

## 잉어 두신 백혈구에서 생성된 Interferon-like cytokine (ILC)의 항바이러스 활성

조미영 · 김은전\* · 임상구\*\* · 김진우 · 박수일\*\*

국립수산과학원 병리연구과, \*부경대학교 수산생명의학과, \*\*국립수산과학원 내수면양식연구소

### Antiviral Activity of Interferon-like Cytokine (ILC) Produced by Head Kidney Leucocytes of Common Carp, *Cyprinus carpio* L.

Mi-Young Cho, Eun-Jeon Kim\*, Sang-Gu Lim\*\*, Jin-Woo Kim and Soo-Il Park\*\*†

Pathology Division, NFRDI, 619-900, Korea

\*Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, 608-737, Korea

\*\*Inland Aquaculture Research Institute, NFRDI, 645-806, Korea

Interferons are kinds of cytokines that play an important role in antiviral defense mechanisms during viral infection by converting cells to synthesize proteins that inhibit viral replication. In the present study, an antiviral response against Spring viremia of carp virus (SVCV) was developed in common carp, *Cyprinus carpio* following stimulation with the potent interferon inducer, poly inosinic : cytidylic acid (poly I:C). Poly I:C injected fish showed lower cumulative mortalities against SVCV than untreated fish did. Moreover, *in vitro* study showed that head kidney leucocytes (HKLs) produced an interferon-like cytokine (ILC) after stimulation with poly I:C. According cytopathic effect reduction (CPER) assay to examine antiviral activity of crude ILC, the capacity of HKLs for ILC production was highest at  $1 \times 10^6$  cells/ml and significantly enhanced when treated with 20~50  $\mu$ g/ml of poly I:C. The optimal temperature and concentration of FBS to induce the highest ILC production were 20°C and 5%, respectively.

**Key words** : Interferon (IFN), Antiviral activity, Carp, SVC

잉어봄바이러스병 (Spring viremia of carp)은 *Rhabdovirus carpio*의 감염으로 인한 잉어류의 급성전염성 질병으로서 Fijan *et al.* (1971) 에 의해 처음으로 보고된 이후 영국, 오스트리아, 프랑스, 독일, 북미 등 광범위한 지역에서 보고되고 있다.

SVCV (Spring viremia of carp virus)는 특히 겨울철 수온이 낮은 유럽국가에서 심각한 피해를 야기시키고 있는데, 최근 우리 나라에서도 낚시터 방류용으로 수입된 어류에서 SVCV가 수차례 검출되어 전량 폐기된 사례가 있어 이러한

외래 악성 전염병에 대한 예방대책 수립이 시급한 실정이다.

인터페론은 바이러스의 감염 초기에 생성되어 바이러스의 증식을 억제하는 사이토카인의 일종으로서 바이러스에 대한 숙주 세포의 비특이적 방어기작에서 중요한 역할을 담당 한다 (Eaton, 1990). 어류에서 인터페론의 생성은 바이러스, synthetic dsRNA polymer 및 다양한 lectin 등에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다 (de Kinkelin and Dorson, 1973; Graham and Secombes, 1990). 특히, 무지개송어 등의 연어과 어

†Corresponding Author : Soo-Il Park, Tel : 051-620-6141,  
Fax : 051-628-7430, E-mail : parksi@mail.pknu.ac.kr

류에서 interferon-like cytokine (ILC)의 활성화에 대한 다양한 결과들이 보고되었으며 (Congleton and Sun, 1996; Nygaard *et al.*, 2000; Jensen and Robertsen, 2002), 잉어류에서도 SVCV를 인위감염한 후 혈청에서 나타난 anti-viral activity에 대하여 보고된 것이 있으나 (Baudouy, 1978; de Kinkelin *et al.*, 1982), 두신백혈구에서 생성된 interferon의 활성화에 대해서 보고된 것은 없다.

