

한국 12-23개월 소아에서 7가 폐구균 단백결합 백신 추가접종으로 유도된 6B와 19F 혈청형 특이 방어항체의 교차혈청형 6A, 6C, 19A에 대한 교차 반응

이화여자대학교 의학전문대학원 소아과학교실*, 의과학연구소 백신효능연구센터†

김경효*,† · 양주연* · 박인호† · 임수영†

Cross-reaction of 6B and 19F Specific Antibodies to Serotypes 6A, 6C, and 19A after Immunization with 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Korean Children Aged 12-23 Months

Kyung-Hyo Kim, M.D.*†, Joo Yun Yang, M.D.*, In Ho Park, Ph.D.†, and Soo Young Lim, M.S.†.

Department of Pediatrics*, and Center for Vaccine Evaluation and Study†, School of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Republic of Korea

Purpose: The cross-protection of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) against vaccine-related serotypes has been controversial. We investigated the serological properties of cross-protective antibodies against vaccine-related serotypes 6A, 6C, and 19A induced in young children aged 12-23 months after booster immunization of PCV7.

Methods: IgG and IgM antibody concentrations and opsonic index (OI) against vaccine serotypes 6B and 19F and vaccine-related serotypes 6A, 6C, and 19A were measured by ELISA and opsonophagocytic killing assay (OPA) in 4 selected immunosera. The serological properties and antigenic specificity of protective antibodies were determined by IgM depletion of immunosera, OPA, and competitive OPA against serogroup 6 and 19 pneumococci.

Results: Compared to pre-IgM depleted immunosera, OI of IgM-depleted immunosera against 6B and 19F decreased and OI against 6A, 6C, and 19A decreased, too. In competition OPA, free 6B and 19F polysaccharide completely inhibited the immune protection against vaccine-related serotypes 6A, 6C, and 19A as well as vaccine types 6B and 19F.

Conclusions: The booster immunization of PCV7 certainly induced cross-protective antibodies against vaccine-related serotypes 6A, 6C, and 19A with both IgG and IgM isotypes. Furthermore, IgM antibodies are more highly contributed to opsonophagocytic activity against vaccine-related serotypes as well as most of vaccine types than do IgG antibodies. Further studies are needed for the more immunized sera in the children as well as adults. (*Korean J Pediatr Infect Dis* 2013;20:53-62)

Key Words : *Streptococcus pneumoniae*, Heptavalent pneumococcal conjugate vaccine, Antibodies, Immunoglobulin M, Cross protection

서 론

소아에게 수막염, 패혈증, 폐렴, 중이염 등의 중요 감염 질환을 일으키는 원인인 폐구균(*Streptococcus pneumoniae*) 감염을 예방하기 위한 폐구균 단백결합백신(pneumococcal conjugate vaccine, PCV)이 개발되어

접수: 2013년 1월 18일, 수정: 2013년 4월 3일

승인: 2013년 4월 3일

책임저자: 김경효, 이화여자대학교 의학전문대학원 소아과학교실

Tel: 02)2650-2857, Fax: 02)2650-2817

E-mail: kaykim@ewha.ac.kr

현재 사용되고 있다¹⁾. 이 중 7가 폐구균 단백결합백신 (7-valent pneumococcal conjugate vaccine, PCV7) 이 2000년 처음으로 사용되었으며 7가지 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F를 포함한다.

PCV7은 폐구균 다당질과 디프테리아 항원인 CRM₁₉₇을 화학적으로 결합시켜 제조한 백신으로, T세포 의존 면역반응을 유도한다. PCV7은 6A, 19A 등 백신 연관 혈청형에 대한 교차방어가 기대되었으며^{2, 3)}, 실험동물 모델에서 교차방어활성이 확인되었다^{4, 5)}. 그러나 미국에서 폐구균 침습 감염에 대한 감시프로그램과 여러 국가의 연구보고에서 6A와 19A에 의한 침습 감염과 보균율이 백신도입 후 감소되지 않고 오히려 증가됨이 보고되면서, PCV7의 교차방어에 대한 논쟁이 지속되고 있다⁶⁻¹⁰⁾.

한편 기존의 토끼 항 혈청반응 검사에 의해 6A로 알려진 폐구균 중 새로운 혈청형 6C가 발견되었다¹¹⁾. 3차 기본접종 또는 추가접종 이후 1개월에서 3년 사이에 수집된 PCV7 면역혈청의 교차방어 효능 결과는 비록 6C가 6A와 매우 유사한 구조를 가지고 있으나, PCV7은 6A 감염에 대한 교차방어 효능을 가지는 것으로 확인되어 6C가 PCV7의 6A 교차방어효능의 혼란을 야기한 원인임을 보고하였다¹²⁾. 19A의 경우는 PCV7 3차 기본접종 후 모든 면역혈청에서 0.35 µg/mL 이상의 항-19A 항체 농도를 유도하였지만, 기능을 보여주는 옥소닌 활성이 1:8 이상인 경우는 19%에 지나지 않았다¹³⁾. 한편 6C의 발견 이전 6A와 19A에 대한 교차면역의 논쟁은 계속 연구 중이며 새로운 13가 PCV에 6A와 19A 혈청형을 더 추가시키는 이유로 작용하였다^{14, 15)}.

