

CFC-101(녹농균 백신)의 능동 및 수동면역 효과

박완제* · 조양제 · 김영지 · 김제학 · 박관하 · 김유삼¹ · 함경수²

제일제당 종합연구소, ¹연세 대학교 생화학과, ²유전공학 연구소

Active and Passive Protective Effect of CFC-101 (Pseudomonas Vaccine) in Mice

Wan Je PARK*, Yang Je CHO, Young Gi KIM, Je Hak KIM
Kwan Ha PARK, Yu Sam KIM¹ and Kyung Soo HAHM²

R&D Center, Cheil Foods and Chemicals Inc, Majang, Ichon, Kyonggi 467-810, Korea

¹Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

²Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Taejon 305-600, Korea

(Received October 28, 1994; accepted December 5, 1994)

Abstract—The treatment of pseudomonal infection is a perplexed problem because of its modest susceptibility to most of the major antibiotics. A novel *Pseudomonas* vaccine(CFC-101) was prepared from the outer membrane protein fractions of several *Pseudomonas* strains. In this study, we examined CFC-101's effectiveness in both active and passive immunization models. CFC-101 in mice at 0.2 mg/kg, i.p., given three times at two-day intervals, completely prevented the death caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Antibody titer, in accordance with the protective effect in this active immunization, was elevated to its peak level following three consecutive administrations of CFC-101. Thereafter, antibody titer stayed at a constantly high level. Each outer membrane protein fraction from the four CFC-101 producers, exhibited good cross-protective effects in mouse infection models against different Fisher types of *P. aeruginosa*. In the passive immunization model, 21~336 µg/kg of anti-rabbit IgG to CFC-101, when mice being infected with a challenge strain, prevented the *Pseudomonas*-induced death up to 60%. Therefore, the preventive effect of CFC-101 was verified in both the active and passive immunization models.

Keywords □ *Pseudomonas* vaccine, CFC-101, cross-protective effect, active immunization, passive immunization

녹농균은 패혈증, 만성기도 감염증, 췌낭포성 섬유증 등의 난치성 감염을 일으키는 병원성 세균이다(Bodey 등, 1983). 특히 녹농균에 의해 야기되는 패혈증은 수술, 열상 및 외상 등에 의해 저항력이 저하된 환자의 혈액 중에 미생물이 침입하여 고열, 혈압저하 등의 쇼크를 일으켜 결국 사망에 까지 이르게 하는 것으로 알려져 있다(Pruitt, 1974). 따라서, 녹농균에 의해 야기되는 난치성 감염증을 효과적으로 치료할 수 있는 약제의 개발이 절실히 요구되어 왔다. 그러나, 녹농균은 많은 항생제에 대해 내성을 가지고 있을 뿐만 아니라, 형태가 다양하여 현재까지도 좋은 효과를 가지는 치료제가 개발되어 있지 않아 녹농균 감염증이 심각한 문제점으로 지적되고 있다.

따라서 녹농균 감염증 예방과 치료에는 면역요법이 유망한 방법으로 제안되고 있다(Pennington, 1990a; Pennington, 1990b).

최근에는 녹농균 감염증에 대한 예방 또는 치료를 목적으로 공통 항원을 이용하는 방법이 적극적으로 연구되고 있다. 현재 공통 항원에 대한 연구는 크게 두 가지 분야로 분류할 수 있다. 하나는, 서로 다른 면역 형태를 가진 녹농균들로부터 공통항원을 분리 정제하여 녹농균 감염증에 대한 예방 백신용 항원으로 사용하는 방법이며(Abe 등, 1975), 다른 하나는, 최근에 급속도로 발전되고 있는 유전공학적인 방법(Woodruff 등, 1986)에 의해 이 항원의 유전자를 적절한 벡터에 재조합시켜 형질발현시킨 후, 공통 항원을 대량 생산하여 항원으로 사용하려는 시도이다.

*To whom correspondence should be addressed.

