

돼지의 백혈구 인터페론 생산에 관한 비교연구

한수남 · 이장락 · 이창업
서울대학교 수의과대학
(1987. 7. 30 接受)

Comparative Study on the Production of Interferons from Porcine Blood Leukocytes

Su-nam Han, Jang-nag Lee and Chang-eop Lee
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received July 30th, 1987)

Abstract: Attempts were to produce porcine leukocyte interferon(PorLeIF) and porcine immune interferon(PorIIF) in the culture of porcine leukocytes. The interferons produced were tested for antiviral activity against vesicular stomatitis virus on porcine-derived PK(15) cells, human-derived FL cells, and Korean native black goat-derived BGK cells.

The results were summarized as follows:

1. In the isolation of porcine leukocytes, the mean isolation rate by the buffy coat separation method(28.7%) was higher than that by the hydroxyethyl starch-RBC sedimentation method (9.2%).
2. When NDV(BI)-induced PorLeIFs were assayed on PK(15) cells and FL cells, the mean titers were 129 IU/ml and 72 IU/ml respectively, being 55.8% of the activity in homologous species system expressed in heterologous system.
3. The activities of PHA-P-induced PorIIFs were 197 IU/ml on PK(15) cells and no activity on human FL cells. The mean antiviral activity of PorIIF was 1.5 times that of PorLeIF in PK(15) cells.
4. The cytopathic effect of vesicular stomatitis virus was observed in BGK cells derived from Korean native black goat kidney permitting interferon assay on the cells. While the cross-species antiviral activity of reference human α , β -interferon was observed on the cells, PorLeIF and PorIIF did not show any activity.

緒 論

인터페론(Interferon, IFN)에 관한 연구는 항바이러스 물질로서 인터페론이 보고된 이후(Cantell, 1978) 이 물질을 이용한 사람과 동물의 바이러스 질병치료에 대한 연구가 활발히 진행되었으나 인터페론의 이종특

이성과 대량생산의 문제점으로 각종 질환치료 연구에 어려움이 많았다(Isaac와 Lindenmann, 1957).

현재까지 발견된 인터페론은 다음의 세 가지로 분류되는데 산에 안정한 IFN- α (leukocyte interferon)와 IFN- β (fibroblast interferon) 및 산에 불안정한 IFN- γ (immune interferon)가 있다. 이것은 각 인터페론의

항원성에 기초하여 분류된 것으로서 주로 사람과 새양귀의 인터페론에 대하여 적용되고 있다(Stewart II 등, 1980). 그러나 인터페론을 생산하는 세포의 종류와 산이나 열에 대한 안정도 차이 이외에도 유발인자의 차이에 따라 IFN- α 와 IFN- β 를 type I IFN, 그리고 IFN- γ 를 type II IFN이라고 명명하기도 한다(Pestka와 Baron, 1981).

세포로부터 인터페론의 유발은 바이러스와 bacteria, foreign cells, macromolecules 등 외부자극 물질이 세포를 자극시켜 그 세포의 고유한 인터페론의 유전자 발현을 촉진함으로써 이루어진다(Pestka와 Baron, 1981; Stewart II, 1981).

인터페론의 항바이러스 효과는 인터페론을 생산한 동종의 세포에서만 특이적으로 작용한다고 알려졌으나(Colby와 Chamberlin, 1969; Baron 등, 1964; Merrigan, 1964), 인간과 원숭이처럼 분류학상 근접한 과의 동물간에 인터페론의 교차반응(cross-reaction)이 증명되면서 부터 사람의 섬유아세포에 인터페론(human fibroblast interferon)이 가토 세포에(Bucknall, 1967), 사람의 백혈구 인터페론과 섬유아세포의 인터페론이 소와 돼지 세포에도 활성이 있다는 보고가 있으며(Gresser 등, 1974; Desmyter 등, 1968; Bucknall, 1967), 사람의 백혈구 인터페론이 사람의 세포(NS diploid cell)보다는 고양이 세포(Fe/Fe LV5, CCC 및 NLFK)에 대하여 약 5배나 더욱 활성이 있었다는 보고가 있다(Desmyter와 Stewart II, 1976).

동물의 인터페론으로서의 소의 백혈구 인터페론이 영장류세포에서(Tovey 등, 1977), 또한 돼지의 백혈구 인터페론은 사람의 섬유아세포인 GM 2504에서 cross-species antiviral activity를 보인 것으로 보고되었다(Carter 등, 1979).

초기의 백혈구 배양에 의한 인터페론의 생산에 있어서는 정상 사람의 백혈구를 분리하여 Sendai virus와 Newcastle disease virus로 *in vitro*에서 인터페론을 유발생산시키는 실험을 확립하였으며(Strander와 Cantell, 1966; Lee와 Ozere, 1965; Gresser, 1961), 사람의 백혈구 인터페론의 대량생산이 개발되었다. 이로써 현재의 인터페론은 바이러스질환 치료제로서 뿐만 아니라, IFN- α 의 신장암 치료에 대한 탁월한 효과와 항암제로서의 임상연구가 활발히 진행중이다(Neidhar 등, 1984; Cantell와 Hirvonen, 1978).

Mitogen에 의해서 유발되는 type II IFN인 IFN- γ 는 Wheelock(1965)에 의해 최초로 발견되었고, 항바이러스 효과 뿐만 아니라 IFN- α 나 IFN- β 보다 훨씬 강력한 항증식성 또는 항암성 효과를 나타내어(Bialock

등, 1980; Rubin과 Gupta, 1980; Crane, 등, 1978; Salvin 등, 1975) 암세포 파괴를 증진시키는 lymphokine인 interleukin-2(IL-2)와 함께 현재 집중적인 연구가 진행되고 있다. 국내에서도 최근 사람의 IFN- γ 에 대한 생산의 연구가 보고되었다(정일엽 등, 1986).

