약학회지 제 49 권 제 6 호 484~489 (2005)
Yakhak Hoeji Vol. 49, No. 6

藥學會誌

폐렴구균 DNA 백신의 유효성 평가

이주희 · 한용문#
동덕여자대학교 약학대학 면역 · 미생물학 연구실
(Received September 30, 2005; Revised October 24, 2005)

Evaluation of a *Streptococcus pneumoniae* DNA Vaccine Efficacy

Jue-Hee Lee and Yongmoon Han#
College of Pharmacy, Dongduk Women's University, 23-1 Wolgok-Dong, Seongbuk-Gu, Seoul 136-714, Korea

Abstract — *Streptococcus pneumoniae* is the leading cause of pneumonia and bacterial meningitis. The current polysaccharide vaccine has been reported ineffective in elderly adults and children less than 2 years of age. Thus, in recent many researchers have been focused on a different approach, DNA vaccine. In our laboratory, we developed a *Streptococcus pneumoniae* DNA (SPDNA) vaccine. This SPDNA vaccine was formulated by inserting the region encoding part of the capsule in the *S. pneumoniae* into the LAMP-1. In present work, with use of the SPDNA vaccine we attempted to establish a certain methodology useful for evaluation of effectiveness and immunoresponse of a DNA vaccine. Results showed that the subcutaneous route was the most effective for production of antisera specific for *S. pneumoniae* in mice. By isotyping analyses, IgM, IgG1, IgG2a, and IgG2b were determined. In addition, INF-γ and IL-4 were predominantly detected. Combination of those data resulted in a pattern of IgG1<IgG2a=IgG2b and INFγ>IL-4, which indicates the immunity towards the Th1 response predominantly. Furthermore, the SPDNA vaccination induced resistance of the CD4+T lymphocyte-depleted mice against disseminated pneumococcal infection. These data appear to be possibly due to activation of CD8+T cell-activation. Taken together, this methodology can be applied for evaluating efficacy and mode of action of a DNA vaccine as minimum criteria.

Keywords □ DNA vaccine, *S. pneumoniae*, isotyping, cytokine, mode of action, evaluation

최근 항생제에 대한 감염균의 빈번한 내성으로 인해 새로운 치료방법이 모색되고 있는데, 그 대안으로 백신을 들 수가 있다. 백신개발의 한 방법으로 분자생물학과 면역학을 접목하여 DNA 백신 또는 RNA를 항원제시세포에 삽입하는 새로운 방법이 시도되고 있다. 최초의 DNA 백신은 바이러스의 유전자조각을 plasmid vector를 이용하여 유전자가 숙주 내에서 episome 형태로 발현되도록 한 것이다.[1-3] 이러한 DNA 백신 개발방법은 감염성질환 뿐 아니라 암치료 방법(gene therapy) 에도 적용되고 있다.[4-6] DNA 백신은 항원제시세포에 직접 작용하여 CD4+ 및 CD8+ T lymphocytes를 활성화하거나 체세포(somatic cell)에 직접 작용하여 CD8+ T-lymphocyte만을 활성화하여 세포매개성 면역성을 작용시키거나 두 기전 모두에 작용하기도 한다. 그러므로 DNA 백신은 체액성 면역과 세포매개성 면역성 모두를 유도하여 감염균을 제거하는 장점이 있다. 이와 같은 장점을 갖춘 DNA 백신개발은 세계적 추세로 유럽과 미국 등에서는 이미 10여 년 전부터 많은 연구가 진행 중에 있으며, DNA 백신의 효능, 유효성 및 안전성검색에 대한 기술을 축적하고 있다.[7,8]

폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)은 폐렴과 뇌막염, 중이염, 패혈증을 일으키는 Gram 양성세균으로 치료는 항생제요법이 주로 사용되지만 최근에는 항생제에 대한 내성증가로 인하여 발병률과 사망률이 가장 높게 보고되고 있다.[9-11] 기존의 폐렴구균용 백신인 다당류백신(Capsular pneumococcal polysaccharide vaccine)은 2세 미만의 유아와 노약자에게는 면역력 미성숙과 약화, T-lymphocyte 비의존성 면역반응 때문에 면역기억(Immunological Memory)가 없어 효과가 낮고 지속적 예방효과를 기대 할 수 없다.[11,12] 이런 이유로, 새로운 종류의 폐렴구균 백신개발이 요구되고 있다.

