

Deferasirox를 활용한 돌돔이리도바이러스에 감염된 돌돔의 폐사율 개선

임동진* · 정명화**†

*한서대학교 수산생명의학과
**국립공주대학교 수산생명의학과

Reduction in mortality rate of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) infected with rock bream iridovirus (RBIV) through the use of Deferasirox

Dong-Jin Lim* and Myung-Hwa Jung**†

*Department of Marine Bio and Medical Sciences, Hanseo University, Republic of Korea.

**Department of Aqualife Medicine, Kongju National University, Republic of Korea.

Rock bream iridovirus (RBIV) poses a significant threat to the domestic rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) aquaculture industry, particularly causing mass mortality during high water temperatures. This study aimed to assess whether rock bream could survive RBIV infection through the administration of deferasirox, either alone or in combination with an inactivated virus. Blood biochemical analysis was conducted after administering deferasirox at doses of 50 µg, 30 µg, and 10 µg per fish. Levels of total protein (TP), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) varied compared to those in the control group, although no fish mortality was observed. When deferasirox (30 µg and 10 µg) was administered alone at intervals of 1 to 2 days before and after infection, a relative survival rate of 20–30% was observed. Additionally, a relative survival rate of 15–25% was recorded three weeks after administering an inactivated vaccine with deferasirox (10 µg). Furthermore, rock bream that survived up to 100 days post infection demonstrated complete resistance to virus re-infection, indicating the formation of a robust defense against re-exposure. These findings demonstrate that administering deferasirox induces an immune response against viral infection in rock bream and suppresses viral replication.

Key words: Rock bream, Rock bream iridovirus, Deferasirox

서 론

Iridoviridae는 Iridovirus, Chloriridovirus, Ranavirus,

Lymphocystivirus, Megalocytivirus를 포함하는 5개의 속으로 구성되어 있으며, 이들 바이러스는 정이십면체의 형태와 120~200 nm의 크기를 지닌 dsDNA의 바이러스이다 (Ince et al., 2018; Kurita and Nakajima 2012). 특히 Megalocytivirus는 높은 폐사율을 유발하며, 아시아 국가에서 서식하는 30종 이상

†Corresponding author: Myung-Hwa Jung
Tel: +82-41-330-1144, Fax: +82-41-330-1144
E-mail: mhjung@kongju.ac.kr

의 해산어와 담수어에 감염되는 광범위한 숙주 범위를 가지고 있다 (Qin et al., 2023; Subramaniam et al., 2012; Min et al., 2021; Kim et al., 2023).

Rock bream iridovirus (RBIV)는 *Megalocytivirus*에 속하는 바이러스로, 국내에서는 1998년 남부 해안 지역에서 처음으로 발생하였다 (Jung and Oh 2000). RBIV는 매년 8~9월(23~27°C)에 돌돔 양식장에서 대량폐사를 유발시켜 큰 피해를 주고 있다 (Jung and Oh 2000). RBIV에 감염이 되면 특징적인 임상적 증상으로 돌돔이 사료를 섭취하는 양이 감소하거나 체표가 어두워지고, 무기력해지다가 이상유형을 하며, 아가미 충혈 또는 출혈 등의 증상을 확인할 수 있다 (Qin et al., 2023; Jung and Oh 2000). 감염된 돌돔 비장의 크기나 무게가 감염되지 않은 일반적인 돌돔에 비해 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있으며 (Jung and Oh 2000; Jung et al., 2017), 아가미가 창백해지는 빈혈 증상이 나타난다 (Jung and Oh 2000). 또한, 바이러스에 감염된 돌돔의 혈액에서는 다양한 크기의 적혈구가 출현하는 등 적혈구 분포폭의 증가와 함께 적혈구, 헤모글로빈, 헤마토크리트의 수치가 감소한다 (Kim et al., 2024). 게다가, 적혈구 내에서는 헤모글로빈의 억제, 조혈세포 인자, 적혈구 생성 기능 인자와 관련된 유전자의 발현이 대조구 대비 10배 이상 감소하면서, 헤모글로빈 합성과 적혈구 생산이 충분하지 않음을 유추할 수 있다 (Kim et al., 2024). 바이러스의 감염 유무는 비장도말표본을 만들어 Giemsa 염색을 한 뒤 현미경으로 관찰하면 세포들이 비정상적으로 확대되는 것을 확인할 수 있다 (Kurita and Nakajima 2012; Jung and Oh 2000). 비정상적인 이형비대세포는 *Megalocytivirus*에 속하는 바이러스들의 감염에 의해 공통적으로 보여지는 증상이다 (Jung and Oh 2000; Inouye et al., 1992; Jung et al., 1997; Kim et al., 2005; Sano et al., 2002; Chao et al., 2004; Wang et al., 2003).

RBIV를 포함한 *Megalocytivirus*를 예방하기 위한 대안과 관련된 다수의 연구 사례가 존재한다 (Xu et al., 2022; Kwon et al., 2020; Wang et al., 2013). 본 연구팀은, 면역증강제로서 Polyinosinic : polycytidylic acid (Poly I:C)와 CpG ODN의 효과에 대한 선행연구를 수행하였다. Poly I:C에 대한 효능

실험은, 감염 2일 전 1차례만 투여한 경우 전량 폐사에 이르렀으나, 감염 2일 전과 감염 2일 후 총 두 번의 Poly I:C 투여 시 다수의 생존어를 확보할 수 있었다. 또한, 이들 생존어는 감염 후 200일이 경과한 시점에서 바이러스 재감염에 의한 방어력 획득 유무를 평가 시 전량 생존하면서, 바이러스의 감염에 의한 임상증상은 보이지 않았다 (Jung and Jung 2017). CpG ODN에 대한 효능 실험의 경우, 바이러스 감염 전 2일, 4일, 7일의 시점에 CpG ODN 1668을 투여 시 다수의 개체들이 생존에 이르는 것을 확인하였다. 이들 생존어도 감염 후 100일이 경과한 시점에서 바이러스 재감염에 의한 폐사 및 임상증상은 보이지 않았다 (Jung et al., 2017). RBIV의 병원성이 매우 강하여 바이러스에 노출 시 폐사를 면하기 어려움에도 불구하고 (Jung et al., 2015; Jung et al., 2016), 감염 전과 후에 면역증강제를 적절하게 투여하면 바이러스 감염으로부터 다수의 개체가 생존에 이를 수 있음이 보여졌다.

