

*Helicobacter pylori*로부터 유래된 항원의 항원성에 관한 연구

박창호* · 배만종¹

대구바이오산업지원센터, ¹대구한의대학교 한방식품약리학과

Received February 19, 2008 / Accepted April 10, 2008

Immunotoxicity Study of Separated Antigen from *Helicobacter pylori*. Chang-Ho Park* and Man-Jong Bae¹. *Daegu Bio Industry Center, Daegu 704-801, Korea, ¹Dept. of Herbal Foodceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea* - The anaphylaxis shock reaction on the whole cells of *H. pylori* exhibited a symptom of slight illness for the first and second medication of causing antigen at an antigen concentration of WC (H) 60 µg/100 µl for WC (H) and no anaphylaxis shock symptom was observed at an antigen concentration of 20 µg/100 µl for WC (L). In the case of anaphylaxis shock reaction on the crude urease, no symptom was observed at an antigen concentration of 20 µg/100 µl for both urease (L) and urease (H). In the heterologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test using a guinea pig-rat, no positive reaction was detected in all the medication groups of WC (H), WC (L), urease (H) and urease (L). In the skin sensitization test, it was observed that the best antigen concentration not causing skin disorder at each of 80 µg/100 µl, 40 µg/100 µl, 20 µg/100 µl, and 20 µg/100 µl was 40 µg/100 µl.

Key words : Adjuvant, immunotoxicity, anaphylaxis, heterologous passive cutaneous anaphylaxis

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 우측나선형 몸통과 4~8개의 유초성 편모(flagella)를 가진 그람 음성 단간균으로서[3] 위 점막세포 사이사이에서 urease를 분비하면서 서식하고 있다[9,17]. 국내에서 *H. pylori* 감염률은 2002년 대한 소화기학회 보고에 의하면 소아에서는 17.2%, 16세 이상 성인에서는 66.9%로 밝혀졌다. 또한 만성활동 위염환자에서는 70~92%의 감염률을 보이고 있고, 소화성궤양, 위암의 원인에도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다[14]. *H. pylori* 제균치료에 있어 많은 약제가 단독 혹은 이제 및 삼제 병합요법으로 투여[23] 되어왔지만 약제의 효과 및 부작용, 환자의 순응도, 경제적인 측면[18], 재감염 등이 문제시 되어 왔다[23]. 따라서 이러한 항생제의 문제점을 보완하기 위해 *H. pylori* 제균 치료법에 대한 새로운 연구가 계속되고 있으며[16,25], 최근에는 백신의 구성, 항원제조, 좋은 adjuvant, 투여방법의 개발 등 면역학적 안전성 문제를 보완한다면 백신으로써의 개발 가능성이 있는 것으로 보고되고 있다[21]. 그리고 질병에 관련된 사망률과 의약치료 등 사회적비용을 생각하면 백신 개발이 경제적 비용절감을 나타내는 것으로 보고되고 있다[22].

항원성시험은 원칙적으로 모든 의약품에 대해서 실시해야 하며 특히 화학구조상 생체 내에서 단백질과 강하게 결합할 가능성이 있는 의약품, 펩타이드 또는 단백질을 성분으로 하

는 의약품 및 고분자 구조를 가진 의약품의 경우 반드시 실시해야 한다. 항원성의 평가방법으로는 guinea pig을 이용한 anaphylaxis 쇼크 반응시험 및 동종 수동 피부 anaphylaxis 반응시험 또는 mouse-rat 이종 수동 피부 anaphylaxis 반응시험이 권장되고 있다[11].

본 연구에서는 anti-*H. pylori* 항체생산을 위한 백신개발과 백신을 반복투여 했을 때 야기될 수 있는 알레르기 및 과민 반응을 예측하고, 페니실린 쇼크와 같은 심각한 부작용 및 독성유발 가능성을 검색하기 위하여 안전성평가의 일환으로 항원성시험을 실시하였다.

재료 및 방법

H. pylori 균주 배양

H. pylori 균주는 한국유전자은행으로부터 KCTC 12083을 분양 받아 사용하였다. 분양 받은 균주는 37°C, CO₂ 농도 10% 환경에서 5% fetal bovine serum (FBS)과 항생제(*H. pylori* selective supplement (Oxoid, SROM4E, England))가 포함된 Brucella agar plate에서 2~3일 간격으로 계대배양 하였다. 계대배양으로 활성화된 균주는 Brucella broth에서 48~72시간 동안 액체배양 하였다[13,15].

Whole cell 항원 분리

Whole cell (WC) 항원은 액체 배양된 균주를 4°C, 4,000×g로 30분간 원심분리 하여 회수하였다. 회수된 균주는 10 mM Tris HCl (pH 8.5)- 2 mM EDTA로 4°C, 4,000×g로 30분간 원심분리 하여 1회 세척 후 멸균된 증류수에 현탁 시켰

*Corresponding author

Tel : +82-53-602-1827, Fax : +82-53-602-1898

E-mail : 9224017@hanmail.net

다. 세척된 균은 얼음물에서 30초간 4회 sonicate (pulse 20, duty cycle 50)한 다음 syringe filter (0.45 μm)로 여과하였다. 여과된 WC의 농도는 Lowry법을 이용한 단백질정량 kit로 측정하여 사용 전까지 -70°C에 냉동 보관하였다[4].

