

경구투여한 *V. vulnificus* 백신의 면역원성 및 감염방어효능

이나경 · 정상보 · 안보영 · 김영지¹ · 이윤하¹ · 전영중 · 박완제*

제일제당 종합연구소 생명공학연구실, 약리분석연구실¹

Immunogenicity and Protective Efficacy of an Oral Vaccine against *Vibrio vulnificus* Infection

Na-Gyong LEE, Sang Bo JUNG, Bo Young AHN, Younha LEE, Young Gi KIM, Yeong-Joong JEON and Wan Je PARK*

R & D Center, Cheiljedang Inc., Ichon, Kyonggi 467-810, Korea

(Received April 21, 1998; accepted May 14, 1998)

Abstract - *Vibrio vulnificus* is an estuarine gram-negative human pathogen that affects people with chronic hepatitis, alcoholic cirrhosis, diabetes mellitus or other underlying diseases. *V. vulnificus* infection is mediated primarily by consumption of raw fish or by exposure of pre-existing wounds to seawater, causing permanent tissue damages or fatal septic shock. We have been developing a vaccine against *V. vulnificus* composed of whole cell lysate of a *V. vulnificus* O-antigen serotype 4 strain. Oral administration of the *V. vulnificus* vaccine elicited a high serum antibody response in rabbits. The induced antibodies were reactive not only to the homologous strain but also to heterologous O-antigen serotype strains, indicating cross-reactivities among serotypes. Western blot analysis revealed that the antibodies are mainly specific for outer membrane proteins (OMPs) and reacted equally well with OMPs purified from 9 O-antigen serotypes. The rabbit antisera showed opsonophagocytic killing activity against heterologous strains as well as the homologous strain. Passively transferred rabbit antisera into mice were protective against a lethal *V. vulnificus* infection. These data demonstrate that oral administration of the *V. vulnificus* vaccine induced a systemic antibody response which had a protective efficacy against *V. vulnificus* infections, suggesting that this vaccine preparation could be used to develop an oral vaccine against *V. vulnificus*.

Keywords □ *V. vulnificus*, oral vaccine, immunogenicity, protective efficacy

*Vibrio vulnificus*는 호염성 그람음성 해양 미생물로서 비브리오 패혈증의 원인균으로 알려져 있다(Kelly, 1982). *V. vulnificus*에 의한 감염은 주로 균에 오염된 어패류나 굴을 날로 섭취할 때 일어나며, 기존의 상처부위가 균으로 오염된 바닷물에 노출되었을 때에도 일어난다(Hlady와 Klontz, 1996; Rotz 등, 1996). *V. vulnificus* 감염은 수막염, 폐렴, 근염, 각막염, 자궁내막염 등을 일으키며, 항생제로 치료하더라도 영구적인 조직손상과 같은 심각한 후유증을 남긴다(박석돈, 1996). 특히 알코올 중독이나 간염 등의 만성 질환환이나 당뇨병과 같은 기저 질환이 있는 경우에는 쉽게 패혈증을 일으키며, 이 때의 치사율은 60% 이상에 달한다(Tacket 등, 1984; Wittman과 Griffin, 1993).

V. vulnificus 균의 병원성에 관련된 인자로는 cytolysin,

elastase, siderophores, 항식균성 표면항원인 capsular polysaccharide(CPS) 및 lipopolysaccharide(LPS) 등이 알려져 있으며 (Bahranti와 Oliver, 1990; Gray와 Kreger, 1985; Kothary와 Kreger, 1985; Park 등, 1996; Wright 등, 1990; 1991; Yoshida 등, 1985), 이들 중 CPS와 LPS는 *V. vulnificus*에 의한 감염을 예방하기 위한 백신개발에 항원으로 사용되었다. Kreger 등 (1984)은 포르말린으로 불활화한 *V. vulnificus* 균을 마우스에 접종하였을 때 마우스를 *V. vulnificus* 균에 의한 패혈증으로부터 방어하는 효력이 있었으며 이때의 유효항원은 열에 약한 표면 항원인 polysaccharide라고 보고하였다. 한편, *V. vulnificus* 균의 CPS를 분리·정제하여 tetanus toxoid, cytolysin 또는 elastase 등과 conjugate로 제조하여 마우스에 투여하였을 때, tetanus toxoid conjugate만이 높은 면역원성과 감염방어력을 보였다(Devi 등, 1995; 1996). 그러나 CPS는 LPS와 마찬가지로 방어력이

* To whom correspondence should be addressed.

같은 혈청형 균주에 제한되는 단점이 있으므로 모든 *V. vulnificus* 균주에 대한 방어력이 있는 백신으로 개발하려면 여러 혈청형을 혼합하여야 하는 불편함이 있다. 주 등(1987; 1989)은 *V. vulnificus* 균의 용균물을 제조하여 토끼에 피하 주사하였을 때 동종 혈청형에 대한 방어능이 있음을 확인하고 이 용균물 중의 O항원이 유효항원이라고 설명하였다.

본 연구에서는 경구 *V. vulnificus* 백신을 개발하기 위한 연구의 일환으로 *V. vulnificus* 백신을 제조하여 토끼에게 경구투여하고 이 백신의 면역원성과 생성된 항체의 *V. vulnificus* 감염에 대한 방어효능을 측정하였다.

실험방법

V. vulnificus 균주 및 실험동물

백신 제조 및 실험에 사용한 *V. vulnificus* 균주는 부산대학교 주진우 교수와 원광대학교 박석돈 교수로부터 분양받아 API 시험으로 동정 확인한 O항원 혈청형 1-9 형 균주로서 혈청형에 따라 CJVV001-CJVV009로 명명하고 실험에 사용하였다. *V. vulnificus* 균주는 37°C에서 3×YPS(0.9% yeast extract, 3% pepton, 1% NaCl) 한천 평판배지나 액체배지에 진탕하면서 배양하였다. 항체 역가를 측정하기 위하여 ELISA에 사용한 *V. vulnificus* 균주는 16시간 동안 3×YPS 한천 배지에서 배양한 균을 30 ml의 3×YPS 액체 배지에 접종하고 37°C에서 5-6시간 동안 배양하였다. 600 nm에서 흡광도를 측정하고 0.9% 식염수로 OD=0.1이 되도록 희석한 뒤 56°C에서 2시간 동안 가열하여 불활화한 후 사용하였다. Opsonophagocytic killing assay와 수동면역시험에는 위와 같은 방법으로 배양한 *V. vulnificus* 균을 0.9% 식염수로 세척하고 600 nm에서 흡광도를 측정한 뒤, 식염수로 희석하여 사용하였다. 실제로 실험에 사용된 균의 수는 적당히 희석한 균 현탁액을 3×YPS 한천 평판배지에 도말하고 하룻밤 동안 37°C에서 배양한 후 자란 집락의 수를 세어 결정하였다.