그러나 최근 본 연구자들은 선행 연구에서 국내의 12-23개월 소아에게 PCV7 추가접종 후 혈청의 교차혈청형 6A, 6C, 19A에 대한 옥소닌 인덱스가 3회의 기본접종을 완료한 소아의 교차혈청형에 대한 옥소닌 인덱스보다 훨씬 높아지는 것을 관찰하였다^{16, 17)}. 이는 12개월 이후의 추가접종이 교차 혈청형에 대한 교차방어활성을 크게 증진시키고 있음을 암시하고 있다. 최근 Simell 등¹⁸⁾은 12개월 전후에 9가 PCV 백신 1회 접종에서 항-6A 다당질 항체 중 IgM 항체가 IgG 보다 더 많이 유도되며, IgM

항체와 옥소닌 인덱스의 상관성은 IgG와의 관계보다 더 높은 것으로 보고하였다. 그러나 소아에게 추가접종 후 혈청 내 IgM 특이항체와 증가된 교차방어효능과의 연관성에 대한 이해는 아직 없다.

따라서 본 연구에서는 12-23개월 소아에게 추가접종 후 유도된 면역 혈청의 항-6B, -19F 피막 특이 IgG 또는 IgM 항체 농도를 확인하고 이들 항체의 교차 혈청형 6A, 6C, 19A에 대한 교차 방어 활성도를 opsonophagocytic killing assay (OPA)와 competitive OPA (cOPA)를 통해 비교하였다.

대상 및 방법

1. 면역혈청

본 연구에서는 생후 2, 4, 6개월 및 12개월 이후에 PCV7 (PrevenarTM, Pfizer Inc, Philadelphia, PA, US) 접종을 완료하고 마지막 접종 1-3개월 후 수집한 4개의 혈청을 사용하였다¹⁶⁾. 혈청 수집은 강남 차병원의 기관 임상시험 심사위원회의 승인(No. 06-25) 대상 소아의 부모 혹은 법정 대리인에게 연구에 대한 명확한 설명을 통해 동의서를 받은 후 시행하였다. 혈청은 사용 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

2. 효소면역법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

혈청형 6B, 19F에 대한 IgG 또는 IgM 특이항체 농도 측정은 3세대 WHO 폐구균 ELISA를 이용하였다¹⁶⁾. 면역혈청과 IgM 제거 면역혈청의 IgM 존재 여부는 WHO 폐구균 ELISA와 동일한 방법을 통해 측정된 희석 면역혈청(1:1,000)의 405 nm에서의 흡광도(optical density, OD 405 nm)를 비교하여 확인하였다.

이를 간략히 기술하면, 먼저 PBS (0.02% Na₃N) 속에 녹인 피막(capsule) 항원(10 µg/mL, ATCC, Rockville, MD) 용액 100 µL를 ELISA 평판(Corning Inc., Corning, NY)에 넣어 5시간 동안 37°C에서 반응시키고,

0.1% Brij 35 (Sigma, St. Louis, MO)가 포함된 Tris-완충 식염수(TBST, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7.4)로 5회 반복 세척하였다. 모든 면역혈청은 세포벽 다당질(cell wall polysaccharide, CWPS, 5 µg/mL, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark)과 22F 피막 다당질(5 µg/mL)을 포함한 PBS (0.05% Tween 20, PBST) 용액으로 실온에서 30분 동안 반응시켜 비특이 항체의 흡착을 제거하였다. 표준혈청 89-SF (Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), FDA, Bethesda, MD)의 비특이 항체 흡착 제거는 CWPS만 넣은 PBST를 사용하였다. 흡착제거 과정 후 면역혈청과 89-SF 혈청을 2.5배 연속 희석하여 ELISA 평판에 각각 첨가하였다. 2시간 실온 반응 후 1:2,000으로 희석한 alkaline phosphatase가 결합된 이차항체인 항-사람 IgG 또는 항-사람 IgM 항체(Southern Biotech, Birmingham, AL)를 ELISA 평판에 넣었다. 2시간 실온 반응 후 1 mg/mL 농도의 p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 기질용액을 첨가해서 발색되도록 하였다. 3N NaOH으로 발색반응을 종료시키고 405 nm에서의 OD 값을 측정하였다. 면역 혈청의 항체 농도는 CDC 분석 프로그램(Brian Plikaytis 제공, US CDC, Atlanta, GA)을 사용하였다. WHO 폐구균 ELISA의 실험 프로토콜은 <http://www.vaccine.uab.edu>로부터 제공받았다.

3. Opsonophagocytic assay (OPA)

두 가지 백신 혈청형 6B, 19F와 3가지 백신 연관 혈청형 6A, 6C, 19A에 대한 면역방어능력 평가를 위해서 미국 알라바마 주립대학교에서 개발 제공한 OPA^{16, 19)}를 사용하였고 혈청군 6와 19내에서의 교차방어 특이성 여부는 cOPA를 통해 확인하였다.