병원성 폐렴구균은 세포표면이 다당물질로 구성된 capsule로 싸여있는데, 다당류백신(예: 23가 백신)은 opsonin에 의한 탐식작용으로 침입균을 사멸케 한다.[9] 이때 항체의 항원기(epitope)

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

는 다당류이므로 peptide mimicking 방법으로 이 항원기를 peptide화하여 codon에 따라 DNA 염기서열을 규명하여 DNA 백신을 제조할 수 있다. 이와 반해서, 폐렴구균의 단백질 항원물질[12,14]을 사용할 때는 peptide mimicking 방법이 필요 없으나, 이 경우에는 유도된 항단백질 항체가 capsule로 싸여 있는 폐렴구균 인식도가 낮아서 효과가 떨어진다. 또한, 다른 발병인자인 pneumolysin을 항원으로 사용이 가능한데, 단점은 pneumolysin 독성이 매우 높아서 항원의 용량조절이 어렵다. 최근에는 pneumolysin 생성이 약화된 *S. pneumoniae* 변종균주를 이용한 생균백신을 사용하는 연구가 활발하게 진행되고 있지만, 약화 생균백신의 단점인 숙주 내에서 병원성회복으로 인해 감염성을 유발할 수 있다. 이런 이유로 폐렴구균용 DNA 백신개발은 매우 의미가 있다.

본 연구에서는 작용기전이 분명하고 안전한 다당류항원을 사용하여 개발된 폐렴구균 DNA 백신의 유효성을 연구 조사하였다. 이 조사를 위해, 본 연구실의 이전 연구에서 capsule 특이성 폐렴구균 접합백신인 JY-Pol/Alum을 개발하여 그 효능과 유효성 여부를 조사결과와,[15] JY-Pol/Alum 제형으로 유도된 항체의 탄수화물 항원기(epitope)를 검색한 결과를[16] 바탕으로 하여 DNA 백신의 유효성 평가모델 확립에 필요한 인자규명을 검색하였다.

재료 및 실험방법

균주 및 배양조건

S. pneumoniae serotype 4는 ATCC(American Tissues and Cell Cultures)에서 구입하여 혈액배지(Blood agar; Becton Dickinson Co.)와 BHI(Brain Heart Infusion; Difco, USA) 액체배지를 이용하여 37°C에서 배양하여 사용하였다. 동물감염 실험에서는, 세포를 상기배양조건하에서 BHI 액체배지에 배양한 후 멸균된 인산완충용액(DPBS: Dulbecco's phosphate saline solution, Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 3회 세척한 다음에 500 nm 흡광도에서 0.1로 조정하여 생쥐의 꼬리정맥으로 전신감염 시켰다. 접종용량은 200 μl/mouse 이었다.

동물

6주령의 inbred BALB/c 암컷생쥐를 Charles River 연구소(USA)에서 구입하였으며, 동물들은 멸균된 물과 사료(Orient Co., Seoul, Korea)를 자유롭게 먹도록 하였다. 항원조와 공기여과장치가 완비된 청결한 동물 사육실은 온도 25°C에서 상대습도를 50~60%로 유지하였으며 조명은 12시간마다 낮과 밤이 반복되도록 조절하여 사용하였다.

