

Helicobacter pylori 특이 계란항체의 생산 및 특성

김병재* · 강병화 · 김태용 · 김태한 · 김기원
일동제약(주) 중앙 연구소

Production and Characterization of IgY Specific to *Helicobacter pylori*. Byoung-Jae Kim, Byung-Hwa Kang, Tae-Yong Kim, Tae-Han Kim and Kee-Won Kim. Research Laboratories, Il-dong Pharmaceutical Co., Kyongki-Do 456-830, Korea - IgY (egg yolk immunoglobulin) against *Helicobacter pylori* was produced by immunizing hen with some *Helicobacter pylori* antigens. *H. pylori* whole cell, whole cell lysates, partially purified urease and p54 protein, which showed high antigenicity in mice, were used as immunogens. Four hens were immunized with these immunogens three times. IgY was purified from immunized egg yolk with polyethylene glycol (M.W. 8000) and its anti-*H. pylori* titer was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The anti-*H. pylori* titer reached peak at 8 weeks and was maintained over 20 weeks. *H. pylori* cells were agglutinated with these purified IgY and the specificity of these purified IgY was detected with immunoblotting.

*Helicobacter pylori*는 1983년 Marshall과 Warren(1)이 위염환자의 위점막 상피세포의 점액층에서 처음으로 배양해낸 이후 NSAID계 약물과 더불어 위염 및 식이성 궤양의 원인균으로 알려져 있다(2, 3). 아직 정확한 감염 경로는 밝혀져 있지 않지만 위생상태가 불량한 후진국일 수록 감염률이 높은 것으로 보아 배설물이나 부패한 음식에 의한 구강 감염에 의한 것으로 추정되고 있다. 위염 및 궤양이 세균에 의한 감염성 질병이라는 사실이 알려지면서 *H. pylori*에 대한 여러 가지 제균 방법이 연구되어지고 있다. 최근 metronidazole이나 bismuth제제, 그리고 omeprazol 등을 혼합한 3중 요법이 많이 사용되어 제균에는 어느정도 성공을 거두고 있으나, 항생제에 내성을 갖는 새로운 균주가 나타나고 사용한 약물에 의한 부작용 때문에 다른 접근 방식을 찾게 되었다. 본 연구에서는 *H. pylori*의 여러 가지 항원을 면역하여 생성된 계란항체(IgY)를 분리 정제하여 *H. pylori*의 증식을 억제시켜 위염 및 궤양에 대한 치료에 이용하고자 실험을 실시하였다. 항체는 항원과의 특이적인 반응을 일으키는 특징 때문에 치료제와 진단시약으로서의 수요가 높아 항체를 경제적으로 생산하고자 하는 연구가 많이 되고 있다. 그러나 현재까지는 채혈이나 도살에 의해 혈액으로부터 항체를 얻고 있어서 비용도 높고, 방법상에서도 어려움이 많다. 이에 비해 계란항체는 난황에 고농도로 축적되어 있고(4), 도살없이도 꾸준히 생산되기 때문에 위의 어려움들을 극복할 수 있을 것이다. 또한 계란항체의 경구 투

여에 의한 실험동물 장 내에서의 *E. coli*나 rotavirus의 감염 예방에도 이미 효과가 있다고 보고(5, 6)되어 있어 위 내에서의 *H. pylori*에 대한 계란 항체의 효과도 기대할 수 있다.

재료 및 방법

균 배양 및 검정

*Helicobacter pylori*는 경상대학교 의과대학에서 분양받은 임상 균주를 사용하였다. 실험 균주는 Mueller Hinton 배지(Difco Co.)에 bovine calf serum을 10% 첨가한 평판배지에서 2-3일 간격으로 계대하며 37°C, CO₂ 농도 10% 환경의 CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험 균주의 검정은 현미경적 관찰, Gram 염색과 urease activity test를 통해 실시하였다.

Urease activity 측정

Urease activity의 측정은 urea와 phenol red를 포함한 Christensen's urea broth(7)를 이용하여 실시하였다. Urea broth와 배양액 또는 시료를 5:1의 비율로 섞어 30분동안 반응시킨 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하여 urease activity를 결정하였다.

닭의 사육과 면역

면역에는 20마리의 갈색 산란용 암탉이 사용되었으며, 네 마리를 한 군으로 하여 일반적인 산란용 닭의 사육방법에 준하여 사육하였다. McCannel 등(8)의 방법에 따라 각각의 면역원을 한 마리당 가슴과 다리의 근육내에 각각 0.5 ml씩 주사하였다. 세 차례에 걸쳐 주사하여 면

*Corresponding author

Tel. 82-334-73-1701, Fax. 82-334-73-4860

E-mail: ilreslab@soback.kornet.nm.kr

Key words: IgY, Chicken immunoglobulin, Purification, *Helicobacter pylori*, Urease, p54, Agglutination, ELISA

