

돼지 췌장 유래 엘라스타제의 항원성 시험

김순희, 백남기, 안병옥, 이상득, 이순복, 김원배, 양중익

동아제약 주식회사 연구소

(1990. 7. 15일 접수)

엘라스타제를 기니피에 감작시킨 후에 항체검출시험을 실시하였다.

감작은 경구투여 및 피하주사의 두가지 방법으로 하였다. 경구감작은 투여직전 엘라스타제를 생식식염수에 용해한 후 강제투여하였으며, 피하감작은 엘라스타제를 Freund's complete adjuvant에 현탁시킨 후, 목 뒷부분에 주사하였다.

항체생성의 양성, 음성 검출은 경구감작군에 대해, 능동적전신성아나필락시(ASA법)과 면역확산법(ID법)으로, 피하감작군에 대해 수신피부아나필락시(PCA법)으로 행하였다. 결과, 경구감작군은 임상용량(180 Unit/kg)의 경우는 ASA법 및 ID법 모두에서 음성을 보였으나, 임상 10배용량의 경우는 ASA법에서는 양성을 보인 동물이 있었으나 통계학적 유의성은 없었으며 ($P < 0.1$), ID법에서는 음성을 보였다.

피하감작군은 모든 투여군에서 PCA양성을 보였다.

결론적으로 엘라스타제는 항원성이 인정되나, 임상용량을 경구적으로 투여한 경우는 항원성이 나타나지 않았다.

서론

엘라스타제는 1949년 J. Balo와 I. Banga에 의해 소의 신선한 췌장에서 발견된 단백질분해 효소로서 혈관의 변성된 엘라스틴섬유중의 엘라스틴을 분해시킨다.

1970년에는 D. M. Shotton에 의해 돼지 췌장에서 고순도로 정제한 엘라스타제(EC 3. 4. 3. 7)의 전체 아미노산 배열이 결정되어 구성 아미노산은 240개이며, 분자량이 약 25,900임도 밝혀졌다.

이미 1953년 동맥경화증 환자는 부검시 췌장내 엘라스타제 함량이 현저히 낮으며, 이 엘라스타제의 감소로 혈관의 엘라스틴섬유의 대사에 이상이 생김이 보고되고 있었다. 1975년 일본의 제약회사는 동맥경화증, 고혈압증, 당뇨병, 고지혈증에 동반하는 혈청지질이상의 개선을 적응증으로 하여 돼지췌장에서 추출한 엘라스타제를 의약품으로 개발하였다.

그러나 엘라스타제의 화학구조 조성이 펩타이드로서 항원성이 충분히 예견됨에도 이에 대한 연구는 별로 이루어지지 않은 상태이다.

이에 엘라스타제의 안전성 검토의 일환으로서 기니피를 사용하여 항원성을 검토하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 시험물질

엘라스타제는 엘라스틴을 특이적인 기질로 하는 단백질분해효소로서 카제인, 피브린, 변성 콜라겐도 분해하며, 특이한 냄새가 나는 회색-담갈색의 분말이다.

본 시험에 사용한 엘라스타제는 돼지체장에서 추출한 분자량 25,900의 효소로, 롯데번호 E004, 역가는 148단위/mg (90/02/03 제조)이었다.

2. 시험동물 및 사육방법

시험동물은 영운축산으로부터 구입한 Hartley계의 웅성 기니픽을 사용하였으며, 군분리시의 체중은 250-400g 범위였다. 시험기간중 전 동물에 대하여 고형사료(제일제당, 기니픽전용사료)를 자유롭게 공급하였으며, 추가로 야채공급도 행하였다. 동물식수는 수도수를 급수병에 담아 자유섭취시켰다. 기험기간중 기니픽은 플리카보네이트제 케이지(25×40.5×17cm)에 1마리씩 수용하였으며, 실내온도는 23±2°C로 유지하였다.

3. 시약 및 조제

시약으로서 Freund's complete adjuvant (FCA : Difco), Evans blue(Merck), 생리식염수(중외 제약)를 사용하였다.

1) 경구용 감작항원 조제

1회 감작량은 저농도군은 180단위/kg을, 고농도군은 이의 10배 농도로 하였다. 시험에 사용한 엘라스타제는 148단위/mg이었으므로, 이를 환산하여 엘라스타제를 평량하여 생리식염수에 용해하여 고농도군을 만들고 이어, 생리식염수로 10배 희석하여 저농도군을 만들었다. 대조군은 생리식염수로 하였으며, 약물조제는 당일 감작직전에 행하였다.

