

기니픽을 이용한 BR92021(정제 브이아이 장티푸스 백신)의 항원성 평가

정태천* · 김갑호 · 배주현 · 구희경 · 서정은 · 박종일 · 차신우 · 임상민¹ · 정한선¹ · 김상린¹
한국화학연구소 안전성연구센터, ¹보령제약(주) 중앙연구소

Antigenicity Tests of BR92021, a Vi polysaccharide Typhoid Vaccine, in Guinea Pigs

Tae Cheon JEONG*, Kap-Ho KIM, Ju-Hyun BAE, Hee Kyoung GU, Jeong-Eun SUH, Jong-Il PARK, Shin-Woo CHA, Sang-Min LIM¹, Hahn-Sun JUNG¹, Sang-Lin KIM¹

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
100 Jang-Dong, Yusung-Ku, Taejon, Korea, and

¹Central Research Institute, Boryung Pharm. Co. Ltd., Korea

(Received July 19, 1999; accepted August 31, 1999)

Abstract – To study the antigenicity of BR92021(Vi polysaccharide typhoid vaccine), active systemic anaphylaxis and passive cutaneous anaphylaxis were tested in guinea pigs. The groups were as follows: group I(low dose, 30 μ l/kg), group II(high dose, 300 μ l/kg), group III(300 μ l/kg plus complete Freund's adjuvant), group IV(positive control, ovalbumin plus complete Freund's adjuvant) and group V(saline-treated control). Male Hartley guinea pigs at 7 weeks of age were sensitized subcutaneously with the test article or saline three times per week for three weeks(i.e., total 9 times). For groups III and IV, animals were sensitized subcutaneously with either the test article or ovalbumin plus complete Freund's adjuvant once per three week for 6 weeks(i.e., total 3 times). Twelve days after the last sensitization, the blood was collected from the sensitized animals for the passive cutaneous anaphylaxis test. In addition, the sensitized animals were subjected to the active systemic anaphylaxis test on fourteen days after the last sensitization by an intravenous challenge with either the test article or ovalbumin. In group I, mild(1/5) or moderate(4/5) symptoms of anaphylactic shock were observed. In group II, no sign(1/5), moderate(3/5) and severe(1/5) symptoms were observed. In group III, four animals of 5 revealed moderate signs and one of 5 showed no signs of anaphylactic shock. In group IV, all 5 animals showed severe signs of shock. In group V, one of 5 revealed moderate and four of 5 showed no signs. The necropsy findings related to the active systemic anaphylaxis were observed in most animals of groups I to V. In the passive cutaneous anaphylaxis test, the antiserum was diluted 10- to 5120- fold and was injected intradermally on the clipped back of recipient animals, followed by an intravenous challenge with either the test article or ovalbumin. No animals in groups I, II, III and V showed the positive reaction, whereas all animals in group IV, the positive control, showed the positive reaction at the dilution range of \times 1280 to \times 5120. Our results indicate that the test article, BR92021, may have weak antigenic potential in male guinea pigs.

Keyword □ BR92021; Vi polysaccharide typhoid vaccine; antigenicity test; active systemic anaphylaxis; passive cutaneous anaphylaxis; guinea pigs

장티푸스는 아직까지 식수, 음식물 및 하수처리 등이 제대로 통제되지 못하고 있는 나라에서 이환율 및 사망률이 높은 질병으로, 통계에 의하면 매년 3,300 만명 정도가 발생해서 50만명 이상이 사망하고 있는 것으로 조사된 바 있어, 이에 대한 백신의 개발은 집단감염의 방지에 매우 중요하다(Engels 등, 1998; Levine과 Edelman, 1990). 장티푸스의 고전적인 백신은 약독화 생백신이나 사백신으로 야생형으로의 복귀 위험성등 비교적 부작용이 높다고 알려져

있다(Ashcroft 등, 1964; Engels 등, 1998; Hackett, 1990). 따라서 연령층이 다양한 대규모 집단에 면역 가능한 백신의 개발이 장티푸스의 예방에 가장 효과적인 방법으로 고려되어 왔고, 장티푸스에 대한 집단예방접종으로의 진전은 1982년 *Salmonella typhi*의 주요 항원인 협막의 Vi 항원을 이용한 새로운 개념의 백신 개발로 인하여 처음으로 가능하였다(Bennish, 1995; Robbins와 Robbins, 1984).