동결된 각 혈청형 폐구균을 녹여 2회 세척 후 적절한 농도(2×10^5 CFU/mL)로 희석하여 OPA에 사용하였다. 모든 면역혈청은 먼저 56°C에서 30분간 반응시켰다. 3배로 연쇄 희석한 면역혈청 20 µL와 균액 10 µL를 지정된 96-well 평판에 넣고, 30분간 600 rpm의 속도로 실온

에서 반응시켰다. 그 후 각 반응액에 토끼 보체 혈청(Pel Freez Biologicals, Rogers, AR) 10 µL, dimethyl formamide (DMF)로 분화시킨 HL-60 세포(4×10^5 세포수) 40 µL를 함께 넣어 45분간 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 다시 반응시켰다. 반응 종료 후 반응액을 10 µL씩 Todd-Hewitt yeast (THY) 평판배지(Todd-Hewitt broth with 0.5% yeast extract [THY broth] and 1.5% agar)에 점적하고 15분간 건조시켰다. 평판배지가 충분히 건조되면 배지 위에 다시 우무겹배지(overlay agar) (THY broth, 0.75% agar, 25 µg/mL 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride, antibiotic)를 부어 굳을 때까지 15분간 실온에서 방치하였다. 우무겹배지에 첨가되는 항생제는 폐구균의 항생제 내성 특성에 따라 streptomycin, optochin, trimethoprim, spectinomycin을 선택하여 사용하였다. 37°C에서 하루 배양한 폐구균의 균 집락의 수는 미국 National Institute of Standards and Technology (NIST)에서 제공하는 NICE 세포수 측정 프로그램을 통해 집계하였고, 분석은 알라바마 주립대학에서 제공한 Opsotiter 2.0을 사용하였다. 옵소닌 인덱스(opsonic index, OD)는 전체 폐구균의 50%를 죽이는 혈청의 희석 배수로 정의하였다. OPA와 관련된 상세한 프로토콜은 <http://www.vaccine.uab.edu>에 있다.

한편 PCV7 면역혈청의 교차 혈청형 6A, 6C, 19A에 대한 교차방어 특이성 평가를 위해 사용한 cOPA에서는 정제된 6B 피막과 19F 피막을 저해제로 사용하였으며, 면역혈청 15 µL와 정제된 6B 또는 19F 피막 다당질 15 µL를 함께 섞어 30분간 저해반응시킨 후 위에서 기술한 방법으로 동일하게 OPA를 진행하였다.

4. Affinity chromatography에 의한 혈청내 IgM 항체 제거

면역혈청 내의 IgM 항체 제거를 위해 각 면역혈청과 항-사람 IgM 항체가 결합된 아가로스 구슬(agarose bead, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)의 혼합액을 2시간 실온에서 반응시켰다. 한편 대조군 면역혈청은 항-사람 IgM 항체가 결합되지 않은 아가로스 구슬과 반응시켜 준비하

였다. 면역혈청과 아가로스 혼합반응액은 Bio-Rad chromatography spin column (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)에 넣어 4°C에서 2,000 rpm으로 1분간 원심분리 하였고 IgM이 제거된 분획을 모아 실험에 사용하였다. 면역혈청의 IgM 제거 여부는 ELISA로 확인하였다.

5. 통계분석

면역혈청에서 각각의 6B, 19F 특이 IgG, IgM의 농도와 각 혈청형에 대한 항체의 옅소닌 인덱스에서 대조군 면역혈청과 IgM 제거 면역혈청 사이의 결과 분석은 GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)를 사용하였다.

결 과

1. 항-6B피막, -19F피막 항체의 isotype이 옅소닌 활성에 미치는 영향

PCV7 면역혈청 내 항-6B 피막, -19F 피막 항체 isotype이 6B와 19F 면역방어에서 어떤 영향을 하는지 조사하고자, 4가지 면역 혈청에서 IgM을 제거하고, OPA를 통해 각 혈청형 6B와 19F에 대한 옅소닌 인덱스를 측정하였다.

IgM 제거 여부는 항-6B 피막, -19F피막 IgM 항체 제거 면역혈청과 대조군 면역혈청 안에 존재하는 IgG와 IgM 항체의 양을 ELISA로 측정하여 확인하였다(Fig. 1). 혈청형 6B, 19F 모두에서 IgG의 경우, 대조군 면역혈청과 IgM 제거 면역 혈청간의 양적 차이를 관찰할 수

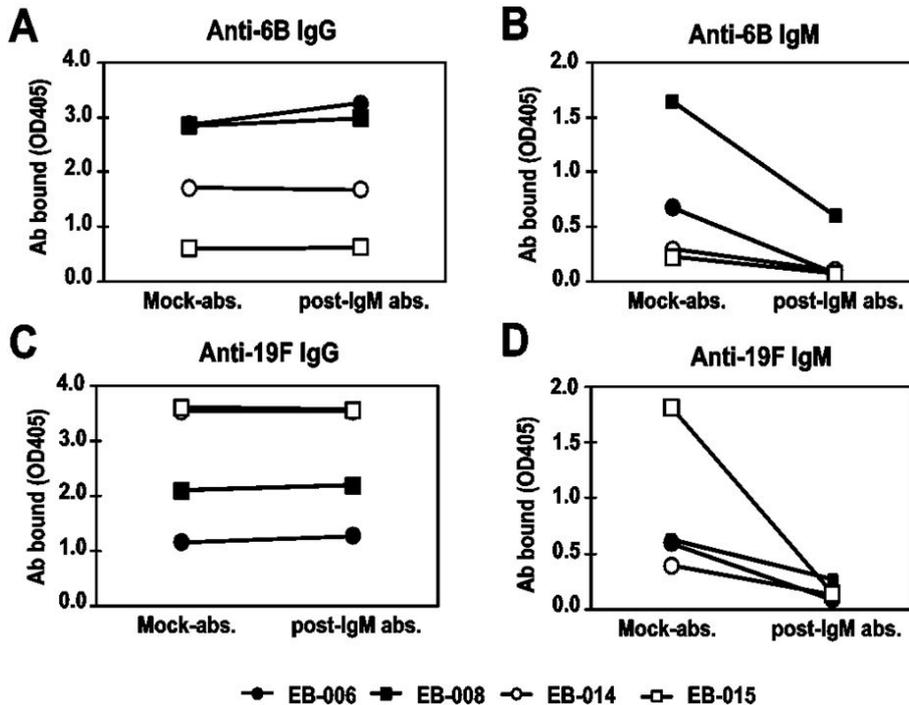


Fig. 1. IgG (A, C) and IgM (B, D) antibody concentrations to capsular serotypes 6B and 19F in four immune sera (EB-006, EB-008, EB-014 and EB-015) collected 1 month after PCV7 booster immunization before and after depletion of IgM antibodies. The levels of IgG and IgM were measured at a 250-fold sample dilution (A-D). IgM or IgG levels are shown for four immune sera after mock absorption (Mock-abs) and IgM absorption (Post-abs).