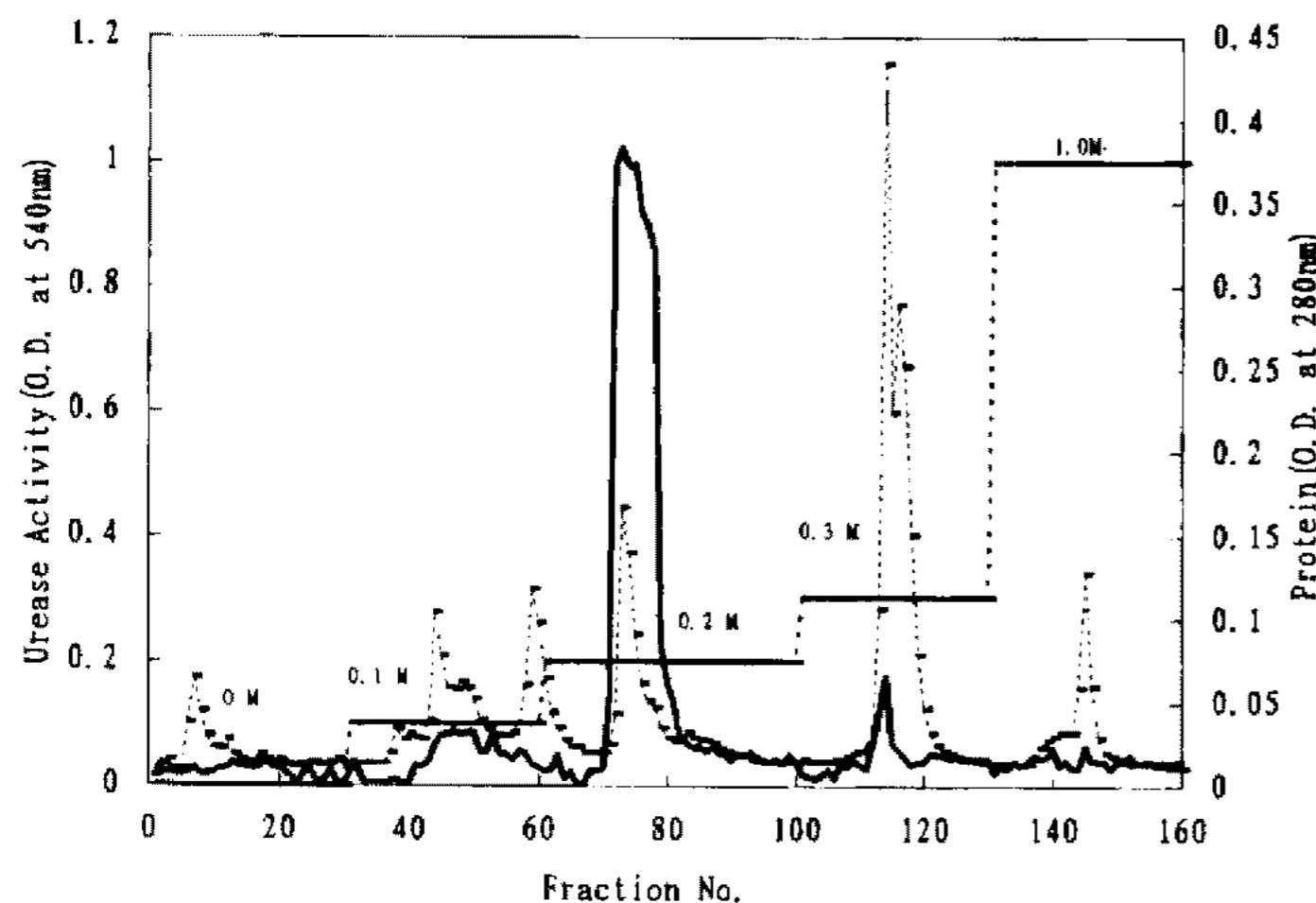


Fig. 1. Partial purification of urease from *H. pylori* cell lysates. EAE-Sephadex ion exchange chromatography was applied for purification of urease. Flow rate was 75 ml/hr and elution buffer was 20 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M and 1.0 M NaCl. Absorbance of total protein was measured at 280 nm and that of urease activity at 540 nm. —— Urease Activity ······ Total Protein —— NaCl Concentration.

역시켰으며 1차 면역 2주후에 2차 면역을, 2차 면역 4주 후에 3차 면역을 실시하였다.

실험에 사용한 면역원은 *H. pylori*의 균체, 균파쇄액, 이로부터 부분정제한 urease 및 p54 단백질을 항원으로 사용하였다. *H. pylori* 균체는 10 mM phosphate buffered saline(PBS, pH 7.6)에 혼탁하여 600 nm에서의 O.D.가 2.0 되게 하여 사용하였고, *H. pylori* 균 파쇄액은 PBS에 녹인 1% n-octyl- β -D-glucopyranoside(Sigma Co.)로 *H. pylori* 균체를 파쇄하여 원심 분리후 상등액을 사용하였다. Urease는 균 파쇄액을 DEAE 이온 교환 수지를 실시하여 urease 활성을 나타내는 분획만을 모아 사용하였으며(Fig. 1), mouse를 이용한 예비실험 결과 항원성이 가장 높게 나타난 부위인 p54 단백질은 파쇄액을 SDS-PAGE하여 54 kd에 해당하는 band를 잘라내어 분쇄하여 사용하였다. 음성대조군은 PBS를 사용하였다. 각각의 항원을 Freund's complete adjuvant와 동량 혼합하여 1차 면역에 사용하였으며, 2차와 3차 면역에는 Freund's incomplete adjuvant를 사용하였다.