SPDNA 백신의 LPS(lipopolysaccharide) 검색

백신제형내의 염증 유도성 cytokine 분비로 인한 비특이성 면역활성을 유발하는 LPS의 혼재여부는 상업용 LAL(Limulus Amoebocyte Lysate: Sigma) Kit을 사용하여 검사하였다. 실험조작은 SPDNA 백신제형 10 μg을 Kit에 포함된 시험관(1.5 cm ×5 cm)에 넣고 LAL과 혼합하여 액체상태의 시료가 젤(gel) 상태로의 전환여부를 측정하여 오염도를 평가하였다.

투여경로 및 접종회수 효과

BALB/c 생쥐에 SPDNA 백신을 10 μl씩 1일, 8일, 그리고 22일에 3번씩 피부, 피하, 또는 근육경로로 접종하고, 각각의 경우마다 투여 6일 후에 면역된 생쥐에서 혈청을 꼬리동맥으로부터 수집하여 항체생성 유무를 ELISA 방법[15,16]으로 검색하였다. 항체생성정도는 수집한 항체를 DPBS 용액으로 계대별 희석하여 동일한 ELISA 방법으로 항체역가를 측정하여 평가하였다. 각 그룹에 사용된 생쥐수는 5마리였다.

항체의 Isotyping 및 cytokine 생성검색

상기 기술한 접종일정에 따라 SPDNA 백신으로 생쥐를 면역시킨 후, 혈청을 수집하여 생성된 항체종류를 검색하였다. 이 실험은 면역력 작용기전 평가를 위한 것으로 anti-IgM, anti-IgA, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b 항체생성 유무를 검색하여 Th1과 Th2 상관성[17-19]과 IgM과 IgG의 생성량을 비교하여 면역의 특이성을 검사하였다. 검색에 사용된 이 항체는 모두 Sigma에서 구입하였다.

체액성 면역반응과 세포매개성 면역반응의 관여도를 조사를 위해서 INFγ와 IL-4를 선정하여 생성정도를 검색하였다. 이 실험에서는 SPDNA로 면역된 생쥐의 혈청을 Biotinylated rat anti-INFγ 항체와 Biotinylated rat anti-IL-4 항체(Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 사용하는 ELISA 방법으로 검색하였다. 결과를 cytokine profile에 따라 INFγ의 생산량이 많으면 Th1 lymphocyte가 더 활성화 된 것으로 평가하였으며, IL-4 생산이 많을 때는 Th2 lymphocyte가 더 관여한 것으로 판정하였다.[18,19]

SPDNA 백신 감작(sensitization)에 의한 CD8+T lymphocyte 활성검색

비특이성(non-specific) 면역반응으로 인한 SPDNA 백신효과의 가능성을 조사하기 위해, BALB/c 생쥐에 anti-CD4 antibody (2 mg/mouse, R&D Science, USA)를 복강내로 투여한 3일 후에 SPDNA 백신으로 면역접종 한 다음, 폐렴구균으로 상기 기술한 방법으로 전신감염시켰다. 예방효과는 면역접종제외한 모든 전 처리를 받은 음성대조군의 생쥐들과의 생존율을 비교하여 평가하였다. 각 그룹마다 생쥐수는 7마리였다.

이 실험 전의 기초실험에서, SPDNA 백신으로 감작(sensitization)된 생쥐의 CD4+T-lymphocytes의 제거여부를 먼저 조사하였다. 즉, 상기 기술한 동일한 방법으로 처리한 생쥐의 spleen을

적출하여 부드럽게 분쇄하고, nylon mesh(pore size=70 μm)를 이용하여 조직 등을 제거한 다음에 splenocytes를 형광물질로 염색하여 FACS(FACScan, Becton Dickinson, CA, USA) 분석방법으로 검색하였다.[20] 또한 세포매개성 면역반응은 본 연구실에서 확립된 JY-Pol(폐렴구균 협막다당물질) 사용하는 족부종(Footpad edema) 검사[15,16] 방법으로 평가하였다.