공통항원을 사용한 예방 백신의 개발은 매우 효과적인 접근 방법이지만, 가장 결정적인 결점은 공통항원 한가지만으로 여러 종류의 면역형태를 가진 녹농균을 모두 예방할 수 없기 때문에 효과가 낮다는 점이다(Homma, 1982). 그러므로 면역원성을 높이기 위해 녹농균 주로부터 세포외막 단백질을 분리하여 항원백신으로 사용하는 방법이 제안되었다(Stanislavsky 등, 1989). 그러므로 녹농균 감염환자로 부터 분리된 녹농균을 면역 형태에 따라 7종으로 구분(Fisher 등, 1969)하여 이들 중 국내 및 외국에서 가장 감염율이 높은 Fisher 1형, 2형, 3형 및 6형(Jang 등, 1982)에 각각 상응하는 *P. aeruginosa* CFCPA10142, CFCPA20215, CFCPA30720 및 CFCPA60534를 선발하여 일련의 약독화 과정을 거쳐서 세포외막 단백질을 분리 정제하였으며 독성이 적으면서도 방어 효과가 우수한 녹농균 백신을 개발하게 되었다.

본 연구에서는 세포외막 단백질을 주성분으로 하는 CFC-101(녹농균 백신)의 녹농균 감염에 대한 능동 및 수동 면역 효과에 대해서 mouse model을 이용해서 알아보고자 하였다.

실험 방법

백신제조, 감염균주 및 실험동물

시험 물질은 제일제당(주) 종합연구소에서 4가지 녹농균, 즉 *P. aeruginosa* CFCPA10142, CFCPA20215, CFCPA30720 및 CFCPA60534의 세포외막 단백질을 분리 정제하였으며, 단독 또는 단백질 함량기준으로 동량 혼합하여 녹농균 백신(CFC-101)을 제조하였다. 감염균주로 *P. aeruginosa* 12(IATS Type 14), *P. aeruginosa* GN11 189(IATS Type 8, Fisher 6형) 및 국내 대학병원에서 분리한 임상균주로 부터 Fisher 1~7형에 각각 해당하는 CFCPA10142(F1), CFCPA20215(F2), CFCPA30720(F3), CFCPA40057(F4), CFCPA50243(F5), CFCPA60534(F6) 및 CFCPA70018(F7)를 선별하여 사용하였다. 실험 동물로는 6주령, 25~30g의 웅성 ICR mouse 및 3개월, 2.5kg의 웅성 Japanese white rabbit를 사용하였다.

생산균주의 능동 교차방어 효과

CFC-101의 제조에 사용되는 4가지의 녹농균, 즉 Fisher type 1형, 2형, 3형 및 6형으로 부터 세포외막 단백질을 순수하게 분리 정제하여 동결건조한 각각을 항원으로 하여, 단백질을 1.0 mg/kg의 용량으로 각 균접종용량 당 10마리의 웅성 ICR mouse에 1주일 간격으로 3회 복강내 투여하여 면역시켰다. 대조군에는 백신 대신에 생리식염수를 시험군과 동일한 방법으로 투여하였다. 최종투여일로 부터 4일 경과후에 1형에서 7형까지의 각 Fisher type의 감염용 시험균주를 각 감염균주 당 5 단계의 균접종용량으로 시험군 및 대조군 각각의 마우스 복강내에 접종하였다. 접종 후 7일간 마우스의 생존율을 관찰하고, 생존율에 근거하여 시험군

및 대조군의 LD₅₀치(cfu/mouse)를 각각 구하고, 이를 이용하여 Index of efficacy(EI)를 구하였다. EI를 계산식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\text{Index of efficacy(EI)} = \frac{\text{시험군의 LD}_{50}(\text{cfu/mouse})}{\text{대조군의 LD}_{50}(\text{cfu/mouse})}$$

교차감염 방어효과는 Fisher type이 동일한 균주로 공격감염시킨 군의 EI에 대한 Fisher type이 다른 균주로 공격감염시킨 군의 EI의 백분율로서 나타내었다. 계산식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\begin{aligned} & \text{교차감염 방어효과(\%)} \\ & = \frac{\text{다른 Fisher type 균주로 감염시킨 군의 EI}}{\text{동일 Fisher type 균주로 감염시킨 군의 EI}} \times 100 \end{aligned}$$

항체 역가 측정(ELISA)

녹농균 백신을 매회 0.2 mg/kg의 용량으로 웅성 ICR mouse에 2일 간격으로 3회 복강내 투여하면서 2일 간격으로 5마리의 마우스 심장에서 각각 채혈해서 혈청을 분리하고, 항체 역가를 ELISA 방법으로 측정하였다.