V. vulnificus 백신의 면역화에는 체중 2.2-2.3 kg의 웅성 Japanese White rabbit을 삼육실험동물에서, 수동면역시험에는 생후 6주령의 웅성 ICR 마우스 (20-25 g)를 일본 Charles River Laboratories로부터 구입하여 사용하였다. 실험동물에게는 실험기간 동안 물과 사료를 자유로이 공급하였다.

V. vulnificus 백신

토끼의 면역화에 사용한 *V. vulnificus* 백신은 Fig. 1에 나타나 있는 바와 같은 방법으로 제조하였다(Lee 등, 1997). *V. vulnificus* 백신의 제조에는 *V. vulnificus* O항원 혈청형 중에서 패혈증 환자에게서 발현빈도가 가장 높은 O4형 균주인 CJVV004를 사용하였다. 우선 5 L 발효조에서 대수기까지 배양한 종배양액을 100 L의 3×YPS 액체배지에 접종하고 37°C에서 공기를 주입하면서 약 6-7시간 동안 배양하였다. 균주의 성장이 최고에 도달하였을 때 배양을 멈추고

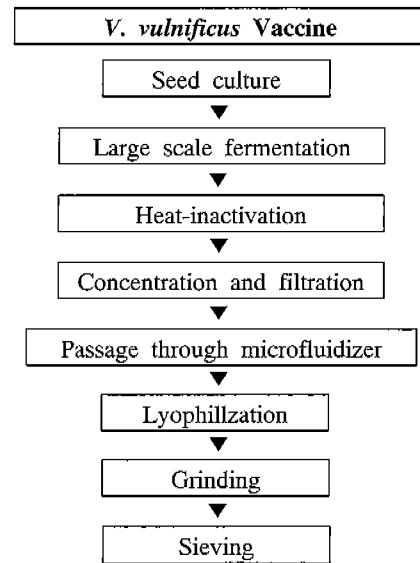


Fig. 1. Schematic diagram of the process used to prepare the *V. vulnificus* vaccine.

100°C에서 2시간 동안 가열하여 불활화하였다. 이 균주 용균물을 Sartocoon II system(Sartorius, Germany)으로 옮기고 0.2 μm 필터 상에서 농축한 뒤 100 L의 0.9% 생리식염수로 세척하였다. 다시 M-110 EH Microfluidizer(Microfluidics Corp., USA)에서 10,000 psi에서 2회 통과시킨 후 동결건조하였다. 이 백신 원말을 막사사발에 갈아서 100메쉬의 체를 통과시켜 분말상태로 제조하였다. 제조된 백신은 상온에서 보관하고 필요할 때마다 멸균 주사용수에 녹여 사용하였다.

V. vulnificus 세포 구성성분의 분리·정제

V. vulnificus 균주의 세포외막단백질 분획은 박 등(1997)의 방법에 의하여 분리·정제하였다. 각 균주를 500 ml의 3×YPS 액체배지에서 성장 최대점까지 배양하고 원심분리하여 균체를 회수하였다. 균체 침전물을 아세톤으로 3회이상 처리한 후, 인산완충용액(PBS, pH7.2) 상에서 진탕하면서 세포외막단백질을 2회 이상 추출하였다. 추출된 단백질 분획은 Centriprep 3(Amicon, USA)을 사용하여 농축하고 Biorad protein assay kit(Biorad, USA)을 사용하여 단백질의 함량을 측정하였다.

V. vulnificus 균주의 LPS는 배양액을 원심분리하여 회수한 균체로부터 페놀추출법으로 분리 정제하였다(Lee 등, 1995). *V. vulnificus* 균주의 CPS는 3×YPS 한천평판배지에서 24시간 배양한 균체를 회수하여 PBS에 현탁시키고 강하게 진탕한 뒤 원심분리하여 상등액으로 유리된 CPS를 페놀로 추출한 뒤 추출된 CPS분획은 Centriprep 3을 사용하여 농축하였다(Reddy 등, 1992).

토끼의 면역화 및 채혈

토끼의 면역화에는 *V. vulnificus* 백신 10 mg에 해당하는

백신 현탁액 4 ml을 튜브를 이용하여 경구투여하였다. 투여 시기는 0, 4, 8, 12 및 16일로서 4일 간격으로 5회 반복 투여하였다. 백신을 투여하기 전과 투여 후에 토끼의 귀 정맥으로부터 혈액을 채취하여 1시간 동안 실온에서 방치한 뒤 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 토끼의 혈청은 -70°C에 보관하였다.

항체역가 분석

백신을 투여한 토끼의 혈청 항체역가는 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 분석하였다. 96 well-polystyrene microtiter plate(Costar Corp., USA)의 각 well 당 *V. vulnificus* 균 부유액 100 μ l를 가하고 4°C에서 하룻밤 동안 코팅하였다. 코팅된 well을 0.05% Tween 20을 함유한 PBS(PBST)로 3회 세척하고 1% 우혈청 알부민을 함유한 PBS 300 μ l로 상온에서 2시간 동안 여백차단하고 PBST로 3회 세척하였다. plate에 2배씩 계열희석한 토끼 혈청 100 μ l를 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. PBST로 5회 세척한 후 horseradish peroxidase와 결합시킨 항 토끼 면역글로블린 염소항체(Accurate, USA)를 1:1000으로 희석하여 50 μ l를 가하고 나서 1시간 동안 반응시키고 o-phenylenediamine dihydrochloride(Sigma, USA)를 발색물질로 이용하여 발색시켰다. 50 μ l의 0.2 N 황산용액을 가하여 발색반응을 정지시키고 Wellscan ELISA Reader(Denley, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시료들은 2회 반복하여 분석하였다.