통계

생존율의 통계적 유의성은 Kaplan-Meier Test 방법(Systat 7.0; New Statistics for Windows; SPSS, Chicago, IL, USA)으로 산출하였다. 대조군과의 비교하였을 때 P 값어치가 0.05 보다 적을 경우는 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

SPDNA 백신제형의 LPS의 혼재 여부

SPDNA 백신제형과 LAL을 혼합하였을 때 Gel 상태로의 전환은 없는 것으로 확인되었으며, 이 결과는 LPS에 의한 비특이성 면역세포활성은 없는 것으로 판정되었다.

투여경로와 접종회수효과

SPDNA 백신의 항체유도는 생쥐에 피하접종하였을 경우만 유도되었으며, 접종회수에 따른 항체 생성은 3회 접종 후 항체가 생성됨이 평가 되었다(Fig. 1). 이 결과를 바탕으로, 이후의 실험에서는 생쥐에 SPDNA 백신을 피하경로로 3회 접종하여 작용기전을 조사하였다.

Table I – IgM and IgG subtypes induced by the SPDNA at the various degrees

	Subtypes of IgG		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
NMS*1	0.17±0.02	0.21±0.021	0.19±0.013
SPDNA*2	0.45±0.065	0.67±0.037	0.76±0.091

Note: Data show mean (±SE) of three separate experiments. Error bars; SE.
*1NMS stands for normal mouse serum.
*2SPDNA indicates antisera isolated from mice immunized SPDNA vaccine.

항체 Isotyping에 의한 작용기전 평가

생성된 항체의 Isotyping 결과, IgM, IgG, IgG2a, IgG2b 생성이 검색되었고 IgG subtype의 생성정도 비교에서는 IgG1 생성이 IgG2a 생성보다 낮았으며 IgG2a와 IgG2b의 생성정도는 거의 동일하게 생성되는 것으로 관측되었다(Table I). 이 폐렴구균 특이성 항체생성은 음성대조군으로 사용된 normal mouse serum에서 측정된 수치와 비교할 때 현저한 차이가 있음을 알 수 있다. IgA의 생성도 검색되었으나, 생성량은 미미하였으며 IgM도 검색되었으나 전체 IgG 생성량에 비교할 때 거의 1/25 정도에 불과하여 대부분의 IgM이 IgG로 전환되어 항체생성이 T-lymphocyte 의존형에 의한 것으로 추정되어졌다. 이 결과를 종합하여 IgG1 : IgG2a 상관비율에 따른 체액성면역과 세포매개성 면역반응여부를 분석 비교하였을 때, IgG1<Ig2a=IgG2b로

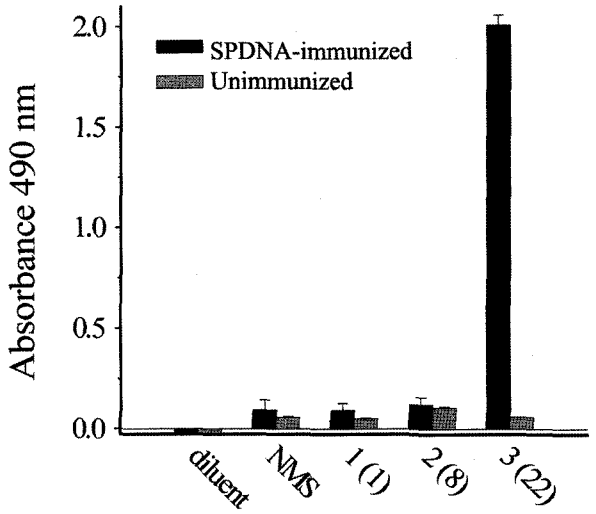

Fig. 1 – Determination of anti-pneumococcal capsule antiserum after the immunization with SPDNA vaccine. The antisera were detected from mice that were immunized three times. Numbers in the X-axis indicate times and interval of the immunization. NMS stands for normal mouse serum. Each group contained three mice. Error bars; SE.