철분 과부하는 심장 기능 장애, 생명을 위협하는 합병증 등 철분 과부하와 수명은 상관관계가 있다는 것이 보고 되었다 (Olivieri et al., 1994). 또한 철은 DNA, RNA 합성 및 ATP 생성을 포함한 기본적인 생물학적 과정에 관여하며, 바이러스는 숙주 세포에서 복제하기 위해 철에 의존하고 (Liu et al., 2020), 이러한 이유로 철의 항상성은 숙주와 병원체의 상호작용에 결정적인 역할을 한다 (Schaible and Kaufmann 2004; Cassat and Skaar 2013; Nairz et al., 2010). 철분 킬레이트제로 알려진 Deferasirox는 철분을 결합하여 무독성 복합체를 형성한 다음 체외로 배출시킨다 (Hamilton et al., 2014). Deferasirox는 호중구에서 생성되어 내피 세포 손상 및 급성 폐 손상을 유발하는 반응성 산소종 (Reactive oxygen species)을 억제하고 (Kono et al., 2016), 면역 반응, 방어 반응, 사이토카인 생성, 호중구 응집 및 염증 반응 조절에 기여하는 것으로 알려져 있다 (Votavova et al., 2021). 또한, 활성화된 T세포에서 사이토카인 유전자의 전사를 차단하는 방식의 면역 억제 특성을 지닌 사이클로스포린 (cyclosporine)과 유사한 방식으로 세포증식을 억제한다 (Matsuda and Koyasu 2000; Jung et al., 2008). Epstein barr virus (EBV)는 헤르페스 바이러스 속에 속하는 DNA

바이러스로 위암을 유발하는 것으로 알려져 있으며, Deferasirox는 EBV 양성 위암 세포를 선택적으로 사멸함으로써 위암을 치료할 수 있는 약물 후보군으로 보고되었다 (Cordes et al., 2023). 고농도의 Deferasirox 투여에 따른 병리조직학적 병변으로는 발진, 위장장애, 혈청 크레아티닌의 경미한 비점진적 증가 등이 보고되었다 (Cappellini et al., 2006).

본 연구에서는, Deferasirox 투여에 의한 돌돔의 면역 반응 증진 유도를 통해 바이러스 감염에 대한 효능을 평가하였다. 바이러스 감염 전과 후에 Deferasirox의 투여 (1차례, 2차례)를 통해 면역증강제로서의 효과를 확인하였고, 불활화바이러스의 면역보조제로서의 효능을 평가하였다. 이후 살아남은 생존어를 대상으로 바이러스 재감염에 의한 생존어의 방어력 획득 유무를 확인하였다.

재료 및 방법

바이러스

본 실험에 사용한 바이러스는 2010년 하동 돌돔 양식장에서 확보한 돌돔에서 분리한 바이러스로,

바이러스의 분리 및 정량 과정은 다음과 같다. 감염된 돌돔의 비장과 신장에 DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium)(Gibco, USA)을 첨가 후 마쇄하여 4°C에서 20분 동안 737xg로 원심분리하였다 (Jung et al., 2014). 이후 상층액을 0.45 µm 주사기 필터로 여과하였고, RBIV의 major capsid protein (MCP) 유전자 사본을 중합효소 연쇄 반응 (Quantitative real-time polymerase reactions, qRT-PCR)으로 정량화하여 $7.5 \times 10^7 / 100 \mu\text{l}$ (major capsid protein gene copies)에 해당하는 바이러스를 확보하였으며, 바이러스는 사용전까지 -80°C에서 보관하였다.

Deferasirox 농도 선정 및 독성 평가

Deferasirox (Merck, Germany)에 의한 독성 평가를 위해 각각 10마리의 돌돔 (평균무게: 7.1 ± 3.4 g, 평균전장: 6.2 ± 1.3 cm) 복강에 Deferasirox (50 ug, 30 ug, 10 ug/fish)를 주사 후 폐사 여부를 확인하였다 (Table 1).

Deferasirox 투여에 의한 간 손상 여부 등을 확인하기 위해 Deferasirox (50 ug, 30 ug, 10 ug/fish)와

Table 1. Hematological parameter in rock bream blood from fish administered with Deferasirox at 3, 7, and 14 days post administration. Blood from five fish (100 µl fish) was pooled for analysis.