는 없었으나(Fig. 1A, 1C), IgM은 대조군에 비교하여 IgM 제거 면역혈청에서 OD405 값이 현저히 감소되었다(Fig. 1B, 1D).

혈청형 6B, 19F에 대한 IgM 항체가 제거된 면역혈청의 옥소닌 활성도 감소를 확인하기 위해 OPA를 통해 옥소닌 인덱스 값을 측정하였다. 4가지 대조군과 IgM 제거 면역혈청의 혈청형 6B, 19에 대한 기하평균 옥소닌 인덱스는 각각 6B에서 9,799 (95% CI: 681, 140,990)와 1,547 (95% CI: 53, 44,976), 19F에서 14,921 (95% CI: 1,429, 155,794)와 5,381 (95% CI: 265, 109,313)로 나타났다. 따라서 IgM의 제거로 각 면역혈청의 옥소닌 인덱스 값이 개별적으로는 67-97% (6B), 혹은 0-85

% (19F)의 감소되었고, 이들의 기하평균도 각각 6배 (6B), 혹은 2배(19F)로 감소하였음을 확인하였다(Fig. 2A, 2D).

2. 항-6B피막, -19F 피막 항체 isotype이 교차혈청형 6A, 6C, 19A의 교차방어 활성에 미치는 영향

PCV7 면역혈청의 항-6B피막, -19F피막 항체 isotype이 교차혈청형 6A, 6C, 19A에 대한 면역방어 활성에 어떻게 영향을 주는지 조사하기 위해서, 앞에서 사용한 4가지 면역혈청의 교차혈청형에 대한 옥소닌 인덱스를 측정하였다.

4가지 혈청의 6A에 대한 기하평균 옥소닌 인덱스 값이 대조군에서 4,279 (95% CI: 358, 51,100), IgM 제거혈

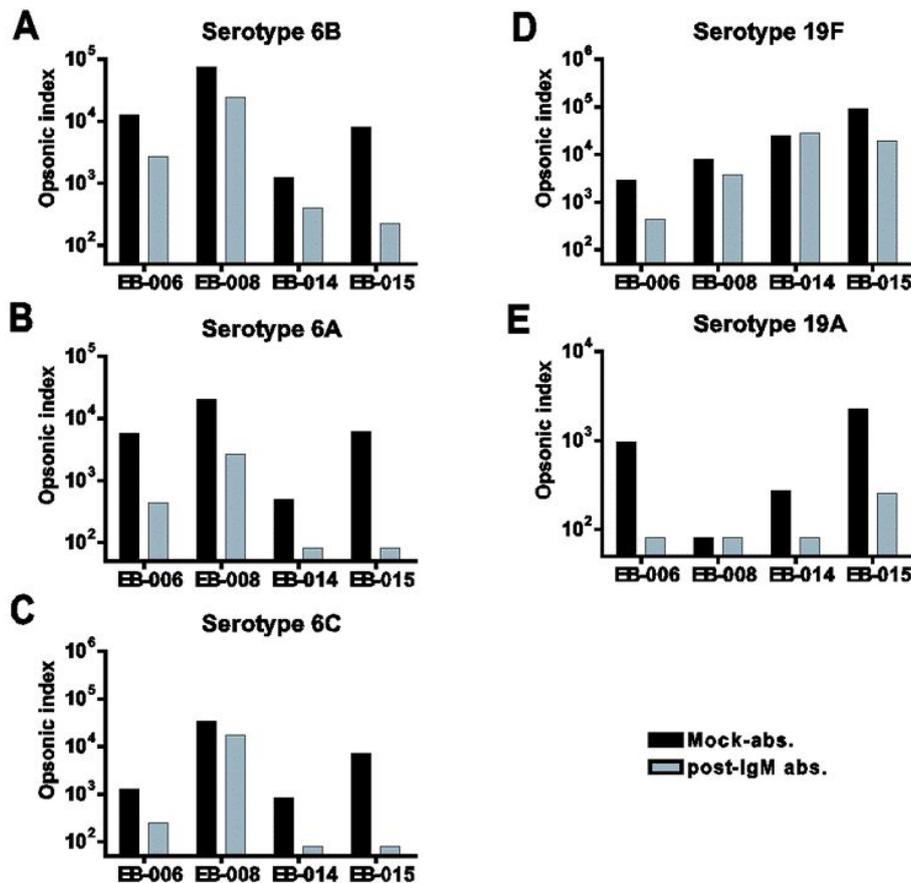


Fig. 2. Opsonophagocytic activity of antipneumococcal antibodies against pneumococcal serotypes 6B (A), 6A (B), 6C (C), 19F (D), and 19A (E) in four booster immune sera collected from young children aged 12-23 months 1 month after PCV7 immunization. Opsonic indices of IgM-absorbed fractions for four immune sera were measured after mock absorption and IgM absorption.