Urease 항원 분리

액체 배양된 균주를 10 mM Tris HCl (pH 8.5) - 2 mM EDTA로 4°C, 4,000× g로 30분간 원심분리로 1회 세척한 후 차가운 증류수에 현탁하였다. 강하게 vortex (2,500 rpm, 1 min)한 후 원심분리(25,000× g, 15 min, 4°C)된 상층액을 crude urease항원으로 사용하였다[22,23]. 분리된 crude urease는 SDS-PAGE (12%)로 분자량을 확인하였고, 항원 농도는 Lowry법을 이용한 단백질정량 kit로 정량하여 사용 전까지 -70°C에 냉동보관 하였다[7].

Anaphylaxis 쇼크 반응

실험동물

실험동물은 한림실험동물(주)(경기도 화성, 한국)에서 Hartley계 guinea pig 6주령(250~350 g, ♂)을 구입하여 1주일간 순화시킨 후 시험에 사용하였다. 사육실은 실험동물 환경조건인 온도 22±3°C, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10~12회/hr, 명암주기 12시간으로 유지하였다. 순화시기 및 시험기간 중 실험동물은 고형사료와 비타민의 공급을 위해 양배추를 사료와 동시에 자유 급여하였고, 음수도 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

감작투여

감작투여는 항원성을 지니는가를 알아보기 위해 실시하는 anaphylaxis 쇼크반응시험, 수동 피부 anaphylaxis 반응시험 및 간접 적혈구 응집 반응시험을 실시할 때 시험동물의 면역

계를 활성화시키기 위하여 사용하는 방법이다.

본 시험에서는 시험 동물을 각 군당 5마리씩 나누어 Table 1과 같이 정상군, 대조군, 양성대조군, 시험물질 투여군으로 설정하였으며, 양성대조군 및 시험물질 투여군은 저용량군과 고용량군으로 나누어 감작시켰다. 감작항원량은 20 μg /100 μl의 농도로 adjuvant (FCA, Sigma.F5506)와 동량으로 emulsion하여 등쪽 피하에 1차 감작투여 하였다. 추가감작 투여는 1차감작 투여 후 2주 간격으로 총 3회 실시하였다[6].

시험물질 야기 투여

최종감작투여 1주와 2주후 야기항원을 귀정맥 내 투여하여 anaphylaxis 쇼크증상의 발현유무를 알아보았다. 감작에 이용한 용량은 투여용량 중 고용량을 적용하였다. 1차와 2차 야기항원 투여 후 30분간 전신의 증상을 관찰하고, anaphylaxis 쇼크반응을 판정기준에 따라 판정하여 기록하였다[12].

관찰 자료의 해석 및 평가

Anaphylaxis는 종합적으로 쇼크정도에 따라 음성[-]은 아무런 임상증상이 관찰되지 않을 때, 경증[±]은 불안(Restlessness), 기모(Piloerection), 진전(Tremor), 코를 문지르거나 핥음(Rubbing or licking nose)의 증상이 나타날 때, 중등도[+]는 재채기(Sneezing), 기침(Coughing), 호흡촉진(Hyperpnea), 배뇨(Urination), 배변(Evacuation), 유루(Lacrimation)의 증상이 보일 때, 중증[++]은 호흡곤란(Dyspnea), 짹짹거리는 소리(Rhonchus), 청색증(Cyanosis), 보행불안(Staggering gait), 도약(Jumping), 혈떡거리고 몸부림침(Gasping and writhing), 경련(Convulsion), 횡와(Side position), Cheyne-Stokes 호흡의 증상이 나타날 때, 그리고 사망 시(Death)[+++]로 판정하였다.

Table 1. Experimental design and number of guinea pig per group

Group ^a	No. of mice	Immunity period (wk)		
		0	2	4
Normal	5	Saline	Saline	Saline
Control	5	Saline+FCA ^b	Saline+FIA ^c	saline+FIA
BSA (H)	5	BSA (H)+FCA	BSA (H)+FIA	BSA (H)+FIA
BSA (L)	5	BSA (L)+FCA	BSA (L)+FIA	BSA (L)+FIA
WC (H)	5	WC (H)+FCA	WC (H)+FIA	WC (H)+FIA
WC (L)	5	WC (L)+FCA	WC (L)+FIA	WC (L)+FIA
Urease (H)	5	Urease (H)+FCA	Urease (H)+FIA	Urease (H)+FIA
Urease (L)	5	Urease (L)+FCA	Urease (L)+FIA	Urease (L)+FIA

^aGuinea pig were divided into eight experimental groups: BSA (H), bovine serum albumin high concentration (1 mg /100 μl); BSA (L), bovine serum albumin low concentration (20 μg/100 μl); WC (H), whole cell high concentration (60 μg/100 μl); WC (L), whole cell low concentration (20 μg /100 μl); urease (H), urease high concentration (60 μg/100 μl); urease (L), urease low concentration (20 μg/100 μl).

^bFCA: Freund's complete adjuvant (Sigma. F5506).