Group	Sampling points	Concentration	TP (g/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	LDH (U/L)	CK (U/L)	Crea (umol/L)	BUN (mmol/L)	GLU (mmol/L)
Deferasirox	3 days	50 µg	28.2	94	21	683	298	3463	10.0	3.04	2.36
		30 µg	27.6	18	6	342	219	3659	10.0	2.20	3.16
		10 µg	27.6	31	8	337	426	3632	10.0	2.95	2.46
	7 days	50 µg	30.3	121	25	418	309	2689	10.0	3.86	1.88
		30 µg	32.9	59	12	496	330	2895	10.0	3.45	2.81
		10 µg	29.2	33	10	401	410	2954	10.0	3.91	2.86
	14 days	50 µg	27.4	34	9	467	498	2658	10.0	3.80	2.52
		30 µg	28.7	49	10	395	287	2854	10.0	4.79	1.89
		10 µg	27.7	14	5	425	312	3369	10.0	4.77	3.11
Control	3 days	Sample 1	19.4	87	28	421	450	2397	10.0	6.08	2.01
		Sample 2	20.4	21	8	331	184	3047	10.0	2.85	1.87
	7 days	Sample 1	13.9	51	16	238	472	3625	10.0	4.55	2.23
		Sample 2	24.4	50	17	397	514	4000	10.0	4.38	2.40
	14 days	Sample 1	19.5	35	11	252	406	3314	10.0	4.22	2.23
		Sample 2	20	64	20	260	480	4000	10.0	4.20	2.30
Reference value based on control group			13.9-24.4	21-87	8-28	252-421	184-514	2397-4000	10.0	2.85-6.08	1.87-2.4

phosphate-buffered saline (PBS)를 100 μ l 주사 후 3, 7, 14일이 경과한 시점에서 Deferasirox 투여구는 5마리, PBS 주사구는 10마리씩 혈액을 채취하였다. Deferasirox 투여구는 비특이 폐사 또는 혈액 채취가 불가능한 경우를 대비하여 여분으로 15마리를 추가 구성하였다. 개체의 크기가 작아 확보되는 혈액의 양이 소량이기때문에 5마리의 혈액을 하나의 튜브에 혼합하였고, Exigo[™] C200 clinical chemistry analyzer (Boule, Sweden)를 활용하여 혈액의 생화학적 분석 (TP, AST, ALP, ALT, LDH, CK, Crea, BUN, GLU)을 수행하였다.

Deferasirox 단독 투여에 의한 생존여 검출

Deferasirox의 단독 투여에 의한 효능 평가를 위해, 개체당 30 μ g와 10 μ g의 Deferasirox를 투여하였다. 감염 전과 후를 기준으로 투여시기 및 실험구를 다음과 같이 구성하였다; i) 감염 1일 전, ii) 감염 1일 전 + 감염 1일 후, iii) 감염 1일 후, iv) 감염 2일 전, v) 감염 2일 전 + 감염 2일 후, vi) 감염 2일 후 (Fig. 1). 각 실험구는 10마리씩 (평균무게 : 9.8 \pm 2.2 g, 평균전장 : 6.9 \pm 1.3 cm) 구성하여 10 L의 해수가 수용된 수조에서 23°C 조건으로 사육하였고, 10⁴/100 μ l (MCP gene copies)의 바이러스를 복강 주사하였다. 이후 감염에 의한 폐사 여부를 50일간 평가하였으며, 매일 80%의 해수를 교환하였다.

Deferasirox 기반 백신 투여에 의한 생존여 검출 (실험1)

바이러스 40 ml (7.5 \times 10⁷/100 μ l, MCP gene copies)에 0.3%의 포르말린을 첨가하여 24시간 동안 4°C의 조건에서 교반을 통해 바이러스를 불활화하였다. 바이러스의 불활화 여부를 입증하기 위해 10마리의 돌돔을 대상으로 불활화바이러스 (7.5 \times 10⁷/100 μ l, MCP gene copies)의 복강 주사를 통한 폐사 여부를 확인하였고, 폐사에 이른 개체는 없었으며, 실험어의 비장에서는 바이러스가 검출되지 않았다.

Deferasirox 기반 불활화백신은 10 μ g의 Deferasirox (50% 용량)와 불활화바이러스 (50% 용량)를 혼합하여 제조하였다. Deferasirox와 불활화바이러

스 (inactivated virus, IV)가 혼합된 백신의 효능 평가를 위해 다음과 같이 실험구를 구성하였다; i) Deferasirox + IV (1차례 투여), ii) Deferasirox + IV (2차례 투여), iii) Deferasirox (1차례 투여), iv) Deferasirox (2차례 투여), v) IV (1차례 투여), vi) IV (2차례 투여), vii) Naive, viii) 바이러스 감염 대조구. 각각의 실험구는 20마리씩 (평균무게 : 12.4 \pm 2.1 g, 평균전장 : 7.7 \pm 1.5 cm) 구성하여, Deferasirox와 Deferasirox 기반 불활화백신을 100 μ l씩 복강 투여하였고, 1차례 투여 후 1주가 경과한 시점에서 2차례 투여를 수행하였다. 각 실험구는 칸막이로 구획된 1톤 용량의 순환수조에 수용하여, 23°C 조건에서 매일 20%의 해수를 교환하였다.

백신 투여 후 3주가 경과한 시점에서 각 실험구들은 10 L의 해수가 수용된 감염수조시설로 이동 후 10⁴/100 μ l (MCP gene copies)의 바이러스를 복강 주사하였고, 폐사 여부를 23°C 조건에서 40일간 평가하였으며, 매일 80%의 해수를 교환하였다.

Deferasirox 기반 백신 투여에 의한 생존여 검출 (실험2)

실험1의 결과를 바탕으로 Deferasirox와 불활화 바이러스가 혼합된 백신의 효능을 재평가하였다. 불활화백신은 실험1과 동일하게 10 μ g의 Deferasirox (50% 용량)와 불활화바이러스 (50% 용량)를 혼합하여 제조하였다. Deferasirox 단독 투여구를 제외하고 다음과 같이 실험구를 구성하였다; i) Deferasirox + IV (1차례 투여), ii) Deferasirox + IV (2차례 투여), iii) IV (1차례 투여), iv) IV (2차례 투여), v) Naive, vi) 바이러스 감염 대조구. 각각의 실험구는 20마리씩 (평균무게 : 15.4 \pm 3.8 g, 평균전장 : 8.3 \pm 1.6 cm) 구성하여, Deferasirox 기반 불활화백신을 100 μ l씩 투여하였다. 각 실험구는 칸막이로 구획된 1톤 용량의 순환수조에 수용하여, 23°C 조건에서 매일 20%의 해수를 교환하였다.