본 연구에서는 돼지의 혈액을 값싸고 많이 얻을 수 있다는 잇점을 고려하여 돼지의 백혈구 배양에서 인터페론을 대량생산할 목적으로 사람 백혈구 배양과 인터페론 생산기법을 응용하여 돼지 혈액으로부터 백혈구를 다량 배양하였고, Newcastle disease virus와 Phytohemagglutinin을 이용하여 백혈구 인터페론(PorIFN- α)과 돼지의 면역 인터페론(PorIFN- γ)을 생산하는 실험을 하였다.

생산한 돼지의 인터페론은 microassay system에서 국제단위(international unit, IU)를 human standard INF과 비교하여 IU를 측정하였으며, 돼지의 인터페론이 돼지의 신장세포에서 뿐만 아니라 사람의 양막세포에서도 antiviral activity가 있는지를 관찰하여 돼지의 백혈구 배양에서 인터페론의 생산을 시도하고 이러한 사실에 입각하여 돼지 백혈구의 인터페론이 비단 인체의 치료면에 있어서 응용될 가능성이 있다고 볼 뿐만 아니라 인체의 중요한 면역기전을 돕는 인자를 규명하는데 기초적인 자료로 하고자 한다.

材料 및 方法

돼지의 전혈 채취: 도축하기 전에 임상관찰에서 건강하다고 판정된 90~120kg의 Yorkshire와 Landrace 교잡 비육돈으로부터 혈액 1 volume을 CPD혈액보존용액(citric acid monohydrate, 3.27g/liter; sodium citrate, 26.3g/liter; sodium dihydrogen phosphate, 2.51g/liter; dextrose, 23.3g/liter) 0.14 volume에 가능한 한 무균적으로 채혈하여 실험에 사용하였다.

돼지의 혈액으로 부터 백혈구 분리: 돼지 백혈구의 분리는 6% hydroxyethyl starch(HES, Sigma)용액을 혈액과 혼합 최종농도를 0.5%로 한 HES-RBC 침강법과 원심분리를 통한 buffy coat 분리법을 사용하였다. 백혈구분리 중 혼합된 적혈구는 0.83% NH₄Cl 용액처리 의해 제거시켰으며 백혈구의 세척은 RPMI-1640 배지에 항생물질을 첨가한 washing medium으로 하였다. 분리된 백혈구는 trypan blue를 사용한 dye-exclusion test에 의해 활성도를 검사하였다.

백혈구 배양의 배지: 백혈구의 세포배양 배지로는 RPMI-1640(Difco)에 fetal bovine serum(Gibco)을 5% 되도록 첨가하고, 배지 ml당 penicillin 100unit, strept-

omycin 100 μ g, kanamycin 20 μ g, amphotericin B 2.5 μ g을 첨가하여 사용하였다.

유발인자(Inducers): Porcine leukocyte interferon (PorLeIF, PorIFN- α)의 유발인자로서 Newcastle disease virus(NDV)BI strain을 가축위생연구소로부터 분양받아 -20°C에 보존하면서 실험에 사용하였다. NDV의 적혈구 응집가 측정은 macroplate에서 실시하였으며, 응집이 일어나는 최고 희석배수의 역수를 적혈구의 응집가로 하였다. NDV의 적혈구의 응집가(hemagglutination unit, HAU)는 1024 HAU/0.1ml이었다.

한편, Porcine immune interferon(PorIIF, PorIFN- α)의 유발인자로서 mitogen인 bactophytohemagglutinin-P(PHA-P, Difco)를 phosphate buffered saline용액(pH 7.4)에 녹인 후 -20°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

돼지의 인터페론 유발 농도: PorLeIF은 백혈구 배

양에 NDV를 125 HAU/ml와 250 HAU/ml 되도록 유발시켰고, 돼지의 면역 인터페론은 PHA-P의 농도를 5~10 μ g/ml와 34~50 μ g/ml이 되도록 하여 각각 유발시켰다.

백혈구의 배양조건: 백혈구의 배양은 백혈구의 농도가 0.5~1 $\times 10^7$ cell/ml이 되도록 하여 실리콘처리된 glass spinner bottle(Bellico, 250ml 혹은 500ml)에서 18시간 동안 교반배양하였고, 온도는 36~37°C를 유지하였으며 교반속도는 magnetic stirring rotor(Corning, RS4, D-100 rpm)를 사용하여 약 60~80 rpm이 되도록 하였다.

粗製 인터페론 제조: 백혈구 세포배양이 끝난 후 백혈구 배양액을 250ml 병에 넣은 다음 1,500g에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 -20°C에 보관하였다. 역가검정시 이를 해동시키고 NDV를 유발인자로 사용했을 경우 NDV 불활화를 위해 1 N HCl로써 pH