청에서 294 (95% CI: 20, 4,218)로 14배 감소하였고, 각 개체에서 87-100% 범위로 옥소닌 인덱스가 감소되었다. 6C에 대한 기하평균 옥소닌 인덱스 값은 대조군에서 3,965 (95% CI: 269, 58,352)이고, IgM 제거에서 404 (95% CI: 7, 23,219)로 각 개체에서는 49-100% 범위에서 옥소닌 인덱스가 9배 정도로 감소하였다. 19A의 경우 대조군(466, 95% CI: 45, 4,787)과 IgM 제거 후 혈청(107, 95% CI: 42, 270)의 기하평균 옥소닌 인덱스 값이 상대적으로 낮았지만 각 개체에서는 89-100% 범위에서 약 4배의 옥소닌 인덱스의 감소를 보여 주

었다(Fig. 2B, 2C, 2E).

항-6B 피막, -19F 피막 항체에 의한 교차방어 특이성을 조사하기 위하여 정제된 유리(free) 6B 피막, 19F 피막 항원을 저해제로 사용한 cOPA를 통해 옥소닌 인덱스를 측정하였다. Fig. 3과 같이, 5 µg/mL의 정제된 유리 6B 피막, 19F 피막을 저해제로 사용하여 각각 면역혈청에 넣어주면 4가지 종류의 대조군, IgM 제거 면역혈청의 옥소닌 인덱스가 6B, 19F (Fig. 3A, 3D) 뿐 아니라 혈청형 6A, 6C, 19A (Fig. 3B, 3C, 3E)에서 억제됨을 확인하였다. 그러나 EB_006 (Fig. 3B)의 경우 유리

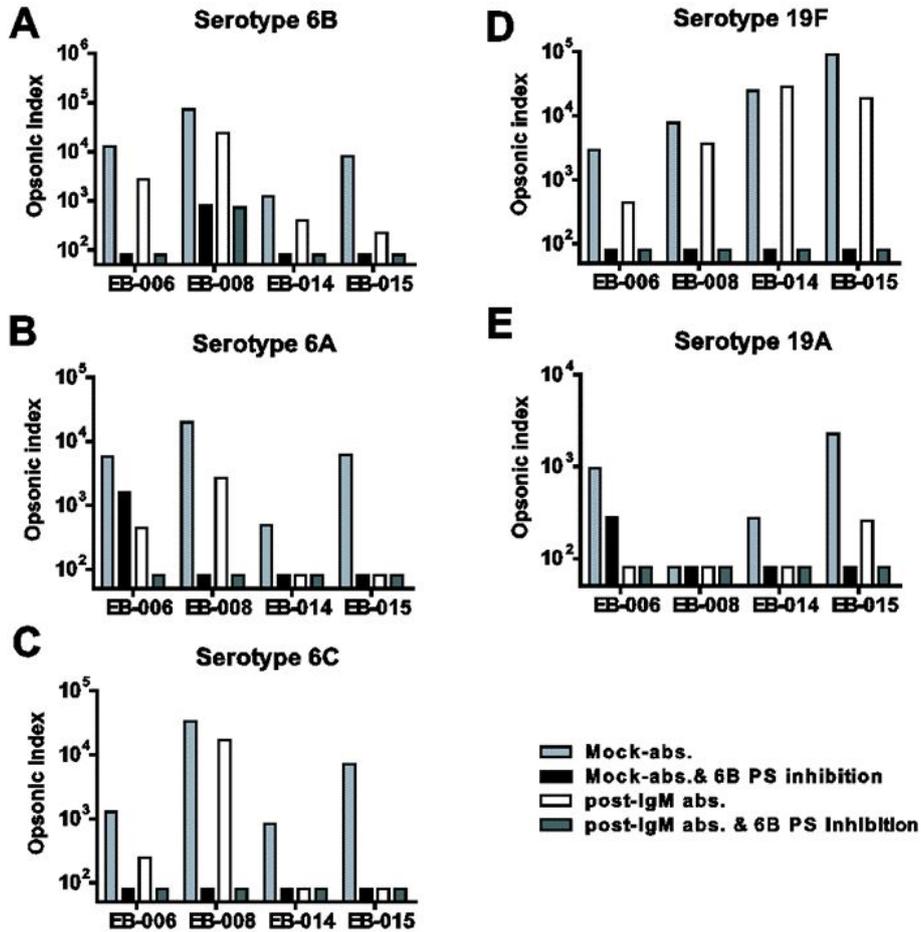


Fig. 3. Competitive opsonophagocytic killing assay. Opsonophagocytic killing activity of antipneumococcal antibodies against pneumococcal serotypes 6B (A), 6A (B), and 6C (C) were inhibited by adding free capsular polysaccharide of serotype 6B. Opsonophagocytic killing activity of anti-serotypes 19F (D) and 19A (E) antibodies were inhibited by adding free capsular polysaccharide of serotype 19F. The specificity of the opsonophagocytic killing activity for four booster immune sera was measured after mock absorption and IgM absorption.

6B 피막에 의한 옴소닌 활성 억제제가 완전히 이루어지지 않았음을 확인하였다. 이러한 현상은 동일 혈청에서 유리 19F 피막에 의한 19A에 대한 옴소닌 활성 억제제에서도 비슷하게 관찰되었다.

