

마우스와 기니픽에서 PDT-Hepa의 효능시험

강경선, 이영순, 임윤규*

서울대학교 수의과대학, 제주대학교 농과대학*

(1991. 9. 20 접수)

B형 간염바이러스의 표면항원, 파상풍, 디프테리아균의 toxoid, 백일해의 혼합백신인 PDT-Hepa의 효능을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 시험물질은 기니픽에 접종하였을 때 B형 간염 바이러스의 표면 항원과 파상풍 및 디프테리아균의 toxoid에 대한 항체형성이 뚜렷이 관찰되었으며, 항체형성의 정도는 접종용량에 비례하였다. 백일해의 경우는 시험물질을 마우스에 접종시킨 후 마우스에 감수성이 있는 *Bordetella pertussis* 18323주로 직접 공격 접종하여 이 균에 대한 방어력이 형성되어 있음을 관찰하였으며, 이러한 방어정도는 투여용량에 비례함을 알 수 있었다.

서 론

병원성 미생물의 감염을 예방하기 위하여 면역원성은 유지하되 병원성만을 제거한 예방백신이 널리 사용되고 있다. 비임상실험에서의 백신제제에 대한 효능은 공인된 방법에 준하여 실험동물에 접종하여 형성된 방어항체의 검출로 확인될 수 있다.

B형 간염백신과 백일해, 파상풍 및 디프테리아 백신은 각각 B형 간염바이러스의 표면항원과 파상풍 및 디프테리아균의 독소이드 및 백일해균의 면역원성 유효성분을 적당한 adjuvant에 혼합하여 백신제제로 사용하고 있으며 “생물학적 제제시험 기준”(보사부, 1987)에 의하면 B형 간염백신의 경우는 B형 간염바이러스 (Blumberg *et al.*, 1965)의 표면항원에 대한 항체를 (Takahashi *et al.*, 1982), 디프테리아 및 파상풍 백신의 경우는 이들에 대한 항독소를 측정하여 (Barr *et al.*, 1975 ; Nyerges *et al.*, 1983) 이들 미생물에 대한 방어정도를 측정할 수 있으며, 백일해의 경우는 백신을 접종한 마우스에 *Bordetella pertussis* 18323주로 직접 공격 접종하여 그에 대한 생존율로 방어효과를 측정한다.

본 실험은 상기 네가지 병원성 미생물에 대한 각각의 면역원성분을 단일 제제화함으로써, 단일 계획의 예방접종으로 동시에 네가지 질병의 예방을 꾀하고자 만들어진 백신제제에 대한, 실험동물에서의 비임상적인 효능을 확인하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 마우스는 4주령의 ICR 암컷을 polycarbonate cage에 10마리씩 넣어 사육하였으며, 마우스용 실험동물 사료(삼양식품)와 음수를 자유로이 급여하였다. 기니픽은 250 내지 300g의 Hartley 품종의 암컷을 기니픽용 cage에 5마리씩 넣어 사육하였으며, 토끼용 실험동물 사료(푸리나)와 Ascorbic acid(회덕약품)가 0.3% 함유된 음수를 자유로이 급여하였다. 동물실은 자연채광을 유지하였다.

2. 시험물질

(주)녹십자에서 공급받은 PDT-Hepa는 무색 내지 약간 담황색의 백탁한 액상제제로 각 3종의 백신이 Pertussis가 85.6 iu, Diphtheria가 2.8 iu, Tetanus가 2.7 iu 함유되며, Hepatitis vaccine의 역가는 reference의 1.4배가 함유되어 있으며 pH 5.682, 삼투압 257 mOsmol의 제제이다.

3. 시험방법

(1) B형 감염에 대한 효능 확인

시험물질을 0.5%의 수산화 알루미늄 겔이 함유된 생리식염수를 사용하여 $\times 1$, $\times 2$, $\times 4$ 및 $\times 8$ 배 희석한 후 기니픽 10마리씩에 0.5ml씩 복강내에 접종하고 28일 후 심장채혈하여 혈청을 분리한 다음, 혈청내의

Table 1. Experimental Design

Item	Animal	Immunization			
		Dose (sample dilution)	Route*	Period	Observation
HBsAg	guinea pig 10/group	$2^0, 2^1, 2^2, 2^3$	I.P.	4 wks	antibody titers
Pertussis	mice (F) 18/group	$4^1, 4^2, 4^3, 4^4$	I.P.	3 wks	survival rates
Tetanus	guinea pig 10/group	$2^0, 2^1, 2^2, 2^3$	S.C.	6 wks	antibody titers
Diphtheria	guinea pig 10/group	$2^0, 2^1, 2^2, 2^3$	S.C.	6 wks	antibody titers

* I.P. : intraperitoneal inoculation, S.C. : subcutaneous inoculation

B형 간염 바이러스 표면항원에 대한 항체 titer를 측정하였다. 음성대조로는 희석액만을 0.5ml씩 기니 피크의 복강내에 접종하였다.

ELISA는 상품화된 kit (Auszyme® Monoclonal Diagnostic kit) 를 사용하여 실시하였다.