백신 투여 후 3주가 경과한 시점에서 각 실험구들은 10 L의 해수가 수용된 감염수조시설로 이동 후 10⁴/100 μ l (MCP gene copies)의 바이러스 감염에 의한 폐사 여부를 23°C 조건에서 평가하였으며, 매일 80%의 해수를 교환하였다. 생존한 개체를 대상으로 감염 후 100일이 경과한 시점에서 10⁷/100

μl (MCP gene copies)의 바이러스 재감염을 수행하였다.

상대생존율 분석

상대생존율 Relative percent survival (RPS)는 바이러스 감염 대조군이 100% 폐사한 시점에서 백신 투여 실험구의 상대적인 생존율을 확인하기 위한 것으로 $[1 - (\text{백신 접종군의 폐사율} / \text{대조군의 폐사율})] \times 100$ 의 방정식을 사용하여 계산하였다 (Amend et al., 1981).

결과 및 고찰

RBIV는 매년 고수온기에 고급 어종인 돌돔에 감염되어 대량폐사를 유발하여 큰 피해를 주고 있기에 (Jung and Oh 2000), RBIV로부터 돌돔을 효과적으로 보호하고, 바이러스의 발생을 줄일 수 있는 효과적인 대안이 필요하다. 본 실험에서는 체내 철분의 항상성 유지를 통해 체내 면역 반응 증진의 기능을 지닌 Deferasirox를 대상으로, 단독 투여 또는 불활화바이러스와 조합하여 바이러스 감염에 따른 효능을 평가하였다.

Deferasirox (50 μg, 30 μg, 10 μg/fish) 투여에 의해 일부 개체에서 비장의 비대를 동반한 안구돌출이 관찰되었으나 폐사하는 개체는 없었다. 간과 신장의 기능 이상 지표로 활용되는 총단백질 (total protein, TP)은 혈청 중에 함유되어 있는 단백질의 총칭으로 (Figge et al., 1991), Deferasirox를 투여한 모든 실험구의 총단백질 수치는 27.6~32.9 (g/L) 범위로 13.9~24.4 (g/L) 범위를 기록한 대조구 수치 대비 전체적으로 높게 측정되었다 (Table 1). 한편, 간 손상 지표인 아스파테이트 아미노전이효소 (AST, aspartate aminotransferase) (Lala et al., 2023; McGill 2016; Chinnappan et al., 2023)의 수치는 50 μg의 Deferasirox를 투여하고 3일과 7일이 경과한 시점에서 94 (U/L)와 121 (U/L)의 범위로 확인되면서 21~87(U/L)의 범위를 기록한 대조구 대비 높게 확인되었다. 그러나, 투여 14일에 이르면 대조구의 측정 범위인 34(U/L)로 감소하는 것으로 확인되었다. 이는, 비교적 고농도인 50 μg의 Deferasirox 투여 초기 시점에만 돌돔의 간에 손상을 유발하는

것으로 판단할 수 있다 (Table 1). AST와 함께 간 손상 지표로 알려진 알카리 포스파타제 (ALP, alkaline phosphatase)는 (Lala et al., 2023; Johnston 1999), 50 μg의 Deferasirox 투여 3일, 7일, 14일이 경과한 시점에서 418~683 (U/L) 범위로 확인되면서 대조구 대비 높게 측정되었다 (Table 1). 비록, TP, AST, ALP의 수치가 대조구 대비 일부 높거나 낮게 측정되었음에도, 돌돔 체내에서는 Deferasirox 투여에 의한 간 조직의 색 변화, 복수 형성 등의 부작용은 보여지지 않았다. 따라서, Deferasirox가 돌돔에게 투여되었을 때 혈액 중의 효소, 단백질, 무기물, 지질 등의 수치에 미치는 영향은 없다고 판단된다.

Deferasirox의 단독 투여에 의한 생존어를 검출하기 위해서 선행된 Poly : IC 기반 연구에서의 투여시기를 토대로 (Jung and Jung 2017), i) 감염 1일 전, ii) 감염 1일 전 + 감염 1일 후, iii) 감염 1일 후, iv) 감염 2일 전, v) 감염 2일 전 + 감염 2일 후, vi) 감염 2일 후로 실험구를 구성하였다. 10 μg의 Deferasirox 투여에 의한 실험 결과, 2개의 실험구에서 (감염 1일 전 + 감염 1일 후, 감염 2일 전) 각각 20%, 30%의 상대생존율이 보여졌으며, 나머지 실험구는 전량 폐사에 이르렀다 (Fig. 1-A and B). 또한, 30 μg의 Deferasirox 투여에 의한 실험 결과, 2개의 실험구에서 (감염 1일 전 + 감염 1일 후, 감염 2일 전 + 감염 2일 후) 각각 20%, 20%의 상대생존율이 보여졌으며, 나머지 실험구는 전량 폐사에 이르렀다 (Fig. 1-C and D). 한편, 10 μg과 30 μg의 Deferasirox를 감염일로부터 2일 전후 간격으로 투여한 실험구는 30 μg 투여구에서만 생존한 개체가 관찰된 것으로 보아, 2일 전후 간격으로 투여 시 10 μg의 용량보다는 30 μg의 용량이 Deferasirox에 의한 항바이러스 면역반응을 유도하기에 적합한 시점 및 농도라고 판단된다. 이러한 결과와 유사하게, Poly : IC를 감염 전과 후로 2차례 투여한 실험구에서 60%의 상대생존율이 보여졌으며, 1차례 투여 시 33.4%의 상대생존율을 기록하였다 (Jung and Jung 2017). 이는, Deferasirox와 Poly : IC 등의 단독 투여에 의한 효과를 유도하기 위해서는, 1차례 투여보다는 감염 전과 후에 걸쳐서 2차례 투여를 하는 방법이 생존어 검출을 위해 효과적인