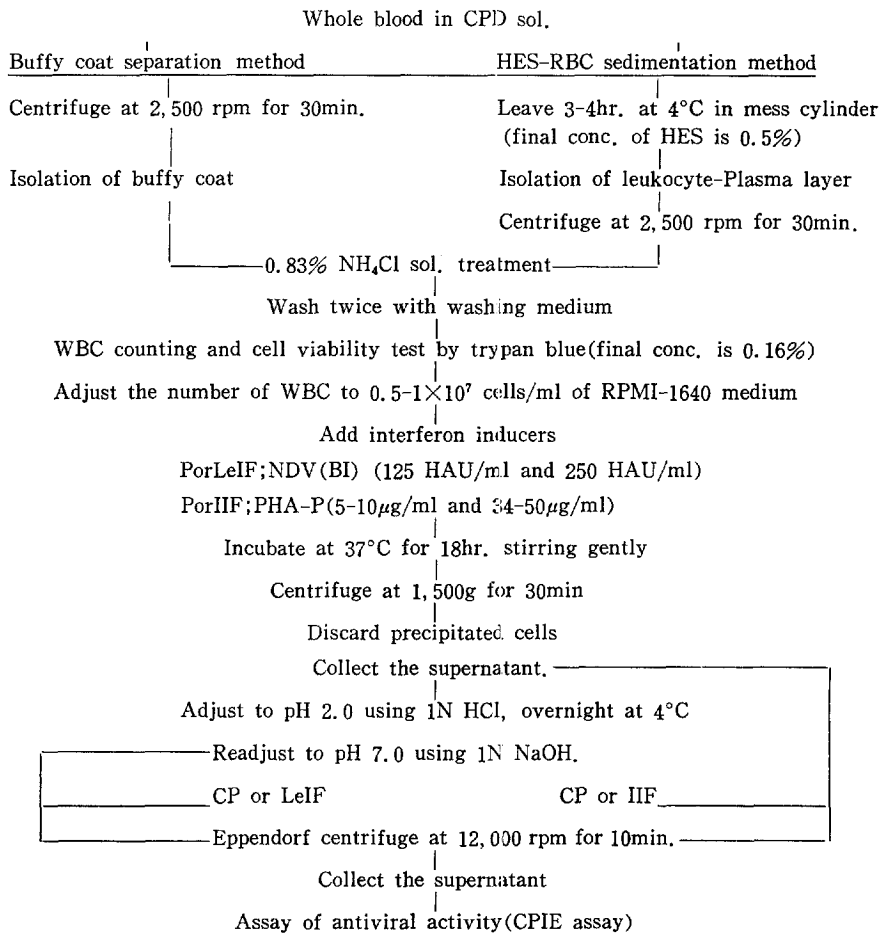


Fig. 1. Diagram of the procedure for the production of porcine interferons.

2.0으로 조정후 4°C에서 overnight 시켰다. 다시 1 N NaOH로써 pH 7.0으로 조정시킨 다음 eppendorf centrifuge에서 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리후 그 상층액을 crude PorLeIF으로 하여 항바이러스 역가 시험에 사용하였다.

또한 PHA·P로 유발시킨 백혈구 배양액을 1,500g에 30분 동안 원심분리하여 상층액을 -20°C에 보존하였다가 역가검정시 해동시켜서 eppendorf centrifuge에서 centrifugation하고 그 상층액을 crude PorIIF으로 하여 항바이러스 역가시험에 사용하였다(Fig. 1).

Cytopathic inhibition effect(CPIE) assay에 의한 Crude porcine interferon의 측정: Porcine interferon sample의 역가측정은 Armstrong(1971)과 Rubinstein 등(1981)의 방법을 이용하여 측정하였다. 역가검정용은 국립보건원에서 분양받은 FL cell(normal human amnion cell, ATCC, CCL 62)과 가축위생연구소에서 분양받은 PK(15) cell(adult pig kidney cell, ATCC, CCL33) 및 challenge virus로는 vesicular stomatitis virus(VSV)Indiana strain을 사용하였다. VSV는 각 cell line에서 Reed와 Muench방법에 의하여 100 TCID₅₀(tissue culture infectious dose 50%)값을 측정하였다.

인터페론의 역가는 VSV challenge 후 virus control well이 100% cytopathic effect(CPE)를 보이고, reference IFN의 희석 well 중 50% CPE 혹은 CPIE를 판독할 수 있을 때 sample의 50% CPE 혹은 CPIE를 나타내는 end point well의 희석배수를 sample의 관찰 unit/ml로 하여 측정하였다. Sample의 국제단위는 reference IFN IU/ml와 관찰된 U/ml를 다음 식에 대입

하여 계산하였다.

$$\text{Sample IU/ml} = \frac{\text{Observed sample U/ml} \times \text{Standard IU/ml(assigned)}}{\text{Observed standard U/ml}}$$

각 well안의 세포를 고정시키기 위하여 dye-fixer solution(0.5% crystal violet, wt./vol.; 50% formalin, v/v; 50% ethanol, v/v in 0.85% NaCl solution)으로 염색시켜 육안적 end point well의 결정이 용이하게 하였다(Fig. 2).

대조로 사용한 국제표준 reference IFN은 사람의 백혈구 인터페론(NIBSC, 69/19, MRC research, standard B, 5,000 IU/container)으로서 농집자 의약품으로부터 분양받았으며 역가검정시 사용한 Eagle's minimum essential medium(MEM)에 1,600 IU/ml로 희석하여 사용하였다.

BGK cell에서의 VSV 감수성 증명: PK(15) cell에서 10³ TCID₅₀/0.2ml의 세포감염가를 갖는 VSV Indiana strain을 사용하여 BGK cell에서 CPE를 관찰하였고 VSV에 대한 감수성을 보았다. 실험에 사용한 BGK cell은 Korean native black goat kidney에서 유래된 국내 cell line로서 가축위생연구소에서 분양받았다.

돼지 인터페론과 사람 인터페론의 BGK cell에서 항바이러스 역가 측정: 본 실험에서 생산한 porcine IFN과 reference human IFN(α & β)을 사용하여 BGK cell에서 VSV에 대한 CPIE assay를 수행하고 각 인터페론의 cross-species antiviral activity를 관찰하였다.