현재 우리나라에서는 매년 접종되는 주사용 장티푸스 백신의 약 80%가 수입에 의존하고 있어 원료의 국산화가 매

*To whom correspondence should be addressed.

우 시급한 실정인데, 최근 본 연구진에 의하여 주사용 장티푸스 백신의 대량생산이 가능한 연구를 수행하여 발효를 통한 Vi 항원의 대량생산과 신정제공정으로 기존제품보다 발열성 원인물질이 최소화한 안전성이 높은 백신을 제조하는데 성공하였다. 실제로 백신의 독성시험에 대하여 보고된 논문에 의하면 Vi 항원을 이용하여 제조한 백신의 경우 백신접종에 따른 발열과 접종부위의 부종 발생의 빈도가 훨씬 낮은 것으로 알려져 있다(Engels 등, 1998).

본 연구에서는 제조된 백신의 제품화를 위한 필수 단계로써 전인상시험에 관한 자료를 확보하기 위하여 주사용 장티푸스 백신인 BR92021(정제 브이아이 장티푸스 백신)에 대한 항원성시험을 수행하였다. 본 연구에서는 최근 개정 고시된 의약품등의 독성시험기준에 수재된 항원성시험인 기니픽을 이용한 아나필락시스 쇼크 반응시험(active systemic anaphylaxis test, ASA test)과 수동 피부 아나필락시스 반응시험(passive cutaneous anaphylaxis test, PCA test)을 고시의 기준에 준하여 실시하였다(식품의약품안전청, 1998). 그 결과, 주사용 장티푸스 백신인 BR92021(정제 브이아이 장티푸스 백신)은 기니픽에서 항원성이 약한 것으로 판명되었다.

재료 및 방법

시험물질

본 시험에 사용한 BR92021(정제 브이아이 장티푸스 백신; 제조번호, 980001)은 무색투명한 액상제제로써 (주)보령제약의 중앙연구소로부터 25 µg/0.5 ml의 농도로 제공받아 냉장보관하여 사용하였다.

시약류

Ovalbumin(OVA)과 Evans blue는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하여 사용하였고, 매체는 시험의뢰자측에서 제공한 용제를 사용하였으며, Complete Freund's adjuvant(CFA)는 Difco Laboratory에서 구입하여 사용하였다.

실험동물

Hartley계 기니픽은 일반적으로 항원성시험의 시험기초 자료가 풍부하고 과민증상시험에 감수성이 높아 널리 사용

되고 있어 본 연구에서도 이를 선택하여 사용하였다. 5주령의 Hartley계 기니픽 수컷(입수시 체중범위, 213.86~249.21 g(감작용), 211.07~263.49 g(야기용))을 삼육실험동물연구센터에서 구입하여 입수일로부터 2주일간 일반증상을 관찰하여 건강하며, 병원체 검사결과 이상이 없는 동물만을 시험에 사용하였다. 투여개시시의 체중은 279.88~338.51 g(감작용)과 263.20~378.02 g(야기용)이었다. 감작용으로는 30마리를 입수하여 25마리를 사용하였으며, 야기용으로는 60마리를 입수하여 50마리를 사용하였다. 군분리는 체중범위에 따른 무작위법으로 실시하였다. 개체식별은 picric acid에 의한 피모색소표시법 및 개체식별카드 표시법을 이용하였고, 순화, 검역 및 투여기간중에 알루미늄제 사육상자(400W×500L×245H mm)에 5마리사육상자로 사용하였다. 본 시험은 온도 23±3°C, 상대습도 55±15%, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 설정된 환경에서 실시하였다. 시험기간의 사육기간중, 동물실의 온습도는 자동온습도 측정기에 의하여 매시간마다 측정되었으며, 조도는 정기적(3개월에 1회)으로 측정되었다. 환경측정의 결과, 시험의 신뢰성에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다. 사료는 퓨리나 코리아사의 기니픽, 토끼용 고품사료를 자유섭취시켰으며, 물은 상수도를 자외선 유수살균기로 소독하여 vitamin C를 1 g/L로 첨가한 후 자유섭취 시켰다. 사료의 오염물질 분석은 한국화학시험연구원(대전)에서 실시하였고, 물에 대하여는 대전 보건환경 연구원에 의뢰하여 오염물질의 검사를 실시하였으며, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