^cFIA: Freund's incomplete adjuvant (Sigma. F5581).

Guinea pig-rat를 이용한 heterologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 시험

Guinea pig을 이용한 항혈청 생산

Anaphylaxis 시험에서 감각시킨 guinea pig으로부터 최종감작 1주 후 채혈하고 실온에 3시간 응고시킨 후 원심분리하여(3,000× g, 10 min) 혈청을 얻었다. 분리한 혈청은 다음 시험까지 -70°C에 보관하여 사용하였다.

항혈청 감각 투여

Sprague-Dawley (♂, 6주령, 250~350 g) rat에 개체별로 분리된 혈청을 멸균 생리식염수로 공비 2배로 10단계 희석하였다. 군당 3마리씩 배부위에 일정한 간격으로 1회용 주사기 (26 G, 1 ml)로 100 µl씩 피내주사 후 주사부위를 표시 하였다[28].

시험 물질 야기

피내투여 24시간 후, 야기항원과 Evan's blue 1:1 혼합액(5 mg/1 ml/ body)을 꼬리정맥내로 투여하였고, 30분 경과 후 CO2 가스로 마취시킨 후 경동맥 부위를 가위로 잘라 실험

치사시켰다. 치사시킨 guinea pig을 배부위 피부를 절취하여 뒷면으로부터 청색반점(Blue spot)을 확인하였다[25].

관찰 자료의 해석 및 평가

주사부위에 출현한 청색반점의 생성여부를 관찰하여 청색반점의 직경((장경+단경)/2)이 5 mm 이상이면 양성으로 간주하고, 양성을 나타내는 가장 마지막 혈청 희석액의 희석배수를 최대 희석배수로 하였으며, 그 혈청의 최종 항체역가로 정하여 anaphylaxis와 관련이 있는 IgE가 생성되는 것으로 판정하였다.

피부감작성 시험

실험 동물

실험동물은 한림실험동물(주)(경기도 화성, 한국)에서 Hartley계 guinea pig 6주령(250~350 g, ♂)을 구입하여 1주일간 순화시킨 후 시험에 사용하였다. 사육실은 실험동물 환경조건인 온도 22±3°C, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10-12회/hr, 명암주기 12시간으로 유지하였다. 순화시기 및 시험기

Table 2. Anaphylaxis symptoms of each groups of male guinea pig after first challenge with whole cell antigen

Group	1	2	3	4	5	6
Sensitization	Saline	Saline + adjuvant ^b	BSA (H) + adjuvant	BSA (L) + adjuvant	WC (H) + adjuvant	WC (L) + adjuvant
Challenge	Saline	Saline	BSA (H)	BSA (H)	WC (H)	WC (H)
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Restlessness	0	0	0	0	1	0
Piloerection	0	0	0	3	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	1	3	1	0
Sneezing	0	0	1	2	0	0
Coughing	0	0	0	0	0	0
Hyperpnea	0	0	0	0	0	0
Urination	0	0	2	2	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	2	2	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	0
Gaspings and writhing	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	3	1	0	0
Side position	0	0	3	2	0	0
Cheyne-stokes respiration	0	0	0	0	0	0
Death	0	0	3	1	0	0
Evaluation of the intensity	-	-	+++	+++	±	-

^aGuinea pig were divided into six experimental groups: BSA (H), bovine serum albumin high concentration (1 mg/100 µl); BSA (L), bovine serum albumin low concentration (20 µg/100 µl); WC (H), WC high concentration (60 µg/100 µl); WC (L), WC low concentration (20 µg/100 µl).

^bAdjuvant: Freund's complete adjuvant or Freund's incomplete adjuvant.

-, normal; ±, mild; +, moderate; ++, severe, +++, death

간 중 실험동물은 고형사료와 비타민의 공급을 위해 양배추를 사료와 동시에 자유 급여하였고, 음수도 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

피내주사 시 감작항원량

시험물질인 WC은 80 µg/100 µl, 40 µg/100 µl, 20 µg/100 µl, 10 µg/100 µl의 농도로 urease는 80 µg/100 µl, 40 µg/100 µl, 20 µg/100 µl의 농도별로 희석하여 제모 된 guinea pig 등부위 피내에 100 µl씩 주사한다. 피내주사 후 주사부위를 관찰하여 2마리 guinea pig 모두 다 피부괴사가 나타나지 않는 최고 농도를 감작항원량으로 정하였다[17].

통계학적 분석

본 실험에서 얻은 측정치에 대한 통계처리는 SPSS (SPSS 12.0KO for Windows)를 이용하여 평균치와 표준편차를 구하였고, 유의성검증은 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의수준 p<0.05일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

H. pylori의 WC 항원에 대한 anaphylaxis 쇼크반응

Anaphylaxis (과민반응)은 항원에 의하여 이미 감작된 개체에 동일한 항원을 재차 투입하였을 때 IgE 항체에 의해 일어나는 즉시형 과민반응을 뜻한다. IgE는 혈청 중에 극소량으로 존재하지만 anaphylaxis 반응을 일으키는 작용을 가지고 있다. 전신성 anaphylaxis는 수초이내에 일어나며, 기도 및 기관지 수축으로 인하여 호흡곤란을 초래하며, 혈압강하로 쇼크에 이른다. 일차 매개물질은 히스타민, 세로토닌, 호산구 주화물질, 헤파린, 각종 효소 등이며, 이차 매개물질은 항원이 IgE와 결합한 후 서서히 분비되기 시작하며 혈소판 활성화인자, 플라디키닌 등이 이에 속한다. 국소 anaphylaxis 반응은 피부, 비후막, 위장관막 등에서 국소적인 항원에 의한 급성염증을 일으킨다[11].