실험에 사용한 reference human IFN- β 는 human

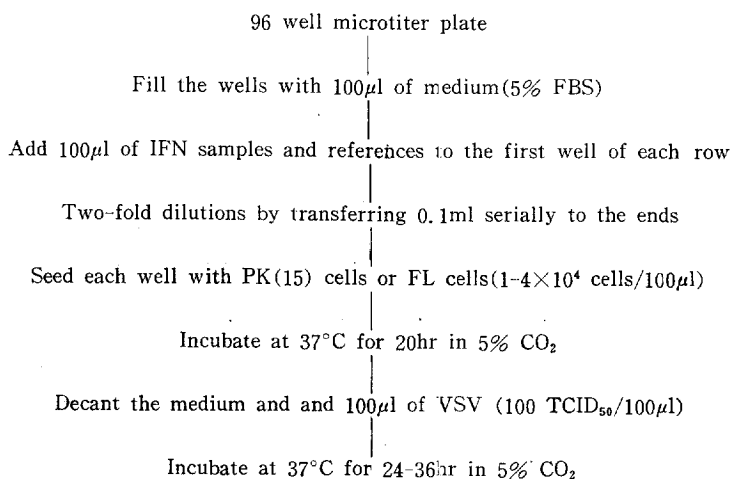


Fig. 2. Diagram of the procedure for the assay of porcine interferons.

fibroblast interferon(NIAID, G-023-902-527, 10,000 IU/container)으로서 국립보건원에서 분양받았다.

結 果

돼지의 백혈구 분리 : 정상용돈의 혈액중 백혈구가 평균 15.5×10^9 ($10.3 \sim 20.7 \times 10^9$)개 있다고 산정되는 돼지혈액 1리터로부터(Mitruka와 Rawnsley, 1981) HES-RBC 침강법과 원심분리에 의한 buffy coat 분리법으로 백혈구 분리율을 조사하였다. Table 1에서와 같이 HES-RBC 침강법으로 분리하는 최고 20.6%, 최저 3.7%의 생존백혈구 분리율을 보였고, 평균 생존백혈구 분리율은 9.2%이었다. 원심분리에 의한 buffy coat 분리법으로 분리하는 최고 37.1%, 최저 20.5%의 분리율을 보였으며, 평균 생존백혈구 분리율이 28.7%로서 HES-RBC 침강법보다 약 3배 높은 분리율을 나타내어 고도의 유의성이 있었다($p < 0.01$).

Trypan blue의 dye-exclusion test에서 백혈구의 세포생존율은 분리된 전체 백혈구의 90%이상 이었으며, 적혈구의 혼입 정도는 백혈구와 적혈구의 비가 10:1 이하로 낮았다.

NDV로 유발시킨 PorLeIF의 PK(15) cell에서의 항바이러스 역가 : Viral inducer인 NDV를 배지 ml당 125 HAU/ml 또는 250 HAU/ml가 되도록 가하여 IFN을 유발시켰던 바 NDV가 125 HAU/ml로 가해진 4 lots의 PorLeIF에서는 PK(15) cell에서 평균 103 IU/ml의 역가를 나타냈으며 NDV가 250 HAU/ml로 가해진 또 다른 3 lots의 PorLeIF에서는 1 lot만이 235 IU/ml를 나타내었을 뿐 나머지 2 lots에서는 antiviral activity를 볼 수 없었다. 역가가 인정된 5 lots(125-250HAU/ml)의 IFN역가는 최고 235, 최저 59 IU/ml로 평균

129 IU/ml 이었다(Table 2).

NDV로 유발시킨 PorLeIF의 FL cell에서의 항바이러스 역가 : NDV를 배지 ml당 125 HAU가 되도록 가하여 유발시킨 PorLeIF 4 lots중 FL cell에서 항바이러스 역가가 인정된 3 lots의 평균 역가는 60 IU/ml이었으며, 250 HAU/ml의 NDV를 가한 PorLeIF 3 lots의 평균 역가는 83 IU/ml로서 125 HAU/ml로 가했을 때보다 약간 높은 역가를 보였다. 역가가 인정된 총 6 lots의 IFN 역가는 최고 142, 최저 13 IU/ml로 평균 72 IU/ml 이었다(Table 2).

이로써 NDV(BI)-induced PorLeIF의 평균 IU는 타종유래인 사람 FL cell에서도 동종 세포에서 보인 역가의 55.8%의 항바이러스 역가를 나타냈다.

PHA·P로 유발시킨 PorIIF의 PK(15) cell과 FL cell에서의 항바이러스 역가 : Mitogen인 PHA·P를 배지 ml당 $5 \sim 10 \mu\text{g}$ 와 $34 \sim 50 \mu\text{g}$ 로 각각 가하여 유발시킨 PK(15) cell에서 역가를 측정 하였던 바, PHA·P농도를 $5 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 로 가하여 유발시킨 PorIIF 3 lots의 평균 역가는 158 IU/ml이었으며 $34 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 로 가하여 유발시킨 PorIIF 3 lots의 역가는 모두 235 IU/ml로 나타났다.

PHA·P를 $5 \sim 10$ 과 $34 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 로 가하여 PK(15) cell에서 항바이러스성이 인정된 총 6 lot의 역가는 최고 330, 최저 29 IU/ml로 평균 197 IU/ml 이었다. 그러나 FL cell에서의 PorIIF의 어떠한 항바이러스성도 관찰할 수 없었다(Table 3). PK(13) cell에서 PorIIF의 평균 IU는 PorIF보다 1.5배 높았다.

BGK cell에서의 VSV 감수성 : PK(15)에서 10^3 TCID₅₀/0.2ml의 세포감염가가 있는 VSV Indiana strain을 사용하여 BGK cell에서 감수성을 관찰하였던 바

Table 1. Isolation of Porcine Leukocytes from 1 Liter of Porcine Blood

Isolation	No. of isolated viable WBC(%) ^a	Mean No. \pm SD. of isolated, viable WBC(%)
HES-RBC sedimentation method	3.20×10^9 (20.6)	$1.43 \pm 1.20 \times 10^9$ (9.2 \pm 7.7)
	0.94×10^9 (6.1)	
	0.58×10^9 (3.7)	
	1.00×10^9 (6.5)	
Buffy coat separation method	3.17×10^9 (20.5)	$4.45 \pm 1.06 \times 10^9$ (28.7 \pm 6.8)
	4.62×10^9 (29.8)	
	4.25×10^9 (27.4)	
	5.75×10^9 (37.1)	

a: Figures in the parentheses are percentages of the leukocyte isolation calculated on the basis of normal mean leukocyte count of 15.5×10^9 /liter.