시험물질의 감작

감작항원액은 시험물질 원액을 매체로 희석하여 사용하였다. CFA와 혼합하는 경우는 BR92021 또는 OVA와 등량의 CFA를 가하고 에멀전화하였다. 아나필락시스 쇼크 반응시험을 위한 야기항원액은 시험물질 원액을 매체로 희석하여 사용하였고, OVA는 주사용 생리식염수에 녹여 사용하였다. 기니픽의 감작은 임상에서 예상되는 경로와 면역 반응을 고려하여 피하투여 경로를 선택하여, 시험물질 투여군과 매체대조군의 경우에는 동물의 경배부 피하에 투여하였으며, CFA와 혼합하여 투여하는 군은 동물의 경배부에 에멀전화한 시험물질을 투여하였다. 각 시험군의 구성

Table I. Experimental design for sensitization

Groups	Sensitizing antigen	Sex	No. of animals	Antigen dose (µl/kg)	Volume (ml/kg)	Route
I	BR92021 (low dose)	Male	5	30	1	s.c.
II	BR92021 (high dose)	Male	5	300	1	s.c.
III	BR92021 + CFA	Male	5	300	1	s.c.
IV	OVA+CFA	Male	5	2.5 mg/kg	1	s.c.
V	Vehicle	Male	5	0	1	s.c.

Male Hartley guinea pigs in groups I, II and V were sensitized three times per week for three weeks (i.e., total 9 times). Animals in groups III and IV were sensitized once per three week for six weeks (i.e., total 3 times).

Table II. Experimental design for challenge in active systemic anaphylaxis test

Groups	Sex	No of Animals	Challenging antigen	Antigen dose ($\mu\text{l}/\text{kg}$)	Volume (ml/kg)	Route
I	Male	5	BR92021	300	1	i.v.
II	Male	5	BR92021	300	1	i.v.
III	Male	5	BR92021	300	1	i.v.
IV	Male	5	OVA	2.0 mg/kg	1	i.v.
V	Male	5	BR92021	300	1	i.v.

Table III. Experimental design for challenge in passive cutaneous anaphylaxis test

Groups	Sex	No of animals	Route for antiserum	Challenging antigen	Antigen dose ($\mu\text{l}/\text{kg}$)	Volume (ml/kg)	Route for antigen
A	Male	10	i.d.	BR92021	300	1	i.v.
B	Male	10	i.d.	BR92021	300	1	i.v.
C	Male	10	i.d.	BR92021	300	1	i.v.
D	Male	10	i.d.	OVA	2.0 mg/kg	1	i.v.
E	Male	10	i.d.	BR92021	300	1	i.v.

은 Table I에 나타내었다. 시험물질 투여군 및 매체대조군의 경우는 주 3회, 3주간 총 9회 감작시켰으며, adjuvant 혼합투여군과 양성대조군은 3주에 1회, 6주간 총 3회 투여하여 감작시켰다. 감작기간중 주 1회 측정된 체중을 기준으로 하여 투여량을 산출하였다. 한편, 시험기간중 매일 1회 일반증상과 사망 및 빈사유무를 관찰하였고, 체중의 변화는 시험기간중 주 1회 체중을 측정하였다.

아나필락시스 쇼크반응의 야기

아나필락시스 쇼크 반응의 야기시 BR92021 및 OVA는 Table II에 나타낸 바와 같이 투여하였다. 투여는 일반적으로 사용되는 경로인 후지정맥을 선택하였고, 최종감작후 14일째에 야기항원액을 투여하고 30분간 전신의 아나필락시스 쇼크 증상을 관찰하였다. 아나필락시스 쇼크 반응의 판정은 1. 불안; 2. 기묘; 3. 진전; 4. 코를 문지르거나 핥음; 5. 재채기; 6. 기침; 7. 과호흡; 8. 배뇨; 9. 배변; 10. 유루; 11. 호흡곤란; 12. 짹짹거리는 소리; 13. 청색증; 14. 보행불안; 15. 도약; 16. 혈떡거리고 몸부림침; 17. 경련; 18. 황화; 19. Cheyne-Stokes 호흡; 20. 사망등의 증상이 나타나는지의 유무를 야기후 30분간 관찰하여, -, 무증상; ±, 약함, 1~4의 증상; 1+, 중등도, 1~10의 증상; 2+, 심함, 1~19의 증상; 3+, 사망 등으로 등급화하였다. 30분간 전신의 증상을 관찰한 후 모든 동물에 대하여 부검을 실시하여 아나필락시스 쇼크와 관련된 기관점막, 폐, 심장, 흉강 및 횡격막 등에 대한 육안적인 관찰을 실시하였다.

