

기니픽과 마우스에서 CFC-101(녹농균 백신)의 항원성시험

백남진 · 김달현 · 이동억 · 선우연¹ · 한형미¹
정승태¹ · 김필선¹ · 김현수*

제일제당 종합연구소, ¹국립보건안전연구원 독성부

Antigenicity of CFC-101(*Pseudomonas* vaccine) in Guinea Pigs and Mice

Nam Jin BAEK, Dal Hyun KIM, Dong Eok LEE, Yearn SUNWOO¹, Hyung Mee HAN¹
Seung Tae CHUNG¹, Pil Sun KIM¹ and Hyun Su KIM*

R&D Center, Cheil Foods and Chemicals Inc, 522-1 Dokpyong-Ri, Majang-Myon,
Ichon-Gun, Kyonggi-Do 467-810, Korea

¹Dept. of Toxicology, National Institute of Safety Research, 5 Nokbun-Dong,
Eunpyung-Ku, Seoul 122-020, Korea

(Received October 28, 1994; accepted November 11, 1994)

Abstract—As a part of the safety evaluation of *Pseudomonas* vaccine(CFC-101), antigenicity tests were carried out in guinea pigs and mice. In active systemic anaphylaxis(ASA) test, guinea pigs showed no sign or only moderate sign(1/5) when sensitized and challenged with up to 200 μ g/kg. In homologous passive cutaneous anaphylaxis(PCA) test using guinea pigs, inoculation of CFC-101 alone did not produce CFC-101-specific antibody. When inoculated with 200 μ g/kg plus adjuvant, challenge of 200 μ g/kg produced PCA titer of 32(5/5) but challenge of 20 μ g/kg did not produce CFC-101-specific antibody. In heterologous PCA test using mice, CFC-101-specific antibody was not detected when sensitized with CFC-101 alone. Some animals(3/12) showed positive PCA response when inoculated with 200 μ g/kg plus alum. In passive hemagglutination (PHA) test, although no antibody was detected at 20 μ g/kg, inoculation of 200 μ g/kg alone or with alum produced positive response in all animals. This result has already been predicted because CFC-101 is a vaccine developed for the purpose of immunization. From the above results, it can be concluded that there is no adverse antigenic potential up to 10 times clinical dose of 200 μ g/kg.

Keywords □ *Pseudomonas* vaccine, antigenicity test, ASA, PCA, PHA, guinea pigs, mice.

녹농균은 패혈증, 만성 기도감염증, 흉낭포성 섬유증, 외상, 화상, 열상 및 수술후 2차감염증 등을 유발하는 병원내 주요 기회감염균으로서, 기존의 항생제에 대한 내성발현율이 높기 때문에 임상에서 감염증을 치료하는 데 많은 어려움이 제기되고 있다. 제일제당(주) 종합연구소에서는 이러한 녹농균에 의한 기회감염을 예방할 목적으로 녹농균의 세포외막 단백질을 주성분으로 하는 CFC-101(녹농균 백신)을 개발하였다. 이에 대한 비임상 독성시험의 일환으로서 guinea pigs와 mice에서의 항원성 시험을 국립보건안전연구원의 “예규 10호 : 의약품 등

의 독성시험기준”(1988)에 따라 실시하였으며, 그 결과를 본고에 발표하게 되었다.

실험방법

시험물질

시험 물질은 제일제당에서 개발한 CFC-101(녹농균백신)을 사용하였다. 시험물질의 농도는 단백질의 양으로써 표시하였으며, 멸균생리식염수에 용해하여 사용하였다. 양성대조물질로서는 ovalbumin(OVA, Sigma A5253)을 멸균생리식염수에 녹여서 사용하였다.

면역보조제

* To whom correspondence should be addressed.

Guinea pig에서는 Freund's complete adjuvant(FCA) 혹은 Freund's incomplete adjuvant를 시험물질 또는 양성대조물질과 혼합(1 : 1, v/v)하여 사용하였다.

