

기니픽과 토끼에서 PDT-Hepa의 항원성 시험

강경선, 이영순

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

(1991. 9. 20 접수)

기니픽과 New Zealand White Rabbit에서 PDT-Hepa에 대한 항원성 시험을 실시하였다. 1) Active Systemic Anaphylaxis (ASA), 2) Passive Systemic Anaphylaxis (PSA), 3) Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 시험을 실시한 결과 ASA, PSA 실험에서 anaphylaxis와 관련된 어떠한 특이적인 임상증상도 나타나지 않아 PDT-Hepa는 기니픽과 토끼에서 항원성이 없는 것으로 보인다. 또한 PCA 실험에서 청색반점이 관찰되지 않은 것으로 보아 PDT-Hepa specific IgE는 생성되지 않은 것으로 판단된다.

서 론

주식회사 녹십자에서 공급받은 PDT-Hepa (백일해, 디프테리아, 파상풍 및 간염 혼합백신)의 안전성 평가시험 중 특수독성시험의 일환으로 항원성시험 (白須泰彦, 吐山豊秋, 1988)을 실시하였다. 시험법은 국립보건안전연구원 예규 제10호, 의약품 등의 독성시험기준 (국립보건안전연구원, 1988)에 준하여 시험하여 Active Systemic Anaphylaxis (ASA), Passive Systemic Anaphylaxis (PSA), Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 등 아나필락시 쇼크여부를 측정하였다.

본 실험은 단일 접종으로 동시에 네가지 질병의 예방을 피하고자 만들어 낸 백신제제에 대한 면역독성 유무를 기니픽과 토끼에서 밝혀 PDT-Hepa를 실제 임상에 적용할 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 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 1.4 배가 함유되어 있으며 pH 5.682, 삼투압 257 mOsmol의 제제이다.

2. 실험동물

순계 배양된 New Zealand White계 백색 토끼 암수 각각 6 마리 (4 개월령, 체중 2.0-2.5 kg) 와 England Hartley계 백색 기니피그 암수 각각 21 마리 (4 개월령, 체중 500-600g) 를 가축위생연구소 동물실험실 실험 동물 연구소에서 분양받아 1주간 실험실 환경에 순화 시킨 다음 실험에 사용 하였다. 토끼용 스테인레스 케이지 (명진기계 제작) 에 기니피그는 3 마리씩, 토끼는 1 마리씩 넣고 (환경조건; 온도, 23±3 ℃; 상대 습도, 60±10%; 명암주기, 12시간) 음수와 사료 (푸리나사료, 양배추) 를 자유급식시켰다.

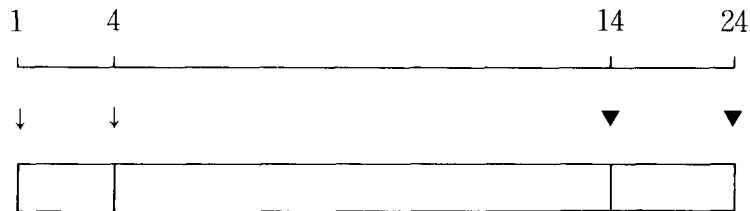
3. 용량결정

PDT-Hepa의 용량은 의약품 독성시험기준 (국립보건안전원 예규 제 10 호, 1988) 에 준하여 임상용 량인 0.5 ml/60 kg/vial으로 사용하였다.