*: The means are significantly different at 1% level.

Table 2. Antiviral Activity of NDV(BI)-induced PorLeIF* on Porcine and Human Cells

Inducer dose (HAU/ml)	Interferon lot No.	PK(15) Cells**		FL Cells**	
		IU/ml	U/ml***	IU/ml	U/ml***
125	1	117	159	0	0
	2	59	80	142	320
	3	117	159	13	29
	4	117	159	25	56
250	5	235	320	50	112
	6	0	0	100	225
	7	0	0	100	225
Mean		129	175	72	162

* NDV(BI)-induced PorLeIF; Newcastle disease virus-induced porcine leukocyte interferon.

** The values of mean were calculated only with units of lots that showed antiviral activity.

*** U/ml; Observed units/ml.

Table 3. Antiviral Activity of PHA·P-induced PorIIF on Porcine and Human Cells

Inducer dose (μg/ml)	Interferon lot No.	PK(15) Cells		FL Cells	
		IU/ml	U/ml	IU/ml	U/ml
5~10	9	29	39	0	0
	10	117	159	0	0
	11	330	449	0	0
34~50	12	235	320	0	0
	13	235	320	0	0
	14	235	320	0	0
Mean		197	267	0	0

* PHA·P-induced PorIIF; Phytohemagglutinin·P-induced porcine immune interferon.

Table 4. Antiviral Activity of IFNs on BGK Cells Against VSV

IFNs	Antiviral activity
NDV(BI)-induced PorLeIFs	NA
PHA·P-induced PorIIFs	NA
Reference HuLeIFs (INF-α)	640 U/ml
Reference HuFIFs (INF-β)	320 U/ml

* NA; No activity

HuLeIF; Human leukocyte IFN.

HuFIFs; Human fibroblast IFN.

CPE가 나타났으며 10^3 TCIE₅₀/0.1ml의 감염가를 보여주었다.

돼지 인터페론과 사람 인터페론의 BGK cell에서의 항바이러스 효과: 본 실험에서 생산된 PorLeIF과 PorIIF는 BGK cell에서 VSV에 대한 antiviral activity를 보이지 않았으나, reference human IFN-α와 β는 antiviral activity를 나타내어 각각 640 U/ml, 320 U/ml의 역가를 보였다(Table 4).

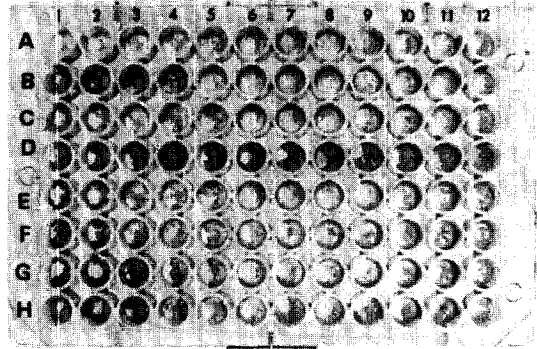


Fig. 3. Titration of antiviral activity of PorLeIFs on FL cells. All the rows A through H, except D, contained different lots of serially diluted samples of PorLeIFs. The row D contained the standard of human leukocyte INF with a titer of 1600 IU/ml. The end point for the standard can be seen at well 9 where 50% protection of the cells was observed. The wells with 50% protection for the other samples were as follows: row B, well 4; row C, well 1; row E, well 2; row F, well 3; row G, well 4; row H, well 4. Row A did not show any antiviral activity.

考 察

돼지의 혈액으로부터 백혈구를 분리할 때 그 분리율은 분리방법 뿐만 아니라 항응고제의 종류에 따라서도 영향을 받는다. 수혈용 항응고제로서 acid citrate dextrose(ACD)와 citrate phosphate dextrose(CPD)를 이용하여 채혈하고 백혈구를 분리하여 감별계산한 바 ACD를 사용한 경우보다 CPD를 사용한 경우에 백혈구 중 polymorphonuclear leukocyte가 약 1.5배 가량 많이 분리되어 총 백혈구수가 증가한다고 하였다(Waldman, 1980). 따라서 본 실험에서는 CPD를 항응고제로 사용하여 암컷 돼지보다는 백혈구가 평균 1.3×10^9 개/liter 정도로 많은 숫컷 돼지의 혈액을 채혈하였

다. 슷컷 돼지로부터 백혈구분리율은 buffy coat분리법으로 분리시 28.7%의 평균 백혈구분리율을 나타내어 HES-RBC 침강법의 9.2%보다 3배나 높았다.

NDV는 동물에 정맥주사 후 훌륭한 인터페론의 유발능력이 인정되었다(Stewart II 등, 1971; Henle 등, 1959). 본 실험에서는 PorLeIF의 viral inducer로서 NDV(BI)를 사용하였으며 그 감염량은 125 HAU/ml와 250 HAU/ml가 되도록 유발시켰다.

Sendai virus가 사람과 몇몇 동물에 인터페론의 유발인자로 사용되어지는데 반해서 NDV는 사람, 흰쥐, 트끼, 생쥐, 돼지, 기니피그, 고양이, 개, 닭 그리고 물고기 등 광범위한 *in vivo*나 *in vitro* system에서 우수한 유발인자로 작용한다고 주장된다(Stewart II, 1981). 특히 PorLeIF를 유발시키는데 있어서 NDV가 Sendai virus보다 우수하다고 하였다(Carter와 Johnson, 1981). NDV 감염량에 있어서 0.1~5 PFU/leukocyte로 하여 HeLeIF를 유발하였으며(Pidot 등, 1972) 5 PFE/leukocyte로 하여 PorLeIF를 유발하였는데(Carter 등, 1979) 이때 NDV 5 PFE/leukocyte는 NDV 약 10^5 virus-infective unit가 1 HAU와 동등하다는 가정에 의하면 약 250 HAU/ 5×10^6 leukocytes/ml inducer dose에 해당한다고 볼 수 있다(Hanson, 1978). Tovey 등(1977)은 NDV 200 HAU/ 10^7 leukocytes/ml의 감염량으로 소의 백혈구 인터페론을 유발한 바 있다.

