병원성 분석

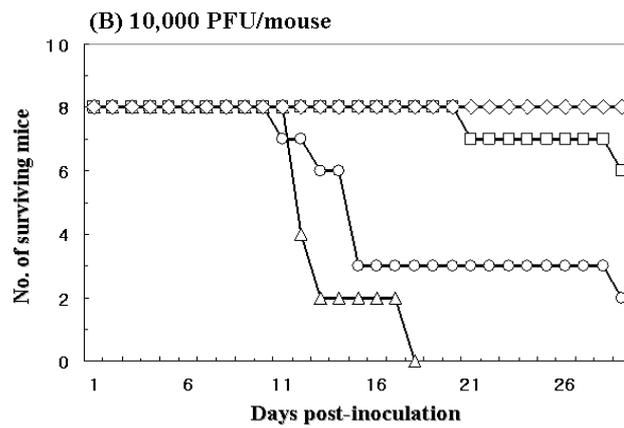
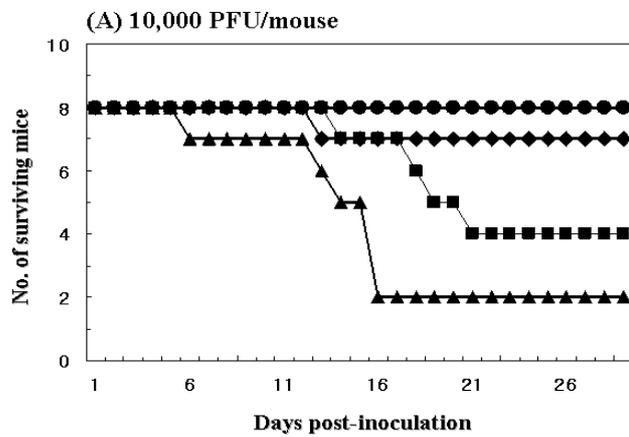
### 가. Neuroinvasiveness와 neurovirulence 비교

국내분리주와 표준주를 이용한 neuroinvasiveness 비교는 진드기매개뇌염의 일반적인 감염경로를 모방하고자 마우스에 피하 접종하는 방법을 이용하였다. 즉 주변조직 (피부)으로부터 바이러스가 퍼져나가 최종적으로 중추신경계 (CNS)로 침투하는 정도를 비교하였고, neurovirulence 비교는 뇌내 접종방법을 이용하여 뇌내에서 일어나는 바이러스의 감염, 즉 뇌염증상의 원인이 되는 바이러스의 감염능력을 비교하였다.<sup>18</sup> 국내분리주 5주와 표준주 4주에서 나타나는 neuroinvasiveness와 neurovirulence 차이는 Fig. 6 및 7과 같다. 피하 접종법으로 비교해본 neuroinvasiveness의 경우 Sofjin-HO주의 생존률이 0%로 접종후 17일에 모두 죽었으며, 국내분리주 5주는 각각 KrM 213주는 25%, KrM 219주는 50%, KrM 216주는 87.5%, KrM 93, 215주는 100%의 생존률을 나타냈다. 평균생존기간을 비교해본 결과 역시 Sofjin-HO주가 비교한 다른 주들에 비해서 평균생존기간이 가장 짧았고 (12.8±2.7일, P<0.05; KrM 93/213/215/216 versus Sofjin-HO, KH98-5 versus Sofjin-HO, Oshima 5-10 versus Sofjin-HO), 국내분리주 사이에서는 KrM 213주가 16.4±7.9일로 평균생존기간이 가장 짧았다.

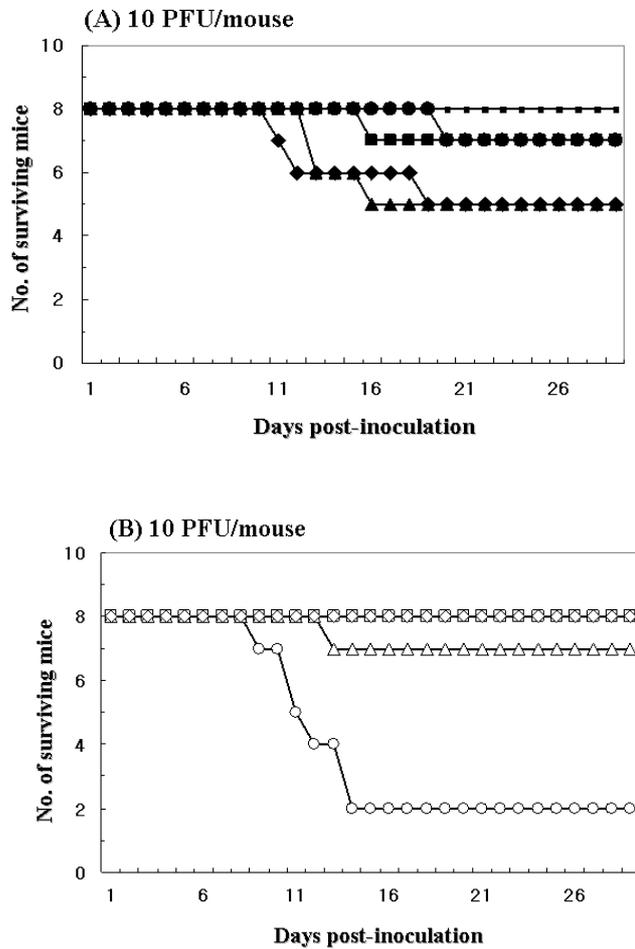
다음으로 뇌내 접종방법으로 비교한 neurovirulence의 경우에는 Neudoerfl주가 비교실험에 이용한 다른 주들에 비해서 가장 병원성이 강하였다 (평균생존기간, 15.3±8.0일, P<0.05; KrM 93/213/215/216/219 versus Neudoerfl, KH98-5 versus Neudoerfl, Sofjin-HO versus Neudoerfl, Oshima 5-10 versus Neudoerfl). Sofjin-HO주의 경우 neuroinvasiveness 비교 결과에서는 국내분리주인 KrM 213주나 표준주인 Neudoerfl주에 비해 병원성이 높게 나타났지만 (Fig. 6), neurovirulence 비교결과 (Fig. 7)에서는 KrM 213