4. 항원성 실험

(1) Active Systemic Anaphylaxis (ASA)

ASA 실험을 위하여 24 마리의 기니피그 (암수 각각 12 마리) 을 무작위로 3 개군으로 나누고 제 1 군은 동결건조시에 사용한 완충용액을, 제 2 군은 양성 대조군으로 소혈청 알부민 (Bovine Serum Albumin, BSA) 을, 제 3 군은 임상용량의 PDT-Hepa를 투여하였다. 제 1일과 4일에 피하주사로 감작투여하고, 제 14 일과 제 24 일에 정맥주사로 유발투여하여 anaphylaxis 유무를 활동성 (restness), 전신떨림 (trembling), rubbing nose, 재채기 (sneezing), 기침 (cough), 배뇨 (urination), 호흡곤란 (respiratory depress), 숨막 힘 (gaspig), 비틀기 (writhing), 경련 (convulsion), 사망 (death) 등으로 관찰하고 종합적으로 shock 정도에 따라 등급을 음성, 경증, 보통, 중증, 사망 등으로 판정하였다.



↓ : S.C. injection
▼ : I.V. injection

Fig. 1. Design of Experiment

(2) Passive Systemic Anaphylaxis (PSA)

a. 항혈청 생산

기니픽 및 토끼를 사용하여 PDT-Hepa에 대한 항체를 생산하였다. 토끼에는 0.5 ml/60 kg의 용량의 PDT-Hepa를 Complete Freund's Adjuvant와 섞어 각각 피하주사한 후 10일 뒤에 이개정맥 (maginal ear vein)에서 채혈하여 혈청을 얻고, guinea pig에서는 ASA실험에서와 동일하게 면역한 뒤 복대정맥에서 채혈하여 혈청을 얻었다.

b. PSA 실험

기니픽 암수 한쌍씩 (500 g 내외) 2 군으로 나누었다. 제 1 군에는 기니픽에서 PDT-Hepa에 의해 형성된 항혈청을, 제 2 군에는 토끼에서 PDT-Hepa에 의해 형성된 항혈청을 0.2 ml씩 각각 정맥주사하였다. 주사후 18 시간이 경과시, PDT-Hepa를 각각 0.5 ml/60 kg씩 정맥주사하고 2 일간에 걸쳐 ASA에서와 동일한 방법으로 anaphylaxis를 관찰 하였다.

(3) Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA)

IgE항체의 생성여부를 관찰하기 위해서 ASA 실험뒤에 각 군별로 1 마리씩 채혈하여 항혈청을 얻고, PSA실험에 사용한 항혈청의 IgE 생성을 조사하였다. 비특이반응을 없애기 위하여 각 항혈청을 생리적 식염수로 1:100으로 희석한 후 주사하였다. 기니픽의 등의 털을 제거하고, 희석된 항혈청을 0.1 ml씩 피하주사하고 3 시간뒤에 PDT-Hepa와 Evan's Blue혼합용액 (10 mg/ml)을 각각 1 ml 씩을 부전골 정맥 (metatarsal vein)으로 주사한 후에 30 분뒤 항혈청 주사부위에 형성되는 청색반점을 관찰하였다.

결과 및 고찰

간염 바이러스의 표면항원 (Blumberg *et al.*, 1965) 과 과산화물 및 디프테리아균의 독소이드 및 백일해균의 면역원성 유효성분을 adjuvant에 혼합한 백신제제인 (주) 녹십자의 PDT-Hepa에 대해 항원성시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. Active Systemic Anaphylaxis (ASA)

각 군의 기니픽을 2 회 감작시키고 14일, 24일 2회에 걸쳐 정맥주사 (metatarsal vein)로 유발투여를 한 결과는 Table 1, 2와 같다.

첫번째 정맥 주사에서는 Table 1에서와 같이 양성대조군인 BSA투여군이 매우 심한 anaphylactic shock를 보였고, 암수 구분없이 group중 반수 정도가 기침과 경련이 있었으며 경련이 있는 후 사망하였다. 음성대조군과 시험물질 투여군에서는 anaphylaxis라 할 수 있는 어떠한 임상에도 관찰되지 않았다.

두번째 정맥주사에서는 첫번째와는 달리 BSA투여군에 거의 정상에 가까운 미약한 반응이 있었고, 음성대조군과 시험물질 투여군에서는 anaphylaxis라 할 수 있는 어떠한 임상에도 관찰되지 않았다.