계란항체의 분리 및 정제

면역된 닭으로부터 계란을 매일 수거하여 분리정제에 사용하였다. 계란 항체의 분리 정제는 Shimizu 등(9)의 방법에 따라 실시하여 polyethylene glycol(PEG, M.W. 8000)을 사용하여 1차 정제하였으며 이 시료를 gel filtration chromatography를 이용하여 2차 정제하였다. 방법을 요약하면 계란의 난황을 난백으로부터 분리하여 10 ml을 취하고 PBS 20 ml과 섞은 후 15% PEG 8,000 10 ml과 섞어 침전을 형성시킨다. 30분 방치후 14,000

g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 30% PEG 8000과 동량 섞어 다시 침전을 형성시킨다. 30분 방치후 다시 14,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물을 PBS 10 ml에 혼탁하여 사용하였다. 이 부분 정제된 시료를 ammonium sulfate로 10배 농축하여 Sephadex S-200(Pharmacia Co.)을 이용한 gel filtration chromatography를 실시하였다. 농축한 시료 2 ml을 가하고 PBS로 1.4 ml/min의 속도로 전개시키면서 3 ml씩 분취하였다. ELISA로 *H. pylori* 특이 계란항체의 양을 측정하였으며, SDS-PAGE를 이용하여 순도를 확인하였다.

Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)

난황으로부터 정제된 IgY의 항 *H. pylori* 역ガ를 ELISA로 확인하였다. *H. pylori* 균체파쇄액을 0.05 M bicarbonate buffer(pH 9.6)에 1:200으로 희석하여 ELISA plate에 coating하였고, 효소가 결합된 2차항체는 anti-chicken IgG alkaline phosphatase(Sigma Co.)를 사용하였다.

계란항체에 의한 *H. pylori* agglutination

IgY가 *H. pylori* 균체를 응집시키는 정도를 조사하였다. PBS로 two-fold dilution한 IgY와 PBS에 혼탁한 *H. pylori* 균체(OD 1.5)를 동량혼합하고 실온에 방치하여 반응시키고 응집이 나타나는지를 관찰하였다.

Western blotting(Immunoblotting)

면역된 닭으로부터 얻은 계란 항체의 항원 특이성을 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다. 먼저 separating gel 농도 12%의 SDS-PAGE에 *H. pylori* 균 파쇄액을 전개시키고, gel을 Towbin 등(10)의 방법에 의해 nitrocellulose(NC) paper(Gelman Sciences Co.)에 transfer한 다음 3% BSA로 blocking 하였다. Blocked paper에 PEG8000으로 정제된 계란 항체를 더하여 상온에서 1시간동안 incubation하고, anti-IgY alkaline phosphatase conjugates(Sigma Co.)를 더하여 상온에서 1시간동안 처리하였다. 세척한 NC paper에 BCIP/NBT substrate(Sigma Co.)를 가하여 반응시키고 발색이 되면 20 mM EDTA/TBS로 반응을 중지시켰다.

결과 및 고찰

H. pylori 배양

*Helicobacter pylori*는 배양 3-4일째까지는 단간균이 많았으나, 4일이 지나면서 구균으로 바뀌었다. 그람 염색 결과 그람 음성을 나타냈으며 Christensen's urea broth를 이용한 urease activity test에서는 30분안에 강한 활성을 나타내었다. 본 실험에는 배양 3-4일째의 *H. pylori*를

Table 1. Comparison of IgY purification methods

Methods	Total Protein* (mg/ml)	IgY** (mg/ml)	Purity (%)
PEG 8000	8.66	6.16	71.1
λ -Carrageenan	8.25	6.18	74.9
Sodium Alginate	9.98	6.97	69.8
Xanthan	8.70	6.65	76.4
Water dilution	8.47	6.49	76.6

*Total Protein (mg/ml)= $1.55 \times O.D.$ at 280 nm- $0.77 \times O.D.$ at 260 nm. **Total IgY (mg/ml)=O.D. at 280 nm/IgG constant at 280 nm (13.6×10 mg/ml)

사용하였다.

계란항체 분리 정제

면역된 계란의 난황에서 항체를 분리하기 위해 여러 가지 방법을 비교 실험하였다. Polyethylene glycol(MW 8000), λ -carrageenan, sodium alginate 및 xanthan을 이용(11)하여 정제하였고, water dilution 법(12)도 사용하였다. 각 방법을 이용하여 난황 10 ml로부터 항체를 정제한 결과를 Table 1에 정리하였다. 각각의 방법에 따른 수율과 순도에 있어서 큰 차이를 보이지 않아서 정제 방법이 가장 간편한 PEG8000을 이용한 방법을 이후의 *H. pylori* 특이 계란 항체의 분리 정제에 사용하였다. PEG8000으로 분리한 시료를 gel filtration으로 한단계 더 정제한 결과(Fig. 2) Sigma사의 IgY시약(순도 95% 이상)과 유사한 순도를 보였다(Fig. 3).