Western blot 분석법

V. vulnificus 균주의 항원에 대한 토끼 항체의 특이성은 western blot을 이용하여 분석하였다. 세포외막단백질, LPS 및 CPS를 8-16% 농도구배 Tris-glycine sodium dodecylsulfate(SDS)-polyacrylamide gel(Novex, USA)에서 전개한 후, 192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl, pH 7.2, 20% methanol을 transfer buffer로 하여 gel blot 기구인 XCell II(Novex, USA)를 사용하여 nitrocellulose 막에 blotting하였다. 이 막을 상온에서 2시간 동안 5%의 탈지유를 함유한 PBS로 여백차단하고 1:250으로 희석된 토끼혈청과 2시간 동안 반응시켰다. 이 막을 PBST로 5회 세척하고, 2차 항체로는 horseradish peroxidase와 결합시킨 항 토끼 면역글로블린 염소항체(Accurate, USA)와 반응시킨 후 4-chloro-1-naphthol(Sigma, USA)과 H₂O₂을 사용하여 발색시켰다. 이때 SeeBlue™ Prestained Standards(Novex, USA)를 사용하여 단백질의 분자량을 결정하였다.

Opsonophagocytic killing activity

생성된 토끼항체가 백혈구의 식균작용을 증가시키는 능력은 opsonization 분석법을 사용하여 측정하였다(Bjornson와 Michael, 1974). 실험에 사용한 백혈구는 건강한 공혈자에게서 얻어진 신선한 말초혈액으로부터 분리하였다. 신선한 혈액을 600×g에서 10분간 원심분리한 후 침전된 백혈

구 세포층만을 취하여 생리식염수로 2회 세척하고 1.5×10⁶/ml이 되도록 생리식염수에 현탁시켰다. 토끼 혈청 100 μ l, *V. vulnificus* 균주의 부유액 200 μ l, 토끼보체(Serotec, England) 50 μ l, 백혈구 부유액 200 μ l를 Eppendorf tube에 넣고 37°C에서 교반기에서 천천히 교반하면서 30분간 반응시켰다. 반응액을 50 μ l씩 취하여 생리식염수로 적절히 희석한 다음, 희석액 50 μ l를 취하여 3×YPS 한천 평판배지에 도말하고, 37°C에서 12-16시간 배양한 후 자란 집락의 수를 세었다.

수동면역시험

V. vulnificus 백신에 대하여 생성된 항체의 감염 방어효능을 측정하기 위하여 마우스를 이용한 수동면역시험을 행하였다. 음성 ICR 마우스 8마리를 한 군으로 하여 토끼의 면역후 혈청 0.3 ml을 복강내 투여하였다. 대조군에는 0.3 ml의 생리식염수 또는 토끼의 면역전 혈청을 복강 투여하였다. 2시간 후 *V. vulnificus* 균 부유액(2.7×10⁷ cfu/ml)을 마우스당 0.3 ml씩 복강 내로 주사하여 감염시키고, 감염 후 6일 동안의 생존률을 관찰하였다.

실험결과

경구 *V. vulnificus* 백신의 면역원성

V. vulnificus O4 혈청형 균주를 대량배양하여 제조한 경구 *V. vulnificus* 백신의 면역원성을 시험하기 위하여 일차적으로 3마리의 토끼에게 백신 10 mg을 4일 간격으로 5회 경구로 투여하였다. 이들 토끼로부터 백신 투여전과 투여 후 일정 간격으로 혈액을 채취하고, 이로부터 혈청을 분리하여 *V. vulnificus* CJVV004 균주에 대한 혈청 IgG 및 IgM 항체역가를 ELISA법으로 분석하였다(Fig. 2). 백신을 투여한 3마리의 토끼 중에서 2마리의 혈청 IgG와 IgM 항체역가는 크게 상승하였으나 다른 1마리는 항체역가가 상승하지 않아 백신 투여전과 후의 역가에 차이가 없었다. 항체 생성반응을 보인 토끼 2마리의 혈청 IgG 항체역가는 16일에 상승하기 시작하여 28일에 최고값에 도달한 뒤 그대로 유지되거나 완만히 감소하는 경향을 보였다. IgG 항체역가는 112일에도 상당히 높은 수준의 역가를 유지하여 백신 투여 전 역가의 2배에 달하였다(Fig. 2A). 반면에 IgM 항체역가는 IgG 항체역가보다 빠르게 상승하여 16일에 면역전 혈청역가의 2-3배에 달하고, 17 또는 28일에 최고 값에 도달하였으나, 그 이후 급격히 하강하여 백신 투여 전의 수준으로 감소하였다(Fig. 2B). 이와 같은 토끼의 항체역가는 *V. vulnificus* 균주로부터 분리한 세포외막단백질을 ELISA 항원으로 사용한 경우에도 유사한 경향을 나타내었다(data not shown).