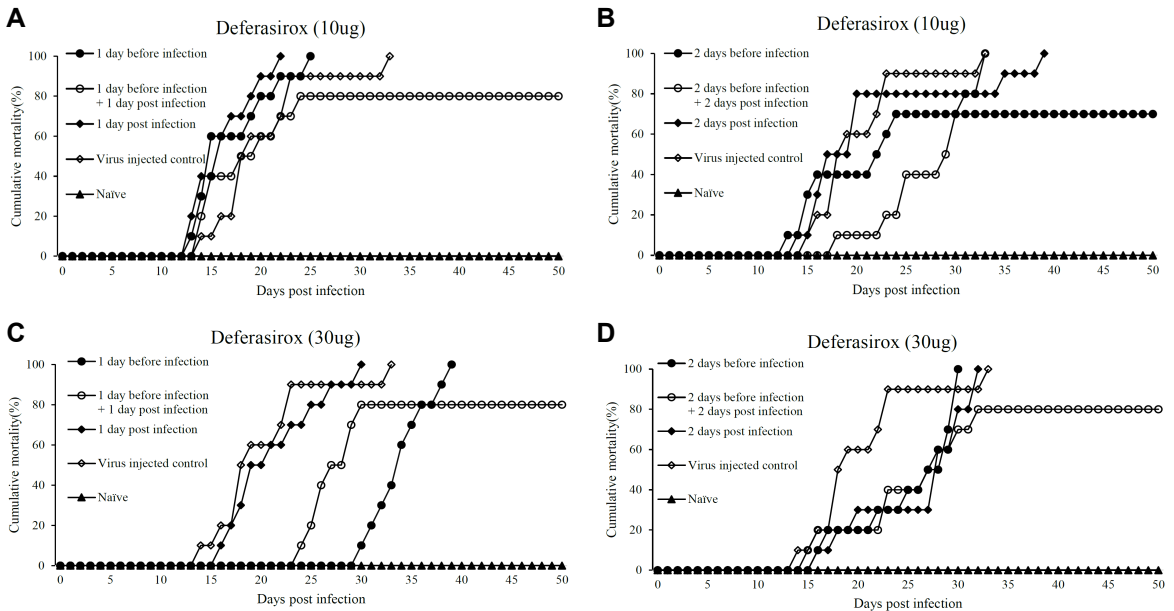


Fig. 1. The effect of Deferasirox on RBIV ($10^4/100 \mu\text{l}$, MCP gene copies) at 23°C . Fish were intraperitoneally (i.p.) injected with Deferasirox at $30 \mu\text{g}$ and $10 \mu\text{g}/\text{fish}$. (A and C) Deferasirox administration at 1 day before infection, 1 day before infection + 1 day after infection, and 1 day after infection. (B and D) Deferasirox administration at 2 days before infection, 2 days before infection + 2 days post infection, and 2 days post infection.

것을 의미하며, 용량 및 최적의 투여 시간대를 조절한다면 더 큰 효과가 있을 것으로 기대된다. EBV 양성 위암은 EBV 감염에 의해 발생하며, 바이러스의 용해 유도 요법을 통해 암세포를 제거하는 치료법이 연구되고 있다 (Cordes et al., 2023). Deferasirox는 EBV 양성 세포에서 용해 유도의 활성화를 통해 용해 유도 단백질인 BZLF1 (BamHI Z fragment leftward)과 BRLF1 (BamHI R fragment leftward)의 합성을 촉진함과 동시에 세포의 선택적 사멸을 효과적으로 유도하였다. 이는, Deferasirox가 위암을 유발하는 바이러스를 치료할 수 있는 잠재적인 후보군임을 의미한다.

Deferasirox 기반 불활화백신의 효능 평가 결과 (실험 1), Deferasirox + IV의 조합을 2차례 투여한 실험구에서만 25%의 상대생존율이 확인되었다 (Fig. 2A). Deferasirox + IV의 1차례 투여 및 Deferasirox 단독 투여 (1차례, 2차례), 불활화바이러스 투여 (1차례, 2차례), 바이러스 감염 대조구는 전량 폐사에 이르렀다 (Fig. 2A). 위의 결과를 토대로, Deferasirox 기반 불활화백신의 효능을 재평가

한 결과, 실험 1의 결과와 유사하게 Deferasirox + IV의 조합을 2차례 투여한 실험구에서만 15%의 상대생존율이 확인되었다 (Fig. 2B). 따라서, Deferasirox 기반 불활화백신 조합을 2차례 투여 시 15~25% 가량의 개체들이 생존에 이르는 것을 확인하였기에, 백신에 함유된 불활화바이러스의 농도와 Deferasirox의 농도 비율을 상향 조정하면 보다 많은 개체가 생존에 이를 수 있을 것이라 판단된다. 이와 유사하게, Saponin을 기반으로 제조한 불활화백신 연구에서도 동일 백신을 1차례 투여한 실험구보다 2차례 투여 시 보다 많은 개체가 생존에 이르는 것이 보여졌다 (Jung et al., 2022).

