휴먼 노로바이러스와 대체 노로바이러스의 생존성 비교

Comparison Study on Viabilities of Human Norovirus and Norovirus Surrogates

하지형[1,3], 이정수[2], 주인선[2], 이희정[2], 하상도[1*]

Ji-Hyoung Ha[1,3], Jeong-Su Lee[2], In-Sun Joo[2], Hee Jung Lee[2], Sang-Do Ha[1*]

[1]중앙대학교 식품공학부; [2]식품의약품안전처, [3]킴랩

[1]School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Seoul, South Korea
[2]Ministry of Food and Drug Safety, Korea
[3]Kim Laboratories LTD., Urbana-Champaign, IL, USA

서 론

2006년 대형 집단급식 식중독 사고의 원인균으로 밝혀진 휴먼 노로바이러스 (genus Norovirus, family Caliciviridae)는 전 세계적으로 널리 분포되어 있는 가장 일반적인 장관계 바이러스다. 국내에서는 질병관리본부에 의해 국가적 관리대상인 1-4군 법정 전염병 외의 지정 전염병으로 집중 관리되고 있다[3,4,16]. 휴먼 노로바이러스 감염증은 병원체 감시대상 지정 전염병으로서 바이러스성 장관감염증으로 분류돼 아스트로바이러스 감염증, 장내 아데노바이러스 감염증과 더불어 보건당국의 집중 감시대상에 포함되었다. 최근 우리나라의 휴먼 노로바이러스에 의한 집단식중독 발생 추이를 살펴보면 2007년 97건에 환자수 2,345명에서 2010년 31건에 환자수 1,994명으로 집계됨으로써 발생건수는 줄어들었으나 발생 건수 대비 환자수 비율은 24.1%에서 64.3%로 크게 상승하였다[20]. 이는 휴먼 노로바이러스로 인한 식중독 사고 유형이 점차 대형화, 집단화되는 추세를 엿보이게 한다(그림 1). 또한 2010년 식중독 유발 원인균 동향을 살펴보면 휴먼 노로바이러스가 식중독 사고를 가장 많이 발생시켰을 뿐만 아니라 가장 많은 환자를 유발했고, 102건 (37.8%)의 원인불명의 식중독 사례 중 대부분이 휴먼 노로바이러스에 의한 식중독으로 추정된다[20].

하지만 현재까지 휴먼 노로바이러스는 검출을 위한 세포배양법 및 동물모델이 개발되지 못해 휴먼 노로바이러스의 보건학적 중요성에 비해 인체의 감염요인, 면역반응, 바이러스의 분자생물학적 특징에 관한 연구가 전세계적으로 활발하지 못한 실정이다. 휴먼 노로바이러스를 배양하고자 했던 노력은 지난 20년간 계속되어 왔으나, 성공하지 못했으며 26개의 다른 세포주와 다양한 배양첨가제 및 배양조건이 연구되었으나 휴먼 노로바이러스에 의한 세포 변성작용 (Cytopathic Effects: CPE)을 유발하지 못했으며, 휴먼 노로바이러스의 증식 또한 유도할 수 없었다고 한다[9]. 이러한 기술적 한계를 극복하기 위한 방안으로 휴먼 노로바이러스의 대체 바이러스인 feline calicivirus virus (FCV) F9

* Correspondence to: Sang-Do Ha
School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-4831 Fax: 82-31-675-4853 E-mail: sangdoha@cau.ac.kr

을 갖고 고양이 모델을 이용하여 휴먼 노로바이러스의 분자생물학적 특성을 추정하고 있는 실정이다. 최근에는 대식세포 (macrophage)와 수상세포 (dendritic cell)에서 복제가 가능한 murine 노로바이러스(MNV)가 발견되어 중요한 연구모델로 인식되면서 연구에 활력이 되고 있다[6]. 하지만 최근에는 휴먼 노로바이러스와 대체 노로바이러스인 FCV, MNV가 pH, 온도 그리고 열처리 등의 외부 환경 요인에 의한 저항성이 다르다는 사실이 밝혀지고 있다.

따라서 본고에서는 향후 심층적인 휴먼 노로바이러스의 연구를 위하여 생태 환경조건에서 휴먼 노로바이러스와 대체 노로바이러스의 생존율을 비교, 분석하고자 한다.