본 실험에서 생산한 PorLeIF의 평균 국제단위기준 역가는 PK(15) cell에서 129 IU/ml이었고, FL cell에서 72 IU/ml로서 사람 유래 FL cell에서도 약 55.8%의 cross-species antiviral activity를 나타내었다. 또한 reference human IFN과 비교하여 국제단위를 얻기 전의 평균 관찰 U/ml 만으로 나타낼 때는 FL cell에서 93%의 cross-species antiviral activity가 인정되어 PK(15) cell에서의 역가와 비등하였다. 그러나 주목할 만한 것은 lot No. 1, 3, 4, 5의 PorLeIF는 homologous cell인 PK(15) cell에서 높은 역가를 나타낸 반면, lot No. 2, 6, 7은 heterologous cell인 FL cell에서 현저하게 높은 역가를 나타낸 점이다.

Natural human IFN에서도 사람체간의 차이나 사람유래 인터페론 생산세포의 종류에 따라 여러 subclass가 발견되었다(Pestka와 Baron, 1981), 또한 돼지에는 16가지의 blood group system이 존재한다는 Diuklage(1968)의 보고를 고려할 때 위에서 나타난 PorLeIF의 이중적인 역가는 돼지 개체이나 다양한 혈액형의 존재에서 비롯된 것이라 보아지며, PorLeIF에서는 homologous cell에 더욱 높은 역가를 나타내는 것과 사람세포와 같은 heterologous cell에서 더 높은 역가를 나타

내는 것도 적어도 두 가지 이상의 subclass가 존재할 것이라 사료된다.

Immune IFN(IFN- γ)은 viral IFN이 virus나 synthetic polynucleotide 등(Field 등, 1967a, 1967b, 1968)에 반응하는 다양한 세포에 의해 생산되어지는데 반해 mixed leukocyte culture 또는 T, B cell의 antigen과 mitogen의 자극에 대한 면역반응으로 합성되어진다(Falcoff 등, 1972; Youngner와 Salvin, 1973; Vall 등, 1975; Epstein, 1977; Wietzerbin 등, 1979; Grossberg 등, 1986).

본 실험에서는 돼지의 백혈구 배양에 PHA·P를 유발인자로 사용하여 5~10 μ g/ml와 34~50 μ g/ml의 두 가지 PE·A·P 농도에서 PorIIF를 생산하였다. PK(15) cell에서 PorIIF의 역가는 PHA·P의 두 농도에서 유의성이 인정되지 않았는데 Epstein과 Ammann(1974)의 보고와 비슷하였다. 이들은 정상인의 lymphocyte를 분리 배양하고 PHA·P의 농도를 8, 17, 33, 50 μ g/ml로 달리 첨가하여 생산된 immune IFN의 역가를 측정된 결과 PHA·P의 농도에 의한 차이가 없다고 하였다.

본 실험에서는 PK(15) cell에서 PorIIF의 평균 역가는 197 IU/ml로서 PorLeIF의 역가보다 1.5배 높게 관찰되었다. 그러나 FL cell에서는 PorIIF의 antiviral activity를 검출할 수 없었다. 이는 PHA-induced swine leukocyte IFN이 소의 신장세포에서는 swine kidney cell에서 보인 평균 역가의 12.5%밖에 안되는 낮은 cross-species antiviral activity를 보였다는 Richmond(1970)의 보고와 비교할 때, PorIIF는 FL cell에서 더욱 더 species-specific한 것으로 생각된다.

여러 학자의 보고에 의하면 사람 세포의 IFN receptor에 있어서 viral induced IFN인 HuIFN- α 와 HuIFN- β 에 대한 type I receptor와 mitogen-induced IFN인 HuIFN- γ 에 대한 type II receptor가 각기 바로 존재한다고 하였다(Orchansky 등, 1984; Anderson 등, 1982; Aquet 등, 1982).

본 실험에서 생산한 PorLeIF는 FL cell에 있는 type I receptor와 친화성이 있어 결합한 후 항바이러스 작용을 자극시켜 역가를 나타낸 반면, PorIIF은 FL cell의 type II receptor와 친화성이 없어 역가가 인정되지 않는 것으로 사료된다.

인터페론의 분석에 VSV가 흔히 이용되는 것은 그 host range가 넓고 인터페론에 대한 감수성이 높기 때문이다(Fenner 등, 1974). 그러나 VSV가 duck embryo cell에서는 그 증식력이 현저히 감소되어 host range가 제한된다고 알려져 있다(Levinson 등, 1978).

본 실험의 BGK cell에서 발견한 VSV의 CPE는 BGK

세포에서 VSV가 증식한다는 것을 의미하며, 한국재래 산양유래의 BGK 세포가 또 하나의 VSV host cell이 될 수 있다고 사료된다.

본 실험에서 생산한 PorLeIF와 PorIIF은 BGK세포에서 VSV에 대한 방어력을 나타내지 못했지만 사람의 α, β -IFN은 항바이러스력을 나타냄으로서 사람에 인터페론의 광범위한 cross-species antiviral activity를 관찰할 수 없었다. 따라서 장차에 사람의 인터페론의 역가검정에 BGK 세포를 사용하는 것도 가능하리라고 생각되나 돼지의 백혈구에서 인터페론을 대량 생산하는 데는 앞으로 많은 연구가 요구된다고 사료된다.