따라서 본 연구에서는 인터페론 유도물질을 투여하여 *in vivo*에서 잉어의 항바이러스 활성을 조사하고, 두신 백혈구를 분리하여 interferon-like cytokine (ILC)의 항바이러스 활성을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험어

시험어로 국립수산과학원 내수면양식연구소에서 사육한 바이러스에 감염된 병력이 없는 건강한 잉어를 사용하였다. 먼저 잉어의 항바이러스 활성을 조사하기 위해 SVCV에 대한 감수성이 높은 1년생 잉어 (18~20.2g)를 공격시험에 사용하였으며, 두신 세포에서의 (*in vitro*) 인터페론 분리를 위해 2년생 잉어 (400~500g)를 사용하였다. 시험어는 4 ton 용량의 FRP 수조에서 유수식으로 사육하였으며, 수온은 18~20°C로 유지하고, 1일 2회 시판용 사료를 먹였다.

### 인터페론 유도물질 (IFN inducer) 및 바이러스 준비

인터페론 유도물질로서 synthetic dsRNA polymer인 poly inosinic : cytidylic acid (poly I:C ; Sigma)를 사용하였다. Poly I:C는 HBSS (Sigma)에 500 $\mu$ g/ml 농도로 조정하여 -20°C에 보관하면서 시험에 사용하였다. 분리한 ILC의 항바이러스 활성을 조사하기 위해 국립수산과학원 병리연구팀에서 SVCV (VR-1390)를 분양 받아 사용하였다. 바이러스는 EPC (epithelioma papulosum cyprini) 세포에서 역가를 측정하여 1 $\times$ 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml 농도로 조정한 다음 -85°C에 보관하

면서 사용하였다.

### 어체내 (*in vivo*) 항바이러스 활성 유도

잉어에서 인터페론에 의한 항바이러스 활성을 조사하기 위해 poly I:C를 농도별로 희석하여 잉어에 주사한 후 4일째 SVCV를 1 $\times$ 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/fish 농도로 인위 감염시킨 다음 3주 동안 누적폐사율을 조사하였다. 각 시험구별로 20마리씩 수용하였으며, SVCV의 병원성 발현을 위해 인위 감염 후 사육 수온을 17°C에서 1일 간격으로 0.5°C씩 떨어뜨려 최종적으로 15°C로 유지하였다.

### 두신백혈구 (head kidney leucocytes; HKLs) 분리

시험어를 아미노산식향산으로 마취시킨 후 주사기를 이용하여 미부정맥에서 가능한 한 순환혈액을 모두 제거한 후에 해부하여 두신을 무균적으로 적출하였다. 적출한 두신을 nylon mesh에 넣은 다음 2% FBS가 첨가된 L-15 medium이 들어 있는 petridish에서 핀셋으로 teasing하여 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 34/51% percoll 용액이 들어있는 실리콘 처리 시험관에 조심스럽게 중층시킨 후 400g, 25분간 원심 분리하여 백혈구 층을 분리하였다. 분리된 백혈구를 L-15 medium으로 3회 세척하고 0.3% trypan blue로 viability를 관찰한 후 혈청이 첨가되지 않은 L-15 medium에 1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml 농도로 조정하였으며, 이렇게 준비된 두신 백혈구 현탁액을 각 실험에 사용하였다.

### Interferon-like cytokine (ILC) 분리를 위한 최적조건

ILC는 Secombes (1994)법을 변형하여 분리하였다. 잉어 두신세포에서 ILC분리를 위한 최적조건을 확립하기 위해 poly I:C 농도, HKLs의 세포 수 및 종류, FBS 첨가 농도, 배양온도를 달리 하여 ILC를 유도하였다. 즉, HKLs을 culture flask (Corning)에 분주하여 20°C, 4시간 배양한 후 poly I:C를 0~20 $\mu$ g/ml 농도로 첨가하고 15~20

℃, 3시간 배양한 뒤 FBS를 최종농도 2~10%가 되도록 첨가하였다. 혈청이 첨가된 HKLs를 20℃, 48시간 배양하여 배양 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액은 600×g, 10분간 원심 분리하여 세포 잔유물을 제거한 후 cryogenic vial (Corning)에 1ml씩 분주하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

**1. Poly I:C 농도에 따른 crude ILC 활성 차이 조사**

HKLs 배양 시에 poly I:C를 다양한 농도로 첨가하여 crude ILC를 유도한 후 SVCV에 대한 항바이러스 활성 차이를 조사하였다. 즉, 배양한 HKLs에 poly I:C를 0, 10, 20, 50, 100µg/ml 농도로 첨가하고 20℃, 48시간 배양한 후 crude ILC를 수확하였다.