Mice에서는 alum gel(aluminum hydroxide)을 면역보조제로 이용하였다. Alum gel은 다음과 같이 조제하였다. $AlNH_4(SO_4)_2$ 15 g을 증류수 180 ml에 녹인 후, 1 N NaOH 75 ml을 조금씩 가하면서 섞어주었다. 침전물을 멸균증류수로 8회 세척하고 건조한 후, 멸균증류수를 가하여 40 mg/ml 용액을 만들었다. 이 용액을 사용 직전에 시험물질 및 양성대조물질과 혼합하여 투여하였다.

실험동물

감작에는 200~300 g의 Hartley계 웅성 guinea pigs (국립보건안전연구원 및 삼육실험동물), 20~30 g의 C57 BL/6계 웅성 mice(국립보건안전연구원)를 사용하였고, passive cutaneous anaphylaxis(PCA) recipient로는 200~350 g의 Sprague-Dawley계 웅성 rats(국립보건안전연구원) 및 200~300 g의 Hartley계 웅성 guinea pigs (삼육실험동물)를 사용하였다. 실험동물은 1주일 이상의 예비순화기간을 거친 후 시험에 사용하였으며, 사료 및 물은 자유로이 섭취하도록 하였다.

감작 및 혈청 채취

Guinea pigs

감작량 및 감작횟수, 감작경로는 Table I과 같다. CFC-101 및 ovalbumin은 모두 멸균생리식염수에 녹여 사용하였다. 단독투여군에는 1주일에 3회, 총 7회 피하 주사하였다. 면역보조제 혼합투여군의 경우 1회 감작시에는 Freund's complete adjuvant(FCA)와 시험물질의 1 : 1 (v/v) 혼합액을, 그리고 2, 3회째에는 Freund's incomplete adjuvant와의 혼합액을 1주일에 1회씩 총 3회 피하 주사하였다.

최종 감작 2주 후, guinea pigs 각 군의 절반으로부터 심장채혈하여 각 개체별로 혈청을 분리하였다. 항혈청은 $-20^{\circ}C$ 에 보존하였다가 homologous PCA(passive cutaneous anaphylaxis) 반응에 사용하였다. 나머지 반수의 guinea pigs는 ASA(active systemic anaphylaxis test)에 사용하였다.

Mice

감작량 및 감작경로는 Table II와 같다. CFC-101 및

ovalbumin은 모두 멸균생리식염수에 녹여 사용하였다. 단독투여군에는 1주일에 3회, 총 7회 복강내 주사하였다. 면역보조제 혼합투여군의 경우 1회씩 감작에는 시험물질, 5% inactivated pertussis(1×10^9 cells/ml), 40 mg/ml Alum의 혼합액을 그리고 2, 3회째에는 시험물질과 40 mg/ml Alum의 혼합액을 1주일에 1회씩 총 3회 복강내 주사하였다. 최종투여 2주일 후에 심장채혈하여 각 개체별로 혈청을 분리하였다. 항혈청은 $-20^{\circ}C$ 에 보존하였다가 heterologous PCA 반응 및 PHA(passive hemagglutination) 반응에 사용하였다.

Active systemic anaphylaxis(ASA) test in guinea pigs

최종 감작 2주 후, 한 군을 5마리씩으로 하여 CFC-101 (20 or 200 μ g/kg), ovalbumin(5 mg/kg)을 정맥내에 투여하였다. 30분동안 전신의 증상을 관찰하여 다음의 기준에 따라 아나필락시스 증상을 판정하였다.

- (Asymptomatic)

± (Mild) : 불안, 기모, 진전, 코를 문지르거나 핏몸

+ (Moderate) : 재채기, 기침, 호흡축진, 배뇨, 배변, 유루

++ (Severe) : 호흡곤란, 짹짹거리는 소리, 청색증, 보행 불안, 도약, 혈떡거리고 몸부림침, 경련, 황와, Cheyne-Stokes 호흡

+++ (Death)

4 hr Homologous PCA(passive cutaneous anaphylaxis) test in guinea pigs

PBS(phosphate buffered saline)로 2배씩 8단계(4배~512배) 희석한 guinea pigs 항혈청 100 μ l씩을 guinea pigs 등에 피내주사하였다. 4시간 후에, CFC-101(20 or 200 μ g/kg), ovalbumin(5 mg/kg)을 2% Evans Blue와 동량으로 혼합하여 정맥내 주사하였다. 30분 후에 ether 마취에 의해 도살하여 항혈청 주사부위에 나타나는 청색 반점을 피부 내면에서 관찰하였다. 청색반점의 직경이 5 mm 이상인 것을 양성으로 하고, 양성을 나타내는 항혈청의 최대 희석배율을 그 항혈청의 항체가로 결정하였다.