H. pylori 특이 항체 역가 측정

닭에 *H. pylori*를 면역하여 높은 수준의 특이 항체를 얻기 위하여 adjuvant 처리효과를 살펴보았다. *H. pylori*의

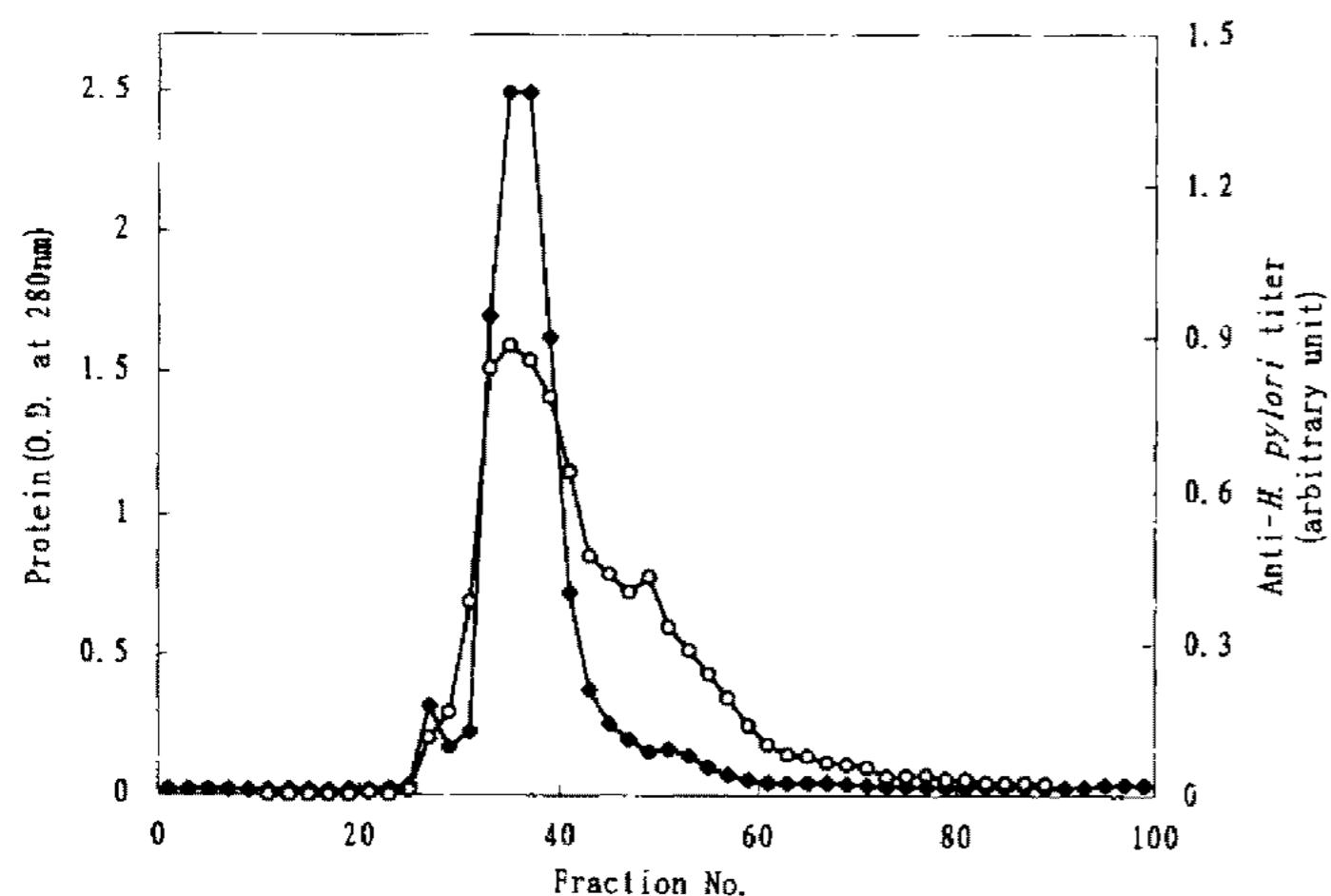


Fig. 2. Sephadryl S-200 gel filtration chromatographic profile of PEG-purified IgY specific for *H. pylori*. Elution buffer was 10 mM PBS (pH 7.6) and flow rate was 1.4 ml/min. Anti-*H. pylori* titer was determined by ELISA.
—●— Protein, —○— Anti-*H. pylori* titer.