**2. HKLs의 세포 수에 따른 crude ILC의 활성 차이 조사**

HKLs의 세포 수에 따른 ILC의 활성 차이를 조사하기 위해 분리된 HKLs를 각각 1×10<sup>6</sup>cells/ml, 1×10<sup>5</sup>cells/ml 및 1×10<sup>7</sup>cells/ml 농도로 조정하여 culture flask에 배양한 다음, poly I:C 20µg/ml을 첨가하여 crude ILC를 수확하였다.

**3. HKLs의 세포 종류에 따른 ILC 활성 차이 조사**

세포 종류에 따른 ILC의 활성 차이를 조사하기 위해 HKLs를 1×10<sup>6</sup>cells/ml로 조정하여 20℃, 4시간 배양하였다. 비부착세포는 따로 모아 세포 수를 동일하게 조정한 다음, 부착세포 및 분리하지 않은 대조구 (total cells)와 동일한 방법으로 crude ILC를 수확하여 항바이러스 활성을 비교하였다.

**4. FBS의 농도에 따른 활성 차이 조사**

FBS의 농도에 따른 ILC의 활성 차이를 조사하기 위해 poly I:C를 처리한 다음 3시간 후에 최종 농도가 2, 5, 10% 되도록 FBS를 첨가하고 crude ILC를 수확하였다.

**5. Poly I:C 처리 후 배양 온도에 따른 활성 차이 조사**

배양 온도에 따른 ILC 활성의 차이를 조사하

기 위해 poly I:C를 처리한 후 HKLs를 15℃ 및 20℃에서 48시간 배양하여 crude ILC를 수확하였다.

**ILC 활성 분석**

인터페론 활성은 Renault *et al.* (1991)법과 Congleton and Sun (1996)법을 변형하여 cytopathic effect reduction (CPER) assay를 실시하였다. 즉, EPC세포를 1×10<sup>6</sup>cells/ml로 조정하여 flat bottomed 96 well-tissue culture plate (Corning)에 100µl씩 분주한 뒤 5~6시간 배양하였다. ILC samples은 round bottomed 96 well-tissue culture plate에서 2% FBS 첨가 MEM (MEM2)를 사용하여 2배씩 단계 희석하여 준비하였다. EPC 세포가 80% 이상 부착되면 배양액을 완전히 제거하고 희석해 둔 ILC samples을 100µl씩 분주하여 20℃, 24시간 배양하였다. 96-well plate의 6줄에는 단계 희석한 ILC samples을 처리하였으며, 나머지 두 줄은 각각 바이러스에 대한 positive control과 negative control로 사용하였다. ILC samples로 자극시킨 EPC 세포에서 crude ILC를 제거하고 SVCV를 0.005 moi 농도로 감염시킨 후 20℃, 1시간 배양하였다. 단, negative control에는 MEM2를 첨가하였다. 바이러스가 흡수된 다음 각 well 당 MEM2를 100µl씩 첨가하여 20℃, 3~4일 배양하였다. Positive control에서 CPE가 80%이상 나타났을 때 배양액을 제거하고 HBSS로 세척한 후 1% crystal violet (in 50% ethanol)을 각 well 당 100µl씩 분주하여 20분간 방치하였다. Wells에서 염색액을 제거한 후 수돗물로 3회 세척하여 여분의 염색액을 모두 제거하고 공기 중에 건조하였다. 각 wells 당 70% ethanol을 100µl씩 분주하여 세포에 염색되어 있는 crystal violet을 용출시켜 ELISA reader를 이용하여 595nm에서 OD값을 측정하였다. 인터페론 활성 (IFN units)은 대조구와 비교하여 50% 이상 CPE가 억제된 값의 역수로 표시하였다.