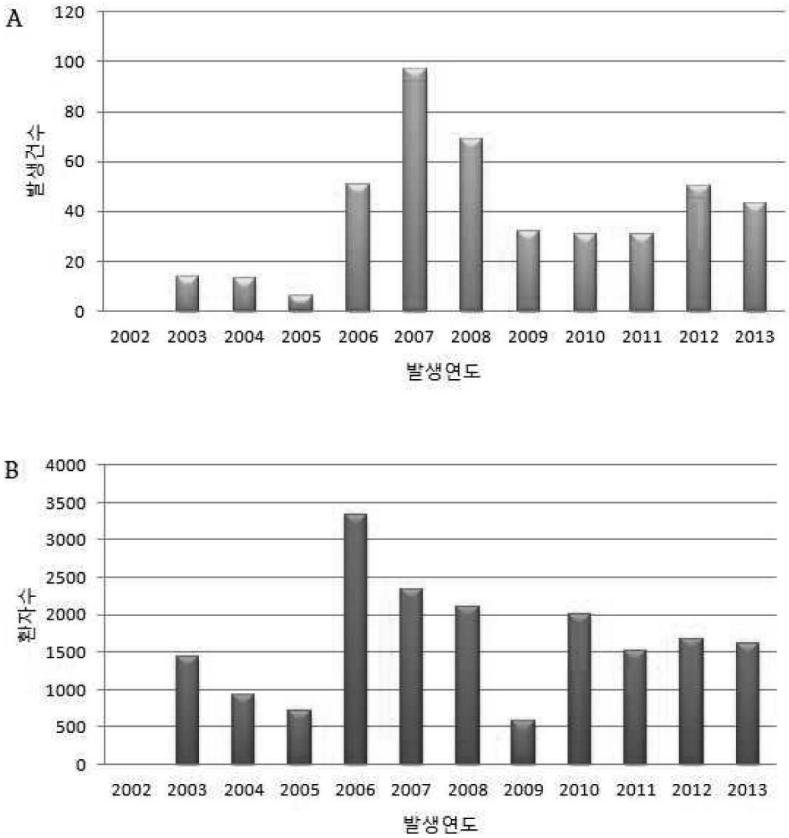

그림 1. 국내 노로바이러스 식중독 발생 동향 (2002-2013년)
(A) 발생 건수, (B) 발생 환자수 (식품의약품안전처 식중독통계시스템)

본 론

휴먼 노로바이러스의 일반 및 분자 생물학적 특성

Caliciviridae family에 속한 휴먼 노로바이러스는 small round-structured virus (SRSV) 또는 Norwalk like virus로 불리어져 왔다. 1968년 미국의 Ohio 주의 Norwalk 지방의 학교에서 처음 발견되었으며, winter vomiting disease로 불리어 왔다[1]. 그리고 Kapikian 등은 winter vomiting disease 증상을 보이는 환자의 분변으로부터 immune electron microscopy를 수행하여 처음으로 노로바이러스를 확인하였다[15]. 그 후 Greenberg 등과 Jiang 등이 분자생물학적인 연구를 통해 약 59 kDa의 단일구조의 단백질이라는 것과 노로바이러스의 genome이 정방향 (positivesense)의 single strand RNA로 이루어졌다는 사실을 증명하였다[11,13]. 또한 면역학적 또는 유전학적으로 높은 다양성을 가진 바이러스로 알려져 있는 휴먼 노로바이러스는 크게 5가지의 genogroup(GI-GV)으로 분류된다. 이 중 3가지인 GI, GII 및 GⅣ의 genogroup이 인간에게 급성장염을 유발하는 인체 병원성 바이러스로 알려져 있으나, GⅣ에 대한 정보는 매우 희귀하다[19]. 휴먼 노로바이러스의 GI과 GII는 감염 및 분자생물학적, 역학적 및 계통학적으로도 매우 상이하며, 현재까지 노로바이러스 GI 및 GII의 capsid 유전자의 염기서열에 따라 31가지 이상의 유전자타입 (genotype)으로 분