24 hr Heterologous PCA test in rats

PBS로 2배씩 7단계(4배~256배) 희석한 C57BL/6 mice 항혈청 50 μ l씩을 각각 2 rats의 등에 피내주사하였다. 24시간 후, 감작량의 10배 항원과 1% Evans

Table I. Sensitization of guinea pigs for active systemic anaphylaxis and homologous passive cutaneous anaphylaxis.

Group	Substance	Dose	No. of animal times route		
1	CFC-101	20 μ g/kg	20	7 ^a	s.c
2	CFC-101	200 μ g/kg	20	7 ^a	s.c
3	CFC-101 + FCA	200 μ g/kg	20	3 ^b	s.c
4	OVA + FCA	2.5 mg/kg	10	3 ^b	s.c
5	Saline	1 ml/kg	10	7 ^a	s.c
Total			80		

^a3 times per week; ^bonce per week.

Table II. Sensitization of mice for heterologous passive cutaneous anaphylaxis and passive hemagglutination test.

Group	Substance	Dose	No. of animal times route		
1	CFC-101	20 μ g/kg	7	7 ^a	i.p
2	CFC-101	200 μ g/kg	9	7 ^a	i.p
3	CFC-101 + Alum	200 μ g/kg	12	3 ^b	i.p
4	OVA + Alum	0.2 mg/body	9	3 ^b	i.p
5	Saline	0.2 ml/body	4	7 ^a	i.p
Total			41		

^a3 times per week; ^bonce per week.

Table V. 24 hr Heterologous passive cutaneous anaphylaxis test in rats with sera of sensitized mice

Group	Sensitization		Challenge		PCA titer	Positive ratio
1	CFC-101	20 µg/kg	CFC-101	200 µg/kg	—	0/ 7
2	CFC-101	200 µg/kg	CFC-101	2000 µg/kg	—	0/ 9
3	CFC-101+ Alum	200 µg/kg	CFC-101	2000 µg/kg	16~>128	3/12
5	OVA+ Alum	0.2 mg/body	OVA	2 mg/body	8~>128	9/ 9
6	Saline	0.2 ml/body	CFC-101	2000 µg/kg	—	0/ 4

Table VI. Passive hemagglutination test with sera of sensitized mice

Group	Sensitization	Dose	Absorbed antigen	PHA titer (No. of mice)	Positive ratio
1	CFC-101	20 µg/kg	CFC-101	—	0/ 7
2	CFC-101	200 µg/kg	CFC-101	64(1), 128(7), 256(1)	9/ 9
3	CFC-101+ Alum	200 µg/kg	CFC-101	512(12)	12/12
4	OVA+ Alum	0.2 mg/body	OVA	512(7), 1024(1), 2048(1)	9/ 9
5	Saline	0.2 ml/body	CFC-101	—	0/ 7

24 hr Heterologous PCA test in rats

각 군의 감작 mice 혈청에 대해 rats를 이용한 수동 피부 아나필락시스반응 시험결과를 Table V에 나타냈다. 저용량군 및 고용량투여군에서 채혈한 항혈청을 rats의 배부피부에 피내주사한 결과 모두 음성이 나타났다. 그러나 고용량혼합투여군의 항혈청에서는 3/12에서 양성 반응이 나타났고, 각 PCA 항체가 16, 64 및 128 이상이었다. 또한 OVA 혼합투여군은 전부 양성반응을 보였고 PCA 항체는 8(1/9), 16(1/9), 32(2/9), 64(2/9) 및 128 이상(3/9)으로 나타났다. 생리식염수를 투여한 음성대조군에서는 양성반응이 관찰되지 않았다.