고 찰

PCV7이 유도한 항-6B 피막, -19F 피막 항체의 교차혈청형 6A, 19A에 대한 교차면역방어 능력에 대해 많은 논란이 있어왔지만, 본 연구자의 선행연구 결과, 국내 12-23개월 소아에서 추가접종 후 얻은 면역혈청 속에는 6A, 6C, 19A에 대해 높은 교차방어 능력을 가진 교차방어 항체가 존재하고 있음을 확인하였으며^{16, 17)}, 본 연구를 통해 국내 12-23개월 소아에서 PCV7 추가접종으로 면역혈청내 항-6B 피막, -19F 피막 항체중 일부는 교차방어 항체로서 6A, 6C, 19A에 대하여 각각 특이적인 옴소닌 활성을 통한 교차방어 능력을 가지고 있음이 확인되었다. 또한 추가접종 후 얻어진 면역혈청 속에는 IgG와 함께 다량의 IgM 항체가 유도되었으며, 이들 IgM 항체가 교차혈청형에 대한 옴소닌 활성에 크게 기여하고 있음이 확인되었다.

비록 폐구균 다당질 백신은 어린 영아에게 면역원성이 낮지만, 성인에게는 좋은 면역원성을 보인다²⁰⁾. 다당질 항원에 대한 항체 면역반응은 주로 IgM 이며, 일반적으로 항체의 친화력 성숙, 면역글로불린의 isotype 스위치, 면역 기억 등의 생성이 제한되어 있다²⁰⁻²³⁾. 그럼에도 불구하고 최근 폐구균 다당질 항원에 대한 T세포 비의존성 다당질-특이 IgM 기억 B 세포가 유도되어 골수에서 오래동안 생존하면서 폐구균에 대한 자연 면역반응에 관여하는 것으로 알려졌다²⁴⁾. 이러한 다당질-특이 IgM 기억 B 세포의 수적인 감소가 노인에게서 관찰되는데²⁵⁾, 이는 노인의 폐구균질환에 대한 감수성과 관련된다.

유전 요인도 폐구균에 대한 감수성의 주 요인으로 작용한다. 예로 IgG2 항체는 폐구균 감염 방어에 주요 역할을 담당하는데, IgG2의 수용체인 FcγRIIa의 allotype 이 IgG2와의 결합능력에 영향을 미친다. 예를 들면 Fcγ

RIIa-R131은 IgG2와 약하게 결합하지만, FcγRIIa-H131은 강하게 결합하여 폐구균 감염에 대한 방어력을 증가시킨다²⁶⁻²⁸⁾. 그러나 2세 미만 소아는 이들 면역기전이 미숙 또는 억제되어 있는 것으로 보이며, 오히려 단백질 항원에 의한 항체 면역반응이 성인에서의 면역반응 수준 정도로 발달되어 있어 PCV7과 같은 단백질결합 백신은 영아에게 방어 면역을 유도할 수 있다.

소아에서 PCV7의 기본 및 추가접종은 T세포 의존성 항체 면역을 유도하여 면역 기억 등을 유도함으로써 강한 IgG 방어항체를 생산한다. 그러나 본 연구 결과에서는 소아에게서 PCV7 추가 접종 후에도 다량의 IgM 항체가 지속적으로 생산되고 있으며, 이들 IgM 항체는 백신 혈청형 뿐 아니라 교차혈청형에 대해서도 효율적인 옴소닌 활성을 나타내었다. 물론 이들 IgM 교차항체는 PCV7 면역으로부터 유도된 것으로 cOPA를 통해 확인되었다. 그러나 PCV7면역이 다당질-특이 IgM 기억 B세포의 활성을 통해 이루어져 다량의 IgM 방어 항체를 유도하였는지는 명확하지 않다. 한가지 추론한다면 12개월 전후에 T세포 비의존성 면역의 발달성숙이 완성되고, 이 시기에 당-단백 결합 백신인 PCV는 다량의 T세포 비의존 항원을 가지고 있어 추가 접종 과정에서 T세포 의존 항체 유도와 함께 IgM 항체 유도가 동시에 활성화 될 가능성을 제시해 볼 수 있다. 만약 12개월 전 후에 T세포 비의존 항체 면역기전이 완성되어 있다면 이미 다른 연구에서 보여준 대로 PCV 기본접종 후에 추가접종으로서 PPV23을 고려할 수 있을 것이다^{29, 30)}.

2세 미만 소아의 PCV7 면역 평가는 주로 ELISA에 의한 IgG항체 농도 측정에 의존하였지만, 개선된 OPA는 적은 양의 면역혈청으로도 여러 백신 혈청형에 대한 기능적 방어 면역 활성 평가를 가능하게 하였다. 본 연구에서는 OPA를 이용하여 교차 혈청형에 대한 면역 방어에서 IgM 이 교차 혈청형에 대해 IgG 보다 더 효율적인 옴소닌 활성을 보임을 발견하였다. 이러한 현상은 아마도 항원 결합부위의 길이가 IgG 보다 상대적으로 긴 구조의 poly-reactive IgM이 본래의 항체 유도 다당질 항원과 매우 유사한 epitope을 가진 교차 항원과 쉽게 결합할 수 있는

특성에 기인한 것으로 해석된다³¹⁾. 한편 IgM은 실질적으로 IgG 보다 보체 고정에 더 효율적이다. 예로 동물감염 모델이나 박테리아 흡소닌 효능 평가실험에서 IgM은 IgG 보다 10에서 100배 이상 더 높은 방어 효과를 가진다^{32, 33)}. 따라서 본 연구의 결과는 백신혈청형과 함께 교차혈청형에 대한 면역방어 평가에 OPA가 가장 명료한 평가 방법을 보여준다.