(2) 백일해에 대한 효능확인

시험물질을 0.5% 산화알루미늄 겔이 함유된 생리식염수로 $\times 4$, $\times 16$, $\times 64$ 및 $\times 256$ 배 희석한 후 마우스 20마리씩에 0.5 ml씩 복강내로 접종하고 21일 후에 각 동물마다 약 100~200 LD₅₀ 분량의 *Bordetella pertussis* 18323주로 뇌내접종하였다.

접종 3일째까지 폐사한 마우스의 경우는 접종사로 간주하고 이후 14일간 관찰하여 생존한 마우스의 숫자를 확인하였다.

(3) 파상풍 및 디프테리아에 대한 효능 확인

시험물질을 0.5% 수산화알루미늄 겔이 함유된 생리식염수로 $\times 1$, $\times 2$, $\times 4$ 및 $\times 8$ 배 희석한 후 기니피크 10마리씩에 각각 0.5 ml씩 피하접종한 후 6주째에 심장채취하고 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 다음의 ELISA방법에 의하여 항 파상풍 및 항 디프테리아 titer를 측정하였다.

즉, 정제된 파상풍 및 디프테리아 독소이드를 50 mM carbonate bicarbonate (pH 9.6) 를 사용하여 약 10 µg protein/ml로 희석한 후 ELISA용 microplate (Nunc-Immuno Module, Polysorb U16, Denmark) 에 흡착시키고 Takakura 등 (1988) 의 방법대로 protein A (Pharmacia, Sweden) 를 HRPO (RZ=3.0, Sigma, USA)와 결합시킨 접합체로 사용하여 ELISA를 실시하였다.

결 과

1. B형 간염 바이러스에 대한 효능

각 동물들의 혈청을 WHO international reference preparation (Hepatitis B immunoglobulin, dried date 17-2-1987) 으로 보정한 기니피크의 anti-Hepatitis B 면역 혈청을 대조로 측정하여 평균치를 산출한 결과, 표 2와 같이, 고용량군부터 15.28 ± 6.92 , 7.75 ± 5.18 , 7.13 ± 3.63 및 $2.78 \pm$

Table 2. Efficacy of PDT-Hepa against Hepatitis B Virus

Sample dilution	No. of guinea pig tested	Titer of anti-Hepatitis B antigen (Mean \pm S.D., iu/ml)
X 2 ⁰	10	15.28 \pm 6.92
X 2 ¹	10	7.75 \pm 5.18
X 2 ²	10	7.13 \pm 3.63
X 2 ³	10	2.78 \pm 1.29

1.29 iu/ml로 나타나서, B형 간염 바이러스의 표면항원에 대하여 강한 항체 양전을 보였으며, 반응의 정도는 접종용량에 비례하여 증가하였다.

2. 백일해 균에 대한 효능

각 용량별로 면역시킨 마우스들에 *Bordetella pertussis* 18323주를 약 200 LD₅₀씩 뇌내접종 한후 14일간 관찰하였을 때 생존한 동물은 Table 3과 같이 고용량군부터 각 66.7%, 50.0%, 38.9% 및 16.7%의 생존률을 보였으므로, 시험물질은 백일해 균에 대한 방어항체 형성의 효능이 있음을 보였으며, 효능은 투여용량에 비례함을 알 수 있었다.

Table 3. Efficacy of PDT-Hepa against *Bordetella Pertussis*

Sample dilution	No. of mice tested	No. of mice survived after 14 days	Survival Rate (%)
X 4 ¹	18	12	66.7
X 4 ²	18	9	50.0
X 4 ³	18	7	38.9
X 4 ⁴	18	3	16.7

3. 파상풍 독소에 대한 효능

각 용량별로 면역시켜 채혈한 기니픽의 혈청은 WHO International reference antitoxin (NIBS)으로 보정한 기니픽의 tetanus antitoxin을 같이 사용하여 ELISA를 실시한 결과, 고용량군부터 2.72±0.49, 1.84±0.34, 1.32±0.27 및 0.93±0.22 iu/ml로 나타나서 시험물질은 파상풍 독소에 대한 방어항체의 형성효능이 있음을 보였으며, 방어효능은 접종용량에 비례함을 알 수 있었다.

Table 4. Efficacy of PDT-Hepa against Tetanus Toxin

Sample dilution	No. of guinea pig tested	Mean titer (iu/ml)
X 2 ⁰	10	2.72 ± 0.49
X 2 ¹	10	1.84 ± 0.34
X 2 ²	10	1.32 ± 0.27
X 2 ³	10	0.93 ± 0.22

4. 디프테리아 독소에 대한 효능

각 용량별로 면역시켜 채혈한 기니픽의 혈청은 WHO International reference antitoxin (NIBS)으로 보정한 기니픽의 diphtheria antitoxin을 같이 사용하여 ELISA를 실시한 결과, 고용량군부터 3.25 ± 1.07 , 2.33 ± 0.86 , 1.55 ± 0.42 및 1.21 ± 0.52 iu/ml로 나타나서 시험물질은 디프테리아 독소에 대한 방어항체의 형성효능이 있음을 보였으며, 방어효능은 접종용량에 비례하였다.