주나 Neudoerfl주에 비해 병원성 정도가 낮았다. 또한 국내분리주 중에서는 neuroinvasiveness 비교 결과와 마찬가지로 KrM 213주가 평균 생존기간이 가장 짧음을 관찰하였다.

Neuroinvasiveness의 정도는 생존율 및 평균생존기간을 근거로 Sofjin-HO주 (0%, 12.8±2.7일) > KrM 213주 (25%, 16.4±7.9일) > Neudoerfl주 (25%, 18.4±7.8일) > KrM 219주 (50%, 22.5±6.2일) > KrM 216 (87.5%, 26±5.7일) > Oshima 5-10주 (75%, 26.9±2.8일) > KrM 93주 = KrM 215주 = KH 98-5주 (100%, 28일) 순으로 나타났으며, neurovirulence는 Neudoerfl주 (25%, 15.3±8.0일) > KrM 213주 (62.5%, 22.4±7.8일) = KrM 216주 (62.5%, 22.4±8.1일) > Sofjin-HO주 (87.5%, 26±5.7일) > KrM 219주 (87.5%, 26.4±4.6일) > KrM 93주 (87.5%, 26.9±3.2일) > Oshima 5-10주 = KH 98-5주 = KrM 215주 (100%, 28일) 순으로 나타났다.



**Fig. 6.** Survival of adult mice subcutaneously inoculated with TBEV. Mice were inoculated subcutaneously with 10,000 PFU of TBEV isolates [ KrM 93(●), KrM 213(▲), KrM 215(■), KrM 216(◆), KrM 219(■) ] (A) and prototype strains [ Neudoerfl(○), Sofjin-HO(△), Oshima 5-10 (□), KH 98-5(◇) ] (B). Survival was recorded for 28 days post-inoculation.



**Fig. 7.** Survival of adult mice intracerebrally inoculated with TBEV. Mice were inoculated intracerebrally with 10 PFU of TBE virus isolates [ KrM 93(●), KrM 213(▲), KrM 215(■), KrM 216(◆), KrM 219(■) ] (A) and prototype strains [ Neudoerfl(○), Sofjin-HO(△), Oshima 5-10 (□), KH 98-5(◇) ] (B). Survival was recorded for 28 days post-inoculation.

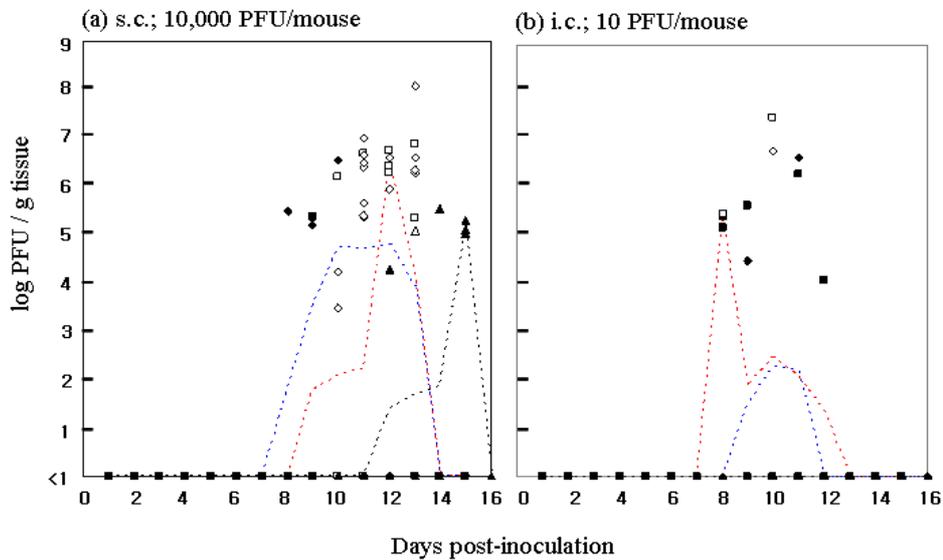
#### 나. 접종후 일별 마우스 뇌에서의 바이러스 역가 및 혈청 내에서의 중화항체가 변화