본 연구는 국내의 12-23개월 연령의 소아의 추가접종으로부터 얻은 면역혈청의 항-6B 피막, -19F 피막 항체들의 일부는 교차혈청형 6A, 6C, 19A에 대하여 높은 흡소닌 인덱스의 면역방어활성을 가지고 있으며, 이들 교차방어항체들은 대부분 PCV7을 통해 유도되었음을 확인하였다.

본 연구의 일부 혈청형에서 보여준 결과처럼 면역혈청내 존재하는 모든 교차방어항체가 PCV7 접종을 통해 유도되었다고 보기는 어렵다. 예로써 면역 혈청(EB-006)의 cOPA에서 6B 다당질 항원은 면역혈청의 항-6B 피막 IgG 항체에 의한 6A에 대한 흡소닌 활성을 완전히 억제하지 못하였다. 이는 6B 다당질 에피토프와 무관한 6A 고유의 에피토프를 인식하는 항체가 면역혈청내 존재하며, PCV7과 무관하게 면역 이전에 유도되었거나 화학결합에 의한 PCV 제조과정에서 다당질 항원의 변형에 의해 유도된 항체에 기인할 수 있는 가능성이 존재한다. 19A의 경우도 6A와 유사한 현상이 관찰되었다. 그러나 결합 항원의 스펙트럼이 넓은 IgM 항체의 경우 모든 교차 혈청형 IgM 항체는 PCV7 면역을 통해 6B, 19F 다당질에 의해 유도된 교차방어 항체임을 명확히 확인하였다.

결론적으로 본 연구에서는 PCV7 추가 접종을 완료한 국내 12-23개월 소아의 면역혈청 내에 항-6B 피막, -19F 피막 특이 IgG 항체와 IgM 항체가 존재하며 일부 항-6B 피막, -19F 피막 특이 IgG 및 IgM 항체가 교차혈청형 6A, 6C, 19A에 대해서도 방어면역 기능을 가지고 있음을 보여주었다. 교차 반응으로 형성된 항체가 실제 감염을 예방하지에 대한 임상 연구는 보고된 바가 없으나 OPA 값이 백신의 효능을 대신하는 대체 표식자로 인정되고 있으므로 1:8 이상의 OPA 값이 보여진다면 이

는 임상에서도 침습성 질환을 예방할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구는 국내 12개월 이후 일부 소아를 대상으로 수행된 것이므로 향후 더 많은 소아를 대상으로 한 연구가 필요할 것이다. 또한 성인에서의 같은 연구는 소아와 성인의 폐구균 백신에 대한 면역 반응 특성의 비교가 가능하도록 할 것이다.

요 약

목적: 폐구균 단백질결합 백신의 교차혈청형에 대한 교차방어 능력에 대한 연구는 매우 부족하다. 본 연구는 12-23개월 연령 소아에게 PCV7 추가접종 후 얻어진 면역혈청에서 교차혈청형 6A, 6C, 19A에 대한 교차 항체의 혈청학적 특성을 연구하기 위해 수행하였다.

방법: 백신 혈청형 6B, 19F와 교차혈청형 6A, 6C, 19A의 IgG, IgM 항체 농도와 흡소닌 인덱스를 ELISA와 OPA를 통해 측정하였다. 혈청군 6과 19에 대한 방어 항체의 혈청학적 특성과 항원 특이도는 면역혈청내 IgM 제거, OPA, cOPA를 통해 확인하였다.

결과: 대조군 혈청에 비교하여 IgM 제거 면역혈청의 6B와 19F에 대한 흡소닌 인덱스가 감소하였고, 6A, 6C, 19A에 대한 흡소닌 인덱스도 역시 감소하였다. cOPA에서 6B 다당질, 19F다당질은 백신 혈청형 6B, 19F 뿐 아니라 6A, 6C, 19A의 방어 면역도 완전히 억제하였다.

결론: 6B, 19F 를 포함한 PCV7은 교차혈청형 6A, 6C, 19A에 대한 IgG 및 IgM 교차방어 항체를 유도하였다. IgM 방어항체는 IgG 항체와 비교하여 백신 혈청형뿐 아니라 백신-연관 혈청형에 대해 더 높은 흡소닌 인덱스를 나타내었다. 향후 더 많은 소아와 성인의 면역 혈청으로 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 2011년 한국소아감염병학회-한국노바티스 학술연구상 연구비에 의해 수행되었습니다.