V. vulnificus 백신에 대한 토끼 항혈청이 다른 혈청형 *V. vulnificus* 균주와의 교차반응성이 있는가를 알아보기 위하

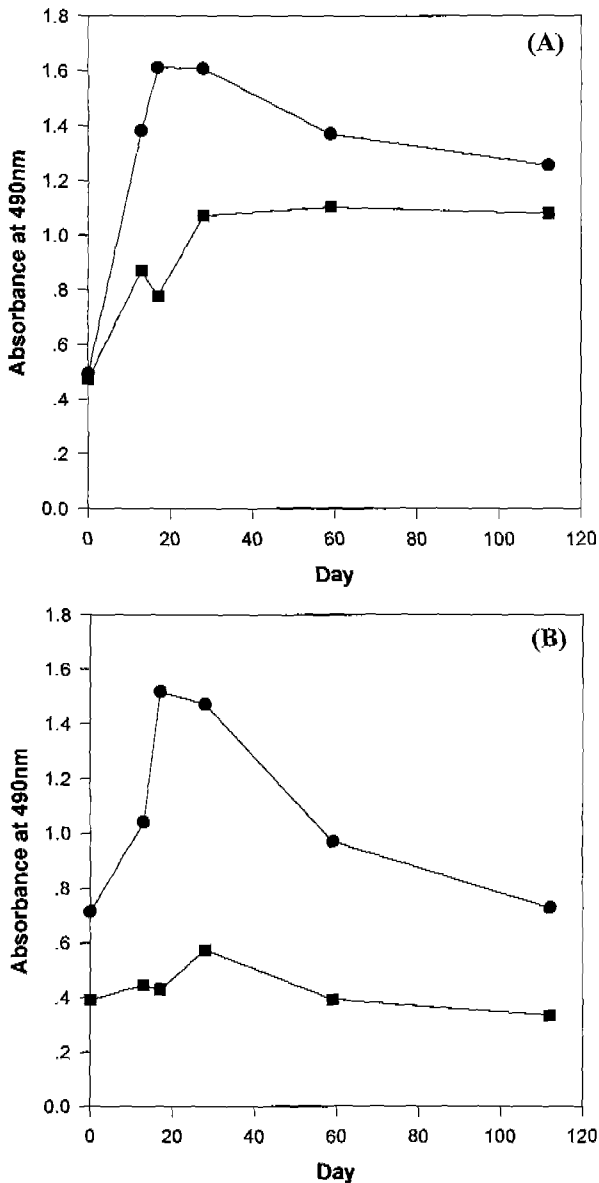


Fig. 2. Serum antibody response of rabbits immunized orally with the *V. vulnificus* vaccine. Rabbits were given orally 10 mg of the *V. vulnificus* vaccine five times at four-day intervals (on days 0, 4, 8, 12 and 16). Blood samples were obtained from the rabbits, and antibody titers of the antisera were assayed against whole cells of *V. vulnificus* strain CJVV 004 by ELISA. A, IgG antibody titer at a 1:800 dilution; B, IgM antibody titer at a 1:100 dilution. Symbols (■, ●) indicate the antibody titers of two rabbits which responded to the vaccine.

여 *V. vulnificus* O항원 혈청형 9균주(CJVV001-CJVV009)에 대한 항체역가를 ELISA로 측정하였다. Fig. 3은 백신에 대하여 면역반응을 보인 토끼 2마리의 항체역가의 평균값을 구하여 나타내었다. 면역전과 면역후의 토끼의 *V. vulnificus* O항원 혈청형 균주에 대한 항체역가는 모든 혈청형에

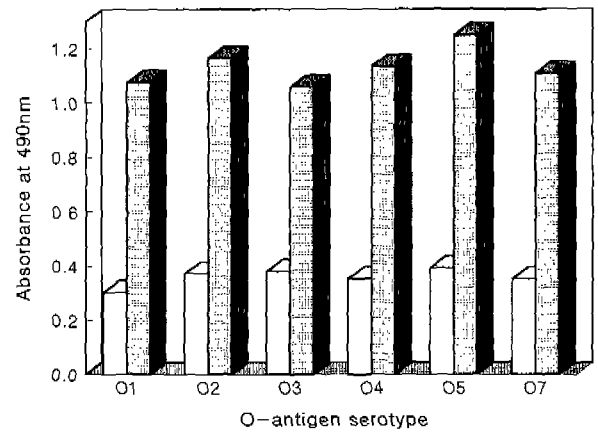


Fig. 3. Cross-reactivity of the antibodies induced against the *V. vulnificus* vaccine to various *V. vulnificus* O-antigen serotypes strains. Rabbits were immunized orally with 10 mg of the *V. vulnificus* vaccine on days 0, 4, 8, 12 and 16, and blood samples were collected on days 0 and 28. Serum IgG antibody levels were measured against whole cells of various *V. vulnificus* O-antigen serotypes by ELISA at a 1:6400 dilution. Shown is the mean titer of two rabbits which responded to the vaccine. Symbols: □, pre-immune sera; ■, post-immune sera.

대하여 백신 생산 균주인 CJVV004 균주와 유사한 수준을 보여 이들 균주에 대하여 교차반응성이 있음을 나타내었다.

V. vulnificus 백신의 면역원성을 알아보기 위하여 일차적으로 행한 실험에서 토끼 3마리 중 2마리만이 백신에 반응하였으므로, 백신의 면역원성을 확인하기 위하여 15마리의 토끼에 *V. vulnificus* 백신 10 mg을 5회 경구투여하고, 토끼의 면역전과 5회 면역 후 7일 후의 혈중 항체역가를 ELISA법으로 측정하였다(Fig. 4). 혈청을 800배 희석하여 항체역가를 측정하였을 때, 토끼 15마리의 면역후 평균항체역가는 면역전 혈청에 비하여 2.5배 상승하였다. 토끼 개개의 혈청역가를 살펴보면 15마리 중에서 면역후 2배 이상의 역가상승을 보인 토끼는 10마리였으며, 가장 높은 상승률을 보인 토끼는 면역후의 항체역가가 면역전 혈청에 비하여 7배나 상승하였다. 역가상승비가 2배 이하인 토끼 5마리 중 3마리의 실제 항체역가는 면역 후 항체역가가 전체 토끼의 면역후 평균항체역가가 이상이었으나 면역전후의 비율이 2배 이하인 것은 원래 높은 면역전 항체값 때문인 것으로 나타났다(Fig. 4). 이와 같은 사실을 고려할 때 실제 항체생성 면역반응을 보이지 않은 토끼는 전체 15마리 중 2마리로서 경구 *V. vulnificus* 백신에 대한 전체 토끼의 항체 생성율은 86.7%로 볼 수 있다.