2) 피하용 감작항원 조제

1회 감작량은 고농도군은 180단위/kg을, 저농도군은 이의 10배 희석농도로 하였다. 엘라스타제를 평량하여 생리식염수로 용해한 후, 동량의 FCA액과 혼합하여 emulsion을 만들었다. 대조군은 생리식염수와 FCA와의 emulsion으로 하였다. 약물조제는 무균적으로 실시하였으며, 당일 감작직전에 행하였다.

4. 감작방법

1) 경구투여에 의한 감작

투여 당일 조제한 경구용 감작항원을 Feeding tube (Kawasumi, 4Fr)를 사용하여 위내까지 삽입한 후 강제적으로 투여하였다. 투여부피는 기니픽 체중 100g당 0.5ml로 하였다. 경구투여는 주당 2회씩 3주간 총 6회 실시하였고, 최종감작후 21일째에 유발실험을 실시하였다.

2) 피하주사에 의한 감작

주사당일에 무균적으로 조제한 피하용 감작항원을 멸균된 1회용 주사기를 사용하여 기니픽의 목 뒷부분에 피하주사하였다. 주사량은 기니픽 100g당 0.25ml로 하였다. 피하주사는 주 1회씩 3주간 총 3회 실시하였고, 최종감작후 21일째에 유발실험을 실시하였다.

5. 항체검출의 종류와 방법

1) 능동적전신성이나필렉시반응

경구감작한 기니픽에 대하여 실시하였다. 대조군은 3마리, 저농도군과 고농도군은 각각 6마리를 실시하였다. 동물은 시험당일에 에테르 마취하에서 수술, 우경정맥에 캐놀을 삽입하여 정맥을 확보해 놓았다. 대조군을 포함한 전체 기니픽에 대하여 개체당 항원인 엘라스타제를 1mg (0.2ml에 용해)씩을 정맥주사했다. 정맥주사후 2시간동안 다음의 12가지 항목을 관찰, 판정했다.

판정항목 : 코를 핏거나 문지름, 털이섬, 쇠약, 호흡곤란,
재채기와 기침, 구토, 천식, 배변,
배뇨, 경련, 허탈, 사망,

관찰결과 판정항목중 +가 0개이면 무증상, 1-3개이면 경도, 4-7개이면 중등도, 8개 이상, 또는 사망이면 중증도로 판정했다.

2) 면역확산법

경구감작한 기니픽에 대하여 실시하였다. 능동적전신성이나필렉시반응을 유발시키기전에 우경정맥에 캐놀을 삽입한 후, 혈액을 0.5ml씩 채취하였다. 혈액은 30분이상 방치한 후 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻어, 냉동보관하였다. 실험일에 Tris barbiturate완충액 (pH 8.6)에 용해시킨 1% Agarose용액을 평평하게 수평을 잡은 평판위에 부어 균혀서, Agarose평판을 만들었다. 굳은 후, 진공펌프를 이용하여 중앙 1개와 주위 6개의 구멍을 뚫었다. 평판의 중앙에는 Tris barbiturate완충액 (pH. 8.6)에 녹인 엘라스타제 1mg/ml액을 가하고, 주위에는 감작기니픽에서 취한 혈청을 각각 가하였다. 이 평판은 습윤의 상자에 넣은 후 랩으로 씌운 뒤, 실온에서 하룻밤 진동이 생기지 않는 상태로 방치하였다. 다음날 아침에 침강선의 유무를 관찰하여 항체 생성여부를 판정하였다.

3) 수신피부아나필렉시반응

피하감작한 기니픽에서 얻은 혈청에 대하여 실시하였다. 3회의 피하감작후 21일째에 기니픽을 에테르 마취시키고, 복부를 절개한 뒤, 복대동맥으로부터 혈액을 5ml씩 채취하였다. 혈액은 30분이상 방치한 후, 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻어, 냉동 보관하였다. 엘라스타제를 감작하지 않은 정상 기니픽을 준비했다. 유발실험 전날에 미리 기니픽의 등의 털을 깎아 놓았다. 실험일에 기니픽을 에테르 마취하에서 수술하여 우경정맥에 캐놀을 삽입하여 정맥을 확보한 후 폐매어 주었다. 기니픽의 등에 빨간색 유성펜으로 우측 5개, 좌측 5개의 점을 찍은 후, 감작 기니픽의 혈청의 원액, 4배, 16배, 64배 희석액과 생리식염수의 5가지를 좌우 점대칭이 되도록 0.1ml씩 피내주사했다. 피내주사 4시간 후에 엘라스타제 2mg/ml액과 2% Evans blue액을 동량혼합한 액을 기니픽 개체당 1ml씩 우경정맥을 통하여 정맥주사하였다. 주사 30분후에 색소의 누출정도를 관찰하여, 직경이 5mm 이상이면 양성으로 판정하였다.