체내에서 활성화된 바이러스는 어종과 바이러스의 종류에 따라 온전히 억제되는 시간이 각기 다르게 나타난다. 신경괴사증바이러스 (nervous necrosis virus, NNV)에 감염된 능성어 (sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*)와 바이러스성 출혈성패혈증바이러스 (viral hemorrhagic septicaemia virus, VHSV)에 감염된 넙치 (olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)는 최종 폐사 후 약 10일이

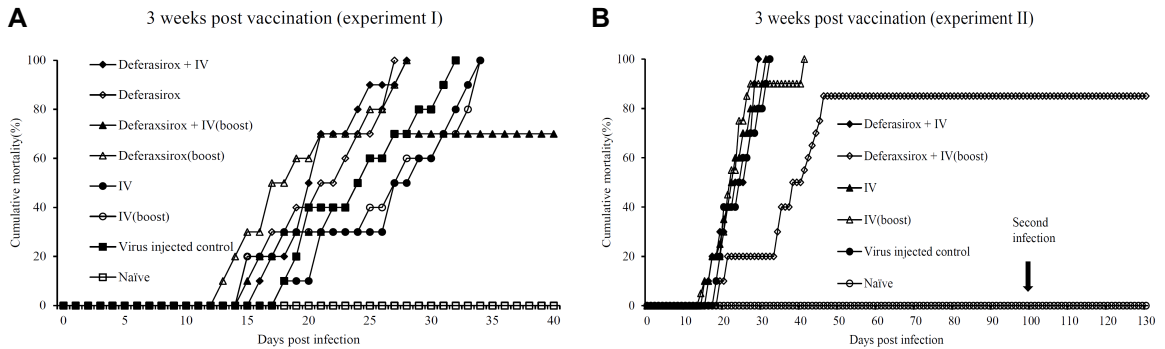


Fig. 2. The effect of Deferasirox-based inactivated RBIV vaccine on RBIV infection ($10^4/100 \mu\text{l}$, MCP gene copies) at 23°C . (A) 3 week post vaccination (experiment I) and (B) 3 week post vaccination (experiment II). To determine the long-term protection from surviving fish, re-infection ($10^7/100 \mu\text{l}$, MCP gene copies) was determine at 100 days post infection.

경과한 시점에서 생존한 개체들을 대상으로 바이러스 재감염 시 다수의 개체들이 생존에 이르면서 바이러스에 대한 방어력을 지니고 있음이 보여졌다 (Nishizawa et al., 2011; Nishizawa et al., 2012). 한편, 한번 활성화된 RBIV는 돌돔의 체내에서 쉽게 불활성화 되지 않기에, 바이러스가 체내에서 온전히 억제되려면 최종 폐사 후 적어도 50일 이상의 기간이 필요하며, 돌돔의 체내에서 천천히 억제됨이 보여진다 (Jung et al., 2017). 이에, RBIV에 감염 후 생존한 개체들의 방어력 유무 평가를 위해, 체내에서 바이러스가 온전히 억제되는 감염 후 100 일이라는 시점을 재감염의 기준점으로 설정하여 방어력 유무를 입증하고 있다 (Jung et al., 2017; Jung and Jung 2017; Jung et al., 2018; Jung et al., 2022a; Jung et al., 2022b). 본 연구에서도 생존한 개체들을 대상으로 감염 후 100일이 경과한 시점에서 $10^7/100 \mu\text{l}$ 수준의 바이러스를 재감염시킨 결과, 전량 생존하면서 돌돔의 체내에서는 바이러스 재노출에 대한 방어력이 형성되어 있음을 확인하였다. 따라서, 바이러스 감염으로부터 생존한 개체들은 연속적인 바이러스의 재노출에도 폐사에 이르지 않음을 의미하며, 선행연구에서 입증한 감염 후 400일이 경과한 시점에서 생존어를 대상으로 바이러스 재감염 수행 시 전량 생존에 이른 결과들 토대로, 한번 획득한 방어력은 최소 400일은 유지되는 것으로 보여진다 (Jung et al., 2017).

요 약

Rock bream iridovirus (RBIV)는 고수온기인 여름철에 대량폐사를 유발하여 국내의 돌돔 양식 산업에 지속적으로 큰 위협을 주고 있다. 본 연구에서는 Deferasirox의 단독 투여 또는 불활화바이러스와 혼합 투여를 통해 RBIV 감염으로부터 돌돔이 생존에 이르는지 평가하였다. Deferasirox ($50 \mu\text{g}$, $30 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}/\text{fish}$) 투여에 의한 혈액 생화학적 분석 결과 TP, AST, ALP 등의 수치는 대조군 대비 일부 높거나 낮게 측정되었으나, 폐사에 이르는 개체는 없었다. 감염 전과 후의 시점에 1~2일의 간격을 두고 Deferasirox ($30 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}/\text{fish}$) 단독 투여 시 20~30%의 상대생존율이 보여졌으며, Deferasirox ($10 \mu\text{g}/\text{fish}$)를 기반으로 제조한 불활화백신 투여 후 3주가 경과한 시점에서는 15~25%의 상대생존율이 확인되었다. 또한, 감염 후 100일까지 생존한 돌돔들은 바이러스 재감염에도 전량 생존에 이르면서 바이러스 재노출에 대하여 방어력을 형성하고 있음이 보여졌다. 이는, Deferasirox 투여에 의해 돌돔의 체내에서는 바이러스 감염에 대한 면역체계가 형성되고 바이러스의 증식이 억제되는 것으로 여겨진다.

사 사

이 논문은 한국연구재단 (RS-2023-00242225, 혈

엑세포 기반 돌돔이리도바이러스병 감염기전 연구)의 지원에 의해 진행되었음.