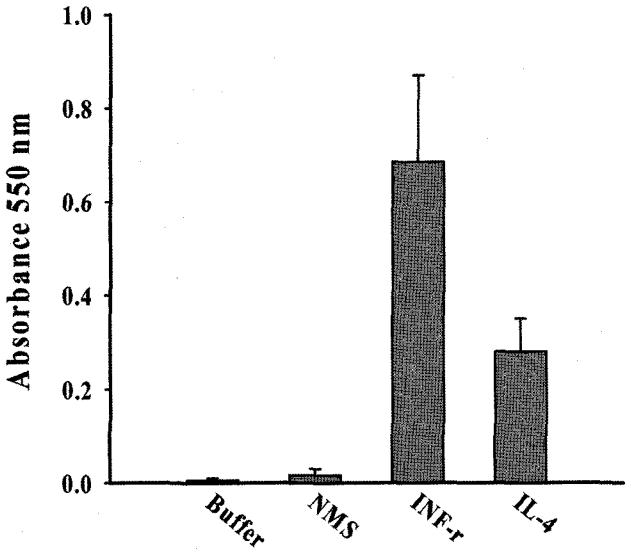

Fig. 2 – Detection of cytokine production in the antisera from SPDNA-vaccinated mice. Results from ELISA analysis revealed that IFNγ was two-fold higher than IL-4 production. i Each group contained four mice. NMS; normal mouse serum. Error bar; SE.

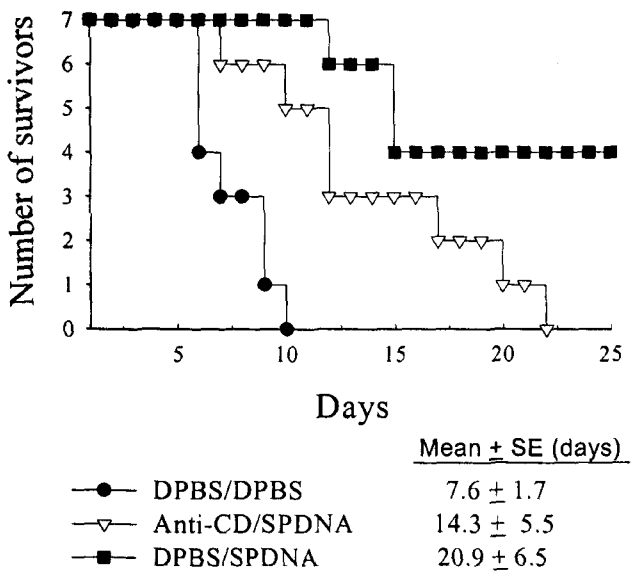

Fig. 3 – The SPDNA vaccine protects CD4 T cell-depleted mice against disseminated pneumococcal infection, possibly due to activation of CD8 Tcells. Mice pre-treated with anti-CD4 antibody before SPDNA immunization (Anti-CD/SPDNA) survived shorter than normal mice that were immunized with SPDNA (DPBS/SPDNA). The survival rates of both groups were greater than only DPBS-given mice (DPBS/SPDNA) ($P<0.05$).

SPDNA 백신은 양 면역성 모두를 유도하며 세포매개성 면역반응이 우세한 것으로 평가되었다.

Cytokine profile에 의한 작용기전 평가

SPDNA 백신으로 유도되는 IFNγ 또는 IL-4의 생성유무 조사결과, IFNγ와 IL-4 모두가 검색되었으며 IFNγ 생성이 IL-4 생성보다는 대략 2배 정도 높았다(Fig. 2). 이 결과를 항체 Isotyping 결과(Table I)와 상호 비교하면, cytokine profile 분석결과도 SPDNA 백신이 체액성면역과 세포매개성 면역반응을 모두 유도하며 세포매개성 면역반응이 우세하게 유도하는 것으로 확인 평가되었다.