본 연구를 위해 도움을 주신 미국 알라바마 주립대학

교의 Moon H. Nahm교수께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) The Korean Pediatric Society. Pneumococcal vaccine. In: Lee HJ, editor. Immunization Guideline. 7th ed. Seoul: The Korean Pediatric Society; 2012. pp. 160-74.
- 2) Lagergard T and Branefors P. Nature of cross-reactivity between *Haemophilus influenzae* types A and B and *Streptococcus pneumoniae* types 6A and 6B. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1983;91:371-6.
- 3) Jakobsen H, Sigurdsson VD, Sigurdardottir S, Schulz D, Jonsdottir I. Pneumococcal serotype 19F conjugate vaccine induces cross-protective immunity to serotype 19A in a murine pneumococcal pneumonia model. *Infect Immun* 2003;71:2956-9.
- 4) Lee CJ, Lee LH, Frasch CE. Protective immunity of pneumococcal glycoconjugates. *Crit Rev Microbiol* 2003;29:333-49.
- 5) Saeland E, Jakobsen H, Ingolfsdottir G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis* 2001;183:253-60.
- 6) Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005. *Clin Infect Dis* 2009;48:e23-33.
- 7) Cohen R. The need for prudent use of antibiotics and routine use of vaccines. *Clin Microbiol Infect* 2009;15 (Suppl 3):S21-3.
- 8) Choi EH, Kim KH, Kim YJ, Kim JH, Park SE, Lee HJ, et al. Recommendation for use of the newly introduced pneumococcal protein conjugate vaccines in Korea. *Korean J Pediatr* 2011;54:146-51.
- 9) Kim KH, Hong JY, Lee H, Kwak GY, Nam CH, Lee YS, et al. Nasopharyngeal pneumococcal carriage of children attending day care centers in Korea: comparison between children immunized with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and non-immunized. *J Korean Med Sci* 2011;26:184-90.
- 10) Pelton SI, Huot H, Finkelstein JA, Bishop CJ, Hsu KK, Kellenber J, et al. Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant *Pneumococcus* in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:468-72.
- 11) Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, Nahm MH. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2007;45:1225-33.
- 12) Park IH, Moore MR, Treanor JJ, Pelton SI, Pilishvili T, Beall B, et al. Differential effects of pneumococcal vaccines against serotypes 6A and 6C. *J Infect Dis* 2008;198:1818-22.
- 13) Lee H, Nahm MH, Burton R, Kim KH. Immune response in infants to the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine against vaccine-related serotypes 6A and 19A. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:376-81.
- 14) Bryant KA, Block SL, Baker SA, Gruber WC, Scott DA. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2010;125:866-75.
- 15) Nuorti JP and Whitney CG. Prevention of pneumococcal disease among infants and children - use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine - recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;59:1-18.
- 16) Lee HJ, Park SE, Kim KH. Immune response to 19A serotype after immunization of 19F containing pneumococcal conjugate vaccine in Korean children aged 12-23 months. *Korean J Pediatr* 2011;54:163-8.
- 17) Cha JH. Immune responses against serogroup 6 (6A, 6B, 6C, and 6D) among subjects vaccinated with the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. Ph.D. dissertation, School of Medicine, Ewha Womans University, Seoul 2012.
- 18) Simell B, Nurkka A, Ekstrom N, Givon-Lavi N, Kayhty H, Dagan R. Serum IgM antibodies contribute to high levels of opsonophagocytic activities in toddlers immunized with a single dose of the 9-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19:1618-23.
- 19) Burton RL and Nahm MH. Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1004-9.
- 20) Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 1995;13:655-92.
- 21) de Vinuesa CG, Cook MC, Ball J, Sunners Y, Cascalho M, Wabl M, et al. Germinal centers without T cells. *J Exp Med* 2000;191:485-94.
- 22) Lentz VM and Manser T. Cutting edge: germinal centers can be induced in the absence of T cells. *J Immunol* 2001;167:15-20.

- 23) Toellner KM, Jenkinson WE, Taylor DR, Khan M, Sze DMY, Sansom DM, et al. Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers. *J Exp Med* 2002;195:383-9.
- 24) Obukhanych TV and Nussenzweig MC. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med* 2006;203:305-10.
- 25) Shi Y, Yamazaki T, Okubo Y, Uehara Y, Sugane K, Agematsu K. Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell. *J Immunol* 2005;175:3262-7.
- 26) Maxwell KF, Powell MS, Hulett MD, Barton PA, McKenzie IFC, Garrett TPJ, et al. Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc γ RIIa. *Nat Struct Biol* 1999;6:437-42.
- 27) Yee AM, Phan HM, Zuniga R, Salmon JE, Musher DM. Association between Fc γ RIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2000;30:25-8.
- 28) Yuan FF, Wong M, Pererva N, Keating J, Davis AR, Bryant JA, et al. Fc γ RIIA polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol* 2003;81:192-5.
- 29) Stray-Pedersen A, Aaberge IS, Fruh A, Abrahamsen TG. Pneumococcal conjugate vaccine followed by pneumococcal polysaccharide vaccine; immunogenicity in patients with ataxia-telangiectasia. *Clin Exp Immunol* 2005;140:507-16.
- 30) Mackenzie GA, Carapetis JR, Leach AJ, Morris PS. Pneumococcal vaccination and otitis media in Australian Aboriginal infants: comparison of two birth cohorts before and after introduction of vaccination. *BMC pediatr* 2009;9:14.
- 31) Baxendale HE, Johnson M, Stephens RC, Yuste J, Klein N, Brown JS, et al. Natural human antibodies to pneumococcus have distinctive molecular characteristics and protect against pneumococcal disease. *Clin Exp Immunol* 2008;151:51-60.
- 32) Raff HV, Bradley C, Brady W, Donaldson K, Lipsich L, Maloney G, et al. Comparison of functional activities between IgG1 and IgM class-switched human monoclonal antibodies reactive with group B streptococci or *Escherichia coli* K1. *J Infect Dis* 1991;163:346-54.
- 33) Shyur SD, Raff HV, Bohnsack JF, Kelsey DK, Hill HR. Comparison of the opsonic and complement triggering activity of human monoclonal IgG1 and IgM antibody against group B streptococci. *J Immunol* 1992;148:1879-84.