수동 피부 아나필락시스 반응의 야기

감작동물에서 최종감작 12일째에 안와정맥총으로부터 부분 채혈하여 수동 피부 아나필락시스 반응시험에 사용하였다. 야기항원액은 메체로 희석한 시험물질 또는 OVA를 1% Evans blue와 등량 혼합하여 사용하였다. 반응의 야기

는 감작한 기니픽으로부터 얻어진 피검혈청을 10배 희석을 시작으로 하여 5120배까지 희석하여 각각 50 μl 씩 기니픽의 배부피내에 투여하고 4시간후 야기항원액을 후지정맥에 투여하였다. 기니픽의 수동 피부 아나필락시스 반응야기시 BR92021 및 OVA는 Table III에 나타낸 바와 같이 투여하였다. 반응용 동물은 혈청시료 1개에 대하여 두 마리를 사용하여 시험에 사용하였다. PCA 반응의 판정은 야기 30분 후에 기니픽의 배부 피부를 각피한 후, 청색반의 유무를 관찰하였는데, 출현한 청색반의 장경+단경의 평균치가 5 mm 이상 되는 것을 양성으로 판정하였다.

통계학적 분석

검사항목중 체중에 관한 분석은 비모수적 방법의 다중비교법으로서 Kruskal-Wallis test를 이용하여 유의수준 $p < 0.05$ (*) 혹은 $p < 0.01$ (**)에서 실시하였다.

시험결과

사망률 및 일반증상 및 체중의 변화

모든 시험군에서 시험물질의 감작기간을 통하여 사망동물이 관찰되지 않았다(Table IV). 또한, 감작기간중 시험물질의 투여와 관련하여 이상증상이 관찰되지 않았다(결과는 보이지 않았음). 그리고 감작기간 중에 체중의 변화를 살펴본 결과, 모든 투여군에서 매체대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 체중의 변화가 관찰되지 않았다(Table V).

아나필락시스 쇼크반응

생존동물을 대상으로 최종감작 14일째에 야기항원액을 기니픽의 후지정맥에 투여하고 30분간 전신의 증상을 관찰한 결과, I군의 경우 5례중 4례에서 중등도(moderate)의 증상을 보였고, 5례중 1례는 약한(mild) 증상이 있었다. II

Table IV. Mortality of male guinea pigs

PERIOD	GROUP : DOSE :	I	II	III	IV	V
		BR92021 (30 µl/kg)	BR92021 (300 µl/kg)	(BR92021) (300 µl/kg)	OVA (2.5 mg/kg)+CFA	Vehicle (1 ml/kg)
0 DAY		0/5 ^{a)}	0/5	0/5	0/5	0/5
1 WEEK		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2 WEEK		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3 WEEK		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 WEEK		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5 WEEK		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 WEEK				0/5	0/5	
7 WEEK				0/5	0/5	
8 WEEK				0/5	0/5	