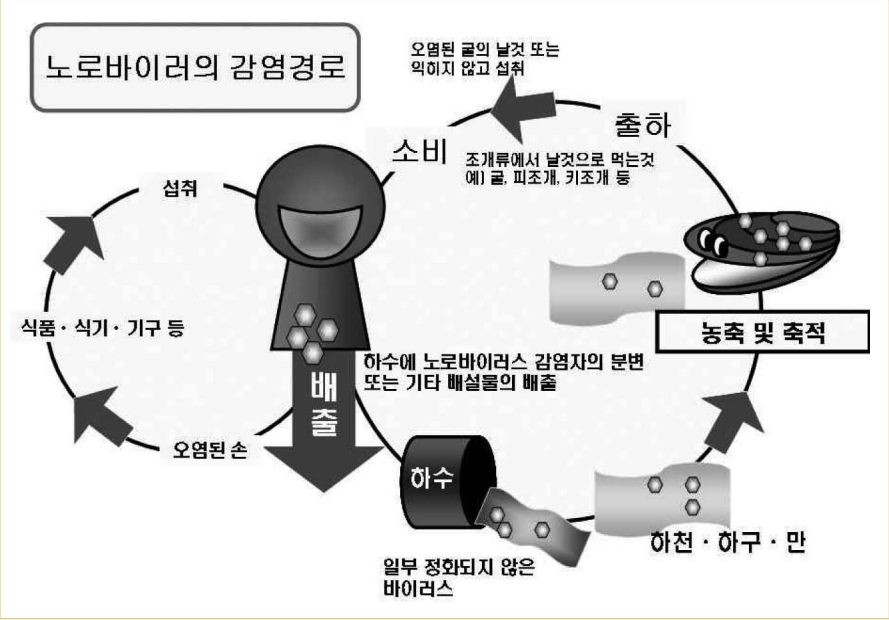

그림 2. 휴먼 노로바이러스의 주요 감염 경로

류되고 있다[14].

휴먼 노로바이러스의 전이 및 발병

휴먼 노로바이러스 등 식중독을 유발하는 바이러스들은 다양한 경로를 통해 사람에게 전이되는 것으로 알려져 있다(그림 2). 특히 주된 전파경로는 식품군과 환경 요인군으로 나뉘며 식품을 통해 전이되는 과정으로는 휴먼 노로바이러스에 오염된 분변이 식품 또는 식수와 교차오염되는 경우, 어패류가 생육하면서 체내에 노로바이러스를 농축하는 경우, 노로바이러스에 오염된 토양에서 유래되는 경우, 노로바이러스 감염환자의 구토물에 직간접적으로 노출되었을 경우, 공기 중에 오염되는 경우 등 매우 다양하다.

또한 식품을 취급하는 작업자에 의한 교차오염도 매우 중요하게 다루어져야 할 부분이다. 휴먼 노로바이러스는 세균에 비해 적은 개체 수에서도 높은 전염성을 보이는데, infective dose는 매우 소량인 약 10 particle 정도만으로도 인체에 침입해 발병시킬 수 있다고 알려져 있다. 질병의 발생은 일반적으로 폐쇄된 생태환경, 즉 노인 및 환자 요양원이나 학교, 병원, 리조트, 크루즈 등 모든 음식과 식수를 공동으로 공급하거나 집단으로 섭취하는 환경에서 빈발하고 있다. Noda 등(2008)의 연구에 따르면 2001~2005년에 발생했던 290건의 노로바이러스 식중독 사고 중 생굴 섭취에 의한 사고는 총 95건, 17명의 환자, 식품을 취급하는 조리자에 의한 사고는 총 195건, 40명의 환자를 발생시켰다(표 1)[17]. 이는 식품 섭취에 의한 노로바이러스 식중독 사고보다 식품 취급자에 의한 2차적 교차오염에 의한 식중독 사고가 더 빈번하다는 것을 입증한다.

다양한 표면 및 조건에서의 노로바이러스 생존율 비교

휴먼 노로바이러스의 전이는 식품접촉표면에 의해 광범위하게 진행되기도 한다. 특히 1차 오염된 후 2차적인 교차오염의 주원인이 된다. 이와 같이 식품을 취급하는 조리장에는 세라믹 타일, 나무, 유리, 고무, 스테인레스 스틸 그리고 플라스틱 재질과 같이 다양한 재질의 표면이 식품과 접촉하면서 휴먼 노로바이러스로 인한 질병을 야기할 수 있는 환경이 조성되고 있다. 심지어 식품 조리환경과 거리가 먼 컴퓨터 마우스, 키보드, 책상 표면 등의 일반 사무실 집기류에서도 노로바이러스가 발견되는 사례가 발생하고 있다[7]. Clay 등

표1. 일본에서 발생한 노로바이러스 식중독 사고 분석 (Noda *et al.*, 2008).