단백질 농도 10 µg/ml이 함유되도록 녹농균 백신 표준품을 0.05 M carbonate 완충용액(pH 9.6)으로 적절히 희석한 다음, 96 well plate에 각 well당 200 µl씩 넣고 4°C에서 16시간 동안 반응시켜 plate에 단백질을 부착시킨 다음, 수용액을 제거하고 여기에 1% 우혈청 알부민(BSA) 300 µl를 가하여 2시간 동안 반응시켜 단백질 비결합 부분을 차단시킨 후, PBST(0.05% Tween 20이 포함된 인산염 완충용액)로 세척하였다. 이때 0.1 mg/ml 농도인 표준항체 및 시험항체를 인산염 완충 용액으로 계열 희석하여 100 µl씩 첨가한후, 37°C에서 2시간 동안 반응시키고 PBST로 5회 세척하였다. 다음 2차 항체인 goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate를 100 µl씩 가하여 37°C에서 1시간 반응 시킨후 PBST로 7회 이상 세척하였다. 여기에 사용한 기질로서는 0.1 M citrate phosphate 완충용액(pH 5.0)에 1.0 µl/ml의 과산화수소(30% H₂O₂)와 o-phenylenediamine dihydrochloride를 0.3~0.4 mg/ml의 농도로 조정하여 100 µl씩 첨가하고 10분간 차광하에서 반응시킨 후, 1N H₂SO₄ 50 µl씩을 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응 용액을 분광 광도계를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 항체를 사용하여 얻어진 검량선으로 부터 시험항체의 역가를 구하였다.

능동 면역 효과

녹농균 백신을 매회 0.2 mg/kg의 용량으로 24마리의 웅성 ICR mouse에 2일 간격으로 3회 복강내 투여하고, 최종 투여 4일 후에 *P. aeruginosa* 12(challenge dose, 1.8×10⁷ cfu/mouse)를 복강내에 감염시킨 다음 7일간 생존율을 관찰하였다. 웅성 대조군에는 백신 대신에 생리식염수를 투여하는 것을 제외하고는 백신 투여군과 동일하게 시험하였다.

토끼 혈청의 제조 및 수동 면역 효과

제조한 녹농균 백신 표준품을 인산염 완충용액(PBS, pH 7.2)으로 적절히 희석하여 rabbit 당 0.2 mg 용량을 10일 간격으로 3회 피하투여하고, 7일후 녹농균 백신에 대한 항체 생성 여부를 확인한 다음, 채혈하여 1시간 이상 상온 보관 후 냉장고에서 12시간 이상 방치한 다음 6000 rpm으로 20분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 이 혈청을 Protein A column(Pharmacia, Upsala, Sweden)을 이용하여 혈청으로 부터 순수한 IgG를 분리정제하여 실험에 사용하였다. Bradford 방법을 이용한 단백질 정량법으로 정제된 IgG의 함량을 측정하였다(Bradford, 1976). 정제된 IgG를 21, 84 및 336 µg/kg의 용량으로 각 군당 10 마리의 웅성 ICR mouse의 복강내에 투여하고 2시간 후에 *P. aeruginosa* GN11189(challenge dose, 6.7×10^7 cfu/mouse)를 mouse의 복강내에 감염시킨 다음 7일간 생존율을 관찰하였다.

실험 결과

생산균주의 능동 교차방어 효과

CFC-101의 제조에 사용되는 4가지의 녹농균, 즉 Fisher type 1형, 2형, 3형 및 6형 각각의 균으로 부터 세포외막 단백질을 순수하게 분리 정제한 항원을 투여한 마우스 시험군의 LD₅₀와 생리식염수만을 투여한 대조군의 LD₅₀에서 EI를 산정하였다. 이를 근거로 하여 CFC-101의 제조에 사용되는 각각의 녹농균과 Fisher type이 동일한 균으로 감염시킨 균의 EI에 대해 Fisher type이 다른 균으로 감염시킨 균의 EI의 백분율로서 능동교차 방어능력을 구하여 Table I에 나타내었다.