**통계처리**

대조구와 각 시험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's t-test 및 paired t-test를 실시하였으며,  $p < 0.05$  에서 통계적 유의성을 판단하였다.

## 결 과

### SVCV에 대한 잉어의 항바이러스 활성 (*in vivo*)

잉어의 복강에 인터페론 유도물질인 poly I:C를 농도별로 투여한 후 SVCV로 인위감염한 결과 표 1에 나타난 바와 같이 50 $\mu\text{g}/\text{fish}$  이상의 농도에서 대조구에 비해 60% 이상의 상대생존율을 나타내었다.

### SVCV에 대한 잉어 ILC의 항바이러스 활성 (*in vitro*)

#### 1. Poly I:C 농도에 따른 crude ILC의 활성 차이

잉어의 두신 세포를 분리하여 배양한 뒤 인터페론 유도물질인 poly I:C를 0, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리하여 crude ILC를 수확하였다. Poly I:C 농도별로 수확된 ILC의 항바이러스 활성을 CPER 법으로 조사한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 각각 0, 80 $\pm$ 46, 533.3 $\pm$ 106, 853.3 $\pm$ 213, 213.3 $\pm$ 56로 나타나 poly I:C 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 가장 효과적인 것으로 나타났으며, 농도별로는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  사이에 유의적인 차이가 없어 이후 실험에서는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 사용하였다 ( $p < 0.05$ ).

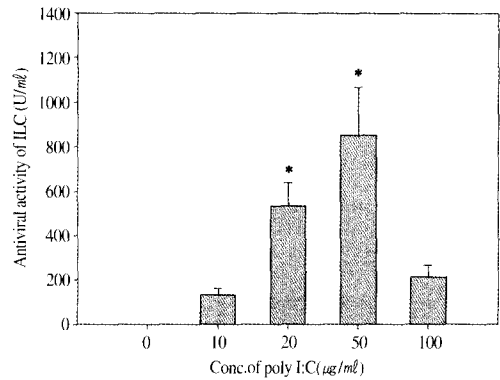


Fig. 1. Anti-SVCV activities of crude ILC produced by head kidney leucocytes (HKLs) of carp ( $n=4$ ) stimulated with different concentrations of poly I:C. Results are shown as means ( $\pm$  SE) of triplicate reading. \*  $P < 0.05$  compared with the control (absent of poly I:C).

#### 2. 두신 백혈구 수에 따른 crude ILC의 활성 차이

두신에서 분리한 백혈구 수를  $1 \times 10^6$  cells/ml,  $1 \times 10^6$  cells/ml,  $1 \times 10^7$  cells/ml로 조정하여 다음 poly I:C를 처리하여 crude ILC를 수확하였다. 각 세포 수에 따른 crude ILC의 항바이러스 활성을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 각각 160 $\pm$ 58, 853.3 $\pm$ 213, 640 $\pm$ 226 U/ml로 나타났다.  $1 \times 10^6$  cells/ml 이상의 세포 수에서는 시험구 사이에 유의적인 차이가 없어 이후 실험에서는  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도를 사용하였다 ( $p < 0.05$ ).

#### 3. 두신 백혈구의 종류에 따른 crude ILC의 활성 차이

**Table 1.** Cumulative mortality (%) against SVCV of carp injected with different concentrations of poly I:C

	Poly I:C ( $\mu\text{g}/\text{fish}$ )				
	200	100	50	10	0
Cumulative mortality rate (%)	25	30	25	45	80
Relative survival rate* (%)	68.7	62.5	68.7	43.7	-

\* Relative survival rate (%) = [1 - (% mortality of poly I:C injected group) / (% mortality of control)]  $\times$  100.