Group	Number of cases	Number of patients		
		Median	25th percentile	75th percentile
Oyster-associated outbreaks	95	17	7	39
Food handler -associated outbreaks	195	40	12	108

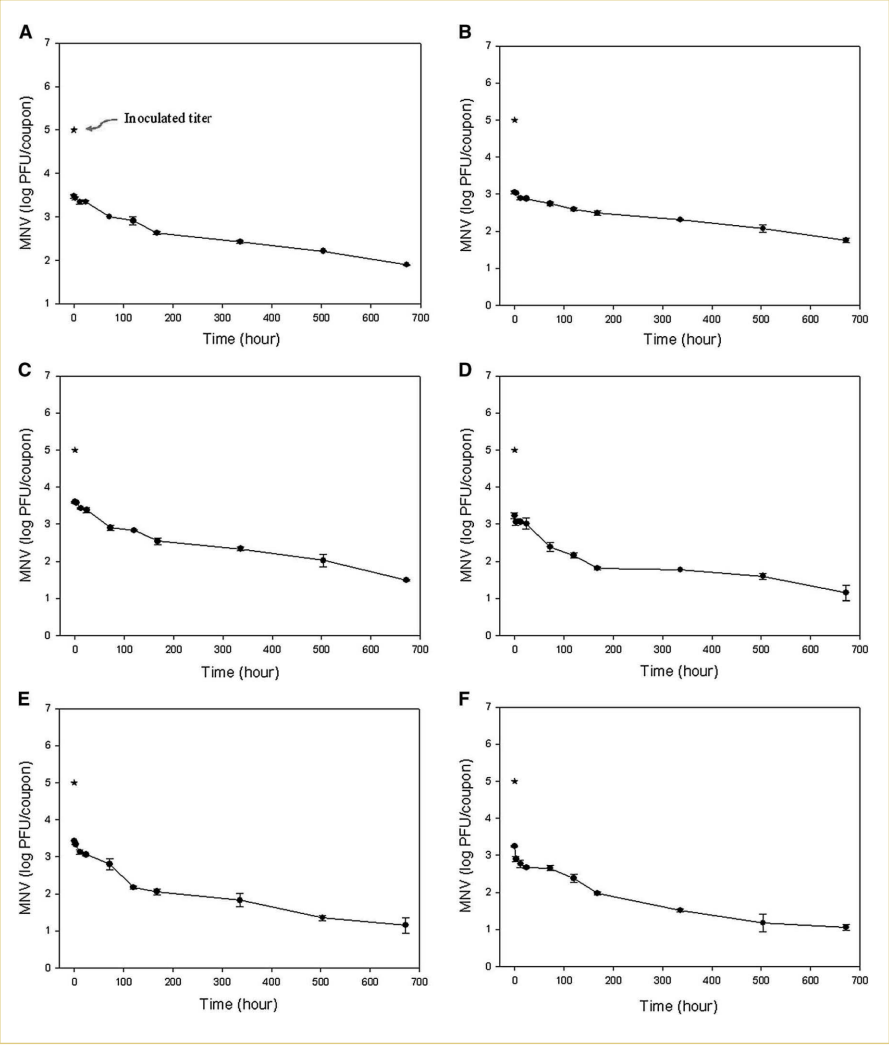

그림 3. 28일 동안 6개 재질별 표면에서 뮤린 노로바이러스 생존율 평가 (Kim, *et al.* 2014).
(A. 세라믹; B. 나무; C. 고무; D. 유리; E. 스테인레스 스틸; F. 플라스틱)