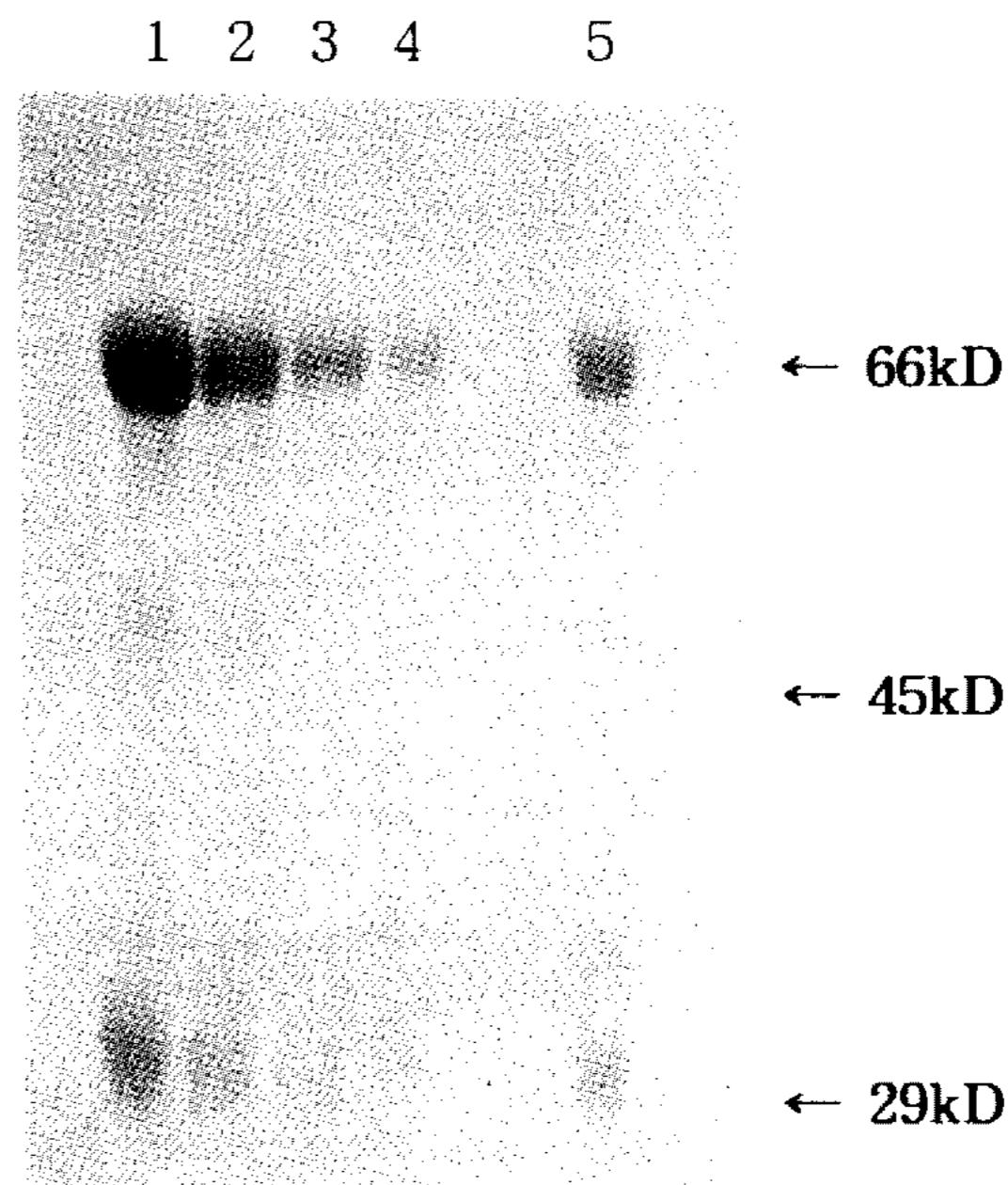


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of purified IgY.

Lane 1 to 4 were two-fold dilution of purified IgY and Lane 5 was authentic IgY (1 mg/ml) from Sigma Co.. Purified IgY was obtained from gel filtration chromatography.

whole cell에 Freund's adjuvant를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 비교한 결과 adjuvant를 처리한 군이 처리하지 않은 군에 비해 1.5배 이상의 높은 역가를 나타내었고, 이 역가는 25주 이상 유지되었다. 일반적으로 많이 사용되는 면역증강제인 Freund's adjuvant를 사용하여 닭에서의 면역 능력을 높일 수 있음을 확인하고 이후의 면역에 Freund's adjuvant를 사용하였다.

*H. pylori*의 항원을 다양하게 사용하여 특이 항체를 생성하고자 실험을 실시하였다. 항원으로는 whole cell, cell 파쇄액, 부분정제된 urease 및 p54 단백질을 사용하였고, 대조군으로는 PBS를 사용하였다. Urease는 *H. pylori*가 위내에 감염되어 생존할 수 있는 수단으로 알려진 효소이며, mouse에서 urease를 면역시켜 *Helicobacter*군의 감염을 억제한 것이 보고(13)되어 있다. 또한 p54 단백질은 확실한 실체규명을 하지는 못했지만 GroEL family의 heat shock proteins analog로 알려진 단백질(14)과 유사한 크기와 성질을 갖고 있고, mouse 예비 실험에서 가장 높은 항원성을 보였다. 이들 항원을 이용한 면역은 첫 면역후 2주, 6주 후에 2, 3차 면역을 실시하여 10주까지의 *H. pylori* 군체에 대한 항체 역가를 ELISA로 측정하였다(Fig. 4). 모든 군에서 8주후에 역가가 최대치에 도달해서 계속 유지되었으며, whole cell과 cell 파쇄액 군에서 높은 역가를, urease와 p54군에서 상대적으로 낮은 역가를 나타내었다. Urease군과 p54군에서의 낮은 역가는 정제된 항원을 사용하였기 때문이며, p54군의 역가는 SDS-PAGE상에서 얻은 gel을 직접 면역한 것을 고려해볼 때