본 실험에서는 1차 야기투여 시 양성대조군인 BSA (H) 투

Table 3. Anaphylaxis symptoms of each groups of male guinea pig after second challenge with whole cell antigen

Group	1	2	3	4	5	6
Sensitization	Saline	Saline + adjuvant ^b	BSA (H) + adjuvant	BSA (L) + adjuvant	WC (H) + adjuvant	WC (L) + adjuvant
Challenge	Saline	Saline	BSA (H)	BSA (H)	WC (H)	WC (H)
No. of animals	5	5	2	4	5	5
Restlessness	0	0	0	0	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	0	1	1	0
Sneezing	0	0	0	2	0	0
Coughing	0	0	0	0	0	0
Hyperpnea	0	0	0	1	0	0
Urination	0	0	0	0	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	0	0	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	0
Gasping and writhing	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	0	3	0	0
Side position	0	0	2	0	0	0
Cheyne-stokes respiration	0	0	0	0	0	0
Death	0	0	0	3	0	0
Evaluation of the intensity	-	-	++	+++	±	-

^aGuinea pig were divided into six experimental groups: BSA (H), bovine serum albumin high concentration (1 mg/100 µl); BSA (L), bovine serum albumin low concentration (20 µg/100 µl); WC (H), WC high concentration (60 µg/100 µl); WC (L), WC low concentration (20 µg/100 µl).

^bAdjuvant: Freund's Complete Adjuvant or Freund's Incomplete Adjuvant.

-, normal; ±, mild; +, moderate; ++, severe; +++, death

여군에서는 중증인 코를 문지르거나 핏몸, 재채기, 배뇨, 보행불안, 황와 증상과 3마리가 사망에 이르는 현상을 나타내었다. BSA (L) 투여군에서도 중증인 핏몸, 재채기, 배뇨, 보행불안, 황와 증상과 1마리가 사망에 이르는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 시험물질 투여군인 WC (H)에서는 불안, 코를 문지르거나 핏몸 증상이 1마리에서 관찰할 수 있었으며, WC (L) 투여군에서는 음성대조군(Control)과 같이 어떠한 증상도 관찰되지 않았다(Table 2).

2차 야기투여 시 양성대조군인 BSA (H) 투여군에서는 1차 야기투여 후 살아남은 2마리 모두 중증의 황와 증상을 나타내었고, BSA (L) 투여군에서는 코를 문지르거나 핏몸, 재채기, 호흡촉진 등의 중증과 1차 야기투여 후 살아남은 4마리 중 3마리가 사망에 이르는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 시험물질 투여군인 WC (H)에서는 불안, 코를 문지르거나 핏몸 증상을 1마리에서 관찰할 수 있었으며, WC (L) 투여군에서는 음성 대조군(Control)과 같이 어떠한 증상도 관찰되지 않았다(Table 3).

이와 같이 *H. pylori*의 whole cell에 대한 전신성 anaphy-

laxis 쇼크반응은 WC (H) 60 µg/100 µl의 항원농도에서 1차, 2차 모두 경증의 증상을 나타내었고, WC (L) 20 µg/100 µl의 항원농도에서는 아무런 anaphylaxis 쇼크 증상이 관찰되지 않았다. 따라서 *H. pylori* WC 백신 제조 시 항원농도가 고려되어야 할 것으로 사료된다.

***H. pylori*의 urease 항원에 대한 anaphylaxis 쇼크반응**

1차 야기투여 시 양성대조군인 BSA (H) 투여군에서는 코를 문지르거나 핏몸, 재채기, 배뇨, 보행불안, 황와 등의 중증과 3마리가 사망에 이르는 현상을 나타내었다. BSA (L) 투여군에서도 핏몸, 재채기, 배뇨, 보행불안, 황와 등의 중증과 1마리가 사망에 이르는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 음성대조군과 시험물질 투여군인 urease (H)와 urease (L)에서는 anaphylaxis로 보이는 어떠한 증상도 관찰되지 않았다(Table 4).