KrM 213, Neudoerfl, Sofjin-HO 주를 피하 또는 뇌내경로로 접종한 후 일별로 마우스 뇌에서의 virus replication level과 혈청 내에서의 중화항체가 변화를 비교한 결과는 Fig. 8 및 9와 같다. 먼저 피하경로로 접종한 Sofjin-HO주의 경우 접종후 8일부터 마우스 뇌에서 처음으로 바이러스 역가가 확인되었고 (68 PFU/g), 역가는 점차 증가하여 12일에 가장 높은 역가를 보였다 ( $6.3 \times 10^4$  PFU/g). 혈청에서의 중화항체는 접종후 4일부터 처음으로 확인되었고, 점차 증가하는 경향을 보였다.

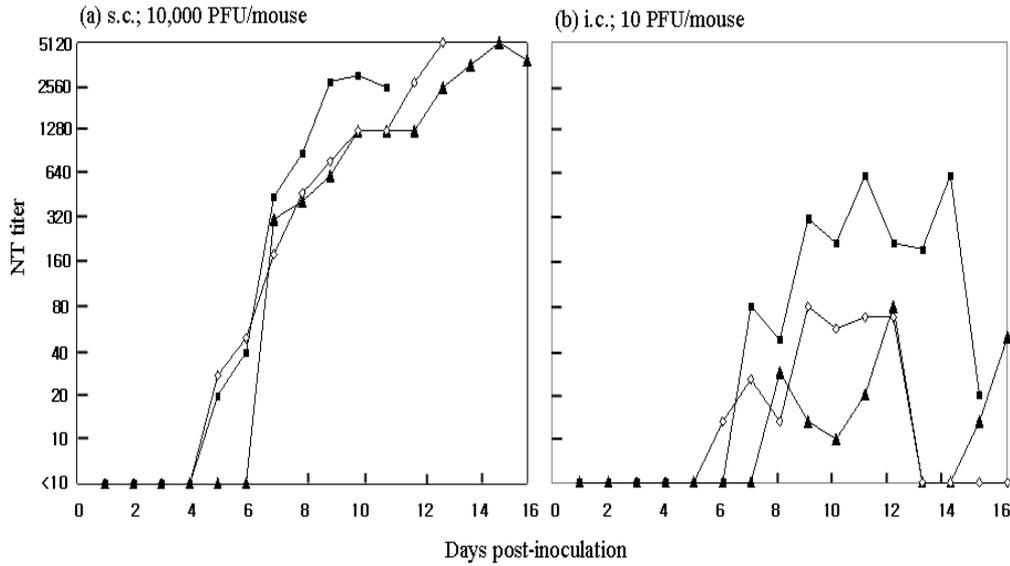
Neudoerfl 주는 접종후 9일부터 마우스 뇌에서 처음으로 역가가 확인되었으며 (62 PFU/g), 가장 높은 역가는 접종후 12일에  $3.2 \times 10^6$  PFU/g 으로 나타났고, 접종후 5일에 처음으로 혈청 내에서 중화항체를 확인하였으며, 역시 점차 중화항체가 증가하는 경향을 보였다. 마지막으로 피하경로로 접종한 KrM 213주의 경우, Sofjin-HO, Neudoerfl주보다 늦은 접종후 12일에 마우스 뇌에서 처음으로 바이러스 역가가 확인되었으며 (25 PFU/g), 점차 증가하다가 접종후 15일에 가장 높은 역가를 나타냈다 ( $1.4 \times 10^5$  PFU/g). 혈청에서의 중화항체가 역시 Sofjin-HO나 Neudoerfl 주에 비해 늦은 접종후 7일에 처음으로 확인되어 점차 증가하는 경향을 보였다.

다음으로 neurovirulence 비교를 위해 뇌내경로를 통해 접종한 경우 Sofjin-HO주는 접종후 9일에 마우스 뇌에서 처음으로 바이러스 역가가 확인되었고 (32 PFU/g), 역가는 점차 증가하여 접종후 10일에  $2.0 \times 10^2$  PFU/g 으로 가장 높은 역가를 나타냈으며, Neudoerfl 주의 경우 접종후 8일에 처음으로 마우스 뇌에서 역가가 확인되어 ( $2.3 \times 10^5$  PFU/g), 이후에는 점차 감소하여 접종후 13일 이후에는 역가가 확인되지 않았다. 국내분리주

인 KrM 213주의 경우에는 접종후 16일까지 마우스 뇌에서 바이러스역가는 확인되지 않았다. 뇌내접종후 혈청에서 나타난 중화항체가 변화는 피하경로로 접종한 후 나타난 중화항체가보다 대체적으로 낮았으며, 피하경로를 통해 접종한 후 나타나는 중화항체가 변화의 경우 관찰기간동안 비교적 증가하는 경향을 보인 반면에 뇌내접종을 통해 비교한 중화항체가 변화 경향은 일정하게 나타나지 않았다.