SPDNA 백신의 면역 비 특이성(non-specificity)에 의한 보호효과

먼저 anti-CD4 항체의 효과확인을 위한 FACS로 검색한 결과 CD4+ lymphocyte가 소실되었음이 확인되었다(Data not shown). 이 생쥐를 SPDNA 백신으로 면역한 후 폐렴구균으로 감염한 생쥐의 생존율은 면역접종을 받지 못한 음성대조군 생쥐와 비교하면 생존율에 비록 차이가 있으나 이 보호효과는 정상생쥐에 SPDNA 백신으로 면역시킨 양성대조군 생쥐의 생존율보다는 낮았다($P<0.05$) (Fig. 3). 즉, CD4+T lymphocyte가 제거된 생쥐의 경우에도 보호효과는 있지만 25일간 생존율 측정기간 동안 생존한 생쥐는 한 마리도 없는 반면에 정상쥐의 경우에는 7마리 중에서 4마리가 생존하였다. 세포매개 면역성 측정결과에서는 폐렴구균 협막 다당물질인 JY-Pol 항원[15,16]을 발바닥에 투여했을 때, CD4+T lymphocyte가 중화 제거된 생쥐도 정상적인 양성대조군 생쥐처럼 거의 동일하게 대략 25% 이상의 족부종이 발현되어 이 보호효과는 CD4+T lymphocyte와는 무관하게 somatic 활성화에 의한 것으로 검색되었다(Table II).

고 찰

현재 각종의 DNA 백신개발은 세계적 추세로 유럽과 미국 등에서는 10여 년 전부터 많은 연구를 진행 중에 있으며 DNA 백신이 생물학적 제제로 취급되어 이의 효능 및 유효성과 안전성 검색에 관한 기술을 축적하고 있다.[20,21] 이에 반해 국내의 경우는 DNA 백신의 유효성 평가기술수준은 국외에 비교할 때 아직 부족한 상태이므로 이에 대한 적절한 검증방법의 확립이 필요하다.

본 연구에서는 DNA 백신의 효능 및 유효성 평가방법의 확립에 대한 연구의 일환으로 본 연구실에서 제조된 폐렴구균 DNA 백신제형을 이용하여 효능과 작용기전 검색을 통해 평가방법을 연구 조사하였다. 평가방법에 가장 중요한 인자중의 하나로 백신제형에 혼재되어 부작용을 일으킬 수 있는 LPS 오염성을 LAL 시험방법으로 평가방법을 설정하였다. 본 실험결과에서는 이 방법으로 제형의 순도성을 조사하였을 때, SPDNA 백신제형에는 LPS가 혼재 되어 있지 않은 것으로 판정되었다. 이 평가는 백신제형에 혼재되어 부적절한 비특이성 면역세포활성 가능성조사에도 적용할 수 있는 방법으로 시험방법 자체는 매우 단순하지만, 그 의미는 매우 중요한 것으로 인식된다. 투여경로 또한 중요한 평가인자 고려되는데, 본 연구에서 생쥐를 사용하여 검색한 결과에서 피하경로로 백신이 투여되었을 때만 항체가 유도되었다.

Table II – The cell-mediated immunity in the CD4 T cell-depleted mice

		Anti-CD4/SPDNA		DPBS/SPDNA		DPBS/DPBS	
		DPBS	JY-Pol	DPBS	JY-Pol	DPBS	JY-Pol
Footpad-Thickness*	24 h	65.9±3.2	83.6±3.6	66.9±3.9	89.2±3.7	66.8±3.3	65.1±3.2
	48 h	64.7±4.3	77.2±3.5	64.8±2.7	79.5±3.7	65.3±3.5	66.8±3.4

Note: *Arbitrary unit. Each group contained 5 mice. Error bars; SE.

실제, DNA 백신은 주로 근육주사로 투여되는[21] 것으로 알려져 있지만, 피하에는 항원제시세포(antigen presenting cells)로 중요한 역할을 하는 수지상세포(dendritic cell)가 많이 분포되어 있으므로 본 연구의 결과는 타당성이 있는 것으로 사료된다. 접종횟수도 중요한 평가인자로서, SPDNA 백신제형은 항체생성 유도를 위해 3번의 면역접종 이후에 항체생성이 검색되어, 일반 DNA 백신에 대한 평가에서 접종회수도 평가에 중요한 요소로 인식된다.