2차 야기투여 시 양성대조군인 BSA (H) 투여군에서는 1차 야기투여 후 살아남은 2마리 모두 황와 증상의 중증의 증상을 나타내었고, BSA (L) 투여군에서는 코를 문지르거나 핏몸, 재채기, 호흡촉진 등의 중증과 1차 야기투여 후 살아남

Table 4. Anaphylaxis symptoms of each groups of male guinea pig after first challenge with crude urease antigen

Group	1	2	3	4	5	6
Sensitization	Saline	Saline + adjuvant ^b	BSA (H) + adjuvant	BSA (L) + adjuvant	Uresae (H) + adjuvant	Urease (L) + adjuvant
Challenge	Saline	Saline	BSA (H)	BSA (H)	Urease (H)	Urease (H)
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Restlessnes	0	0	0	0	0	0
Piloerection	0	0	0	3	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	1	3	0	0
Sneezing	0	0	1	2	0	0
Coughing	0	0	0	0	0	0
Hyperpnea	0	0	0	0	0	0
Urination	0	0	2	2	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	2	2	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	0
Gasping and writhing	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	3	1	0	0
Side position	0	0	3	2	0	0
Cheyne-stokes respiration	0	0	0	0	0	0
Death	0	0	3	1	0	0
Evaluation of the intensity	-	-	+++	+++	-	-

^aGuinea pig were divided into six experimental groups: BSA (H), bovine serum albumin high concentration (1 mg/100 µl); BSA (L), bovine serum albumin low concentration (20 µg/100 µl); Urease (H), urease high concentration (60 µg/100 µl); Urease (L), urease low concentration (20 µg/100 µl).

^bAdjuvant: Freund's complete adjuvant or Freund's incomplete adjuvant.

-, normal; ±, mild; +, moderate; ++, severve, +++, death

은 4마리 중 3마리가 사망에 이르는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 1차 투여와 같이 음성대조군, 시험물질 투여군에서는 모두 어떠한 증상도 관찰되지 않았다(Table 5).

이와 같이 *H. pylori*의 urease에 대한 전신성 anaphylaxis 쇼크반응은 항원농도 20 µg/100 µl의 urease (L)와 60 µg/100 µl의 urease (H) 모두 아무런 증상도 관찰되지 않았다. 따라서 whole cell과 비교할 때 urease로 분리된 항원에 대해서는 anaphylaxis 쇼크증상으로부터 더 안전한 결과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

Guinea pig-rat를 이용한 heterologous PCA 시험

PCA 실험은 IgE 항체를 피하 주사하여 일정한 잠복기간이 경과한 후에 해당 항원과 색소(Evan's Blue)를 정맥주사하면, 항체를 주사한 부위에서 국소 anaphylaxis 반응이 일어나고 색소가 혈관에서 유출되어 그 해당 부위가 청색으로 되는 반응이다. 즉시형 과민반응을 일으키는 항체의 연구에 사용된다. 그리고 수동 피부 anaphylaxis 반응시험에서 2마

리 중 1마리가 양성반응을 나타낸 경우 의약품의 안전성 평가라는 관점에서는 양성으로 판정한다[20].

본 시험법은 항원으로 감작시켜 얻은 Guinea pig 항혈청을 rat의 배부 피내에 수동면역 시킨 후 항원을 정맥내에 주사하여 조직 친화성 항체(IgE)의 역가를 알아 보았다. 각 항혈청을 희석하여 피내주사하고 항원과 Evans Blue 혼합액을 정맥주한 결과, 양성대조군인 BSA (L)에서는 개체에 따라 23~26배, BSA (H)는 25~26배 희석배율까지 5mm 이상 크기의 청색반점을 나타내었다(Table 6, 7). 그러나 음성대조군과 시험물질 투여군인 WC (H), WC (L), Urease (H), Urease (L)에서는 청색반점을 관찰 할 수 없었다. 따라서 *H. pylori*에서 분리된 whole cell 과 urease 항원의 PCA 실험결과 조직 친화성 항체 IgE를 생성하지 않는 것으로 나타났다.

피부감작성 시험

피부 외용제로 사용되는 의약품의 피부에서 접촉감작 위험성을 예측하기 위한 것으로써 접촉하는 약물의 피부감작

Table 5. Anaphylaxis symptoms of each groups of male guinea pig after second challenge with crude urease antigen

Group	1	2	3	4	5	6
Sensitization	Saline	Saline + adjuvant ^b	BSA (H) + adjuvant	BSA (L) + adjuvant	Urease (H) + adjuvant	Urease (L) + adjuvant
Challenge	Saline	Saline	BSA (H)	BSA (H)	Urease (H)	Urease (H)
No. of animals	5	5	2	4	5	5
Restlessness	0	0	0	0	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	0	1	0	0
Sneezing	0	0	0	2	0	0
Coughing	0	0	0	0	0	0
Hyperpnea	0	0	0	1	0	0
Urination	0	0	0	0	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	0	0	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	0
Gasping and writhing	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	0	3	0	0
Side position	0	0	2	0	0	0
Cheyne-stokes respiration	0	0	0	0	0	0
Death	0	0	0	3	0	0
Evaluation of the intensity	-	-	++	+++	-	-

^aGuinea pig were divided into six experimental groups: BSA (H), bovine serum albumin high concentration (1 mg/100 µl); BSA (L), bovine serum albumin low concentration (20 µg/100 µl); Urease (H), urease high concentration (60 µg/100 µl); Urease (L), urease low concentration (20 µg/100 µl).

^badjuvant : Freund's complete adjuvant or Freund's incomplete adjuvant.