(2006)의 연구에 따르면 FCV는 컴퓨터 마우스, 키보드 자판, 문 손잡이, 전화기 버튼이나 수화기의 표면에서 8~72시간 생존할 수 있다고 한다[7]. D'Souza 등(2006)은 스테인레스 스틸, 열경화성 수지, 세라믹 타일 재질의 표면에 약 4 log_{10} RT-PCR U/surface의 휴먼 노로바이러스 GI type을 접종한 후 생존율을 평가한 결과, 7일까지 휴먼 노로바이러스가 양성반응을 보였다고 보고했다[8]. 또한 Cannon 등(2006)은 FCV와 MNV를 대상으로 4℃ 조건에서 스테인레스 스틸 표면에서의 생존율을 비교, 분석한 결과, 유의적 차이가 없음을 증명했다. 상온의 용액에서는 MNV가 FCV보다 안정적이고 오랜 생존력을 보인다고 보고하였다[5]. 뿐만 아니라, Fallahi & mattison(2011)은 MNV가 상온의 스테인레스 스틸, 양상추, 토양이나 식수에서 42일 동안 생존하였다고 보고하였다. 특히 식수에서의 MNV는 29일 경과 후 1 log만이 감소햇으며, 양상추에서는 4일, 토양에서는 12일 그리고 스테인레스 스틸에서는 15일 경과했을 때 1 log 감소를 나타냈다고 보고하였다[10]. Sattar 등(1986)은 휴먼 노로바이러스가 유리, 스테인레스 스틸이나 플라스틱 표면에서 10일 까지 생존 가능하다고 보고하였고 Doultree 등(1999)은 FCV를 대상으로 생존율을 분석하여 상온의 유리 표면에서 20일 까지 생존할 수 있다는 사실을 밝혔다[18].

휴먼 노로바이러스와 MNV를 다양한 재질별 표면에 접종한 후 동일한 조건에서 생존율을 비교 분석한 연구 결과는 첨부 그림 3, 4에서 확인할 수 있다. 접종 표면 재질은 세라믹 타일, 나무, 유리, 고무, 스테인레스 스틸 그리고 플라스틱으로써 식품 조리장에서 가장 쉽게 접할 수 있는 재질이며, 28일간 상온에서 분석했다. Kim 등(2014)에 의하면 초기 접종균수가 5 log_{10} PFU였으며 28일 경과 후 모든 재질별 표면 샘플에서 MNV가 검출되었다고 밝혔다. 특히 28일 동안 스테인레스 스틸에서의 MNV는 2.28 log10 PFU/coupon의 가장 큰 감소값을 보였으며 나무 재질의 표면에서 가장 낮은 1.29 log_{10} PFU/coupon의

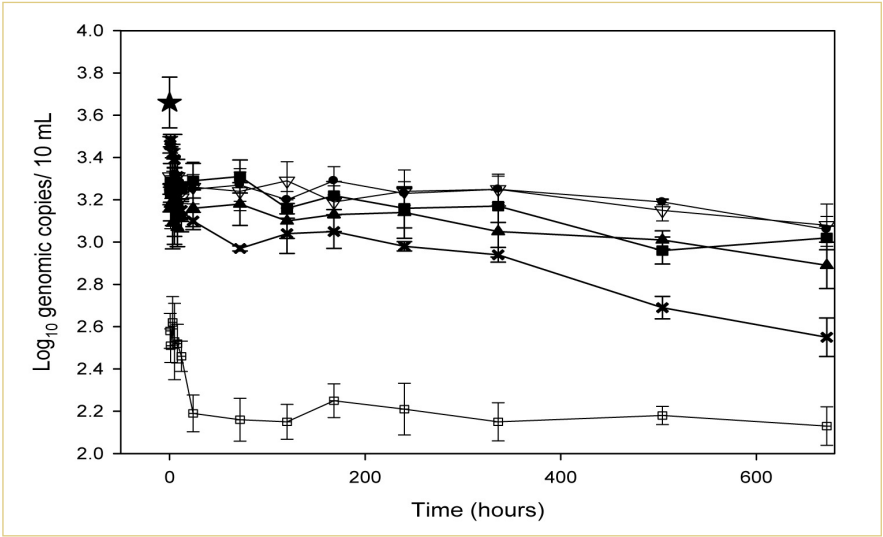

그림 4. 28일 동안 6개 재질별 표면에서 휴먼 노로바이러스 GII.4 type 생존율 평가 (Ha, *et al.*, 2014).
(★: 초기균수, ○: 세라믹, □: 나무, ■: 고무, ▲: 유리, X: 스테인레스 스틸, ▽: 플라스틱)

