

## 알긴산 장용 비드에 봉입한 새로운 장 표적성 경구용 장티푸스 Ty21a 백신의 개발

장윤정 · 정성균\* · 박동우\* · 김희준\* · 김기호 · 김홍진#

중앙대학교 약학대학, \*일양약품(주) 중앙연구소

(Received August 3, 2001; Revised September 7, 2001)

## Development of a New Gut-targeted Oral Typhoid Vaccine Ty21a Encapsulated within Alginate Enteric Beads

Yoon-Jung Jang, Sung-Kyun Chung\*, Dong-Woo Park\*, Hee-Jun Kim\*,  
Ki-Ho Kim and Hong-Jin Kim#

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, 156-756, Korea

\*Central Research Institute, Il-Yang Pharm. Co. Ltd. Yongin, Kyunggi, 449-900, Korea

**Abstract** — To increase the viability of oral typhoid vaccine during the passage through the gastro-intestinal tract, numerous attempts have been made including the vaccine coating. However, problems such as high death rate during the coating process and its instability in the gastric juice still remain to be solved. In this study, the oral vaccine was made as the micro-enteric beads by adding *Salmonella typhi* Ty21a cells to sodium alginate solution and spraying onto calcium chloride solution (ionotropic gelation method). The vaccine showed more than 90% of its original viability after treating it for 1 hour in the artificial gastric juice (37°C, 300 rpm). The clearance rate of the Ty21a in the liver and spleen of the mice orally administered with coated Ty21a was similar to that of the mice intraperitoneally administered with uncoated Ty21a. The peripheral blood lymphocytes (PBL) isolated from the mice orally administered with this vaccine produced 15.5 fold higher specific IgA antibody titer than that from the control mice administered with saline solution. Furthermore, the mice treated with the coated Ty21a had higher survival rates (50~87%) than the control mice treated with saline solution (0~10%) in the intraperitoneal challenge test with wild type *S. typhi* Ty21a cells. These results suggest that the alginate-based coating technique is effective to protect live Ty21a from acidic environments, and produces better intestinal immune responses thereby providing a potentially excellent oral typhoid vaccine.

**Keywords** □ *Salmonella typhi* Ty21a, micro-enteric alginate beads, IgA, PBL, protective immunity

장내세균감염의 일종인 장티푸스는 주요한 법정 전염병으로서 전세계적으로 매년 약 33,000,000건 정도가 발생하고 있다.<sup>1)</sup> 특히 후진국의 초등학교 어린이와<sup>2,3)</sup> 그러한 국가로 여행하는 여행자에게 있어<sup>4)</sup> 발병 위험성이 크다.

따라서 지난 수십 년간 이에 대한 백신이 개발되어

왔는데, 크게 비경구용 사균백신과 Vi 항원 백신 및 경구용 생균백신으로 분류된다. 사균백신은 *S. typhi*를 화학 처리로 불활성화하여 사균 전체를 주사제로 투여하는 것이나, 그 효과가 약 70% 이하로 미약할 뿐만 아니라<sup>5)</sup> 균체에 존재하는 lipopolysaccharide(LPS)로 인해 나타나는 국소적 또는 전신적 부작용이 심하므로<sup>6,7)</sup> 현재 이 백신은 거의 사용되지 않고 있다. 한편 Vi 항원 백신은 *S. typhi*의 중요한 virulence factor 중의 하나인 Vi capsular polysaccharide 항원만을 정제한 백신으로, 사균백신에서 나타나는 부작용을 대부

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5613 (팩스) 02-816-7338  
E-mail: hongjink@cau.ac.kr