6. 통계처리

본 실험에서 얻어진 데이터는 R×C Chi-square test를 실시하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 경구투여에 의한 감작군의 항체검출

능동적전신성이나필렉시반응과 면역확산법을 실시하였다.

1) 능동적전신성이나필렉시반응

엘라스타제의 실험 결과를 Table 1에 나타냈다. Elastase는 임상용량인 180단위/kg의 저농도군에서는 감작 기니픽 6마리 모두가 무증상의 음성반응을 보였다. 그러나 임상용량의 10배인 고농도군에서는 항원유발 정맥주사 10분 정도에 쇠약과 호흡곤란의 정도의 반응을 1마리가 보였고 2마리가 사망하였다. 사망한 감작 기니픽은 항원 정맥주사후 수분후부터 귀와 눈이 퍼래지고 호흡곤란을 보이기 시작하여 1마리는 주사 7분에 다른 1마리는 8분에 사망하였다. 고농도에서는 능동적전신성이나필렉시 반응에 양성을 보였으나, R×C Chi-square test결과 통계학적으로는 유의성이 인정되지 않았다(P<0.1).

Table 1. Active systemic anaphylaxis in elastase-sensitized guinea-pigs.

감작항원		유발항원	동물수	무증상	증	상	중증도
화합물	Dose	(1mg/마리)			경도	중등도	
Saline	용매대조	Elastase	3	3	0	0	0
Elastase	180U/kg	Elastase	6	6	0	0	0
	1800U/kg	Elastase	6	3	1	0	2

There is no significant association between dose and anaphylaxis(P<0.1)

2) 면역확산법

엘라스타제의 실험결과를 Table 2에 나타냈다. 엘라스타제의 저농도 감작군 및 고농도감작군과 엘라스타제 유발항원간에 침강선은 생기지 않았으며, 따라서 음성이었다.

Table 2. Immunodiffusion test

감작항원		유발항원	동물수	양성을 보인 개체 수
화합물	Dose	(1mg/ml 액)		
Saline	용매대조	Elastase	3	0/3
Elastase	180U/kg	Elastase	6	0/6
	1800U/kg	Elastase	6	0/6

Table 3. 4 hr. Homologous passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs.

감작항원 화합물(Dose)	유발항원 1mg/마리	동물 번호	site	감작기니피 혈청의 희석배수				
				Saline	원액	1/4	1/16	1/64
Saline	Elastase	1	R	-	-	-	-	-
			L	-	-	-	-	-
		2	R	-	-	-	-	-
			L	-	-	-	-	-
		3	R	-	-	-	-	-
			L	-	-	-	-	-
Elastase (18단위/kg)	Elastase	1	R	-	+	+	+	+
			L	-	+	+	+	+
		2	R	-	+	+	+	+
			L	-	+	+	+	+
		3	R	-	+	+	+	+
			L	-	+	+	+	+
Elastase (180단위/kg)	Elastase	1	R	-	+	+	+	+
			L	-	+	+	+	+
		2	R	-	+	+	+	+
			L	-	+	+	+	+
		3	R	-	+	+	+	+
			L	-	+	+	+	+

2. 피하주사에 의한 감작군의 항체검출

수신피부아나필렉시반응을 이용하였으며, 실험결과는 Table 3에 나타내었다. 엘라스타제 18단위/kg 감작군 및 180단위/kg 감작군 모두의 혈청을 원액, 4배, 16배, 64배 희석시켰을 때 모두 색소누출이 관찰되었다. 색소누출은 항원인 엘라스타제를 정맥주사한 수분후부터 누출되기 시작하여 30분에는 누출직경이 5mm를 훨씬 넘어 10~20mm정도를 보였다. 기니픽을 두부강타하고, 방혈 치사시킨 후 등부위 피부를 떼내어 표본을 만든 결과 더욱 선명한 누출을 확인할 수 있었다.

감작항원 elastase대신 생리식염수로 감작시킨 기니픽의 혈청은 색소누출을 보이지 않았다.

고 찰

약물 알레르기는 Coombs and Gell (1968)의 분류에서 볼 때, IgE항체의 관여로 일어나는 I형 알레르기, IgG, IgM 항체의 관여로 일어나는 II형 및 III형 알레르기, 임파구관여의 IV형 알레르기 등이 개별적으로 또는 몇 가지가 복합하여 관여된다고 알려져 있다.