항체의 특이성

V. vulnificus 백신을 경구투여하여 생성된 토끼의 항체가 백신항원에 특이적으로 반응하는가를 확인하기 위하여 western blot을 시행하였다. *V. vulnificus* 세포 구성성분 중

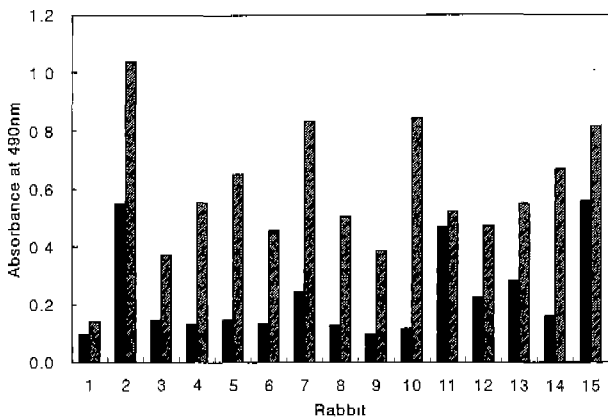


Fig. 4. Serum IgG antibody levels of rabbits immunized orally with the *V. vulnificus* vaccine. Blood samples were collected before and 7-days after the fifth immunization, and antibody titers in the antisera were determined against whole cells of *V. vulnificus* strains CJVV004 by ELISA at a 1:800 dilution. ■, pre-immune sera; ▨, post-immune sera.

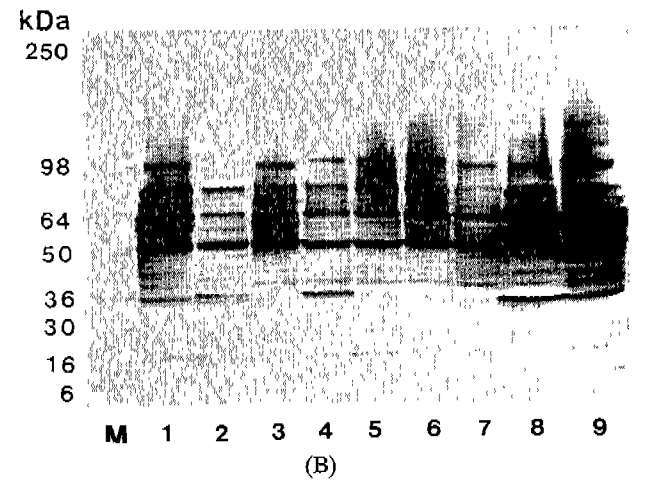
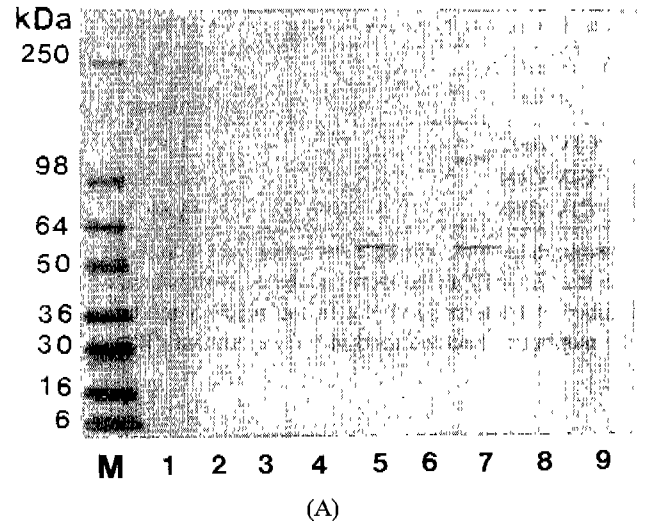


Fig. 6. Reactivity of the rabbit antisera with outer membrane proteins of various *V. vulnificus* O-antigen serotype strains. OMPs purified from various *V. vulnificus* strains were separated on a 8-12% gradient SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane and probed at a 1:250 dilutions with rabbit pre-immune sera (A) or post-immune sera (B). M, pre-stained protein molecular weight markers; lanes 1 to 9 are the OMPs purified from *V. vulnificus* O1 to O9 serotype strains, respectively. Molecular sizes of the protein markers are shown on the left.

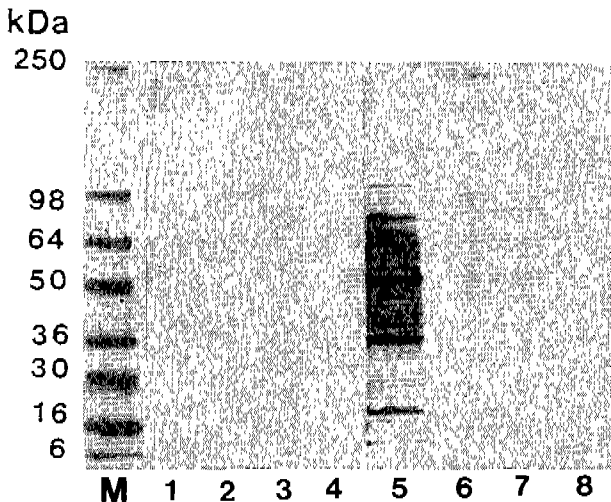


Fig. 5. Western blot analysis of various *V. vulnificus* cell components using rabbit antisera raised against the *V. vulnificus* vaccine. Lanes: M, protein molecular weight markers; 1 and 5, OMPs; 2 and 6, LPS; 3 and 7, CPS; 4 and 8, OMPs treated with protease; 1, 2, 3 and 4, rabbit pre-immune sera; 5, 6, 7 and 8, rabbit post-immune sera. Molecular sizes of the protein markers are shown on the left.

에서 세포외막단백질, LPS 및 CPS를 분리하여 토끼 혈청과 western blot분석 결과 Fig. 5에서와 같이 세포외막단백질만이 토끼의 면역후 혈청과 반응하였으며 (lane 5), 면역전 혈청은 아무런 반응성도 보이지 않았다(lane 1). 이 세포외막단백질을 protease로 처리하였을 때는 혈청과의 반응성이 사라진 것이 관찰되었다(lane 8). 이 결과로 *V. vulnificus* 백신의 주요항원은 세포외막단백질 성분인 것으로 확인되었다. 토끼의 항혈청과 *V. vulnificus* O항원 혈청형별