특히, DNA 백신의 작용기전 검사는 대단히 중요한데, 이것은 투여된 유전자가 숙주의 유전자 통합(integration)에 의한 부작용 발생가능성 조사에도 관련이 있으며, 면역성 조사를 위해서도 매우 필요한 것으로 여겨진다. 면역성조사를 위한 검사방법은 다양하게 있으나, 본 연구에서는 가장 기본적이며 근본적인 평가방법 확립을 설정하고자하였다. 즉, 생성된 항체의 Isotyping과 cytokine profile을 비교 검색하여 체액성면역과 세포매개성면역을 조사하여 면역성 관련여부를 평가하고자 하였다. 그 결과 IgG1, IgG2a, IgG2b의 생성정도에 의한 상호비율과 IFNγ와 IL-4 생성여부에 결과를 종합 비교하여 Th1과 Th2 형평성에 의한 면역성을 조사하였다. 실험결과, SPDNA 백신은 체액성면역과 세포매개성면역 모두를 유도하지만 세포매개성 면역반응이 우세한 것으로 평가되었다. 이 실험에서 더 다양한 cytokine에 대한 조사가 고려되었으나, 일목요원한 평가방법의 체계화를 위해 복잡한 평가방법은 배제하고자 하였다. 그러나 작용기전 결과를 구체적으로 입증하기 위해 CD4+T lymphocyte를 제거하고 SPDNA 백신의 효능을 검사하는 평가방법으로 조사하였다. 실험결과 SPDNA 백신은 CD8+T lymphocyte의 단독활성에 의한 부분적 보호효과가 있었으며, 족부종 검사방법을 이용한 조사에서 이 보호효과는 세포매개성면역이 관여하는 것으로 입증이 되었다.