^{a)}Number of dead animals/Number of dosed animals

Table V. Body weights of male guinea pigs

PERIOD	GROUP:	I	II	III	IV	V
0 DAY	MEAN	321.81	313.40	312.21	309.20	305.20
	S.D.	21.18	17.90	16.61	11.82	20.68
1 WEEK	MEAN	384.34	363.83	374.93	370.44	377.98
	S.D.	23.78	19.03	17.69	16.11	31.69
2 WEEK	MEAN	422.55	402.52	425.95	404.22	406.12
	S.D.	29.66	38.06	30.19	28.30	49.03
3 WEEK	MEAN	464.27	450.53	468.17	468.71	454.02
	S.D.	35.28	53.31	56.55	30.85	46.71
4 WEEK	MEAN	518.66	507.37	510.35	519.50	504.73
	S.D.	34.50	59.91	78.88	34.05	53.30
5 WEEK	MEAN	540.04	528.21	553.81	527.43	494.70
	S.D.	40.00	71.82	87.83	29.75	50.21
6 WEEK	MEAN			587.52	577.16	
	S.D.			93.97	25.97	
7 WEEK	MEAN			612.09	612.02	
	S.D.			93.80	37.17	
8 WEEK	MEAN			652.83	628.03	
	S.D.			91.13	50.38	

군에서는 5례중 1례가 심한(severe) 증상을 보였고, 5례중 3례는 중등도 증상을 보였고, 1례는 증상이 없었다. III군에

서는 5례중 4례가 중등도의 증상을 보였고, 1례는 증상이 없었다. IV군의 경우에는 전례(5례중 5례)에서 심한 증상이 나타났다. V군에서는 5례중 1례에서 중등도의 증상을 보였고, 5례중 4례는 증상이 관찰되지 않았다(Table VI).

부검소견

모든 동물에 대하여 아나필락시스 쇼크 반응시험을 실시한 다음 부검을 한 결과, I군의 소견으로는 5례중 5례에서 기관(trachea)점막의 충혈(congestion), 폐(lung)의 출혈점(petechia) 또는 출혈반(ecchymosis), 그리고 횡격막(diaphragm)의 출혈(hemorrhage)이 관찰되었고, II군의 소견으로는 5례중 4례에서 기관점막의 충혈 또는 폐의 출혈점 또는 출혈반 또는 심장(heart)의 출혈등이 관찰되었다. III군에서는 5례중 3례에서 폐의 출혈점이 관찰되었고, IV군에서는 기관점막의 충혈, 폐의 출혈점 또는 출혈반, 심장의 출혈 또는 횡격막의 출혈 등이 관찰되었다. 한편, V군에서도 5례중 4례에서 기관점막의 충혈, 폐의 출혈점 또는 출혈반 등의 부검소견이 관찰되었다(Table VII).

수동 피부 아나필락시스 반응

I군에서는 수동 피부 아나필락시스 양성반응을 관찰할 수 없었고, II군에서도 양성반응을 관찰할 수 없었으며, III군

Table VI. Active systemic anaphylaxis in male guinea pigs

Group	Sensitizing antigen	Challenging antigen	No. of animals	Severity of anaphylaxis ^{a)}				
				[-]	[±]	[1+]	[2+]	[3+]
I	BR92021 (30 µl/kg)	BR92021 (300 µl/kg)	5		1	4		
II	BR92021 (300 µl/kg)	BR92021 (300 µl/kg)	5	1		3	1	
III	BR92021 (300 µl/kg)+CFA	BR92021 (300 µl/kg)	5	1		4		
IV	OVA (2.5 mg/kg) + CFA	OVA (2.0 mg/kg)	5				5	
V	Vehicle (1 ml/kg)	BR92021 (300 µl/kg)	5	4		1		

^{a)} Severity of anaphylaxis was expressed as follows;

1. restlessness, 2. piloerection, 3. tremor, 4. rubbing or licking nose, 5. sneezing, 6. coughing, 7. hyperpnea, 8. urination, 9. evacuation, 10. lacrimation, 11. dyspnea, 12. rhonchus, 13. cyanosis, 14. staggering gait, 15. jumping, 16. gasping and writhing, 17. convulsion, 18. side position, 19. Cheyne-Stokcs respiration, 20. death

[-]: asymptomatic, [±]: mild (symptoms of 1 to 4), [1+]: moderate (symptoms of 1 to 10), [2+]: severe (symptoms of 1 to 19), [3+]: death