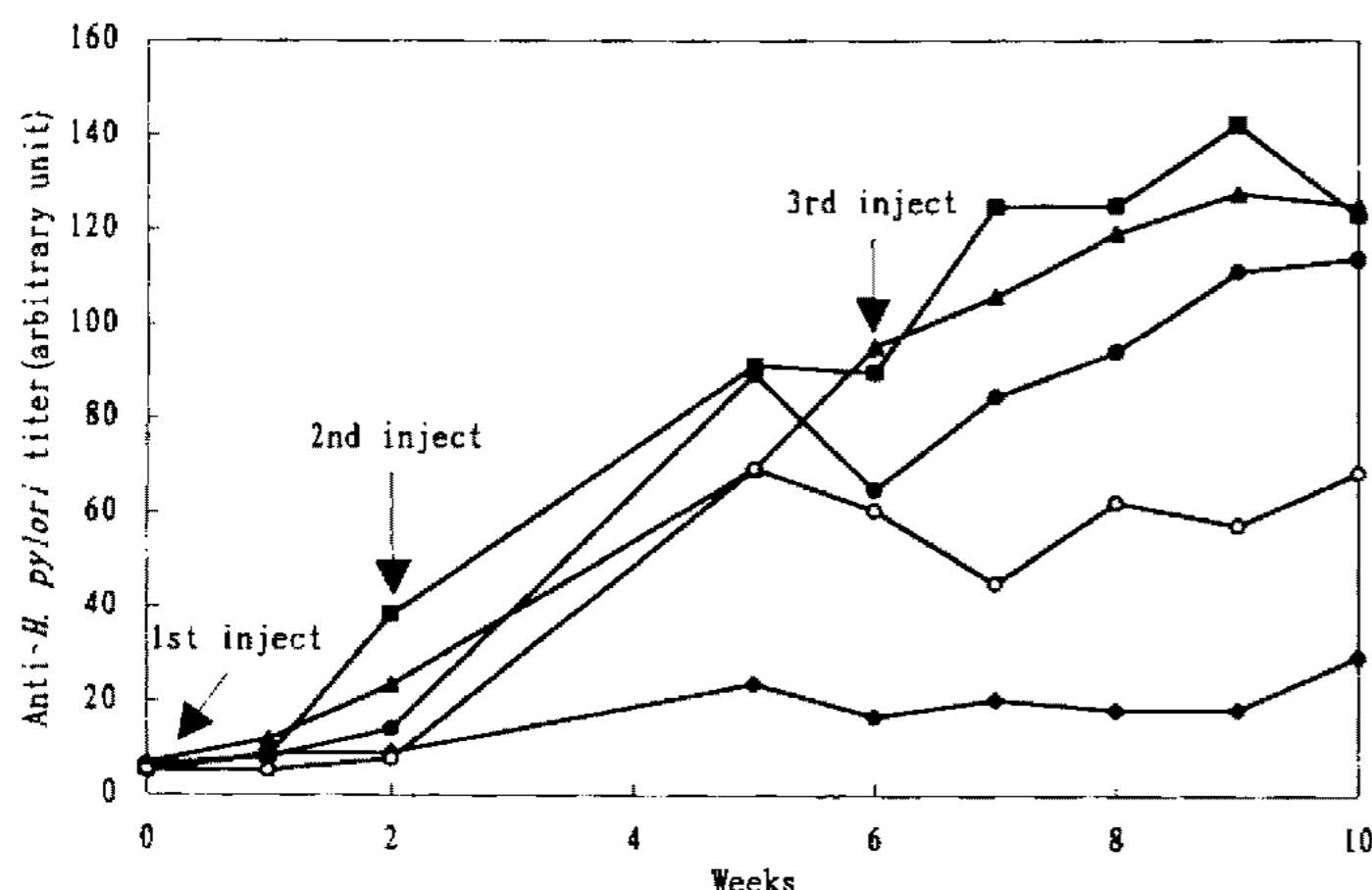


Fig. 4. Anti-*H. pylori* titer of IgY that obtained from immunized hen.

Immunizing antigens were PBS blank (◆), *H. pylori* whole cell (■), *H. pylori* cell lysates (▲), partial purified urease (●) and p54 protein (○). After 1st injection, 2nd and 3rd injection were performed in 2 weeks and 6 weeks. Titer was determined by ELISA.

비교적 높게 나타난 것으로 생각된다.

계란항체에 의한 *H. pylori* 응집

응집의 정도는 Table 2와 같다. 면역하지 않은 IgY는 응집을 일으키지 않은 반면 *H. pylori*를 면역시켜 얻은 모든 IgY는 *H. pylori*와 응집을 일으켜, 면역시켜 얻은 IgY와 *H. pylori* 사이의 반응이 일어남을 확인 하였다. 다른 IgY에 비해 p54 IgY의 응집 정도가 낮은 것은 p54 IgY의 역할 자체가 낮기 때문인 것으로 생각된다.