균주와의 교차반응성을 확인하기 위하여 O항원 혈청형 1-9형 균주의 세포외막단백질을 분리, 정제하여 western blot 분석을 시행하였다. 토끼의 면역전 혈청은 각 균주의 세포외막단백질과 별다른 반응성을 보이지 않았으나(Fig. 6A), 면역후 혈청은 모든 *V. vulnificus* 혈청형 균주에 높은 반응성을 보였으며, 그 반응성은 혈청형 간에 큰 차이가 없었다(Fig. 6B). 세포외막단백질들 중에서는 9종의 O항원 혈청형 균주의 모든 균주에서 공통적으로 약 50, 60, 80 및 100 kDa 크기의 단백질들이 반응성을 보였다. 이 실험 결과로

Table I. Opsonophagocytic killing activity of rabbit antisera raised against an oral *V. vulnificus* vaccine^a

<i>V. vulnificus</i> strain	No. of colonies (cfu)			Reduction in No. of colonies (%)	
	in-put ^b	pre-immune serum	post-immune serum	vs. in-put	vs. pre-immune serum
CJVV002 ^c	7.5×10 ⁵	1.1×10 ³	1.4×10 ²	99.98%	87.27%
CJVV004	5.0×10 ⁵	2.3×10 ⁴	3.8×10 ²	99.92%	98.34%
CJVV005	1.3×10 ⁵	1.8×10 ⁴	6.2×10 ³	95.23%	65.56%

^aOpsonophagocytic killing activity of rabbit antisera was measured as described in Materials and Methods. Human peripheral leukocytes (7.5×10⁵ cells) were incubated with bacteria and rabbit sera in the presence of rabbit complement for 30 min at 37°C, and the number of bacteria surviving in the reaction mixture was determined by counting colonies grown overnight on 3×YPS agar plates.

^bthe number of bacteria used in the experiment. ^cRabbit complement was heat-inactivated before use for this strain.

V. vulnificus 경구백신은 세포외막단백질이 주요 항원이며, 모든 O형원 혈청형 균주에 대하여 교차 반응성이 있음을 확인하였다.

항체의 감염 방어능

V. vulnificus 백신을 투여한 토끼에서 생성된 항체의 *V. vulnificus* 균에 대한 감염방어능력을 두 가지 방법으로 측정하였다. 먼저 *V. vulnificus* 백신에 대한 혈청 내 항체가 백혈구에 의한 *V. vulnificus*의 식균작용을 증가시키는 능력을 opsonophagocytic killing activity 시험을 통하여 측정하였다. 건강한 공혈자의 혈액에서 분리한 백혈구와 토끼 보체를 *V. vulnificus* 균과 함께 반응시킨 후 반응액에 남아 있는 녹농균의 수를 측정하였다. 이 반응액에 토끼의 면역전, 후의 혈청을 가하고 반응시켜 *V. vulnificus* 백신에 특이적인 항체에 의한 백혈구의 식균능 증가활성을 구하였다 (Table I). *V. vulnificus* 균에 대한 토끼 혈청의 식균능 증가활성에는 혈청형 균주별로 차이가 있었다. 반응액에 면역혈청을 가하였을 때 반응액중 CJVV004와 CJVV005 균의 수가 95%이상 감소하였으며, 면역전 혈청과의 반응액에 남아 있는 균 수와 비교하여서는 각각 98.34%와 65.56%가 감소하였다. 이는 *V. vulnificus* 백신으로 면역화된 토끼의 항체가 보체 존재 하에서 *V. vulnificus* 균에 대하여 백혈구의 식균능을 증가시키는 작용이 있음을 나타낸다. O형원 혈청형 2형 균주인 CJVV002 균주는 보체 존재 하에 면역 후 항체를 가하였을 때는 반응액에서 균이 거의 검출되지 않았으며, 항혈청 없이 보체와 백혈구만을 가하였을 때에도 상당수의 균이 제거되어 항체의 식균능 증가활성을 측정할 수 없었다. 따라서, CJVV002 균주의 경우에는 반응액에 항혈청과 불활성화된 보체를 가하고 백혈구의 식균능을 측정하였다. 이 때 반응액에 가해준 CJVV002 균의 99.98%가 식균작용에 의해 감소하였으며, 면역전 혈청에 남아 있는 균의 87.27%가 항혈청에 의하여 감소하였다. 따라서 세포외막단백질에 대한 토끼항체가 CJVV002균주에 대하여는 보체가 없는 경우에도 식균능 증가작용이 있음을 나타낸다.

토끼 항체의 *V. vulnificus* 균에 대한 방어력을 직접적으로 확인하기 위하여 수동면역시험을 수행하였다. *V. vulni-*

Table II. Passively transferred protection by rabbit antisera of mice against *V. vulnificus* infection

Rabbit sera	No. of mice survived ^a				Protection rate
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 6	
saline	8	0	0	0	0%
pre-immune	8	0	0	0	0%
post-immune	8	8	8	8	100%

^aGroups of 8 mice were given i.p. 0.3 ml of saline or rabbit sera. Two hours later mice were challenged i.p. with 8.3×10⁶ cfu of *V. vulnificus* and observed for 6 days postinfection.

ficus 백신을 5회 경구투여한 토끼의 혈청을 마우스에 복강 내 주사하고 2시간 후 *V. vulnificus* O4 혈청형인 CJVV004로 감염시키고 마우스의 생존율을 관찰하였다. 대조군에는 생리식염수 또는 토끼의 면역전 혈청을 투여하였다. Table II에 나타난 바와 같이 식염수나 면역전 혈청을 투여한 마우스는 균으로 감염시킨 다음날 모두 사망하였으나, 반면에 *V. vulnificus* 백신에 대한 토끼의 면역혈청을 투여한 마우스는 6일 후에도 모두 생존하여 100%의 감염 방어율을 보였다.

고 찰

V. vulnificus 균은 일반적으로 자연환경에서 검출되는 균과 환자에게서 분리되는 임상균주들의 O형원 혈청형별 분포가 다르게 나타난다(박석돈, 1996). 우리나라의 자연환경에서 분리되는 균주는 O1형과 O4형이 비슷한 비율을 보여 각각 17, 18%로 가장 높으며, O2, O7 및 O8형이 10-14%의 발생비율을 보이고 있다. 반면에 환자로부터 검출되는 *V. vulnificus* 균은 연구자에 따라 차이는 있으나 모든 연구에 있어서 O4형 혈청형에 의한 발생빈도가 59%이상으로 절대 다수를 차지하고 있다. 본 연구에서 제조된 경구 *V. vulnificus* 백신은 백신성분 중에서 세포외막단백질이 주요 항원으로 작용하는 것으로 밝혀졌다. 세균의 세포외막단백질은 모든 혈청형 균주에 공통적으로 존재하며, 따라서 세

포외막단백질에 대한 항체는 모든 혈청형 균주에 교차반응성을 갖는다. 이는 본 연구에서 *V. vulnificus* 균을 ELISA 항원으로 하여 측정된 항체역가와 세포외막단백질을 분리하여 행한 western blot 실험 결과로 확인되었다.