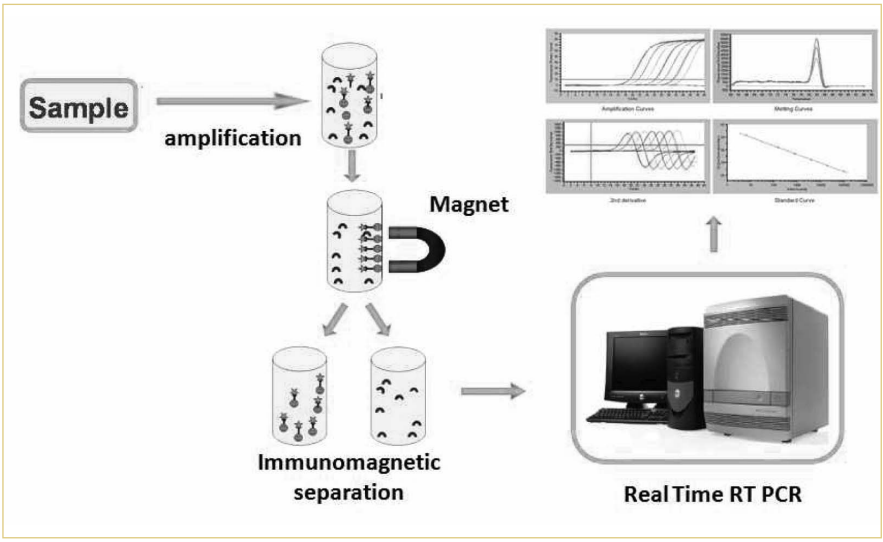

그림 5. 면역자성복합체 기술을 이용한 휴먼 노로바이러스 검출

감소값을 보였다. 뮤린 노로바이러스의 재질별 생존율은 나무, 세라믹, 유리, 고무, 플라스틱 그리고 스테인레스 스틸 순으로 높게 나타났다[2]. 이와 유사하게 Ha 등(2014)은 약 3.66 log10 genomic copies/10㎕의 휴먼 노로바이러스가 28일 동안 6가지 재질별 표면에서 생존하였다고 밝혔고, 특히 28일 경과 후의 휴먼 노로바이러스 감소값을 분석한 결과, 나무 재질을 제외한 5가지 재질의 표면에서 1 log10 genomic copies/10㎕ 미만의 감소값을 보였다고 보고하였다[12]. 이 연구에서는 휴먼 노로바이러스의 생존율을 분석 및 평가하기 위해서 Nano-magnetic beads에 휴먼 노로바이러스의 항체를 코팅시키는 면역자성복합체 기술을 활용하여 연구를 수행하였다(그림 5). 아울러 휴먼 노로바이러스의 세포배양법이 확립되지 못한 기존의 한계점을 극복시키고 보다 폭 넓은 노로바이러스 연구를 수행할 수 있는 기술이라고 평가하였다. 이로써 휴먼 노로바이러스와 대체(surrogate) 노로바이러스(surrogate)인 MNV는 상온의 조건 및 다양한 재질별 표면에서 사멸하지 않고 28일 동안 생존이 가능하다는 사실이 입증되었다[2,12]. 이는 세라믹 타일, 나무, 유리, 고무, 스테인레스 스틸 그리고 플라스틱 등의 재질별 표면에 휴먼 노로바이러스가 1차 오염된 후에 장기간 생존하면서 2차적인 교차오염을 일으켜 휴먼 노로바이러스의 확산을 야기할 수 있다는 증거가 된다. 뿐만 아니라, 휴먼 노로바이러스가 생존 가능한 다양한 재질별 표면을 대상으로 확실한 살균 · 제어 처리의 필요성을 제시하는 연구결과로 해석이 가능하다.

결 론

휴먼 노로바이러스는 현재까지 *in vitro* 배양법이 개발되지 못해 인체를 대상으로 위해성 평가 및 감염요인, 면역반응 등의 분야에 있어서 확실한 연구성과를 얻지 못하고 있다. 따라서 그 동안 휴먼 노로바이러스를 대신한 대체 노로바이러스인 FCV와 MNV를 대상으로 대체 연구가 활발히 진행되어 왔다. 최근에는 휴먼 노로바이러스를 대상으로 면역반응을 이용한 immuno assay나 hybridization assay와 Reverse transcription (RT)-PCR와 같은 nucleic acid 분석 등 다양한 검출방법이 활용되고 있지만 국내에서는 현재 휴먼 노로바이러스에 관한 연구는 초기단계에 있으며, 여전히 FCV와 MNV가 휴먼 노로바이러스를 대신하고 있다. 전 세계적으로 휴먼 노로바이러스를 이용한 연구성과가 두각을 보이는 시점에서, 우리나라도 휴먼 노로바이러스를 직접 이용한 다양한 연구를 실시할 때가 왔다. 특히 휴먼 노로바이러스는 상온에서 유리, 스테인레스 스틸, 고무 및 타일 등의 다양한 재질의 표면에서 장기간 생존이 가능하기 때문에 이를 효과적으로 제어할 수 있는 시스템 마련이 반드시 필요하다.