結 論

돼지의 백혈구 배양에서 인터페론을 생산하기 위하여 Newcastle disease virus(VDV)BI strain 및 Phytomhemagglutinin·P(PHA·P)를 유발인자로서 사용하여 porcine leukocyte interferon(PorLeIF) 및 porcine immune interferon(PorIIF)을 생산하고, 돼지유래 PK(15)세포, 사람유래 FL 및 BGK세포 배양에서 VSV에 대한 항바이러스 역가를 측정하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 돼지의 혈액으로부터 백혈구를 분리할 때 buffy coat 분리법으로는 평균 생존백혈구 분리율이 28.7% 이었고, hydroxyethyl starch-RBC 침강법에서는 9.2%로 buffy coat 분리법의 분리율이 높았다.

2. NDV(BI)로 유발시킨 PorLeIF의 평균 역가는 PK(15) 세포에서 129 IU/ml, FL 세포에서는 72 IU/ml로 55.8%의 cross-species antiviral activity를 보였다.

3. PHA·P로 유발시킨 PorIIF의 평균 역가는 PK(15) 세포에서 197 IU/ml로 PorLeIF의 1.5배였으나, FL 세포에서는 antiviral activity가 나타나지 않았다.

4. 한국재래산양유래 BGK 세포에서 VSV를 접종한 결과 CPE가 관찰되어 BGK 세포의 VSV에 대한 감수성이 인정되었으며 VSV를 사용한 인터페론의 분석이 가능하였다.

NDV(BI)-induced PorLeIF과 PHA·P-induced PorIIF는 BGK 세포에서 antiviral activity가 나타나지 않았다. 그러나 reference human α, β -interferon의 antiviral activity는 관찰되어 PK(15) 세포뿐만 아니라 BGK 세포에서도 cross-species antiviral activity가 인정되었다.

謝辭: 본 연구를 수행하는데 있어서 여러 가지로 도와주신 가축위생연구소의 박봉균 연구관 그리고 서울대학교 수의과대학의 태주호 조교에게 감사드립니다.

參 考 文 獻

- Aquet, M., Belardelli, F., Blanchard, B., Marcucci, F. and Gressor, I. (1982) High-affinity binding of 125 I-labelled mouse interferon to a specific cell surface receptor. IV. γ -interferon and cholera toxin do not compete for the common receptor site of α/β interferon. *Virology*, 117:541.
- Anderson, P., Yip, Y.K. and Vilcek, J. (1982) Specific binding of 125 I-human interferon- γ to high affinity receptor on human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 257:11301~11304.
- Armstrong, J.A. (1971) Semi-micro, dye-binding assay for rabbit interferon. *Appl. Microbiol.*, 21:723~725.
- Baron, S. and Buckler, C.E. (1963) Circulating interferon in mice after intravenous injection of virus. *Science.*, 141:1061~1063.
- Baron, S., Barban, S. and Buckler, C.E. (1964) Host cell species specificity of mouse and chicken interferons. *Science.*, 145:814.
- Blalock, J.E., Georgiades, J.A., Langford, M.P. and Johnson, H.M. (1980) Purified human immune interferon has more potent anticellular activity than fibroblast or leukocyte interferon. *Cellular Immunol.*, 49:390~394.
- Bucknall, R.A. (1967) "Species specificity" of interferons: a misnomer? *Nature*, 216:1022~1023.
- Cantell, K. and Hirvonen, S. (1978) Large-scale production of human leukocyte interferon containing 10^8 Units per ml. *J. Gen. Virol.*, 39:541~543.
- Carter, W.E., Davis, L.R. Jr., Chadha, K.C. and Johnson, F.H. Jr. (1979) Porcine leukocyte interferon and antiviral activity in human cells. *Molecular Pharmacol.*, 15:685~690.
- Carter, W.E. and Johnson, F.H., Jr. (1981) [7] Induction and production of interferon with porcine, bovine, and equine leukocytes. *Methods in Enzymology.*, 78:48~54.
- Colby, C. and Chamberlin, M.J. (1969) The Specificity of interferon induction in chick embryo cells by helical RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 63:160~167.