항체의 항원 특이성 조사

각 항원에 의해 생성된 항체가 각 항원에 특이적으로 반응하는지를 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다(Fig. 5). Whole cell군은 urease와 p54 그리고 비특이 항원에 반응한 반면, cell 파쇄액 군은 p54와 비 특이 항원에 반응하였다. Urease군은 urease와 비 특이 항원에 반응하였는데, 이는 이온교환수지에 의한 urease 정제가 완전하지 못했음을 보여준다. p54군은 p54 단백질에만 특이적으로 반응을 나타내었는데, 역가는 낮지만

Table 2. Agglutination of *H. pylori* by IgY

IgY	Agglutinating dilution fold of IgY
Negative Control	-
Whole cell IgY	1/8
Cell lysate IgY	1/8
Urease IgY	1/8
p54 IgY	1

H. pylori (O.D. 1.5 at 600 nm in PBS) 50 μl and same volume of diluted IgY were mixed in round bottom plate for 1 hr at RT. The aggregation was detected by simple visual inspection.

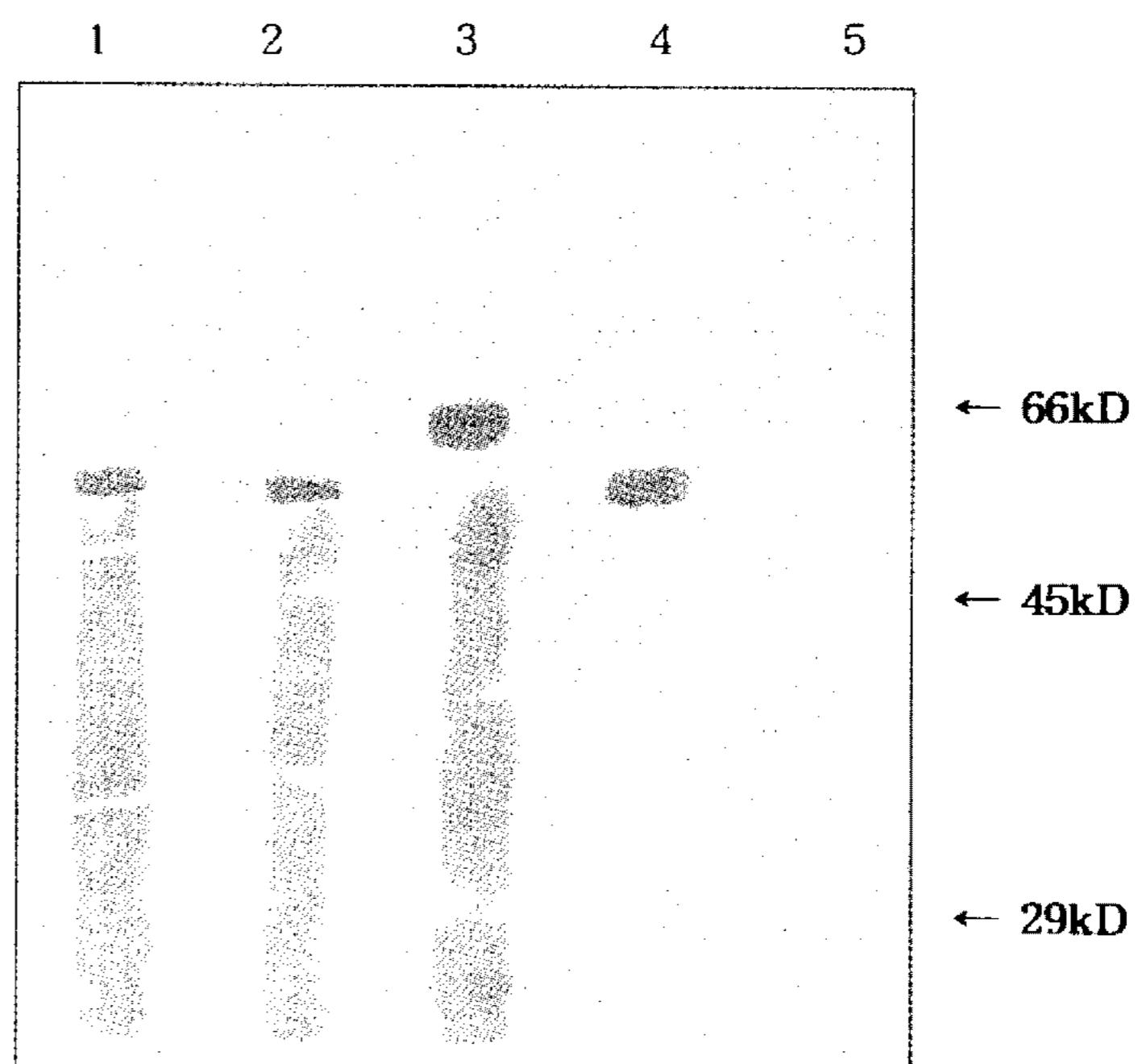


Fig. 5. Western blotting profile of IgY from various antigens. *H. pylori* cell lysates was electrophorated and various IgY from lane 1 to 5 were used as primary antibodies. Lane 1, IgY against *H. pylori* whole cell; Lane 2, IgY against cell lysates; Lane 3, IgY against urease; Lane 4, IgY against p54; Lane 5, Nonimmunized IgY.