Table VII. Necropsy findings of active systemic anaphylaxis test animals

Group	Sensitization		Animal No.	Challenging		Organ				
	Antigen	Route		Antigen	Route	Trachea	Lung	Heart	Thorax	Diaphragm
I	BR92021 (30 µl/kg)	s.c.	1	BR92021 (300 µl/kg)	i.v.	-	c	-	-	-
			2			a	e	-	-	h
			3			-	p	-	-	-
			4			a	p	-	-	h
			5			-	p	-	-	-
II	BR92021 (300 µl/kg)	s.c.	6	BR92021 (300 µl/kg)	i.v.	-	e	h	-	-
			7			-	p	-	-	-
			8			a	c	-	-	-
			9			-	-	-	-	-
			10			a	e	-	-	-
III	BR92021 (300 µl/kg)+CFA	s.c.	11	BR92021 (300 µl/kg)	i.v.	-	-	-	-	-
			12			-	p	-	-	-
			13			-	-	-	-	-
			14			-	p	-	-	-
			15			-	p	-	-	-
IV	OVA+CFA (2.5 mg/kg)	s.c.	16	OVA (2.0 mg/kg)	i.v.	a	e	h	-	-
			17			a	e	h	-	h
			18			a	p	h	-	h
			19			a	e	h	-	-
			20			-	p	-	-	h
V	Vehicle (1 ml/kg)	s.c.	21	BR92021 (300 µl/kg)	i.v.	-	e	-	-	-
			22			-	-	-	-	-
			23			a	e	-	-	-
			24			-	e	-	-	-
			25			-	p	-	-	-

a, congestion. c, hydropericardium. e, ecchymosis. h, hemorrhage. p, petechia

Table VIII. Four-hour homologous passive cutaneous anaphylaxis test in male guinea pigs with sera from sensitized male guinea pigs

Group	Sensitizing antigen	Challenging antigen ^{a)}	PCA titer ^{b)}	Positive ratio
I	BR92021 (30 µl/kg)	BR92021 (300 µl/kg)	-. ^{c)}	0/10
II	BR92021 (300 µl/kg)	BR92021 (300 µl/kg)	--	0/10
III	BR92021 (300 µl/kg)+CFA	BR92021 (300 µl/kg)	--	0/10
IV	OVA (2.5 mg/kg)+CFA	OVA (2.0 mg/kg)	x1280 ~ x5120	10/10
V	Vehicle (1 ml/kg)	BR92021 (300 µl/kg)	--	0/10

^{a)}Challenging antigen was intravenously injected 4 hours after sensitization of guinea pigs with sera.

^{b)}PCA titer represents the maximum dilution factor of original serum which gives positive reaction.

^{c)}Specific antibodies were not detected in 10-fold dilution of original sera.

에서도 양성을 보이지 않았다. 한편 양성대조군인 IV군에서는 10례 모두가 1280~5120배 희석까지 양성반응을 보였고, 매체대조군인 V군에서는 양성반응이 관찰되지 않았다(Table VIII).

고찰

아직도 전세계 많은 지역에서 심각한 전염병중의 하나인 장티푸스로 인류의 건강이 위협받고 있는 실정인데, 일단 감염되면, 40°C 이상의 고열과 복통을 일으키다가 치료가 늦으면 장출혈이나 장천공을 일으켜 중태에 빠지거나 사망에 이르게 된다. 장티푸스는 매년 여름철에서 초가을에 걸쳐 오염된 음식이나 식수 등의 섭취를 통해 감염되는데, 집단 발병하는 특성이 있어서 사회보건측면에서 가장 큰 문제로 대두되었다. 또한 생활의 수준이 향상됨에 따라 일 반대종 및 공중보건 관련당국자들도 치료보다는 예방에 대한 고려가 높아지고 있다. 식수나 음식물의 관리가 미흡한 등남아 국가 뿐만아니라 이러한 지역으로의 국내 여행자수가 급증함에 따라 장티푸스의 철저한 예방은 더욱 요구되

고 있다. 따라서 면역성이 최대이면서 부작용은 최소한으로 나타나는 장티푸스 백신을 개발하는 것은 인류의 큰 과제중의 하나이다.