종합적으로, 본 연구에서 규명된 실험방법과 절차는 DNA 백신의 유효성 평가방법에 적용될 수 있으며, 작용기전조사에서 CD4+ 및 CD8+ 관여도를 측정하는 실험방법은 면역반응성 조사와 함께 기존의 DNA 백신평가인자 확립에 적용 될 수 있을 것으로 사료된다. 좀 더 다양한 평가방법 확립을 위해, 본 실험실에서는 현재 DNA 백신의 병리, 임상적측면의 부작용에 대한 평가방법에 대한 연구가 진행 중에 있는데, 특히 보체계(Complement System)에서 중요 요소로 작용하는 C3의 비특이적 활성에 의한 평가방법이 진행 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2005년도 식품의약품안전청 독성연구원의 생물의약품평가기술개발사업(05092생의평380)의 연구지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Nichols, W. W., Ledwith, B. J., Manam, S. V. and Troilo, P. J. : DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann. N. Y. Acad Sci.* **72**, 30 (1985).
2) Montgomery, D. L., Ulmer, J. B., Donnelly, J. J. and Liu, M. A. : DNA vaccines. (Review). *Pharmacol. Ther.* **74**(2), 195 (1997).
3) Smith, H. A. and Klinman, D. M. : The regulation of DNA vaccines. (Review). *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**(3), 299 (2001).
4) Klinman, D. M., Takeshita, F., Kamstrup, S., Takeshita, S., Ishii, K., Ichino, M. and Yamada, H. : DNA vaccines: capacity to induce auto-immunity and tolerance. *Dev. Biol.* (Basel). **104**, 45 (2000).
5) Donnelly, J. J., Ulmer, J. B. and Liu, M. A. : DNA vaccines. *Dev. Biol. Stand.* **95**, 43 (1998).
6) Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. and Liu, M. A. : DNA vaccines. *Ann. Rev. Immunol.* **15**, 617 (1997).
7) Ellenberg, S. S. and Chen, R. T. : The complicated task of monitoring vaccine safety. *Public Health Rep.* **112**, 10 (1997).
8) Cichutek, K. : DNA vaccines: development, standardization and regulation. *Intervirology* **43**, 331 (2000).
9) Bosarge, J. R., Watt, J. M., McDaniel, D. O., Swiatlo, E. and McDaniel, L. S. : Genetic immunization with the region encoding the alpha-helical domain of PspA elicits protective immunity against *Streptococcus pneumoniae. Infect. Immun.* **69**(9), 5456 (2001).
10) Ogunniyi, A. D., Giammarinaro, P. and Paton, J. C. : The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed *in vivo. Microbiology* **148**, 2045 (2001).
11) Gregory, B., Lesinski, S., Smithson, L., Srivastava, N., Chen, D., Widera, G. and Westerink, J. : A DNA vaccine encoding a peptide mimic of *Streptococcus pneumoniae* serotype 4 capsular polysaccharide induces specific anti-carbohydrate antibodies in Balb/c mice. *Vaccine*. **19**, 1717 (2001).
12) Lesinski, G. B. and Westerink, M. A. : Vaccines against polysaccharide antigens. *Curr. Drug. Targets. Infect. Disord.* **1**, 325 (2001).
13) Lesinski, G. B., Smithson, S. L., Srivastava, N., Chen, D., Widera, G. and Westerink, M. A. : A DNA vaccine encoding a peptide mimic of *Streptococcus pneumoniae* serotype 4 capsular polysaccharide induces specific anti-carbohydrate antibodies in Balb/c mice. *Vaccine*. **19**, 1717 (2001).
14) Miyaji, E. N., Dias, W. O., Gamberini, M., Gebara, V. C., Schenkman, R. P., Wild, J., Riedl, P., Reimann, J., Schirmbeck, R. and Leite, L. C. : PsaA (pneumococcal surface adhesin A) and PspA (pneumococcal surface protein A) DNA vaccines induce humoral and cellular immune responses against *Streptococcus pneumoniae. Vaccine*. **20**, 805 (2001).

15) Han, Y. and Lee, J.-H. : A pneomococcal conjugate vaccine formula induces protection in mice against disseminated disease due to *Streptococcus pneumoniae*. *Yakhak Hoeji* **48**, 345 (2004).
16) Lee, J.-H. and Han, Y. : Antibody induced by the JY-Pol pneumococcal conjugate protects mice against systemic infection due to *Streptococcus pneumoniae*. *Yakhak Hoeji* **48**, 369 (2004).
17) Pengo, V., Biasiolo, A., Pegoraro, C., Cucchini, U., Noventa, F. and Iliceto, S. : Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.* **93**(6), 1147 (2005).
18) Endo, T., Sato, N., Koizumi, K., Nishio, M., Fujimoto, K., Yamamoto, S., Sakai, T., Bohgaki, T., Sawada, K. and Koike, T. : A preliminary analysis of the balance between Th1 and Th2 cells after CD34+ cell-selected autologous PBSC transplantation. *Cytotherapy* **6**(4), 337 (2004).
19) Guy, B. and Burdin, N. : New adjuvants for parenteral and mucosal vaccines. *Therapie*. **60**(3), 235 (Review) (2005).
20) Faubel, S., Ljubanovic, D., Poole, B., Dursun, B., He, Z., Cushing, S., Somerset, H., Gill, R. G. and Edelstein, C. L. : Peripheral CD4 T-cell depletion is not sufficient to prevent ischemic acute renal failure. *Transplantation* **80**(5), 643 (2005).
21) Wang, D., Christopher, M. E., Nagata, L. P., Zabielski, M. A., Li, H., Wong, J. P. and Samuel, J. : Intranasal immunization with liposome-encapsulated plasmid DNA encoding influenza virus hemagglutinin elicits mucosal, cellular and humoral immune responses. *J. Clin. Virol.* **31**(Suppl 1), S99 (2004).