**Fig. 8.** Replication of TBEV strains in mouse brain. Mice were inoculated subcutaneously with 10,000 PFU (a) or intracerebrally with 10 PFU (b) of TBE virus strains Neudoerfl (■; surviving, □; dead), Sofjin-HO (◆; surviving, ◇; dead) or KrM 213 (▲; surviving, △; dead), respectively. Each virus titer is shown. Geometric mean titers are calculated for each time period in Neudoerfl (red dotted line), Sofjin-Ho (blue dotted line) and KrM 213 (dotted line) strains, respectively.



**Fig. 9.** Developing pattern of anti-TBE neutralizing antibody titer of mice. Mice were inoculated subcutaneously with 10,000 PFU (a) or intracerebrally with 10 PFU (b) of TBE virus strains Neudoerfl (■) or Sofjin-HO (◇) or KrM 213 (▲), respectively. For each time period antibody titers are shown as a geometric mean of 2-3 mice.

#### IV. 고찰

진드기매개뇌염은 TBEV에 감염된 참진드기에 의해 전파되는 질환으로 많은 유럽국가, 러시아 및 아시아 등지에서 공중보건학적으로 중요한 질병으로 알려져 있다. 그러나 아직까지 국내 TBEV에 의한 뇌염환자 발생 사례는 보고된 적이 없다. 하지만 뇌염증상을 보이지만 원인을 알 수 없는 불명뇌염 검체의 증가, 우리나라와 인접한 국가 (러시아, 일본, 중국)에서의 TBEV에 의한 뇌염환자 발생 및 바이러스 분리 보고, 그밖에 국제적인 교류 및 기후변화로 인한 절지동물 매개 질환의 국내유입 가능성<sup>25-27</sup>, TBEV의 매개체로 알려진 참진드기종의 국내분포<sup>28</sup> 등으로 미루어 볼 때 우리나라에서의 진드기매개뇌염 발생 가능성은 매우 높다고 할 수 있다. 이에 본 연구에서는 국내에서 확보한 매개체, 숙주동물, 불명뇌염 임상검체에서의 TBEV 감염여부를 확인해 보았고, TBEV 유전자가 검출된 검체를 대상으로 한 바이러스 분리 및 확인실험을 통해 야생 설치류인 등줄쥐의 폐조직에서 5주의 국내분리주를 분리하였다.

매개체 검체의 경우 현재까지 TBEV를 매개하는 참진드기종으로 알려진 3속 9종들 (*Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes arboricola*, *Ixodes ovatus*, *Hemaphysalis punctata*, *Hemaphysalis concinna*, *Dermacenter reticulatus*, *Dermacenter marginatus*)<sup>29</sup> 중 국내 분포한다고 알려진 3속 5종에 포함되는 참진드기종들 (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ovatus*, *Hemaphysalis concinna*, *Dermacenter reticulatus*, *Dermacenter marginatus*)<sup>28</sup>은 본 연구에선 확보하지 못하였지만, 확보된 참진드기 중 비교적 많은 수의 *Hemaphysalis longicornis*, *Hemaphysalis flava* 보다 적은 수를 확보한 *Ixodes niponensis* 에서의 감염률이 높게 나타남을 알 수 있었다. 그렇지만 단순히 유전자 검출만으로는 그 결과를 입증하기 어렵다는

점, 또한 지금까지 알려진 TBEV를 매개하는 종 중 국내 분포 종들을 확보하지 못했고 확보된 참진드기 개체수도 적다는 점으로 볼 때 국내 서식하는 참진드기의 TBEV 감염여부를 판단하기는 어렵다.

또한 본 연구에 이용된 임상검체의 경우에도 TBEV의 바이러스 혈증기간 (viremia)이 짧기 때문에 유전자가 검출되었어도 바이러스를 분리하는 것이 매우 어렵고, 매개체 검체와 마찬가지로 바이러스가 분리되지 않은 상태에서 유전자 검출만으로는 그 결과를 입증하기 어렵다고 할 수 있다. 따라서 임상검체의 경우 뇌염증상을 나타내는 불명뇌염검체, 매개체 검체에서는 TBEV 매개하는 참진드기류의 더 많은 개체수 확보를 통한 TBEV 확인 및 분리실험을 지속적으로 실시하여 그 결과를 검증해야 될 것이다. 또한 본 연구에서 확인된 기준에 알려진 TBEV 매개체 이외에 유전자가 검출된 참진드기류가 실제로 TBEV를 매개하는지에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