잉어 두신 세포를 부착세포와 비부착세포로 분리하여 poly I:C로 자극한 결과, 부착세포 및 비부착세포가 각각  $533 \pm 106$ ,  $320 \pm 160 \text{ U/ml}$ 로 나타난 반면 total cells에서  $853.3 \pm 213 \text{ U/ml}$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 3).

**4. 혈청 농도에 따른 crude ILC의 활성 차이**

Poly I:C를 처리한 후 배지에 첨가하는 FBS의 농도를 2, 5, 10%로 달리하여 얻어진 ILC의 항바이러스 활성을 조사한 결과, 각각  $66 \pm 13$ ,

$1,066.6 \pm 213$ ,  $746.6 \pm 282 \text{ U/ml}$ 로 나타나 혈청의 첨가 농도는 5%가 가장 적합한 것으로 나타났다 (Fig. 4).

**5. 배양 온도에 따른 crude ILC 활성 차이**

잉어 두신 세포에 poly I:C를 처리한 후 15°C 및 20°C에서 배양한 후 crude ILC를 수확하여 항바이러스 활성을 조사한 결과 (Fig. 5), 각각  $66.6 \pm 48$  및  $800 \pm 160 \text{ U/ml}$ 로 나타나 20°C에서 더 높은 활성이 유도되는 것을 알 수 있었다.

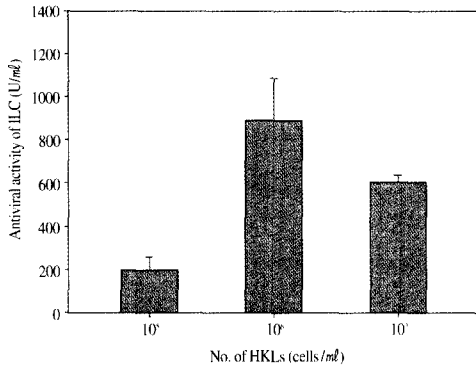


Fig. 2. Anti-SVCV activities of crude ILC produced by different numbers of HKLs of carp (n=4) stimulated with  $20 \mu\text{g/ml}$  of poly I:C. Results are shown as means ( $\pm$  SE) of triplicates.

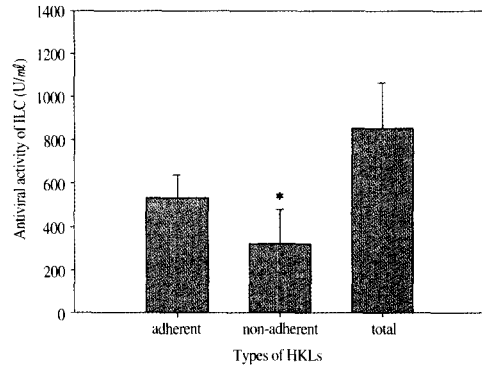


Fig. 3. Anti-SVCV activities of crude ILC produced by different cell types of HKLs of carp (n=3) stimulated with poly I:C. Results are shown as means ( $\pm$  SE) of triplicates. \* P < 0.05 compared with the control (total cell).

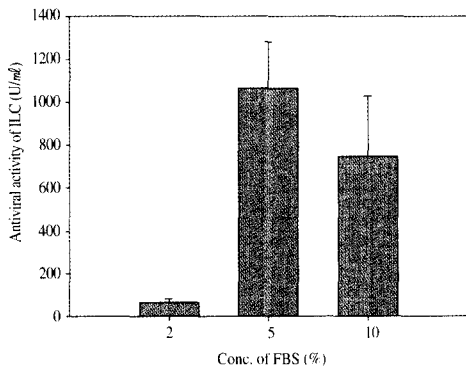


Fig. 4. Effect of the concentration of FBS on the production of ILC induced by HKLs of carp (n=3). HKLs were pre-cultured in FBS-free MEM containing  $20 \mu\text{g/ml}$  poly I:C for 3hrs at 20°C then 2, 5 or 10% FBS added in culture plates. Results are shown as means ( $\pm$  SE) of triplicates.