참고 문헌

1. Adler, J. L., and Zickl, R., 1969. Winter vomiting disease. J. Infect. Dis. 119:668~673

2. Kim, A. N., Park, S. Y., Bae, S. C., Oh, M. H., Ha, S. D., 2014. Survival of Norovirus Surrogate on Various Food-Contact Surfaces. Food Environ. Virol. Epub ahead of print.

3. Anderson, A.D., Garrett, V.D., Sobel, J., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Schwab, K.J., Bresee, J.S., Mead, P.S., Higgins, C., Campana, J. and Glass, R.I.: Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. Am. J. Epidemiol. 154:1013~1019 (2001).

4. Berg, D.E., Kohn, M.A., Farley, T.A., and McFarland, L.M., 2000. Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana. J. Infect. Dis. 181:381~S386.

5. Cannon, J. L., Papafragkou, E., Park, G. W., Osborne, J., Jaykus, L. A., and Vinje, J., 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. Journal of Food Protection, 69:2761~2765.

6. Christine E. W., Larissa B. T., and Virgin I. V. H. W., 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. J. Virol. 80:5104-5112.

7. Clay, S., Maherchandani, S., Malik, Y. S., and Goyal, S. M. (2006). Survival onuncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. American J. Infect. Con. 34:41~43.

8. D'souza, D. H., Sair, A., Williams, K., Papafragkou, E., Jean, J., Moore, C. (2006). Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. International J. Food Microbiol., 108:84~91.

9. Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., de Groot, A., Twisk, F., and Koopmans, M. 2004. Inactivation of caliciviruses. Appl. Environ. Microbiol. 70:4538~4543.

10. Fallahi, S., andMattison, K. 2011. Evaluation of Murine Norovirus Persistence in Environments Relevant to Food Production and Processing. J. Food Protect. 74:1847~1851.

11. Greenberg, H. B., Valdesuso, J. R., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., McAuliffe, V. J., Kapikian, A. Z. and Chanock, R. M. 1981. Proteins of Norwalk virus. J. Virol. 37:994~999.

12. Ha, J. H.,Kim, M. L., Choi, C., Choi, I. S., Myoung, J., and Ha, S. D., 2014. Recovery of structurally intact Norovirus from food-contact surfaces. Food Environ. Virol. Epub ahead of print.

13. Jiang, X., Graham, D. Y., Wang, K. N. and Estes, M. K. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. Science 250:1580~1583.

14. Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S. Hoshino, F. B., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N., and K. Katayama, 2004, Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. J. Clin. Microbiol. 42:2988~95.

15. Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin,R. Thornhill, T. S., Kalica,A. R. and Chanock, R. M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastorenteritis. J. Virol. 10:1075~1081.

16. Kim, C. S., Yuk, D. Y., Kim, M. R., Lee, E. M., Eom, J. H., Byun, J. A., Kim, B. J., Jung, W. Y., Park, Y. G., Jung, R. S., Na, M. A., Yun, M. H., Ju, I. S., Son, S. H., Gang, J. Y. and Heo, O. S., 2010. Investigation of norovirus occurrence and influence of environmental factors in food service institutions of chungcheong area. J. Food Hyg. Safety. 25:153~161.

17. Noda, M., Fukuda, S., and Nishio, O. 2008. Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. Int. J. Food Microbiol. 122:216~220.

18. Sattar, S. A,, Lloyd-Evans, N., Springthorpe, V. S., & Nair, R.C. (1986). Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. The Journal of Hygiene (Lond), 96(2), 277~289.

19. Vinje, J., Green, J., Lewis, D. C., Gallimore, C. I., Brown, D. W., and M. P. Koopmans., 2000. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of “orwalk-like viruses”. Arch. Virol. 145:223~41.

20. 식품의약품안전청. 식중독 발생현황통계. Available from: http://e-stat.kfda.go.kr/ Accessed Nov. 10, (2010).