- Crane, J.L. Jr., Glasgow, L.A., Kern, E.R. and Youngner, J.S. (1978) Inhibition of murine osteogenic sarcomas by treatment with type I or type II interferon. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61:871~874.
- Desmyter, J., Rawls, W.E. and Melnick, J.L. (1968) A human interferon that crosses the species line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 59: 69~76.
- Desmyter, J. and Stewart II, W.E. (1976) Molecular modification of interferon: Attainment of human interferon in a conformation active on cat cells but inactive on human cells. *Virology.*, 70:451~458.
- Diuklage, H., Junk, N.V. (1968) Results of the third pig blood grouping comparison test. In 11th European conference on animal blood groups and biochemical polymorphism.
- Epstein, L.B., Stevens, D.A. and Merigan, T.C. (1972) Selective increase in lymphocyte interferon response to vaccinia antigen after revaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69: 2632~2636.
- Epstein, L.B. and Ammann, A.J. (1974) Evaluation of T lymphocyte effector function in immunodeficiency diseases: Abnormality in mitogen-stimulated interferon in patients with selective IgA deficiency. *J. Immunol.*, 112:617~626.
- Epstein, L.B. (1977) Mitogen and antigen induction of interferon *in vitro* and *in vivo*. In "Texas Reports on Biology and Medicine. 35:42~56.
- Falcoff, R., Oriol, R. and Iscaki, S. (1972) Lymphocyte stimulation and interferon induction by 7S anti-human lymphocyte globulins and their uni and divalent fragments. *Eur. J. Immunol.*, 2:476~478.
- Fenner, F., McAuslan, B., Mims, C., Sambrook, J. and White, D. (1974) In *The biology of animal viruses* (F. Fenner, B.R. McAuslan, C.A. Mims, J. Sambrook, and D.O., White, eds.). Academic press, N.Y., pp.40.
- Field, A.K., Tytell, A.A., Lampson, G.P. and Hilleman, M.R. (1967a) Inducers of interferon and host Resistance, II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 58:1004~1010.
- Field, A.K., Lampson, G.P., Tytell, A.A., Nemes, M.M. and Hilleman, M.R. (1967b) Inducers of interferon and host resistance, IV. Double-stranded replicative form RNA (MS2-RF-RNA) from *E. coli* infected with MS2 coliphage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 58:2102~2108.
- Field, A.K., Tytell, A.A., Lampson, G.P. and Hilleman, M.R. (1968) Inducers of interferon and host resistance, V. *In vitro* studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 61:340~346.
- Gressor, I. (1961) Induction by Sendai virus of non-transmissible cytopathic changes associated with rapid and marked production of interferon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 108:303~307.
- Gresser, I., Bandu, M.T., Brouty-Boyé, D. and Tovey, M. (1974) Pronounced antiviral activity of human interferon on bovine and porcine cells. *Nature.*, 251:543~545.
- Grossberg, S.E., Taylor, J.L., Sibenlist, R.E. and Jameson, P. (1986) Biological and immunological assays of human interferons In "Manual of Clinical Laboratory immunology, 3rd ed. Edited by Rose *et al.* ASM, Washington.
- Hanson, R.P. (1978) Chap. 18 Newcastle disease in "diseases of poultry," 7th ed. Edited by Iofstad *et al.*, Iowa State Univ. Press, Iowa. pp.517.
- Henle, W., Henle, G., Deinhardt, F. and Bergs, V.V. (1959) Studies on persistent infections of tissue cultures. IV. Evidence for the production of an interferon in MCV cells by myxoviruses. *J. Exp. Med.*, 110:525~541.
- Ho, M., Breining, M.K., Postic, B. and Armstrong, J.A. (1970) The effect of preinjections on the stimulation of interferon by a complexed polynucleotide, endotoxin, and virus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 173:680~688.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc. Royal. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147:258~267.
- Lee, S.H.S. and Ozere, R.L. (1965) Production of interferon by human mononuclear leucocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 118:190~195.
- Levinson, W., Oppermann, H., Rubenstein, P. and Jackson, J. (1978) Host range restriction of

- vesicular stomatitis virus on duck embryo cells, *Virology.*, 85:612~616.
- Merigan, T.C. (1964) Purified interferons: Physical properties and species specificity. *Science*, 145:811~813.
- Mitruka, B.M. and Rawnsley, H.M. (1981) Clinical biochemical and hematological reference value in normal experimental animals and normal humans, 2nd ed., Masson, USA. pp.110.
- Orchansky, P., Novick, D., Fisher, D.G. and Rubinstein, M. (1984) type I and type II interferon receptors. *J. Interferon Res.*, 4:275~282.
- Pestka, S. and Baron, S. (1981) [1] Definition and classification of the interferon. *Methods in Enzymology.*, 78:3~14.
- Pidot, A.L., O'Keefe III, G., Mcmanus, N. and McIntyre, O.R. (1972) Human leukocyte interferon: The Variation in normal and correlation with PHA transformation, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140:1263~1269.
- Richmond, J.Y. (1970) Interferon of foot and mouth disease virus: A new assay for interferon. *Arch. Fur ges. Virusforsch.*, 30:75~81.
- Rubin, B.Y. and Gupta, S.L. (1980) Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77:5928~5932.
- Rubinstein, S., Familletti, P.C. and Pestka, S. (1981) Convenient assay for interferons. *J. Virol.*, 37:755~758.
- Salvin, S.B., Youngner, J.S., Nishio, J. and Neta, R. (1975) Brief comm. Tumor suppression by a lymphokine released into the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *J. Natl. Cancer Inst.* 55:1233~1236.
- Stewart II, W.E., Gosser, L.B. and Lockart, R.Z., Jr. (1971) Distinguishing characteristics of the interferon responses of primary and continuous mouse cell cultures. *J. Gen. Virol.*, 13:35~50.
- Stewart II, W.E., Blalock, J.E., Burke, D.C., Chany, C., Dunicc, J.K., Falcoff, E., Friedman, R.M., Galasso, G.J., Joklik, W.K., J.T., Youngner, J.S. and Zoon, K.C. (1980) Interferon nomenclature, *Nature*, 226:110.
- Stewart II, W.E. (1981) The Interferon system. 2nd enlarged ed., Springer, New York.
- Strander, H. and Cantell, K. (1966) Production of interferon by human leukocyte *in vitro*. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 44:265~273.
- Tovey, M.G., Bandu, M.T., Begon-Louis, J., Brouty-Boye, D. and Gresser, I. (1976) Antiviral activity of bovine interferons on primate cells. *J. Gen. Virol.* 36:341~344.
- Valle, M.J., Borrovo, A.M., Strober, S. and Merigan, T.C. (1975) Immune specific production of interferon by human T cells in combined macrophage-lymphocyte culture in response to herpes simple antigen. *J. Immunol.* 114:435~441.
- Waldman, A.A. (1980) *Transfusion*, Philadelphia, 20:384.
- Wheelock, E.F. (1965) Interferon like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, 149:310~311.
- Wietzerbin, J., Stefanos, S., Lucero, M., Falcoff, E., O'Malley, J.A. and Sulkowski, E. (1979) Physico-chemical characterization and partial purification of mouse immune interferon. *J. Gen. Virol.*, 44:773~781.
- Younger, J.S. and Salvin, S.B. (1973) Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 111:1914~1922.
- 정일엽, 염영일, 이상기, 정태화, 한문희 (1986) 인체 혈중 임파구로부터 감마-인터페론의 생산. *대한생화학회지*, 19:219~224.
- 河野晴地 (1983) インタフェロン. *東京化学同人*, pp. 22~44.