-, normal; ±, mild; +, moderate; ++, severe, +++, death

Table 6. Passive cutaneous anaphylaxis test of whole cell antigen in SD-rat with sera of sensitized guinea pigs

Sensitized antiserum (0.1 ml, id ^a)	Challenged antigen (1 ml, iv ^b)	Mark of animal		Dilution of antisera in sensitized mice										
		Guinea pig	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	
Guinea pig anti-MC	Saline	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EB	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guinea pig anti-BSA (L)	BSA (H)	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	EB	6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Guinea pig anti-BSA (H)	BSA (H)	7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	+	8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	EB	9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Guinea pig anti-WC (L)	WC (H)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EB	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guinea pig anti-WC (H)	WC (H)	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EB	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[-]: less than 5 mm of PCA titer, [±]: approximately equal 5 mm of PCA titer, [+]: more 5 mm of PCA titer

BSA (H), bovine serum albumin high dose treatment (1 mg/0.1 ml/animal); BSA (L), bovine serum albumin low dose treatment (200 µg/0.1 ml/animal); WC (H), WC high dose treatment (60 µg/0.1 ml/animal); WC (L), WC low dose treatment (20 µg/0.1 ml/animal); EB, evans blue (5 mg/1 ml/animal)

^aid, intradermal injection; ^biv, intravenous injection

Table 7. Passive cutaneous anaphylaxis test of urease antigen in SD-rats with sera of sensitized guinea pigs

Sensitized antiserum (0.1 ml, id ^a)	Challenged antigen (1 ml, iv ^b)	Mark of animal		Dilution of antisera in sensitized mice										
		Guinea pig	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	
Guinea pig anti-MC	saline	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EB	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guinea pig anti-BSA (L)	BSA (H)	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	EB	6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Guinea pig anti-BSA (H)	BSA (H)	7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	+	8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	EB	9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Guinea pig anti-urease (L)	Urease (H)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EB	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guinea pig anti-urease (H)	Urease (H)	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EB	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[-]: less than 5 mm of PCA titer, [±]: approximately equal 5 mm of PCA titer, [+]: more 5 mm of PCA titer

BSA (H), bovine serum albumin high dose treatment (1 mg/0.1 ml/animal); BSA (L), bovine serum albumin low dose treatment (200 µg/0.1 ml/animal); Urease (H), urease high dose treatment (60 µg/0.1 ml/animal); Urease (L), urease low dose treatment (20 µg/0.1 ml/animal), EB; Evans blue (5 mg/1 ml/animal)