Passive hemagglutination(PHA) test

Mice 항혈청에 대한 간접적혈구응집반응시험(PHA)의 결과는 Table VI에 나타내었다. 음성대조군 및 저용량투여군의 항혈청에서는 응집반응이 나타나지 않았다. 고용량투여군의 항혈청은 64배(1/9), 128배(7/9) 및 256배(1/9) 희석액에서 응집반응이 관찰되었다. 고용량혼합투여군의 항혈청은 12마리 모두 512배 희석액에서 응집반응을 보였다. 한편 양성대조군인 OVA 혼합투여군의 항혈청은 512배(7/9), 1024배(1/9) 및 2048배(1/9)의 희석액에서 혈구응집반응을 보였다.

고 찰

특정 항원에 반복적으로 노출되었을 때 나타날 수 있는 면역계의 과민반응을 hypersensitivity라 한다. Immediate hypersensitivity(type I)는 항원에 노출된 즉시 나타나는 과민반응으로서, 흔히 allergy라 부른다. Allergy 반응은 항원-항체 반응의 결과 활성화된 mast cell이 여러가지 mediator를 분비함으로써 나타나게 되는데,

이러한 mediator 중에서 특히 histamine은 1) 혈관의 투과성 증가, 2) 피부 두드러기 반응, 3) 기관지 수축, 4) 장(gut)의 투과성 증가 등을 야기한다(Ivan 등, 1993). ASA test는 피부 두드러기 반응과 기관지 수축에 의해 나타나는 여러 임상증상들을 관찰하여 양성의 여부를 결정한다. PCA test는 피부에서의 혈관 투과성 증가의 정도에 따라 양성의 여부를 결정한다. 항원 유입시 항원과 반응하여 mast cell을 자극하는 항체로서 guinea pig PCA에서는 동종의 IgE와 IgG1(Ovary 등, 1963), mouse-rat PCA에서는 IgE(Mota and Wong, 1969)를 검출할 수 있다.

CFC-101에 대하여 guinea pigs에서 ASA test를 실시한 결과, 임상용량 10배까지 CFC-101 단독으로 혹은 면역보조제와 함께 투여하더라도 0/5 혹은 1/5에서만 재채기 등의 약한 아나필락시스 반응이 관찰되었다. Guinea pig에서의 PCA test에서는 CFC-101 단독으로 임상용량 10배까지 투여한 경우에는 PCA 항체를 확인할 수 없었으며, 면역보조제와 함께 투여한 경우에도 임상용량의 10배로 야기한 경우에만 32배의 PCA 항체를 보였다.

ASA와 PCA test 모두가 결국은 항원-항체반응에 의한 histamine의 분비 정도를 확인하는 것이다. 그러므로, CFC-101 단독으로 투여한 경우 ASA test중 일부 개체에서 약한 아나필락시스 반응이 관찰되었어도 PCA test에서 음성이 나온 것으로 보아, guinea pig에서는 CFC-101 단독으로 임상용량의 10배까지 투여하더라도 별다른 anaphylaxis 반응을 일으키지 않음을 확인할 수 있었다.

Mice-rats를 이용한 heterologous PCA test에서도, CFC-101 단독으로 임상용량의 10배까지 투여한 경우에

는 PCA 항체가를 확인할 수 없었으며, 면역보조제와 함께 투여하고 임상용량의 100배로 야기하였을 때에는 3/12 예에서 PCA 항체를 확인할 수 있었다. 이 결과도 guinea pigs에서의 실험결과와 일치한다.

Mice를 이용하여 실시한 passive hemagglutination test 에서 CFC-101은 임상용량 10배로 투여한 경우 응집가를 보였는데, CFC-101의 임상목적이 녹농균 감염의 예방을 위한 능동면역인 것을 고려하면 위의 결과는 당연한 것이라 할 수 있다.

이상의 실험 결과를 종합하면, CFC-101을 면역보조제와 함께 투여하는 경우에는 아나필락시스 반응이 유

발될 수 있으나, CFC-101 단독으로 투여하는 것은 비교적 안전함을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- 국립 보건 안전 연구원 예규 10호: 의약품등 독성 시험 기준, (1988).
- Ivan, R., Jonathan, B. and David, M. (1993). Immunology(3rd Ed.), Chapter 19, Mosby-Year Book Europe Ltd., London.
- Mota, I. and Wong, D. (1969). *Life Sciences* **8**, 813-820.
- Ovary, Z., Benacerraf, B. and Bloch, K. J. (1963). *J. Exp. Med.* **117**, 951-964.