다음으로 야생쥐 폐조직으로부터 분리, 동정된 국내분리주 5주의 특성에 관한 연구에서는 국내분리주의 전체 E 단백질 염기서열 및 번역된 아미노산 서열을 바탕으로 기존분리주와의 계통유연관계 및 아미노산 서열을 분석하였고, 기준에 보고된 플라비바이러스의 E 단백질 특정 아미노산 서열 치환이 병원성에 영향을 준다는 많은 연구결과를 바탕으로 국내분리주와 기존분리주 사이에서 나타나는 병원성 비교 및 아미노산 치환과의 연관성에 대해서 알아보았다. 전체 E 단백질 염기서열 및 번역된 아미노산 서열을 바탕으로 기존분리주들과의 계통유연관계 및 상동성을 비교해 본 결과 국내분리주 5주는 모두 Western 아형에 속함 (97%이상의 상동성)을 알 수 있었고, 이 같은 결과는 국내분리주의 partial E 단백질 염기서열을 바탕으로 분석한 결과와 일치하였다.<sup>30</sup>

번역된 아미노산 정렬 결과 역시 Western 아형에서만 특징적으로 나타

나는 아미노산 서열을 국내분리주도 모두 가지고 있음을 확인하였고, 그 중 206번 (Western 아형, Val; Far-Eastern 아형, Ser; Siberian 아형, Leu)<sup>20</sup>, 317번 (Western 아형, Ala; Far-Eastern 아형, Ile; Siberian 아형, Thr)의 경우 각 아형마다 서로 다른 아미노산 서열을 가짐을 확인하였다. 이런 점에서 이 위치의 아미노산 서열은 TBEV의 3가지 아형을 구분하는 genetic marker로서 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.<sup>20</sup>

또한 모기매개 플라비바이러스 (mosquito-borne flavivirus)에는 없지만, 진드기매개 플라비바이러스 (tick-borne flavivirus)에서는 보존된다고 알려진 EHLPTA서열<sup>31</sup>, Flavivirus type-specific hypervariable region으로 특히 진드기매개뇌염바이러스와 텅기바이러스를 구분한다고 알려진 231-234번 아미노산서열들<sup>32</sup>이 잘 보존된 것으로 보아 국내분리주 5주는 플라비바이러스 중 TBE complex에 속함을 확인하였다. 결과적으로 본 연구에서 분리, 동정된 국내분리주 5주는 TBE complex flavivirus에 속하며, 그 중에서도 TBEV Western 아형의 특징을 가짐을 알 수 있었다.

게다가 E 단백질 진드기매개뇌염바이러스(TBEV)<sup>33-35</sup>, 일본뇌염바이러스 (JEV)<sup>36-38</sup>, Louping-ill 바이러스<sup>39</sup>, Murray Valley 바이러스<sup>40,41</sup> 등과 같은 플라비바이러스의 병원성을 결정하는데 중요한 역할을 하며, 특히 E 단백질 내에서의 특정 아미노산 치환이 neuroinvasiveness, neurovirulence를 감소시키는 원인이 된다는 많은 연구결과가 보고되었다. 무엇보다도 E 단백질을 구성하고 있는 3개의 domain에서의 아미노산 치환, 즉 domain I에서의 아미노산 치환은 E 단백질의 당질화 부분 (glycosylation site)의 돌연변이로 인한 당단백질인 E 단백질의 발현감소로 인해, domain II에서의 치환은 이 부분이 pH-dependent fusion activity에 관여할지도 모른다는 점에서, domain III의 경우 lateral surface가 receptor binding 부분으로 추정된다는 점으로 미루어 볼 때 E 단백질의 각 domain에서의 아미노산 치환이 병원성

감소와 관련이 있다고 보고되어 있다.<sup>18,34,42</sup> 이를 바탕으로 본 연구에서도 전체 E 단백질 정렬결과 나타난 특정 아미노산 치환과 병원성과의 연관성에 대해 알아보기 위해 피하와 뇌내접종법으로 neuroinvasiveness와 neurovirulence의 정도를 비교해보았다. 우선 neuroinvasiveness 경우 가장 높은 병원성을 나타낸 Sofjin-HO주와 비교해서 비교적 낮은 neuroinvasiveness를 보인 국내분리주들간의 특정 아미노산 치환을 비교해본 결과 기존에 neuroinvasiveness 감소와 연관된다고 보고된 E 단백질의 domain I의 E181 (Asp→Tyr)<sup>34</sup>, Domain II의 E122<sup>19</sup> (Glu→Gly), E123 (Ala→Lys)<sup>34</sup> E201 (Glu→Lys)<sup>19</sup>, Domain III의 E368 (Gly→Arg)<sup>34</sup>, E384 (Tyr→His)<sup>33</sup> 중 Sofjin-HO주와 비교해서 KrM 215주는 E181 (domain I) 위치에서 Asp→Gly로, KrM 93주는 E122 (domain II)에서 Glu→Gly로, KrM 213, 215, 216주는 E201 (domain II)에서 Glu→Lys로 아미노산이 치환됨을 확인하였고, E123, E368, E384 위치에서의 아미노산 치환은 확인되지 않았다. 하지만, 알려진 위치 이외에도 Sofjin-HO주와 비교해서 domain I에 해당되는 E47에서 KrM 93, 213, 215, 216, 219주는 Ser→Ala으로, E153에서 KrM 93, 213, 215, 216, 219주는 Val→Ala으로, E178에서 KrM 93, 213, 215, 216, 219주는 Asp→Glu으로, E292에서 KrM 216주는 Val→Ala으로 각각 치환됨을 확인하였다. 또한 domain II에 해당되는 위치에서도 총 12곳에서 아미노산 치환을 확인하였고 [KrM 93, 213, 215, 216주는 E52 (Asn→Ser), KrM 213주는 E83 (Ala→Val), KrM 93, 213, 215, 216주는 E88 (Ser→Gly), KrM 93, 213, 215, 216주는 E115 (Thr→Ala), KrM 93, 213, 215, 216주는 E120 (Ser→Ala), E198 (Val→Asp), KrM 216주는 E204 (Lys→Glu), KrM 93, 213, 215, 216주는 E206 (Ser→Val), KrM 93, 215주는 E239 (Glu→Lys), KrM 93, 213, 215, 216주는 E267 (Ser→Ala), KrM 93, 213, 215주는 E277 (Asp→Glu), KrM 216주는 E277 (Asp→Gly)], domain III에 해당되는 E317에서 KrM