일반적으로 단백질은 경구로 반복 투여하였을 때는 면역반응을 일으키기보다는 항원에 대한 내성을 일으키는 것으로 알려져 있다. 그러나 단백질 항원을 가용성 상태가 아닌 입자상태로 투여하였을 때는 면역반응을 일으키게 된다. 또한, 소장과 같은 점막을 통한 면역화에는 입자의 크기가 항원의 전달에 중요한 결정인자가 된다는 사실이 잘 알려져 있다. 생체 내에서 분해되는 microsphere에 ovalbumin을 넣어 행한 실험에서 microsphere 입자의 크기에 따라 소장 점막의 Peyer's patch(PP)를 통한 흡수와 비장으로 이동하는 속도가 영향을 받는다는 사실이 밝혀졌다(Tabata 등, 1996). 크기가 4 μm 이하인 입자는 PP에서 흡수되어 비장으로 이동한 후 전신면역반응을 일으켜 혈중 내의 IgG 항체생성을 유도하며, 10 μm 이상인 입자는 PP에서 흡수되거나 비장으로의 이동이 제한되어 주로 장점막에서의 IgA 항체 생성에 관여한다. 본 연구에서 사용한 백신은 백신성분 중 세포외막단백질이 주요 항원으로 작용하는 것으로 밝혀졌다. 냉동건조한 백신 원말의 입자는 전자현미경으로 관찰하였을 때 크기가 2-10 μm 로 나타났다(unpublished data). 이는 백신의 세포외막단백질 성분이 세포막과 다른 세포 구성성분들과 micelle 형태의 입자를 구성하기 때문인 것으로 생각되며, 이 크기의 입자들은 쉽게 소장에서 흡수되고 비장으로 이동하는 것으로 추측된다.

본 연구에서 백신의 면역원성을 확인하기 위하여 행한 두 차례의 실험에서 *V. vulnificus* 백신을 경구투여한 토끼중 3마리는 백신에 대하여 항체를 형성하지 않았으며, 토끼에서 수차례 반복하여 시험한 결과 모든 경우 비슷한 결과를 얻었다. 반면에 이 cell lysate 백신을 토끼에 근육주사하였을 때에는 모든 토끼들이 세포외막단백질 성분에 대하여 높은 면역반응을 보였다. 이 사실로 미루어 볼 때, 몇 마리의 토끼에서 경구투여에 의하여 항체를 생성하지 않는 것은 토끼 각각의 장점막내의 구조차이, 점막면역체계(mucosal immunity)의 차이에 기인하는 것으로 추측되며, 이는 더 앞으로 연구되어야 할 내용이라고 생각된다. Mucosal immunity에 대하여는 현재까지 systemic immunity에 비하여 많이 연구되어 있지 않으나, 최근에 경구백신을 개발하기 위하여 몇 종의 세균을 대상으로 연구가 진행되고 있다. 위궤양과 위암을 일으키는 것으로 알려진 *H. pylori*의 경우 *H. pylori*의 cell lysate를 adjuvant와 병용 또는 단독으로 마우스에 경구투여하였을 때 점막에서 sIgA 항체를 생성하였을 뿐만 아니라 혈중 IgG 항체생성을 유도하였으며 이 항체는 *H. pylori*의 세포외막단백질에 특이적으로 반응하였다(Czinn and Nedrud, 1991). 이러한 보고는 세균 lysate의 경구투여에 의한 항체

생성반응의 가능성을 보인 본 연구와 일치한다고 하겠다.

V. vulnificus 균의 감염에 대한 생체의 방어기전은 아직 잘 밝혀져 있지 않다. *V. vulnificus* 균은 균주에 따른 차이는 있으나 일반적으로 *V. cholerae*보다 혈청에 의한 살균작용에 잘 견디며(Kreger 등, 1981), *V. cholerae*나 *V. parahemolyticus*에 비하여 보체를 활성화하지 않는 것으로 알려졌다(Tamplin 등, 1983). 따라서, *V. vulnificus*균에 대한 방어기전은 보체와 *V. vulnificus*에 특이적인 항체에 의존적인 백혈구의 식균작용(complement-dependent antibody-mediated opsonophagocytosis)에 의한 것으로 생각되며, 이와 같은 사실은 본 연구결과로 확인되었다. *V. vulnificus* 백신에 의하여 생성된 항체는 보체 존재 하에서 백혈구의 식균작용을 증가시켜 시험관 내에서 *V. vulnificus*의 수를 크게 감소시켰으며(Table I), 또한 항체의 opsonization 역가는 혈청의 항체역가와 비례하는 경향을 보였다(unpublished data).