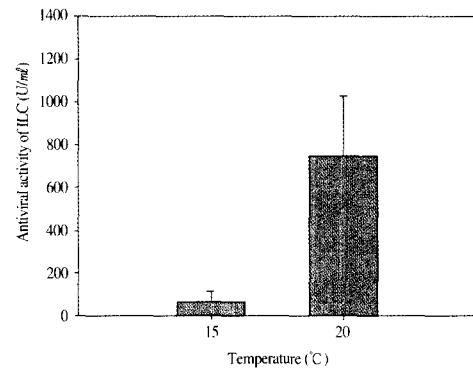


Fig. 5. Effect of incubation temperatures on the production of crude ILC induced by HKLs of carp (n=3). HKLs were incubated with  $20 \mu\text{g/ml}$  of poly I:C and 5% FBS. Results are shown as means ( $\pm$  SE) of triplicates.

## 고 찰

바이러스에 대한 생체의 첫 번째 방어선에는 다양한 신호전달체계가 관여하며, 이들은 궁극적으로 면역조절에 관여하는 유전자와 단백질을 활성화시켜 세포 내 환경을 바이러스의 증식에 적합하지 못한 상태로 전환시키게 된다. 인터페론은 바이러스의 감염 초기에 생성되어 세포로 하여금 바이러스의 증식을 억제하는 단백질을 합성하게 하는 사이토카인으로서 인터페론에 의해 유도된 항바이러스 활성은 한 종류의 바이러스에 특이적인 것이 아니라 일단 활성화된 시스템은 다른 종류의 바이러스에 대해서도 방어력을 나타내는 것으로 알려져 있어 (Eaton, 1990), 다양한 바이러스질병에 대한 치료제 및 예방대책으로서 개발되고 있다.

인터페론은 바이러스, 세균 및 기생충의 대사 산물에 의해 생성되며, polyanionic pyran copolymer 및 double-stranded RNA 등에 의해 생성이 자극된다. 무지개송어 등의 연어과 어류에서는 바이러스, Con A, phorbol myristate acetate (PMA), CpG oligodeoxynucleotides 및 poly I:C 등이 인터페론 또는 인터페론과 유사한 사이토카인의 생성을 자극하는 것으로 보고되고 있다 (Graham and Secombes, 1990; Jorgensen *et al.*, 2001). 이중에서도 특히, synthetic dsRNA인 poly I:C는 포유동물의 강력한 인터페론 유도물질로 알려져 있다 (Giron *et al.*, 1981; Lampson *et al.*, 1981). 어류에서도 MacDonald and Kennedy (1979)가 steelhead 또는 rainbow trout의 주화세포와 sockeye salmon 및 kokanee salmon이 인터페론을 생성하며, poly I:C를 처리한 결과 interferon-like cytokine이 생성되었다고 보고하였다. 또한 다양한 연어과 어류에 poly I:C를 복강주사한 결과 주사 후 3일에서 7일 사이에 조직에서의 항바이러스 활성이 최고로 증가하였으며, IHNV로 인위감염한 결과 대조구에 비해 누적 폐사율이 유의적으로 감소하였으며, 바이러스의 증식도 억제되었다고 보고하였다 (Eaton, 1990).

Congleton and Sun (1996)도 두신 백혈구를 분리하여 poly I:C로 자극한 결과 6.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 항바이러스 활성이 증가하였다고 보고하였다.

잉어류에서 인터페론과 관련된 항바이러스 활성에 대한 첫 번째 보고는 1978년 A. M. Baudouy에 의한 것으로 잉어에 SVCV를 복강 주사한 결과 혈청내에서 circulating interferon과 neutralizing antibody가 생성되었다. 또한, de Kinkelin *et al.* (1982)은 잉어에 SVCV를 인위감염한 결과 24시간 후 혈청에서 circulating IFN의 존재가 확인되었으며 4일 이후부터 감소하였다고 보고하였다. 그러나 이러한 결과들은 바이러스 감염 후 혈청 내 antiviral activity를 분석한 것으로서, 잉어 두신 세포를 분리하여 인터페론의 생성을 유도하고 항바이러스 활성을 정량화한 보고는 없었다.