93, 213, 215, 216, 219주는 Ile→Ala으로, E331에서 KrM 93, 213, 215, 216, 219주는 Ala→Thr로 치환됨을 확인하였다.

다음으로 뇌내접종법으로 neurovirulence를 비교한 결과, 가장 병원성이 강한 Neudoerfl주와 국내분리주 사이에 나타난 특정 아미노산 치환은 neurovirulence 감소와 연관된다고 알려진 E154에서의 Asn→Leu로의 치환이 대표적으로 보고된 경우인데<sup>43</sup>, 국내분리주 5주 모두 E154에서의 치환은 나타나지 않았다. 하지만 알려진 위치 이외에도 Neudoerfl주와 비교해서 domain I에 해당되는 E167에서 KrM 93, 213, 215, 216, 219주는 Ile→Val으로, E181에서 KrM 215주는 Asp→Gly으로, E292에서 KrM 216주는 Val→Ala으로 치환됨을 확인하였다. 또한 domain II에 해당되는 E52에서 KrM 93, 213, 215, 216주는 Asn→Ser으로, KrM 219주는 Asn→Gly으로, E83에서 KrM 213주는 Ala→Val으로, E115에서 KrM 93, 213, 215, 216, 219주는 Thr→Ala으로, E120에서 KrM 93, 213, 215, 216, 219주는 Ser→Ala으로, E122에서 KrM 93주는 Glu→Gly으로, E198에서 KrM 93주는 Val→Asp으로, E201에서 KrM 213, 215, 216, 219주는 Glu→Lys으로, E239에서 KrM 93, 215주는 Glu→Lys으로, E244에서 KrM 219주는 Phe→Leu으로, E277에서 KrM 216주는 Glu→Gly으로 각각 치환됨을 확인하였다.

병원성 비교 결과 기존에 보고된 특정 아미노산 치환이외에 국내분리주 5주와 비교해 높은 병원성을 보인 Sofjin-HO나 Neudoerfl주 사이에 나타난 아미노산 치환이 실제로 neuroinvasiveness나 neurovirulence 감소와 연관성이 있는지는 아직까지 밝혀진 바가 없고, 실제적으로 병원성 감소에 관여하는 정확한 mutation site는 본 연구를 통해서 알 수가 없었다. 하지만 앞선 연구결과로 미루어 볼 때 E 단백을 구성하고 있는 3개의 domain에서의 특정 아미노산 치환 중 본 연구에서 확인된 domain I, II, III에서의 하나 이상의 아미노산 치환이 pH-dependent fusion activity,

glycosylation site, receptor binding과 연관되어 결과적으로 병원성 감소에 영향을 미칠지도 모를 것이다. 또한 병원성 감소에 영향을 미치는 정확한 mutation site를 알기 위해서는 site-directed mutagenesis, E 단백질 이외에 병원성과 연관된 다른 region 분석 등의 추가적인 실험이 필요할 것이다.

결론적으로 본 연구에서는 국내에서 처음으로 TBEV를 분리함으로써 국내 TBEV에 의한 TBE 발생 가능성을 확인하였고, 분리된 국내분리주의 전체 E 단백질 유전자 및 병원성 분석을 통해 국내분리주와 기존에 분리되어진 바이러스주들과의 계통유연관계 및 E 단백질의 특정 아미노산 치환과 병원성과의 연관 가능성을 확인 할 수 있었다.