CFCPA10142(F1)의 세포외막 단백질을 항원으로 사

용하여 면역시키는 경우 공격용 균주로 사용한 모든 Fisher type들에 대해서 50% 이상의 높은 교차 방어 능력을 보여주고 있으며, 특히 F3에 대해서는 100%, F2에 95%, F5에 82%의 우수한 교차 감염방어 효과를 보였다. CFCPA20215(F2)의 경우는 단지 F3에 대해서만 41%의 교차 방어 능력을 보여주고 있고, CFCPA30720(F3)의 경우는 Fisher type이 다른 균주에 대해 20% 이하의 교차방어효과를 보였다. 또한 CFCPA60534(F6)의 경우는 F3, F4 및 F5에 대해서 50% 이상의 교차 방어 효과를 보였으며, F7에 대해서도 40%의 방어능력이 있음을 알 수 있었다.

항체역가 측정

녹농균 백신을 ICR mouse에 매회 0.2 mg/kg 용량으로 복강내에 2일 간격, 3회 투여한 후 심장 채혈하여 ELISA 방법으로 항체 역가를 측정하였다. Fig. 1은 투여횟수 및 날짜에 따른 항체역가의 변화 곡선을 나타낸 것이다. 이때 mouse 혈청을 1차항체로 사용하였고, peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG를 2차항체로 사용하였다. 백신 투여군에서는 3회 투여 후에 가장 높은 역가를 나타내었고, 이후에는 변화를 거의 보이지 않았다. 생리식염수를 투여한 음성대조군은 기준선의 항체 역가를 유지하였다.

능동 면역 효과

녹농균 백신을 매회 0.2 mg/kg의 용량으로 2일 간격, 3회 복강내 투여하고, 최종 투여 4일 후에 *P. aeruginosa* 12를 복강내에 감염시킨 다음 7일간 생존율을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 녹농균 백신 투여군은 100%(24/24)의 생존율을 보인 반면에, 생리식염수를 투여한 음성 대조군의 경우는 4.2%(1/24)의 생존율을 보였다.

Table I. Active cross-protection of ICR mice following immunization with various outer membrane proteins of different origin.

| Source organism of outer membrane proteins ^{a)} | Percent cross-protection against challenged strain ^{b)} | | | | | | |
|--|--|-----|-----|----|----|-----|----|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 |
| CFCPA10142(F1) | 100 | 95 | 100 | 70 | 82 | 54 | 62 |
| CFCPA20215(F2) | 15 | 100 | 41 | 15 | 20 | 17 | 17 |
| CFCPA30720(F3) | 7 | 11 | 100 | 12 | 12 | 11 | 19 |
| CFCPA60534(F6) | 18 | 31 | 52 | 61 | 66 | 100 | 40 |

^{a)}Outer membrane proteins from producers were, respectively, immunized intraperitoneally three times at the intervals of one week with the dose of 1.0 mg/kg as protein into male ICR mice. Challenge strains of each Fisher type were inoculated intraperitoneally day 4 after final immunization. In both the treated and control groups, mice were challenged with five dose levels of two-fold serial dilutions with ten mice per dose.

$$\text{Index of efficacy(EI)} = \frac{\text{LD}_{50}(\text{cfu/mouse}) \text{ of treated group}}{\text{LD}_{50}(\text{cfu/mouse}) \text{ of control group}}$$

^{b)}Challenge strains of each Fisher type *P. aeruginosa* for infection were used as follows: CFCPA10142 for F1, CFCPA20215 for F2, CFCPA30720 for F3, CFCPA40057 for F4, CFCPA50243 for F5, CFCPA60534 for F6 and CFCPA70018 for F7. The values for the different Fisher type strains in this table represent percentage converted in proportion to the index of efficacy calculated from the median lethal doses when the same Fisher type strain was inoculated into mice.

$$\text{Cross-protection(\%)} = \frac{\text{EI of heterologous challenge strain}}{\text{EI of homologous challenge strain}} \times 100$$