백신을 개발함에 있어서 가장 먼저 고려해야 할 사항은 안전성과 유효성이며, 백신의 유효성은 백신의 면역원성과 생성된 항체가 대상 병원균의 감염을 방어하는 능력의 여부로 결정된다. 세균백신 성분으로 사용되고 있는 세포구성물 항원은 여러 가지가 있으나 이들 제제는 대부분 주사제의 형태로 되어 있다. 투여가 간편하고 안전한 경구용 백신은 근래에 들어서 활발히 개발되고 있다. 본 연구자들은 *V. vulnificus* 패혈증 예방을 위한 백신을 개발하기 위하여 간편하고 효율이 좋은 항원제조법을 개발하였다. 이 *V. vulnificus* 백신을 실험동물에 경구로 투여하였을 때 전신적인 항체생성반응을 일으키는 능력이 있어 혈중 내에 IgG 항체를 유도하였고, 생성된 항체는 주로 세포외막단백질에 대해 특이적 반응성을 보였다. 또한 이 항체는 in vitro와 in vivo 실험에서 *V. vulnificus* 균주의 감염을 예방하는 능력이 있었다. 이와 같은 실험결과를 볼 때, 본 연구자들이 독자적으로 개발한 항원 제조법으로 제조한 백신 항원은 경구투여시에 우수한 면역원성과 감염예방능력을 보여 주었고, 사람에게 있어서 *V. vulnificus*의 감염예방을 위한 경구백신으로의 개발가능성 뿐만 아니라 유사한 병원성 세균에 대한 경구백신제조에도 범용적으로 적용이 가능한 기술로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구에 사용된 *V. vulnificus* 균주는 부산대학교 주진우 교수와 원광대학교 박석돈 교수로부터 제공받았으며, 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- 박석돈. (1996). 비브리오 불니피쿠스 감염증. 고려의학.
주진우. (1987). *Vibrio vulnificus* 백신제조원의 혈청형 균주 분리. 대한미생물학회지 22, 393-402.

- 주진우, 김극찬, 조운복, 이연태, 이미현, 주성아. (1989). *Vibrio vulnificus*의 사균백신과 정제 IgG의 면역효과. 대한미생물학회지 **24**, 369-380.
- Bahranti, K. and Oliver, J. D. (1990). Studies on the lipopolysaccharide of a virulent and an avirulent strain of *Vibrio vulnificus*. *Biochem. Cell. Biol.* **68**, 547-551.
- Bjornson, A. B. and Michael, J. G. (1974). Factors in human serum promoting phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Interaction of opsonins with the bacterium. *J. Infect. Dis.* **130**: S119.
- Czinn, S. J. and Nedrud, J. G. (1991). Oral immunization against *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **59**, 2359-2363.
- Devi, S. J., Hayat, U., Fransch, C. E., Kreger, A. S. and Morris, Jr., J. G. (1995). Capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines of carbotype 1 *Vibrio vulnificus*: construction, immunogenicity, and protective efficacy in a murine model. *Infect. Immun.* **63**, 2906-2911.
- Devi, S. J., Hayat, U., Powell, J. L. and Morris, Jr., J. G. (1996). Preclinical immunoprophylactic and immunotherapeutic efficacy of antisera to capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **64**, 2220-2224.
- Gray, L. D. and Kreger, A. S. (1985). Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **48**, 62-72.
- Hlady, W. G. and Klontz, V. (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J. Infect. Dis.* **173**, 1176-1183.
- Kelly, M. T. (1982). Effect of temperature and salinity on *Vibrio(Benechea) vulnificus* occurrence in a Gulf coast environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 820-824.
- Kothary, M. A. and Kreger, A. S. (1985). Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **50**, 534-540.
- Kreger, A., Dechatelet, L. and Shirley, P. (1981). Interaction of *Vibrio vulnificus* with human polymorphonuclear leukocytes: Association of virulence with resistance to phagocytosis. *J. Infect. Dis.* **144**, 244-248.
- Kreger, A. S., Gray, L. D. and Testa, J. (1984). Protection of mice against *Vibrio vulnificus* disease by vaccination with surface antigen preparations and anti-surface antigen antisera. *Infect. Immun.* **45**, 537-543.
- Lee, N.-G., Jung, S. B., Ahn, B. Y., Kim, Y. G., Kim, J. H., Lee, Y., Park, W. J. and Kim, H. S. (1997). Preparation of a *Vibrio vulnificus* vaccine with immunogenicity and protective efficacy. *J. Microbiol. Biotech.* **7**, 423-428.
- Lee, N.-G., Sunshine, M. G. and Apicella, M. A. (1995). Molecular cloning and characterization of the nontypeable *Haemophilus influenzae* 2019 rfaE gene required for lipopolysaccharide biosynthesis. *Infect. Immun.* **63**, 818-824.
- Park, W. J., Cho, Y.-J., Ahn, D. H., Jung, S. B., Lee, N.-G., Kim, H.-S., Hahm, K. S. and Kim, Y. S. (1997). An outer membrane protein preparation as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Microbiol. Biotech.* **7**, 144-150.
- Park, J. W., Ma, S. N., Song, E. S., Chae, M. R., Park, B. H., Rho, R. W., Park, S. D. and Kim, H. R. (1996). Pulmonary damage by *Vibrio vulnificus* cytolysin. *Infect. Immun.* **64**, 2873-2876.
- Reddy, G. P., Hayat, U., Abeygunawardana, C., Fox, C., Wright, A. C., Maneval Jr., D. R., Bush, C. A., Morris Jr., J. G. (1992). Purification and determination of the structure of capsular polysaccharide of *Vibrio vulnificus* M06-24. *J. Bacteriol.* **174**, 2620-2630.
- Rotz, L. D., Buckley, D. P. and Fine, D. P. (1996). Overwhelming sepsis with *Vibrio vulnificus*: a coastal pathogen in Oklahoma. *J. Okla. State Med. Assoc.* **89**, 349-352.
- Tacket, C. O., Brenner, F. and Blake, P. A. (1984). Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J. Infect. Dis.* **149**, 558-561.
- Tabata, Y., Inoue, Y. and Ikada, Y. (1996). Size effect on systemic and mucosal immune response induced by oral administration of biodegradable microspheres. *Vaccine.* **14**, 1677-1685.
- Tamplin, M. L., Specter, S., Rodrick, G. E. and Friedman, H. (1983). Differential complement activation and susceptibility to human serum bactericidal action by *Vibrio* species. *Infect. Immun.* **42**, 1187-1190.
- Wittman, C. M. and Griffin, P. M. (1993). Preventing *Vibrio vulnificus* infection in the high risk patient. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **2**, 275-276.
- Wright, A. C., Simpson, L. M., Oliver, J. D. and Morris, Jr, J. G. (1990). Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **58**, 1769-1773.
- Wright, A. C. and Morris, Jr., J. G. (1991). The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*: Inactivation and relationship to virulence in mice. *Infect. Immun.* **59**, 192-197.
- Yoshida, S.-I., Ogawa, M. and Mizuguchi, Y. (1985). Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **47**, 446-451.