본 연구 결과는 뇌염증상을 보이지만 원인 병원체를 알 수 없는 국내 불명뇌염 (unknown encephalitis)의 TBEV 감염에 의한 발병 가능성을 이해하는데 도움을 줄 것이며, 본 연구에서 확인된 국내분리주의 분자생물학적 특성 및 이를 바탕으로 한 후속연구는 TBEV 진단법 개선 및 백신개발 연구를 위한 유용한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

## V. 결론

본 연구에서는 국내에서 확보한 임상, 숙주 및 매개체 검체를 대상으로 진드기매개뇌염바이러스 감염여부를 확인하고, 유전자가 검출된 검체를 대상으로 한 바이러스 분리 및 동정을 통해 국내분리주를 확보하여, 확보된 국내분리주가 가지는 분자생물학적 특성에 대해 알아보고자 하였다. 연구결과를 종합하면

1. 국내에서 확보한 검체 중 야생쥐 폐조직에서 5주의 진드기매개뇌염바이러스를 처음으로 분리하였다.
2. 확보한 국내분리주의 전체 E 단백질 염기서열 및 번역된 아미노산 서열을 바탕으로 기존분리주와의 계통유연관계분석, 상동성비교, 번역된 전체 E 단백질 아미노산 서열 비교를 통해 국내분리주 5주는 진드기매개뇌염바이러스의 Western 아형으로 분류되었다.
3. E 단백질 아미노산 정렬결과 나타난 특정 위치에서의 아미노산 치환이 병원성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 병원성 비교 및 확인 실험을 통해 병원성이 높게 나타난 Sofjin-HO나 Neudoerfl 주와 비교해서 국내분리주의 병원성이 감소됨을 확인 할 수 있었고, 이들과 비교해서 국내분리주는 E 단백질의 domain I, II, III에 속하는 위치의 특정 아미노산이 치환됨을 확인하였다.

## 참고문헌

1. Dumpis U, Crook D, Oski J. Tick-borne encephalitis. Clin Infect Dis 1999;28:882-90.
2. Takashima I, Morita K, Chiba M, Hayasaka D, Sato T, Takezawa C, Igarashi A, Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Hashimoto N. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the the virus. J Clin Microbiol 1997;35(8):1943-7.
3. Takeda T, Ito T, Osada M, Takahashi K, Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepizootiologic survey in Hokkaido, Japan. Am J Trop Med Hyg 1999;60(2):287-91.
4. Takeda, T, Ito T, Chiba M, Takahashi K, Niioka T, Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan. J Med Entomol 1998;35(3):227-31.
5. Ternovoi VA, Kurzhukov GP, Sokolov YV, Ivanov GY, Ivanisenko VA, Loktev AV, Ryder RW, Netesov SV, Loktev VB. Tick-borne encephalitis with hemorrhagic syndrome, Novosibirsk region, Russia, 1999. Emerg Infect Dis 2003;9(6):743-6.

6. Gritsun TS, Frolova TV, Zhankov AI, Armesto M, Turner SL, Frolova MP, Pogodina VV, Lashkevich VA, Gould EA. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J virol* 2003;77(1):25-36.
7. Weidmann M, Schmidt P, Hufert FT, Krivanec K, Meyer H. Tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus* in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006;6(4):379-81.
8. Vingre I, Nesaule V, Kalvelis G. Tick-borne encephalitis (in Latvian). Riga, Latvia: Zvaigens 1984:30-84.
9. Chiba N, Iwasaki T, Mizutani T, Kariwa H, Kurata T, Takashima I. Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. *Vaccine* 1999;17:779-87.
10. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990;44:649-88.
11. Gritsun TS, Venugopal K, Zanotto PM, Mikhailov MV, Sall AA, Holmes EC, Polkinghorne I, Frolova TV, Pogodina VV, Lashkevich VA, Gould EA. Complete sequence of two

tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5'- and 3'-UTRs. *Virus Res* 1997;49(1):27-39.

12. Mandl CW, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stadler PF, Allison SL, Heinz FX. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J virol* 1998;72(3):2132-40.
13. Markoff L. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res* 2003;59:177-228.
14. Heinz. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Virus Res* 1986;31:103-68.
15. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res* 2003;57:129-46.
16. Heinz FX. Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine* 2003;21:Suppl 1:S3-10.
17. Monath TP, Heinz FX. In *Fields Virology*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Flaviviruses*. 3rd ed.

Philadelphia: Lippincott-Raven Press; 1996. p.961-1034.

18. McMinn PC. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *J Gen Virol* 1997;78:2711-22.
19. Mandl CW. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res* 2005;111(2):161-74.
20. Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen virol* 1999;80:179-85.
21. Ruzek D, Stastna H, Kopecky J, Golovljova I, Grubhoffer L. Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *J Virol Methods* 2007;144:133-7.
22. Gresikova M, Kaluzova M. Biology of tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol* 1997;41:115-24.
23. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mole Biol Evol* 2007;24:1596-9.

24. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. The Clustal W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-80.
25. Patz JA, Epstein PR, Burke TA, Balbus JM. Global climate change and emerging infectious disease. *J Am Med Asso* 1996;275:217-23.
26. Lindgren E, Gustafson R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet* 2001;358:16-8.
27. Lindgren E. Climate and Tickborne encephalitis. *Conservation Ecology online* 1998;2:119-23.
28. Lee HI. *Medical Entomology. Family Acari*. 2nd ed. (in Korean) Seoul: Kommunsa Press; 1999. p.365-412.
29. Suss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 2003;21:Suppl 1:S19-35.
30. Kim SY, Yun SM, Han MG, Lee IY, Lee NY, Jeong YE,

- Lee BC, Ju YR. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008;8(1):7-14.
31. Shiu SY, Ayres MD, Gould EA. Genomic sequence of the structural proteins of louping ill virus: comparative analysis with tick-borne encephalitis virus. *Virology* 1991;180:411-5.
32. Shiu SY, Jiang WR, Porterfield JS, Gould EA. Envelope protein sequence of dengue virus isolates TH-36 and TH-Sman, and identification of a type-specific genetic marker for dengue and tick-borne flaviviruses. *J Gen Virol* 1992;73(1):207-12.
33. Holzmann H, Heinz FX, Mandle CW, Guirakhoo F, Kunz C. A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *J Virol* 1990;64:5156-9.
34. Holzmann H, Stiasny K, Ecker M, Kunz C, Heinz FX. Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice. *J Gen Virol* 1997;78(1):31-7.

35. Wallner G, Mandle CW, Ecker M, Holzmann H, Stiasny K, Kunz C, Heinz FX. Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 1996;77(5):1035-42.
36. Cecilia D, Gould EA. Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. *Virology* 1991;181:70-7.
37. Hasegawa H, Yoshida M, Shiosake T, Fujita S, Kobayashi Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* 1992;191:158-65.
38. Ni H, Barrett AD. Molecular differences between wild-type Japanese encephalitis virus strains of high and low mouse neuroinvasiveness. *J Gen Virol* 1996;77(7):1449-55.
39. Jiang WR, Lowe A, Higgs S, Reid H, Gould EA. Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence. *J Gen Virol* 1993;74(5):931-5.
40. McMinn PC, Marshall ID, Dalgarno L. Neurovirulence and

neuroinvasiveness of Murray Valley encephalitis virus mutants selected by passage in a monkey kidney cell line. *J Gen Virol* 1995;76(4):865-72.

41. McMinn PC, Weir RC, Dalgarno L. A mouse-attenuated envelope protein variant of Murray valley encephalitis virus with altered fusion activity. *J Gen Virol* 1996;77(9):2085-8.
42. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 1995;375:291-8.
43. Pletnev AG, Bray M, Lai CJ. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses : effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* 1993;67:4956-63.
44. Abe M, Kuzuhara S, Kino Y. Establishment of an analyzing method for a Japanese encephalitis virus neutralization test in Vero cells. *Vaccine* 2003;21:1989-94.

## Abstract

### Isolation of tick-borne encephalitis virus and *in vivo* virulence analysis of TBEV isolates

Seok-Min Yun

*Department of Medical Science*  
*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Tai-Soon Yong)

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is an arthropod-borne virus belonging to the genus *flavivirus* within the family *Flaviviridae*. It is endemic in central Europe, Russia and parts of Asia and represents a significant public health problem in these areas. Although tick-borne encephalitis (TBE) has not been reported in Korea, it seems quite probable that tick-borne encephalitis by TBEV occurred in Korea since an increase of the number of unknown encephalitis patients, distribution of the main vectors of TBEV in Korea and TBEVs have been isolated near the countries including Japan, China and Russia. But TBEV has never been investigated so far in Korea. To investigate whether

TBEV is present in Korea, Human, vector ticks and animal hosts were tested to detect and isolate TBEV using RT-nested PCR, cell culture and inoculation into ICR mice. As a result, TBEV were isolated from wild rodents (lung tissue) in Korea. We determined the complete envelope (E) protein genes of five Korean isolates and analyzed the genetic variability within five Korean isolates or with 13 other TBEV strains. Five isolates had high identity with Western subtype (97~99% identity) in nucleotide and deduced amino acid. The phylogenetic analysis showed TBEV isolates from Korea were clustered with Western subtype. Results of deduced amino acid alignment of five isolates conserved unique amino acids as Western subtype strains. It was found from the result that provide the first evidence of the presence of TBEV in Korea and five isolates was characterized by Western subtype.

To identify whether the amino acid substitutions of three domains in E protein associated with neuroinvasiveness and/or neurovirulence, *in vivo* virulence assay in 6-week-old ICR mice were performed. The results showed both neuroinvasiveness level by subcutaneous inoculation and neurovirulence level by intracerebral inoculation, five Korean isolates were lower than Sofjin-HO and Neudoerfl strains. The amino acid substitution of domain I, II, III in E protein between five Korean isolates and 2

other TBEV strains (Sofjin-HO and Neudoerfl strain) were identified.

From these studies the precise mutation sites were unable to identify involved in attenuation of neuroinvasiveness and/or neurovirulence of five Korean isolates. However, one or more of the amino acid substitutions in domain I,II,III may be assumed to contribute to attenuation of neuroinvasiveness and/or neurovirulence of five Korean isolates. The results of this study will provide a valuable information for the development of an effective vaccine and diagnosis of TBEV.

---

Key Words : tick-borne encephalitis virus, isolates, western subtype, envelope protein gene, amino acid substitution, neuroinvasiveness, neurovirulence