^aid, intradermal injection; ^biv, intravenous injection

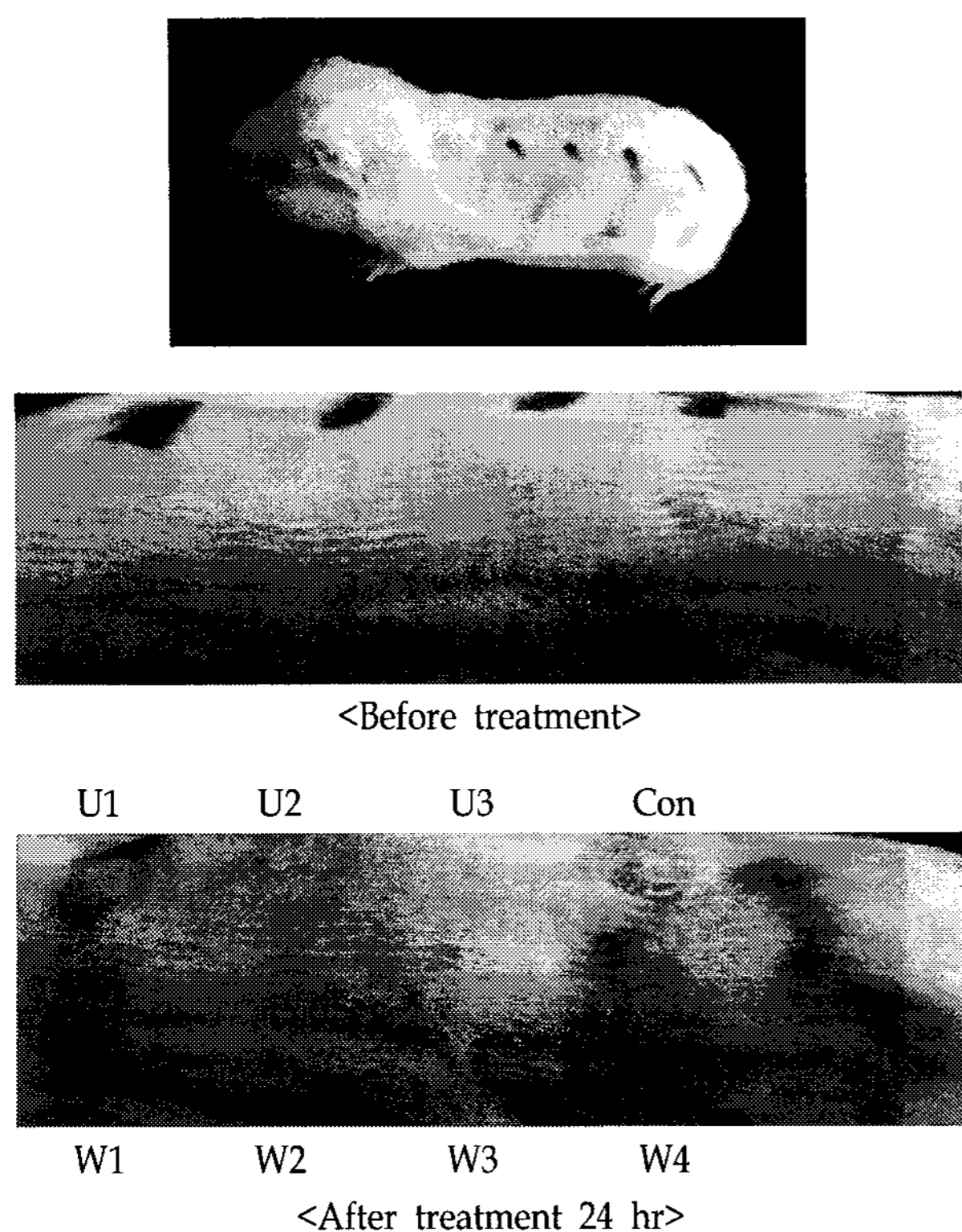


Fig. 1. Skin test of separated WC and crude urease antigen from *H. pylori*. W1, WC 80 µg/100 µl dose; W2, WC 40 µg/100 µl dose; W3, WC 20 µg/100 µl dose; W4, WC 10 µg/100 µl dose; U1, urease 80 µg/100 µl dose; U2, urease 40 µg/100 µl dose; U3, urease 20 µg/100 µl dose; Con, control (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 20 µg/100 µl.

성을 평가하기 위하여 피내주사 후 주사부위를 관찰하여 2마리 guinea pig 모두 피부괴사가 나타나지 않는 최고 농도를 감작항원량으로 정하였다[11].

본 실험에서는 투여하고자 하는 항원의 감작항원량을 결정하기 위하여 WC 항원과 urease 항원을 피내 감작시킨 후 염증이나 이상반응이 발생하지 않는 최고 농도를 알아보고 그 농도를 결정하고자 하였다. 실험결과 WC와 urease항원 모두 20 µg/100 µl의 농도에서 피부 이상증상 반응을 나타내지 않았으며, 항원농도 80 µg/100 µl와 40 µg/100 µl에서는 염증증상은 아니지만 붉은 반점의 이상증상을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 따라서 피부 이상증상이 발생하지 않는 최고의 농도를 20 µg/100 µl로 결정하고 가장 적합한 감작항원 농도로 결정하였다(Fig 1).

요 약

본 연구에서는 *H. pylori*의 감염을 예방하고 치료보조제로 사용할 목적으로 포유동물을 통한 피동면역용 항체를 생산하고자 하였다. 따라서 anti-*H. pylori* 항체를 함유한 면역유 유 생산용 백신개발에 기초자료를 얻고자 *H. pylori*의 면역성

과 면역독성에 관한 실험을 수행하였다. 백신을 반복해서 투여했을 때 야기될 수 있는 알레르기 및 과민반응을 예측하고, 페니실린 쇼크와 같은 심각한 부작용 및 독성유발 가능성을 검색하기 위하여 백신의 면역독성을 평가하였다.

전신성 anaphylaxis 쇼크반응의 유무를 평가하기 위해 각 군당 5마리의 guinea pig에 감작투여한 후 최종감작 1주와 2주째에 귀정맥(ear vein)으로 야기항원을 투여하였다. anaphylaxis 쇼크 반응 시험에서 5마리 중 1마리가 양성반응을 나타낸 경우 의약품의 안전성 평가라는 관점에서는 양성으로 판정한다[11]. *H. pylori*의 WC항원에 대한 1차 및 2차 야기항원 투여 후 전신성 anaphylaxis 쇼크반응에 대한 관찰 결과는 다음과 같다.

*H. pylori*의 WC에 대한 anaphylaxis 쇼크반응은 WC (H) 60 µg/100 µl의 항원농도에서 1차, 2차 야기항원 투여 모두 경증의 증상을 나타내었고, WC (L) 20 µg/100 µl의 항원농도에서는 아무런 anaphylaxis 쇼크 증상이 관찰되지 않았다. 그리고 crude urease에 대한 anaphylaxis 쇼크반응은 항원농도가 20 µg/100 µl의 urease (L)와 60 µg/100 µl의 urease (H) 모두에서 아무런 증상도 관찰되지 않았다. Guinea pig-rat를 이용한 PCA 시험에서는 WC (H), WC (L), urease (H), urease (L) 투여군 모두에서 양성반응이 나타나지 않았다. 피부감작성 시험에서는 항원농도에 따라 각각 80 µg/100 µl, 40 µg/100 µl, 20 µg/100 µl, 20 µg/100 µl 일 때 피부이상 증상 즉, 피부 트러블이 발생하지 않는 최고의 항원농도는 40 µg/100 µl인 것으로 관찰되었다.

결론적으로 항원성 시험에서 *H. pylori*로부터 분리된 urease 항원이 WC 항원보다 면역독성 측면에서 좀 더 안전할 것으로 조사되었다.