장티푸스에 대한 개발된 백신의 종류를 살펴보면 초기에는 사백신이 주로 사용되어 왔고, *Salmonella typhi*의 strain Ty21a를 이용한 경구 생백신이 실제로 임상시험에서 어린이 10,000명당 장티푸스 발생율이 대조군에 비하여 훨씬 빈도가 낮게 나타나 효과적이며 안전한 것으로 보고되어 있으며(Wahdan 등, 1982), 특히 장용 코팅된 캡슐형과 액상 백신의 비교연구에서는 액상 백신이 더 효과적임이 보고된 바 있다(Levine 등, 1990; Simanjuntak 등, 1991). 최근에는 *Salmonella typhi*의 헵막을 구성하는 다당류인 Vi 항원을 정제하여 제조한 새로운 형태의 백신이 개발되었다. 정제 Vi 항원에 대한 백신과 기존의 사백신과의 비교연구가 637명의 건강한 남성들에게서 비교연구된 문헌에 의하면, 접종부위의 국소적인 반응이 기존의 백신에 비하여 Vi 항원에 대한 백신을 접종할 때 발생율이 현저히 줄어들며, 전신적인 반응을 호소하는 사람의 수도 절반 정도로 낮아, 훨씬 안전한 백신으로 판단되고 있다(Acharya 등, 1987; Cumberland 등, 1992; Klugman 등, 1996). 최근 본 연구진은 주사용 장티푸스 백신의 대량생산이 가능한 연구를 수행하여 발효를 통한 Vi 항원의 대량생산과 신정제 공정으로 기존제품보다 발효성 원인물질을 최소화한 안전성이 높은 백신을 제조하는데 성공하였고, 제품화에 필요한 전임상시험 및 임상시험이 신속히 진행되어 국내에서 자체생산을 할 수 있게 되었다.

본 연구에서는 이러한 정제 브이아이 장티푸스 백신의 전임상 시험의 일환으로 고분자 물질의 문제점중의 하나인 원치않는 항원성으로 갖는지의 여부를 판단하기 위하여 식품의약품안전청 고시 의약품등의 독성시험기준에 수제된 항원성시험으로 수행하였다. 개정 고시에는 항원성의 판단을 위하여 기니피를 이용한 아나필락시스 쇼크 반응시험과 수동 피부 아나필락시스 반응시험이 수제되어 있는 관계로 이 두 시험을 실시하였다.

아나필락시스 쇼크반응은 감각이 성립된 동물에 항원을 투여하여 항원-항체 반응을 전신성반응으로 관찰하는 것인데, 일반적으로 취급이 용이하고 감수성이 높으며 반응이 신속하게 일어날 뿐만아니라 쇼크장기와 병태생리학적인 기작이 명확한 것으로 알려진 기니피를 사용하고 있다(Ovary, 1958). 이에 따라 본 시험에서는 Hartley계 기니피를 이용하여 BR92021(정제 브이아이 장티푸스 백신)의 아나필락시스 쇼크반응을 시험한 결과, I군에서는 일부의 동물에서 중등도의 증상이 관찰되었고, II군에서는 중등도의 증상과 심한 증상이 관찰되었으며, III군에서는 중등도의 증상이 일부 동물에서 나타났다. 양성대조군(IV군, OVA+CFA)에서는 모든 동물이 심한 쇼크증상을 나타내었고, V군에서는

중등도의 증상이 일부 동물에서 관찰되었다. 30분간 아나필락시스 쇼크에 대한 전신의 증상을 관찰한 후 모든 동물에 대하여 부검을 실시한 결과, 양성대조군을 비롯한 시험물질 투여군에서 아나필락시스 쇼크에 기인하여 기관점막의 충혈, 심장출혈, 폐의 출혈반 또는 출혈점, 횡격막의 출혈 등이 관찰되었다. 한편, 매체를 투여한 매체대조군에서도 일부의 동물에서 부검소견이 관찰되었다.

수동 피부 아나필락시스 반응은 동물의 피내에 항혈청을 투여하여 국소피내의 호염기구와 비만세포를 수동적으로 감각시키고 일정시간 후에 항원과 색소를 정맥주사하여 항원-항체반응의 결과를 유도해 내는 것으로서, 세포로부터의 화학적 매개인자의 유리에 의한 국소모세혈관의 투과성 항진으로 나타나는 누출색소의 정도를 측정하는 것이다(Ovary, 1952; Ovary와 Karush, 1959). 즉, 항원에 특이적인 항체중에서 IgE 항체는 호염기구나 비만세포의 수용체인 FcεR와 결합하여 화학적 매개인자들인 histamine 및 serotonin 등을 유리시키도록 유도하며, 이들은 혈관의 투과성을 항진시키고 평활근의 수축과 점액분비의 항진을 유도하는 작용을 갖기 때문에 제1형 과민반응을 일으키게 되는 것이다(Ishizaka 등, 1966; Ishizaka와 Ishzaka, 1967).