References

- Ince, İ. A., Özcan, O., Ilter-Akulke, A. Z., Scully, E. D., & Özgen, A. (2018). Invertebrate iridoviruses: a glance over the last decade. *Viruses*, 10(4), 161. <https://doi.org/10.3390/v10040161>
- Kurita, J., & Nakajima, K. (2012). *Megalocytiviruses*. *Viruses*, 4(4), 521-538. <https://doi.org/10.3390/v4040521>
- Qin, P., Munang'andu, H. M., Xu, C., & Xie, J. (2023). Megalocytivirus and other members of the family iridoviridae: a review of the etiology, epidemiology, diagnosis, prevention and control. *Viruses*, 15(6), 1359. <https://doi.org/10.3390/v15061359>
- Subramaniam, K., Shariff, M., Omar, A. R., & Hair-Bejo, M. (2012). Megalocytivirus infection in fish. *Reviews in Aquaculture*, 4(4), 221-233. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01075.x>
- Min, J. G., Jeong, Y. J., Jeong, M. A., Kim, J. O., Hwang, J. Y., Kwon, M. G., & Kim, K. I. (2021). Experimental transmission of red sea bream iridovirus (RSIV) between rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Journal of fish pathology*, 34(1), 1-7. <https://doi.org/10.7847/jfp.2021.34.1.001>
- Kim, K. H., Kang, G., Woo, W. S., Sohn, M. Y., Son, H. J., Kwon, M. G., ... & Park, C. I. (2023). Impact of red sea bream iridovirus infection on rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and other fish species: a study of horizontal transmission. *Animals*, 13(7), 1210. <https://doi.org/10.3390/ani13071210>
- Jung, S. J., & Oh, M. J. (2000). Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beak-perch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *Journal of Fish Diseases*, 23(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00212.x>
- Jung, M. H., Lee, J., Ortega-Villaizán, M., Perez, L., & Jung, S. J. (2017). Protective immunity against Megalocytivirus infection in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) following CpG ODN administration. *Vaccine*, 35(30), 3691-3699. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.073>
- Kim, S. J., Lee, S. J., Jung, S. J., & Jung, M. H. (2024). Effect of rock bream iridovirus (RBIV) contained tissue intake on rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) mortality and blood cell distribution. *Fish & Shellfish Immunology*, 153, 109858. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109858>
- Inouye K., Yamano K., Nakajima K., Matsuoko M., Wada Y. & Sorimachi M. (1992) Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology* 2, 19-27. <https://doi.org/10.3147/jsfp.27.19>
- Jung, S., Miyazaki, T., Miyata, M., Danayadol, Y., & Tanaka, S. (1997). Pathogenicity of iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major* in Japan, and histopathology of experimentally infected fish. *Fisheries science*, 63(5), 735-740. <https://doi.org/10.2331/fishsci.63.735>
- Kim, W. S., Oh, M. J., Jung, S. J., Kim, Y. J., & Kitamura, S. I. (2005). Characterization of an iridovirus detected from cultured turbot *Scophthalmus maximus* in Korea. *Diseases of aquatic organisms*, 64(2), 175-180. <https://doi.org/10.3354/dao064175>
- Sano, M., Minagawa, M., & Nakajima, K. (2002). Multiplication of red sea bream iridovirus (RSIV) in the experimentally infected grouper *Epinephelus malabaricus*. *Fish Pathology*, 37(4), 163-168. <https://doi.org/10.3147/jsfp.37.163>
- Chao, C. B., Chen, C. Y., Lai, Y. Y., Lin, C. S., & Huang, H. T. (2004). Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus* hybrids infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Diseases of aquatic organisms*, 58(2-3), 127-142. <https://doi.org/10.3354/dao058127>
- Wang, C. S., Shih, H. H., Ku, C. C., & Chen, S. N. (2003). Studies on epizootic iridovirus infection among red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel), cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, 26(3), 127-133. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00441.x>
- Xu, X., Liu, L., Feng, J., Li, X., & Zhang, J. (2022). Comparative transcriptome analysis reveals potential anti-viral immune pathways of turbot (*Scophthalmus maximus*) subverted by megalocytivirus RBIV-C1 for immune evasion. *Fish & Shellfish Immunology*, 122, 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.02.005>
- Kwon, W. J., Choi, J. C., Hong, S., Kim, Y. C., Jeong, M. G., Min, J. G., ... & Do Jeong, H. (2020). Development of a high-dose vaccine formulation for prevention of megalocytivirus infection in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Vaccine*, 38(51), 8107-8115. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.001>
- Wang, W., Xiao, Z. Z., & Sun, L. (2013). The megalocytivirus-induced protein CsMig1 enhances Cyno-