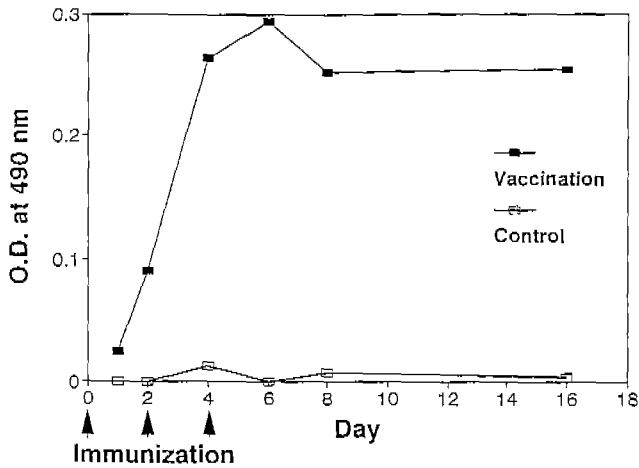


Fig. 1. Antibody titration curve of CFC-101 by ELISA method following 3 times intraperitoneal administration at intervals of 2 days with 0.2 mg/kg in mice.

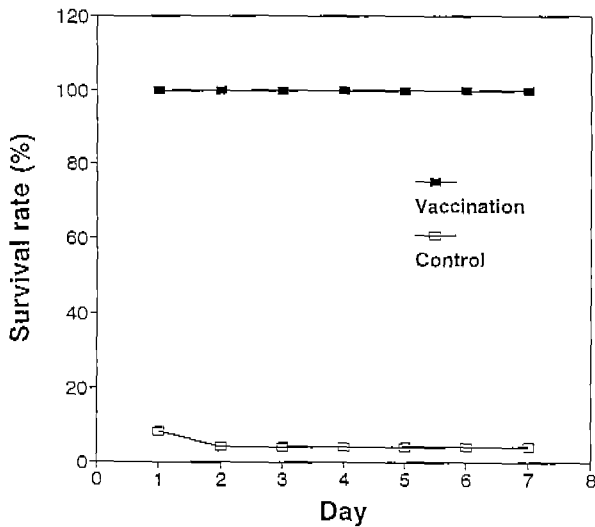


Fig. 2. Active protection by immunization with CFC-101 in mice.

수동 면역 효과

Fig. 3에서 보는 바와 같이 녹농균 백신을 토끼에 3회 피하투여한 후 채혈하여 정제한 IgG를 각 군당 10마리의 mouse에 336 μ g/kg 용량으로 투여한 군에서는 60%, 84 μ g/kg 용량 투여군에서는 40% 그리고 21 μ g/kg 용량 투여군에서는 30%의 생존율을 나타내어 용량 상관성이 있는 수동면역효과를 보였으며, 음성대조군은 0%의 생존율을 나타내었다.

고 찰

CFC-101의 제조에 사용된 4종류의 녹농균은 국내의 병원에서 감염 빈도가 높은 Fisher type 으로서 각각 1, 2, 3 및 6 형에 속한다.

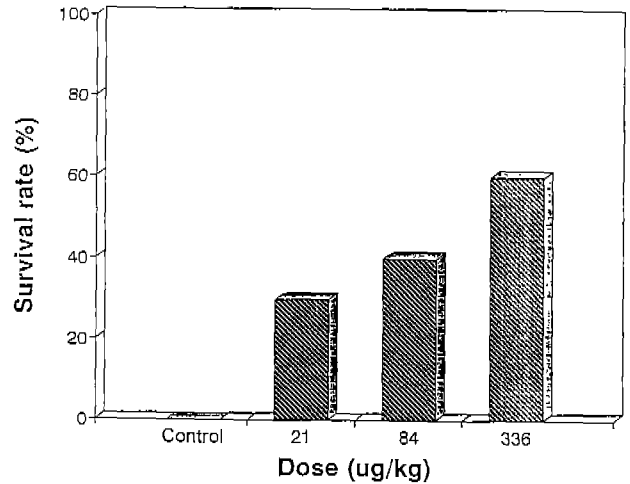


Fig. 3. Protective efficacy by passive immunization of anti-rabbit IgG to CFC-101 in mice.