수동 피부 아나필락시스 반응시험의 결과, BR92021(정제 브이아이 장티푸스 백신)을 감각한 I, II 및 III군에서 양성반응을 전혀 관찰할 수 없었으며, 양성대조군인 IV군에서는 모든 동물이 양성반응을 나타냈다. 한편, 매체를 투여한 V군에서는 항체가 전혀 검출되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 시험물질인 BR92021(정제 브이아이 장티푸스 백신)은 기니피에 수신감작시켜 아나필락시스 쇼크반응을 관찰한 시험에 있어서 항원성이 약한 것으로 판단되었으며, BR92021(정제 브이아이 장티푸스 백신)은 기니피-기니피계를 이용한 수동 피부 아나필락시스 반응시험에 있어서 항원성이 없는 것으로 판단되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1998년도 보건복지부에서 지원한 제품화과제인 주사용 장티푸스 백신의 개발의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Acharya, I. L., Lowe, C. U., Thapa, R., Gurubacharya, V. L., Shrestha, M. B., Cadoz, M., Shultz, D., Armand, J., Bryla, D. A. and Trollfors, B. (1987). Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Samonella typhi*. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **317**(18), 1101-1104.
- Ashcroft, M. T., Ritchie, J. M. and Nicholson, C. C. (1964). Controlled field trial in British Guiana school children of heat-killed phenolized and acetone-killed lyophilized

- vaccines. *Am. J. Hyg.* **79**, 196-206.
- Bennish, M. L. (1995). Immunization against *Salmonella typhi*. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **4**, 114-122.
- Cumberland, N. S., St. Clair Roberts, J., Arnold, W. S., Patel, R. K. and Bowker, C. H. (1992). Typhoid Vi: a less reactogenic vaccine. *J. Int. Med. Res.* **20**(3), 247-253.
- Engels, E. A., Falagas, M. E., Lau, J. and Bennish, M. L. (1998). Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity. *B.M.J.* **316**, 110-116.
- Hackett, J. (1990). Salmonella-based vaccines. *Vaccine* **8**(1), 5-11.
- Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M. M. (1966). Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* **97**, 75-85.
- Ishizaka, K. and Ishizaka, T. (1967). Identification of E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* **99**, 1187-1198.
- Klugman, K. P., Koornhof, H. J., Robbins, J. B. and Le Cam, N. N. (1996). Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. *Vaccine* **14**(5), 435-438.
- Levine, M. M. and Edelman, R. (1990). Future vaccines against enteric pathogens. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **4**(1), 105-121.
- Levine, M. M., Ferreccio, C., Cryz, S. and Ortiz, E. (1990). Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in randomised controlled field trial. *Lancet* **336**, 891-894.
- Ovary, Z. (1952). Quantitative studies in passive cutaneous anaphylaxis of the guinea pigs. *Int. Arch. Allergy* **3**, 162-174.
- Ovary, Z. (1958). Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. *Progr. Allergy* **5**, 459-508.
- Ovary, Z. and Karush, F. (1959). Studies on the immunologic mechanism of anaphylaxis. I. Antibody-hapten interactions studied by passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig. *J. Immunol.* **84**, 409-415.
- Robbins, J. D. and Robbins, J. B. (1984). Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.* **150**(3), 436-449.
- Simanjuntak, C. H., Paleologo, F. P., Punjabi, N. H., Darmowigoto, R., Soeprawoto, Totosudirjo, H., Haryanto, P., Suprijanto, E., Witham, N. D. and Hoffman, S. L. (1991). Oral immunisation against typhoid fever in Indonesia with Ty21a vaccine. *Lancet* **338**, 1055-1059.
- Wahdan, M. H., Serie, C., Cerisier, Y., Sallam, S. and Germanier, R. (1982). A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: three-year results. *J. Infect. Dis.* **145**(3), 292-295.
- 식품의약품안전청 (1998) 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 1998-116호, 1998년 12월 8일.