Table 1. Symptoms of Guinea Pigs after First Injection.

Group	I (Buffer)	II (BSA)	III (PDT-Hepa)
Symptoms			
Restlessness	—	+	—
Trembling	—	+	—
Rubbing Nose	—	+	—
Sneezing & Cough	—	+	—
Urination	—	+	—
Respiratory Depress	—	+	—
Jumping & Rushing	—	+	—
Gasping & Writhing	—	+	—
Convulsion	—	+	—
Death	—	+	—
Evaluation of the intensity	0	III	0

0: negative III: severe

Table 2. Symptoms of Guinea Pigs after Second Injection.

Group	I (Buffer)	II (BSA)	III (PDT-Hepa)
Symptoms			
Restlessness	—	—	—
Trembling	—	—	—
Rubbing Nose	—	+	—
Sneezing & Cough	—	—	—
Urination	—	+/-	—
Respiratory Depress	—	—	—
Jumping & Rushing	—	—	—
Gasping & Writhing	—	—	—
Convulsion	—	—	—
Death	—	—	—
Evaluation of the intensity	0	I	0

0: negative I: mild

2. Passive Systemic Anaphylaxis (PSA)

토끼 및 기니픽에서 분리한 항혈청과 PDT-Hepa를 이용하여 검사한 결과는 Table 3 과 같다.

Table 3. Experimental Results of PSA Test.

Group	Antiserum	Antigen	Results
I	Anti-rabbit serum to PDT-Hepa	PDT-Hepa	normal
II	Anti-G.P. serum to PDT-Hepa	PDT-Hepa	normal

위의 Table 3에서 보는 바와 같이 sensitized antiserum에 대한 anaphylaxis는 없었다.

3. Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA)

ASA 시험중 실제 형성된 IgE량을 측정하기 위해 PCA시험을 실시하였다. 각 항혈청을 희석하여 피내주사하고 항원과 Evan's Blue 혼합용액을 정맥주사한 결과는 Table 4와 같다.

이 실험 결과에서 어떠한 군에서도 색소 침착이 일어나지 않았으므로 PDT-Hepa specific IgE는 형성되지 않은 것으로 보인다.

실험에 사용한 시료는 항체유발을 목적으로 한 제제이므로 효능시험으로 항체가를 측정하게 되어 있다. 따라서 항체가의 측정이 항원성시험의 항목으로는 의미가 없는 것으로 판단되어 실시하지 않았다.

Table 4. Experimental Results of PCA Test.

Sensitization	PCA Reaction	
	Positive/Recipients	Extravasated Dye
Anti-PDT-Hepa from rabbit	0/2	0
Anti-PDT-Hepa from guinea pig	0/2	0

REFERENCES

1. Blumberg, B. S., H. J. Alter, and S. Visnich, (1965): A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191: 541.

2. 白須泰彦, 吐山豊秋 (1988) : 新毒性試験法. *Realize Inc.*, 352-374.
3. 국립보건안전연구원 (1988) : 국립보건안전연구원 예규 제 10 호 (의약품 등의 독성 시험기준), 907-908.

Antigenicity Test of PDT-Hepa in Guinea Pigs and Rabbits

Kyung-Sun Kang, Yong-Soon Lee

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

Antigenicity tests — ASA (Active Systemic Anaphylaxis), PSA (Passive Systemic Anaphylaxis), PCA (Passive Cutaneous Anaphylaxis) — of PDT-Hepa (Pertussis, Diphtheria, Tetanus, and Hepatitis Type B mixed vaccine) were performed using guinea pigs and rabbits as experimental animals. No specific clinical signs related to anaphylaxis were observed, therefore, it was concluded that PDT-Hepa did not have antigenicity in guinea pigs and rabbits. No blue spot was observed on the back of guinea pig in the PCA test indicating that PDT-Hepa-related Ig E was not produced.