*H. pylori*의 특정 항원과만 반응하는 점을 이용한다면 *H. pylori*를 특이적으로 검출해내는 진단용 항체로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 생성된 항체가 중성 실험 조건에서는 *H. pylori*의 증식을 억제하지 못하였고(Table 3), 따라서 urease같은 효소가 *H. pylori*가 산성인 위내에서 감염되어 증식하는데 중요하게 작용하는 점을 감안한다면 계란항체를 이용한 산성 조건에서의 *H. pylori* 불활성화 현상(15)을 살펴 *H. pylori* 억제에 대한 계란항체의 이용 가능성을 살펴 보는게 필요하며, urease나 p54 단백질 이외에 vacuolating cytotoxin인 VacA(16)나 VacA와 관련된 CagA(17) 및 superoxide

Table 3. Effect of IgY on the growth of *H. pylori* in neutral medium

IgY group	<i>H. pylori</i> growth (IgY 10%)	<i>H. pylori</i> growth (IgY 20%)
Blank	100 %	100 %
Normal IgY	104.6%	103.6%
Whole cell IgY	121.4%	123.6%
Cell lysates IgY	115.1%	114.5%
Urease IgY	116.3%	116.9%
p54 protein IgY	99.3%	99.6%

PEG-purified IgY was mixed with *H. pylori* broth and the mixture was incubated for 4 days in CO₂ incubator. The growth of *H. pylori* was determined by absorbance at 600 nm.

dismutase(18) 등을 항원으로 사용한 계란항체의 이용도 연구되어져야 한다.

요 약

위염의 원인균으로 알려진 *Helicobacter pylori*를 암탉에 면역시켜 특이 계란항체(IgY)를 생산하고 그 특성을 조사하였다. 주사한 항원으로는 *H. pylori*균체, *H. pylori*균 파쇄액, 부분 정제된 urease 및 예비실험 결과 항원성이 가장 높게 나타난 p54 단백질을 사용하였다. 이 항원들을 각각 4마리의 암탉에 3차례에 걸쳐 다리와 가슴에 근육주사하여 면역시켰다. 계란으로부터 PEG 8000을 이용하여 항체를 부분 정제하고, 역ガ를 enzyme linked immunosorbent assay 방법으로 확인하였다. 항 *H. pylori* 역가는 8주후에 최고에 도달해 20주이상 유지되었다. 또한 생산된 항체의 항원 특이성을 immunoblotting 방법을 이용하여 확인하였다. 이 *H. pylori*균 특이 IgY는 응집반응을 일으킬 수 있지만 *in vitro*에서 *H. pylori*의 증식을 억제하지는 못하였다.

참고문헌

- Warren, J. R. and B. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* i: 1273-1275.
- Peterson, W. L. 1991. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *New Eng. J. Med.* **324**: 1043-1048.
- Hazell, S. L., A. Lee, L. Brady and W. Hennessy. 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: Association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J. Infect. Diseases* **153**: 658-663.
- Kaspers, B., I. Schranner and U. Losch. 1991. Distribution of immunoglobulins during embryogenesis in the chicken. *J. Vet. Med. A* **38**: 73-79.
- Bartz, C. R., R. H. Conklin, C. B. Tunstall and J. H. Steele. 1980. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. *J. Infect. Diseases* **142**: 439-441.
- Yokoyama, H., R. C. Peralta, R. Diaz, S. Sendo, Y. Ikemori and Y. Kodama. 1992. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect. Immun.* **60**: 998-1007.
- Atlas, R. M. 1993. Urea broth base. p. 968. In L. C. Parks (ed.), *Handbook of microbiological media*. CRC press.
- McCannel, A. and S. Nakai. 1989. Isolation of egg yolk immunoglobulin-rich fractions using copper-loaded metal chelate interaction chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **22**: 487-490.
- Shimizu, M., R. C. Fitzsimmons and S. Nakai. 1988. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* **53**: 1360-1366.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.
- Hatta, H., M. Kim and T. Yamamoto. 1990. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2531-2535.
- Akita, E. M. and S. Nakai. 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods* **160**: 207-214.
- Theulaz, I. C., N. Porta, M. Glauser, E. Saraga, A. C. Vannay, R. Haas, J. P. Kraehenbuhl, A. L. Blum and P. Michetti. 1995. Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against *Helicobacter* infection in mice. *Gastroenterology* **109**: 115-121.
- Dunn, B. E., R. M. Roop II, C. C. Sung, S. A. Sharma, G. I. Perez-Perez and M. J. Blaser. 1992. Identification and purification of a cpn60 heat shock protein homolog from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **60**: 1946-1951.
- Shibata, K., Y. Ito, A. Hongo, A. Yasoshima, T. Endo and M. Ohashi. 1995. Bactericidal activity of a new antiulcer agent, Ecabet Sodium, against *Helicobacter pylori* under acidic conditions. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* **39**: 1295-1299.
- Ricci, V., C. Ciacci, R. Zarrilli, P. Sommi, M. K. Tummuru, C. D. V. Blanco, C. B. Bruni, T. L. Cover, M. J. Blaser and M. Romano. 1996. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: Role of VacA and CagA. *Infect. Immun.* **64**: 2829-2833.
- Hazel, M. M., S. L. Hazell, T. Kolesnikow, J. Mitchell and D. Frommer. 1996. Antigen recognition during progression from acute to chronic infection with a cagA-positive strain of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **64**: 1166-1172.
- Spiegelhalder, C., B. Gerstenecker, A. Kersten, E. Schiltz and M. Kist. 1993. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect. Immun.* **61**: 5315-5325.

(Received 22 August 1997)