본 연구에서는 잉어류에 poly I:C를 복강 주사하여 항바이러스 활성이 유도되는 것을 확인하고, 잉어에서 분리한 HKLs에서 항바이러스 활성을 가지는 interferon-like cytokine (ILC)를 분리하였다. 분리한 HKLs에 poly I:C를 농도별로 처리하여 crude ILC를 유도한 결과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 농도에서는 농도 증가에 따라 항바이러스 활성이 증가하였으나 고농도인 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 항바이러스 활성이 오히려 감소되었다.

포유동물에서는 인터페론이 다양한 세포로부터 생성되는 것으로 알려져 있으나, 어류에서 세포의 종류에 따른 인터페론의 특성에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 잉어 두신백혈구에서 부착세포 및 비부착세포를 분리하여 각 세포군의 ILC 유도능력을 조사하였다. 그 결과 두신 백혈구를 부착시킨 후 4시간 경과 시  $6 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$  cells/ml 정도의 세포가 부착되었으며, 이들 부착세포는 대부분이 대식세포 및 림프구로 구성되어 있었다. 부착세포를 분리하지 않은 total cells의 항바이러스 활성이 가장 높게 나타났으며, 두신백혈구에서 부착세포를 제거한 결과 ILC 활성이 유의적으로 감

소하였다. 이러한 결과는 Congleton and Sun (1996)의 보고와도 다소 일치하는 것으로 무지개송어의 백혈구에서 부착세포를 제거한 경우 IFN이 생성되지 않았으며, 부착세포 중 대식세포가 IFN의 생성에 중요한 역할을 담당한다고 하였다. 본 연구에서 비부착세포군에서도 IFN 활성이 나타난 것으로 보아 부착능력이 뛰어난 대식세포 외의 다른 세포군들도 ILC의 유도에 영향을 미치는 것으로 추정된다.

본 연구에서는 또한, 잉어에서 분리한 HKLs의 ILC 유도 능력이 첨가한 FBS의 농도에 따라 달라지는 것으로 나타났다. 본 연구의 예비 실험에서 ILC 유도에 대한 혈청의 영향을 조사하기 위해 poly I:C와 혈청을 동시에 첨가한 경우  $186.6 \pm 70U/ml$ 로 오히려 항바이러스 활성이 감소하는 것으로 나타났으며, poly I:C 처리 후 3시간째 혈청을 농도별로 첨가한 경우 저농도 보다 고농도에서 높은 활성이 유도되었다. 그러나 5%에 비해 10%의 혈청을 첨가한 경우 유의적인 차이는 없었으나 ( $P > 0.05$ ), 활성이 다소 감소하는 것으로 나타났다. 따라서, 혈청의 첨가가 ILC의 생성보다는 세포의 생존에 필요한 요소인 것으로 사료된다. 또한 잉어에서 분리한 HKLs은  $15^{\circ}C$ 에 비해  $20^{\circ}C$ 에서 ILC의 유도능력이 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 수온이 높은 경우 잉어가 SVCV를 보균하고 있을 경우에도 폐사가 나타나지 않을 수 있음을 의미하는 것으로 사료된다.