항원성시험을 실시할 경우, 특히 사람에게서 중증의 전신성아나필렉시에 관여한다고 알려진 IgE형 항체 생성과 검출을 주요 지표로 행하는 것이 적절한 방법이며, 따라서 I형 알레르기 검출방법이 많이 이용된다.

본 실험에서는 기니픽의 감작경로서 경구투여와 피하주사가 행해졌다. 경구감작시에는 생리식염수에 용해하여 투여하였으며, 피하감작시에는 Freund's complete adjuvant와의 유화액을 만들어 주사하였다.

경구감작후 항원성 발현유무와 항체검출은 *in vivo*방법으로는 I형 알레르기 검출방법인 능동적전신성아나필렉시반응과 *in vitro*방법인 면역확산법을 이용하였다. 실험결과, 능동적전신성아나필렉시반응의 경우 임상용량인 180단위/kg으로 감작시킨 시험군은 모두 음성을 나타냈고, 임상 10배용량인 1800단위/kg으로 감작시킨 시험군에서 감작 기니픽 6마리중 3마리가 양성을 보였고, 나머지 3마리는 음성을 보였다. 이는 문헌 (1975년)에 언급되어 있는 것과 일치되는 결과이다. 고농도로 경구투여 감작시에 항원성을 보인 것은 엘라스타제가 펩타이드이지만 위장관을 통해 흡수되었음을 말해 준다. 면역확산법에 의한 항체검출 결과, 경구감작군 모두에서 음성반응을 보였다. 이는 Egg albumin으로 감작한 양성대조군은 침강선이 생성되었으나, 경구감작군은 생기지 않았던 예비시험으로부터 예상했던 결과였다.

피하감작한 기니픽은 수신피부아나필렉시반응을 이용하였는데, 이는 수신피부아나필렉시반응이 I형 알레르기 검출법이고 국소반응을 이용한다는 점 때문이었다. 경구감작 기니픽에 대하여 이미 전신반응을 보았으므로, 이번에는 국소반응을 보고자 하였다. 피하감작한 기니픽에서 얻은 항체는 64배 희석한 경우에도 강한 수신피부아나필렉시반응을 보인 점으로 보아, Titer는 훨씬 더 높아지리라 예상된다.

일반적으로 기니픽이 매우 민감한 면역반응을 보인다는 점과 통계학적으로는 유의성이 없었던 점을 고려하여 볼 때, 엘라스타제는 주사에 의한 비경구 투여시에는 항원성이 인정되나, 저농도로서 경구적으로 투여될 때는 분체가 되지 않으리라고 생각된다.

REFERENCES

1. Balo, J. and I. Banga, (1949): Elastase and elastase inhibitor. *Nature* 164: 491-494.
2. Shotton, D.M. and B.S. Hartely, (1970): Amino acid sequence of porcine pancreatic elastase and its homologies with other serine proteinases. *Nature* 225: 802-806.
3. Cooms, R.R.A. and P.G.H., Gell, (1968): Clinical aspect of immunology 575, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
4. 월간약사(일본), (1975) : Vol. 17, No. 9, 65-67
5. 동아제약(주), 항원성시험 SOP : SOP/PTX/801, SOP/PTX/802, SOP/PTX/804, SOP/PTX/807.
6. 국립보건안전연구원 예규 10호.

Antigenicity Test of Porcine Pancreatic Elastase

Soon-Hoe Kim, Nam-Gi Baik, Byoung-Ok Ahn, Sang-Deuk Lee,
Soon-Bok Lee, Won-Bae Kim, Joong-Ik Yang

*Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd.,
47-5 Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-kun, Kyunggi-do, 449-900, Korea*

Porcine pancreatic elastase was examined for its antigenicity on guinea pigs. For three weeks, guinea pigs were sensitized with repeated oral doses of 180 or 1800 unit/kg twice a week, or with subcutaneous doses of 18 or 180 unit/kg once a week.

Antigenicity test was carried out by means of active systemic anaphylaxis (ASA) and immunodiffusion (ID) for orally-sensitized groups and by means of 4 hr passive cutaneous anaphylaxis (PCA) for subcutaneously-sensitized groups. In orally-sensitized groups, all of guinea pigs of therapeutic dose (180 unit/kg) showed negative reaction in ASA and ID. In ten times high dose, there were three guinea pigs showing positive symptoms in ASA, but they were negative in ID. The result of oral challenges was statistically not significant. In subcutaneously-sensitized groups, all of guinea pigs of low and high doses elicited the positive reaction of PCA.

The results suggest that elastase has antigenicity in subcutaneous injection, but it has no antigenicity in case of oral administration in a therapeutic dose.