Table I에서 보는 바와 같이 각 균주로 부터 얻어진 세포외막 단백질을 항원으로 사용하여 면역시키는 경우에 같은 Fisher type의 공격용 균주 뿐만 아니라 다른 Fisher type의 균주에 대해서도 우수한 감염방어 효과를 보여주고 있다. 특히 CFCPA10142(Fisher type 1)의 세포외막 단백질 항원으로 면역시키는 경우에는 Fisher type 1에서 7의 공격용 균주에 대해 적어도 50% 이상의 우수한 교차 감염방어효과를 보여주고 있으며, CFCPA 60534(Fisher type 6)의 세포외막 단백질 항원의 경우에도 4가지 Fisher type(F3, F4, F5 및 F6)에 대해 50% 이상의 우수한 교차 감염방어효과를 보여 주었다. 따라서 4개의 백신 생산균주로 부터 세포외막 단백질을 동량 혼합하여 제조한 CFC-101은 1형에서 7형의 모든 Fisher type 감염균에 대해서 우수한 교차 감염방어 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

녹농균 백신의 mouse에서의 항체역가 생성곡선의 경향은 2일 간격으로 백신을 1회 및 2회 투여시 계속 증가하다가 3회 투여시 최고 높은 항체역가를 나타낸 후, 8일 이후까지 높은 농도를 유지하였다(Fig. 1).

본 녹농균 백신의 능동면역효과를 확인하기 위하여, 0.2 mg/kg 용량으로 2일 간격, 3회 복강내 투여하고, 최종투여 4일 후에 *P. aeruginosa* 12(IATS Type 14)를 균주를 공격시켰을 경우에, 100%의 완전한 생존율을 보이는 것으로 보아 4개의 백신 생산균주로 부터 제조한 CFC-101도 우수한 감염방어 효과가 있음을 입증하였다. CFC-101이 각종 Fisher type 녹농균 감염에 대해 충분한 교차 감염방어효과가 있음을 보여주기 위해서는 향후 더 많은 감염균주에 대한 확대시험을 수행할 필요성이 있다.

녹농균 백신을 토끼에 투여하여 얻어진 토끼 항혈청의 수동 면역효과를 *P. aeruginosa* GN11189(Fisher type 6)를 감염시킨 mouse에서 확인하였다. IgG의 투여용량을 336, 84 및 21 μ g/kg으로 투여한 결과, 생존율이 각각

60%, 40% 및 30%로 용량상관성이 있는 감염방어 효과를 보였으며, 수동면역제제가 녹농균 감염증의 치료제로서 가능성이 있음을 시사하였다. 따라서 본 녹농균 백신이 사람에게 감염 빈도가 높은 혈청형의 녹농균에 대해 감염방어효과가 높을 뿐만 아니라, 수동면역에 의한 치료 효과도 우수하기 때문에 향후 본 백신의 약효적인 측면에서 기존의 항생제에 의존하던 녹농균 감염증에 대한 새로운 감염방어수단으로서의 가능성을 제시하는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Abe, C., Shionoya, H., Hirao, Y., Okada, K. and Homma, J. Y. (1975). Common Protective antigen(OEP) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Exp. Med.* **45**, 355-359.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **723**, 248-254.
- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. and Jadeja, L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 279-313.
- Chang, W. H., Choi, M. S., Rhee, K. H. and Suk, J. S. (1982). 녹농균증에 대한 다가 녹농균 백신 효과의 실험적 연구. *Seoul J. Med.* **23**, 436-442.
- Fisher, M. W., Devlin, H. B. and Gnabsik, F. J. (1969). New immunotype schema for *Pseudomonas aeruginosa* based upon protective antigens. *J. Bacteriol.* **98**, 835-836.
- Homma, J. Y. (1982). Perspectives on the development of a new vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection. In : Eason CSF, Jeljaszewicz J, eds. *Medical microbiology*. **1**, New York : Academic Press, 389-431.
- Pennington, J. E. (1990). *Pseudomonas aeruginosa* immunotherapy. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **9**, 377-380.
- Pennington, J. E. (1990). *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccines and immunotherapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **4**, 259-270.
- Pruitt, B. A., Jr. (1974). Infections caused by *Pseudomonas* species in patients with burns and in other surgical patients. *J. Inf. Dis.* **130**(Suppl.) S8-S13.
- Stanislavsky, E. S., Edvabnaya, L. S., Bandman, O. A., Bolk, V. F., Zhvanetskaya, M. I. and Vargina, A. K. (1989). Experimental studies on the protective efficacy of a *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* **7**, 562-566.
- Woodruff, W. A., Parr, T. R., Hancock, R. E. W., Hanne, L., Nicas, T. I. and Iglewski, B. (1986). Expression in *Escherichia coli* and function of porin protein F of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **167**, 473-479.