앞으로 본 연구에서 사용한 poly I:C 이외에 인터페론 생성을 증가시킬 수 있는 다양한 물질에 대한 screening과 항바이러스 활성에 대한 연구가 필요하며, 이러한 연구결과는 양식어류의 바이러스질병에 대한 치료 및 예방대책을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

인터페론은 바이러스에 감염된 세포에서 생성되어 다른 세포로 하여금 바이러스의 증식을 억

제하는 단백질을 합성하게 하는 사이토카인의 일종으로서 바이러스에 대한 방어작용에서 중요한 역할을 담당한다. 본 연구 결과 강력한 인터페론 유도물질로 알려져 있는 poly inosinic : cytidylic acid (poly I:C)를 잉어에 주사한 결과 SVCV에 대한 항바이러스 활성을 확인할 수 있었다. 즉, Poly I:C 주사구에서 대조구에 비해 누적폐사율이 감소하였으며, 또한 두신백혈구를 분리하여, poly I:C를 처리한 결과 interferon-like cytokine (ILC)이 생성되었다. Crude ILC의 항바이러스 활성을 cytopathic effect reduction (CPER) assay로 조사한 결과, 적정 HKLs 농도는  $1 \times 10^6$  cells/ml로 나타났으며,  $20 \sim 50 \mu g/ml$  농도의 poly I:C를 처리했을 때 유의적으로 증가하였다. ILC 생성을 위한 적정온도 및 FBS의 농도는 각각  $20^{\circ}C$ 와 5%로 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Baudouy A. M. : Host-virus relationship during experimental spring viremia in carp. C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D., 286 : 1225-1228, 1978.
- Congleton, J. and Sun, B. : Interferon-like activity produced by anterior kidney leucocytes of rainbow trout stimulated *in vitro* by infectious hematopoietic necrosis virus or Poly I:C. Dis. Aquat. Org., 25 : 185-195, 1996.
- de Kinkelin P. and Dorson, M. : Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with egtved virus. J. Gen. Virol., 19 : 125-127, 1973.
- de Kinkelin, Dorson, M. and Hattenberger-Baudouy, A. M. : Interferon synthesis in trout and carp after viral infection. Dev. Comp. Immunol., Suppl., 2 : 167-174, 1982.
- Eaton W. D. : Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic : cytidylic acid. Dis. Aquat. Org., 9 :

- 193-198, 1990.
- Fijan, N., Petrinc, Z., Sulimanovic, D. and Zwillenberg, L. O. : Isolation of viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. *Vet. Arh.*, 41 : 125-138, 1971.
- Giron, D. J., Smith, K. C., Hoffman, J. A. and Fowler, A. K. : Enhancement of viral RNA-induced interferon production in L cells treated with insulin and Amphotericin B methyl ester. *J. Interferon Res.*, 1(4) : 581-586, 1981.
- Graham, S. and Secombes, C. J. : Do fish lymphocytes secrete interferon- $\gamma$  ? *J. Fish Biol.*, 36 : 563-573, 1990.
- Lampson, G. P., Field, A. K., Tytell, A. A. and Hilleman, M. R. : Poly I:C/Poly-L-Lysin : potent inducer of interferons in primates. *J. Interferon Res.*, 1(4) : 539-549, 1981.
- Jensen, I and Robertsen, B. : Effects of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 13 : 221-241, 2002.
- Jorgensen, J., Johansen, B. A., Stenersen, B. and Sommer, A. I. : CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatant with antiviral activity. *Dev. Comp. Immunol.*, 25 : 313-321, 2001.
- MacDonald, R. D. and Kennedy, J. C. : Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects chinook salmon embryo cells independent of interferon. *Virology*, 95 : 260-264, 1979.
- Nygaard, R., Husgrad, S., Sommer, A. I., Leong, J. A. C. and Robertsen, B. : Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish Shellfish Immunol.*, 10 : 435-450, 2000.
- Renault, T., Torchy, C. and de kinkelin, P. : Spectrophotometric method for titration of trout interferon, and its application to rainbow trout fry experimentally infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, 10 : 23-29, 1991.
- Secombes, C. J. : Interferon assessment. In *Technique in fish immunology*, pp. 71-77. Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Rowley, A. F. Zelikoff, J. T., Kaattari, S. L. and Smith, S. A. eds., Fair Haven, NJ : SOS Publications, 1994.

---

Manuscript Received : February 04, 2004

Revision Accepted : April 24, 2004

Responsible Editorial Member : Myung-Joo Oh  
(Yosu Univ.)