- glossus semilaevis resistance against viral infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 151 (1-2), 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.11.005>
- Jung, M. H., & Jung, S. J. (2017). Protective immunity against rock bream iridovirus (RBIV) infection and TLR3-mediated type I interferon signaling pathway in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) following poly (I: C) administration. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.026>
- Jung, M. H., Jung, S. J., Vinay, T. N., Nikapitiya, C., Kim, J. O., Lee, J. H., ... & Oh, M. J. (2015). Effects of water temperature on mortality in Megalocytivirus-infected rock bream *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel) and development of protective immunity. *Journal of fish diseases*, 38(8), 729-737. <https://doi.org/10.1111/jfd.12286>
- Jung, M. H., Lee, J., & Jung, S. J. (2016). Low pathogenicity of flounder iridovirus (FLIV) and the absence of cross-protection between FLIV and rock bream iridovirus. *Journal of Fish Diseases*, 39(11), 1325-1333. <https://doi.org/10.1111/jfd.12459>
- Olivieri, N. F., Nathan, D. G., MacMillan, J. H., Wayne, A. S., Liu, P. P., McGee, A., ... & Cohen, A. R. (1994). Survival in medically treated patients with homozygous β -thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 331(9), 574-578. <https://doi.org/10.1056/nejm199409013310903>
- Liu, W., Zhang, S., Nekhai, S., & Liu, S. (2020). Depriving iron supply to the virus represents a promising adjuvant therapeutic against viral survival. *Current clinical microbiology reports*, 7, 13-19. <https://doi.org/10.1007/s40588-020-00140-w>
- Schaible, U. E., & Kaufmann, S. H. (2004). Iron and microbial infection. *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), 946-953. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1046>
- Cassat, James E., and Eric P. Skaar. 2013. "Iron in Infection and Immunity." *Cell Host & Microbe* 13 (5): 509-19. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.010>
- Nairz, M., Schroll, A., Sonnweber, T., & Weiss, G. (2010). The struggle for iron—a metal at the host–pathogen interface. *Cellular microbiology*, 12(12), 1691-1702. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01529.x>
- Hamilton, J. L., Hatef, A., Imran ul-haq, M., Nair, N., Unniappan, S., & Kizhakkedathu, J. N. (2014). Clinically approved iron chelators influence zebrafish mortality, hatching morphology and cardiac function. *PLoS One*, 9(10), e109880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109880>
- Kono, M., Saigo, K., Yamamoto, S., Shirai, K., Iwamoto, S., Uematsu, T., ... & Kawano, S. (2016). Iron-chelating agent, deferasirox, inhibits neutrophil activation and extracellular trap formation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(10), 915-920. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12612>
- Votavova, H., Urbanova, Z., Kundrat, D., Dostalova Merkerova, M., Vostry, M., Hrubá, M., ... & Belickova, M. (2021). Modulation of the immune response by deferasirox in myelodysplastic syndrome patients. *Pharmaceuticals*, 14(1), 41. <https://doi.org/10.3390/ph14010041>
- Matsuda, S., & Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 47(2-3), 119-125. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(00\)00192-2](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(00)00192-2)
- Jung, Y. S., Bae, E. Y., Chung, N. G., Cho, B., Kim, H. K., Min, C. K., ... & Jeong, D. C. (2008). Comparison of immune responses induced by deferoxamine and deferasirox. *The Korean Journal of Hematology*, 43(3), 150-158. <https://doi.org/10.5045/kjh.2008.43.3.150>
- Cordes, B. L. A., Bilger, A., Kraus, R. J., Ward-Shaw, E. T., Labott, M. R., Lee, S., ... & Mertz, J. E. (2023). Drugs That Mimic Hypoxia Selectively Target EBV-Positive Gastric Cancer Cells. *Cancers*, 15(6), 1846. <https://doi.org/10.3390/cancers15061846>
- Cappellini, M. D., Cohen, A., Piga, A., Bejaoui, M., Perrotta, S., Agaoglu, L., ... & Alberti, D. (2006). A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with β -thalassemia. *Blood*, 107(9), 3455-3462. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3430>
- Jung, M. H., Nikapitiya, C., Song, J. Y., Lee, J. H., Lee, J., Oh, M. J., & Jung, S. J. (2014). Gene expression of pro-and anti-apoptotic proteins in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) infected with megalocytivirus (family Iridoviridae). *Fish & shellfish immunology*, 37(1), 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.012>
- Amend, D. F. (1981). Potency testing of fish vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, 49, 447-454. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570854175051651456>
- Figge, J., Rossing, T. H., & Fencl, V. (1991). The role of serum proteins in acid-base equilibria. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 117(6), 453-467. <http://europepmc.org/abstract/MED/2045713>
- Lala, V., Zubair, M., & Minter, D. (2023). Liver function tests. *StatPearls. Liver Function Tests | Treatment*

& Management | Point of Care

- McGill, M. R. (2016). The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI journal*, 15, 817. <https://doi.org/10.17179/excli2016-800>
- Chinnappan, R., Mir, T. A., Alsalameh, S., Makhzoum, T., Alzhrani, A., Al-Kattan, K., & Yaqinuddin, A. (2023). Low-cost point-of-care monitoring of ALT and AST is promising for faster decision making and diagnosis of acute liver injury. *Diagnostics*, 13(18), 2967. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13182967>
- Johnston, D. E. (1999). Special considerations in interpreting liver function tests. *American family physician*, 59(8), 2223-2230. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/1999/015/p2223.html>
- Jung, M. H., Kole, S., & Jung, S. J. (2022a). Efficacy of saponin-based inactivated rock bream iridovirus (RBIV) vaccine in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 121, 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.047>
- Nishizawa, T., Takami, I., Yang, M., & Oh, M. J. (2011). Live vaccine of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) for Japanese flounder at fish rearing temperature of 21°C instead of Poly (I: C) administration. *Vaccine*, 29(46), 8397-8404. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.032>
- Nishizawa, T., Gye, H. J., Takami, I., & Oh, M. J. (2012). Potentiality of a live vaccine with nervous necrosis virus (NNV) for sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* at a low rearing temperature. *Vaccine*, 30(6), 1056-1063. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.033>
- Jung, M. H., Nikapitiya, C., & Jung, S. J. (2018). DNA vaccine encoding myristoylated membrane protein (MMP) of rock bream iridovirus (RBIV) induces protective immunity in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Vaccine*, 36(6), 802-810. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.077>
- Jung, M. H., Nikapitiya, C., Kim, S. J., Han, H. J., Kim, M. S., Choi, H. S., & Jung, S. J. (2022b). Protective immunity induced by ankyrin repeat-containing protein-based DNA vaccine against rock bream iridovirus (RBIV) in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Virus Research*, 318, 198827. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198827>

Manuscript Received: Nov 14, 2024

Revised: Nov 30, 2024

Accepted: Dec 04, 2024