References

1. Birmingham, N., S. Payankulam, S. Thanesvorakul, B. Stefura, K. HayGlass and V. Gangur. 2003. An ELISA-based method for measurement of food-specific IgE antibody in mouse serum: an alternative to the passive cutaneous anaphylaxis assay. *J. Immunol. Methods* **275**, 89-98.
2. Blanchard, T. G., J. C. Eisenberg and Y. Matsumoto. 2004. Clearance of *Helicobacter pylori* infection through immunization: the site of T cell activation contributes to vaccine efficacy. *Vaccine* **22**, 888-897.
3. Ermak, T. H., P. J. Giannasca, R. Nichols, G. A. Myers, J. Nedrud, R. Weltzin, C. K. Lee, H. Kleantous and T. P. Monath. 1998. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II- restricted responses. *J. Exp. Med.* **188**, 2277-2288.
4. Garhart, C. A., R. W. Redline, J. G. Nedrud and S. J. Czinn. 2002. Clearance of *Helicobacter pylori* infection and resolution of postimmunization gastritis in a kinetic study

- of prophylactically immunized mice. *Infect. Immun.* 3529-3538.
5. Graham, D. Y., H. M. Malaty, D. G. Evans, D. J. Jr Evans, P. D. Klein and E. Adam. 1991. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology* **100**, 1495-1501.
 6. Hayashi, K., T. Ishikawa, T. Yamashita, T. Tajima and K. Nakayama. 2003. Biphasic response of cutaneous blood flow induced by passive cutaneous anaphylaxis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **482**, 305-311.
 7. Hifumi, E., Y. Yamada and T. Uda. 2006. A catalytic antibody heavy chain HpU-2 degrading its epitope peptide and *H. pylori* Urease. *Immunol. Lett.* **103**, 68-74.
 8. Hu, L. T. and H. L. Mobley. 1990. Purification and N-Terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **58**, 992-998.
 9. Hunt, R. H. 1996. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Med.* **100** (5A) 42S-50S.
 10. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994. *Helicobacter pylori*. in: Schistosomes, liver flukes, and *Helicobacter pylori*: views and expert opinions of IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 61-241.
 11. Jo, E. H., S. D. Cho, N. S. Ahn, J. W. Jung, S. R. Yang, J. S. Park, K. S. Park, I. S. Hong, M. S. Seo, N. B. Tiep, Y. S. Lee and K. S. Kang. 2003. Antigenicity study of non-specific immunostimulator BARODON^R. *Kor. J. Vet. Res.* **43**, 255-261.
 12. Justine, S. G., E. C. Natalie and H. S. Dieter. 1980. Methods in immunology, a laboratory text for instruction and research. W. A. Benjamin, Inc, Canada.
 13. Kim, B. J., B. H. Kang, T. Y. Kim, T. H. Kim and K. W. Kim. 1997. Production and characterization of IgY specific to *Helicobacter pylori*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 612-616.
 14. Lee, D. H. 2002. Current status and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Korea. *Kor. J. Gastroenterol.* **39**, 153-160.
 15. Lesley, E., M. J. Smythies, K. B. Novak, J. Waites, L. Russell, D. M. Casey and D. S. Phillip. 2005. Poliovirus replicons encoding the B subunit of *Helicobacter pylori* urease protect mice against *H. pylori* infection. *Vaccine* **23**, 901-909.
 16. Mabe, K., M. Yamada, I. Oguni and T. Takahashi. 1999. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**, 1788-1791.
 17. Marshall, B. J. and J. R. Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* **323**, 1311-1315.
 18. Megraud, F. 1998. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Br. Med. Bull.* **24**, 207-216.
 19. Michetti, P., I. Corthésy-Theulaz, C. Davin, R. Haas, A. C. Vaney, M. Heitz, J. Bille, J. P. Kraehenbuhl, E. Saraga and A. L. Blum. 1994. Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease. *Gastroenterology* **107**, 1002-1011.
 20. Parsonnet, J., R. A. Harris, H. M. Hack and D. K. Owens. 1996. Modelling cost-effectiveness of *Helicobacter pylori* screening to prevent gastric cancer; A mandate for clinical trials. *Lancet* **348**, 150-154.
 21. Ruggiero, P., P. Samuele, R. Rino and D. G. Giuseppe. 2003. The quest for a vaccine against *Helicobacter pylori*: How to move from mouse to man? *Micro. Infec.* **5**, 749-756.
 22. Rupnow, M. F., D. K. Owens, R. Shachter and J. Parsonnet. 1999. *Helicobacter pylori* vaccine development and use: A cost-effectiveness analysis using the institute of Medicine methodology. *Helicobacter* **4**, 272-280.
 23. Rupnow, M. F., R. D. Shachter, D. K. Owens and J. Parsonnet. 2001. Quantifying the population impact of a prophylactic *Helicobacter pylori* vaccine. *Vaccine* **20**, 879-885.
 24. Satoh, K., K. Kimura and Y. Taniguchi. 1996. Distribution of inflammation and atrophy in the stomach of *Helicobacter pylori*-positive and -negative patients with chronic gastritis. *Am. J. Gastroenterol* **91**, 963-969.
 25. Simon, P. M., P. L. Goode, A. Mobasser and D. Zopf. 1997. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal infect. *Immun.* **65**, 750-757.
 26. Warren, J. R. and B. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **4**, 1273-1275.