Table 5. Efficacy of PDT-Hepa on Diphtheria Toxin

Sample dilution	No. of guinea pig tested	Mean titer (iu/ml)
X 2 ⁰	10	3.25 ± 1.07
X 2 ¹	10	2.33 ± 0.86
X 2 ²	10	1.55 ± 0.42
X 2 ³	10	1.21 ± 0.52

고 찰

B형 간염과 백일해, 과상풍 및 디프테리아의 예방을 위하여 각각의 단일제제로서의 백신이나 몇 가지의 혼합제제는 실용화 되어있다. 본 실험에서는 이러한 백신들의 각각의 접종일정에 따른 예방접종의 불편함을 없애고자 상기 네 가지의 백신을 혼합하여 단일의 제제를 만들어 단일의 접종 일정에 의한 예방접종을 실시하기 위한 시도로서, 임상적인 실험의 실시에 앞서 동물에의 효능 유무를 알아보려고 실시하였다.

상기 각 병원체에 대한 방어효과는 B형 간염백신의 경우 표면항원에 대한 항체가 방어항체로서 인정받고 있으며, 과상풍과 디프테리아백신의 경우는 독소에 대한 항독소가를 측정함이 공인된 실험방법으로 알려져 있다. 본 실험에서는 시험물질을 동물에 접종할 때 B형 간염 바이러스의 표면항원과 과상풍 및 디프테리아균의 toxoid에 대한 항체형성이 뚜렷이 관찰되었으며, 항체형성의 정도는 접종용량에 비례하였다.

백일해의 경우는 시험물질을 마우스에 접종시킨 후 마우스에 감수성이 있는 *Bordetella pertussis* 18323주로 직접 공격접종하여 이 균에 대한 방어력이 형성되어 있음을 관찰하였으며, 이러한 방어정도는 투여용량에 비례함을 알 수 있었다.

Manghi 등 (1990)에 의하면, 마우스를 이용한 실험에서 백일해균에 대한 방어항체는 *per-tussis toxin* (Chambard *et al.*, 1987)에 대한 항체가와 비례한다고 하였다. 본 실험에서는 이에 대한 실험은 실시하지 않았으나 추후 이에 대한 확인 실험을 실시하여 그 결과에 대한 고찰을

하여야 할 것으로 생각되며, 실제로 사람에게 예방접종을 실시한 후 이 병원균에 대한 방어력 형성의 여부를 간단한 시험관적 실험으로 판정할 수 있는 방안을 마련하여야 할 것이다.

REFERENCES

1. Barr, A., B. C. Dow, W. C. Watson, and E. Hunter, (1975): Detection and quantitation of tetanus antitoxin in blood donation. *J. Clin. Path.* 28: 969-971.
2. Blumberg, B. S., H. J. Alter, and S. Visnich, (1965): A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191(7): 541.
3. Chambard, J. C., S. Paris, G. L'Allenmain, and Pouyssegur, (1987): Two growth factor signalling pathways in fibroblasts distinguished by pertussis toxin. *Nature* 326: 800-803.
4. Manghi, M. A., N. I. Dellepiane, P. V. Ericksson, G. D. Paola, and F. H. De Dios, (1990): Antibody response to pertussis toxin and filamentous haemagglutination in NIH mice immunized with the international standard for pertussis vaccine. *Biologicals* 18: 165-172.
5. Nyerges, G., E. Virag, and L. Judit, (1983): The potency testing of diphtheria and tetanus toxoids as determined by the induction of antibody in mice. *J. Biol. Std.* 11: 99-103.
6. Takahashi, T., H. Saito, M. Kurokawa, J. Yasuda, and T. Hashimoto, (1982): Studies on the potency test of HB vaccine by the parallel line assay method in guinea pig. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 35(2): 53-62.
7. Takakura, A., N. Kakiyama, Y. Sakurai, H. Suzuki, N. Kobayashi, and E. Terada, (1988): Detection of Sendai virus antibody in mouse and guinea pig sera by an enzyme-linked immunosorbent assay with protein A. *Exp. Anim.* 37: 279-283.
8. 보건사회부 (1987): 생물학적 제제 기준 및 시험방법, 보사부 고시 제 87-84호.

Efficacy Test of PDT-Hepa in Mice and Guinea Pig

Kyung-Sun Kang, Yong-Soon Lee and Yoon-Kyu Lim*

*Dep. of Vet. Public Health, College of Veterinary Med.,
Seoul National University, Suwon, Korea*

**College of Agriculture, Cheju National University, Cheju, Korea*

Studies on the efficacy of PDT-Hepa were performed in female ICR mice (4 w.o.) and female Hartley guinea pigs (250-300 g). We carried out efficacy tests of PDT-Hepa in animals for preclinical experiment. The surface antigens of hepatitis type B, and the toxoids of tetanus and diphtheria were clearly produced, and the formation of antibodies was proportional to the dose administered. In pertussis, after inoculation of this agent to mice, mice were directly attacked by *Bordetella pertussis* strain 18323 and protective effects of PDT-Hepa against this strain were observed. Formation of antibodies was again proportional to the dose administered.