분 극복하였으며 주사제로 적용하여 혈중에서 항 Vi 항체의 생성을 촉진하여 그 효력을 발휘하는 것으로 알려졌다.<sup>8,9)</sup> 그러나, 주사로 적용해야 하는 어려움은 여전히 남아 있으며, 국소적 동통과 발열, 두통 등의 부작용<sup>8,9)</sup> 때문에 새로운 제형의 백신 개발이 필요하게 되었다. 특히, 장티푸스균은 환자의 대소변에 오염된 물 또는 음식물을 통해 경구로 소화기계에 전염되어 발병하기 때문에 사균백신 또는 Vi 항원백신을 주사하여 혈중에서 항체가 생성되도록 하는 것보다는 생균백신을 경구로 투여함으로써 소장 점막의 림프 조직인 Peyer's patch에 항체가 집중되도록 하는 것이 백신의 효과가 월등히 우수하다.<sup>10)</sup> 이처럼 장을 통해 질병을 일으키는 병원 미생물에 대한 경구 백신의 장점은 국소적 면역반응을 발생시킴으로써 감염 경로 중 가장 초기 단계를 저해한다는 데 있다. 소아마비, 콜레라, 장티푸스, 그리고 가장 최근에는 rotavirus에 대한 백신이 이러한 백신의 좋은 예이다.<sup>11-14)</sup>

경구용 장티푸스 생균백신으로 사용되는 *Salmonella typhi*의 Gal-E mutant인 Ty21a는 Vi-antigen을 생성하지 않으며 uridine-diphosphatase(UDP)-galactose-4-epimerase라는 효소가 결핍된 것이 특징이다. 이 효소가 결핍됨으로 인해 O-antigen side chain이 없는 불완전한 LPS가 형성되지만 외부로부터 galactose가 공급되면(이것은 *in vivo*에서 일어날 수 있다) galactose-1-phosphate를 통해 UDP-galactose가 합성되어 정상적인 smooth type의 LPS가 형성되므로 우수한 면역 효과를 나타낸다. Ty21a는 면역 후에 UDP-galactose와 galactose-1-phosphate가 축적되어 용균을 일으킴으로써 약독화된다.<sup>15)</sup> 생쥐에 있어 Ty21a는 saline이나 gastric mucin에 현탁한 형태로 복강주사하였을 때 LD<sub>50</sub>가 10<sup>8</sup>을 넘고 1000배 높은 용량을 투여하였을 때도 liver나 spleen에서 virulent parent strain(Ty2)보다 훨씬 빨리 소실된다는 과거의 실험을 통해 그 무독성이 증명되었고<sup>15)</sup> 사람에게 있어서도 이 백신의 안전성은 검증되었다.<sup>16)</sup>

이러한 Ty21a 경구 백신 개발에 있어 가장 큰 난점은, Ty21a가 위장관을 통과하는 동안 위산에 의해 사멸하거나 약화되어 장내 도달 생존율이 낮아 백신의 효과를 거의 나타내지 못한다는 것이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 두 가지의 제형이 개발되어 지금까지 사용되어 오고 있다. 하나는 위산을 중화하는 완충제(중탄산나트륨 등)를 먼저 복용한 후 동결건조된

Ty21a 생균을 복용하는 방법(liquid formulation)이고, 다른 하나는 동결건조된 Ty21a 생균을 장용코팅 캡셀에 충전한 형태로 복용하는 방법(enteric-coated formulation)이다.<sup>17)</sup> 그러나 위산의 중탄산나트륨에 의한 중화법은 복용 방법이 불편할 뿐 아니라 복용자나 복용 시점에 따라 위산의 중화 정도나 중화 시간이 생균백신에 영향을 주지 않을 정도로 일정한 효과를 나타내지 못한다는 단점이 있다. 또한 장용코팅 캡셀화 방법은 캡셀을 장용성 고분자물질로 코팅하는 동안 높은 온도에 장시간 노출됨에 따라 생균이 대량 사멸될 수 있으며, 열풍에 의해 캡셀 자체가 함유하고 있는 약 12%의 수분이 건조되어 보존시 안정성이 감소되어 캡셀이 파괴되거나 복용시 위내에서 위연동에 의해서도 캡셀이 파괴될 수 있다. 또한 코팅 공정에서 캡셀 상, 하부의 결합 부위에 미세공이 발생하면 캡셀이 위장을 통과할 때 이 미세공으로 위산이 침투됨으로써 생균백신의 장내 도달율이 낮아진다는 단점이 있다.

본 연구에서는 실온에서 짧은 시간 내에 완료하는 새로운 장용코팅 기법을 활용함으로써 장용코팅 제조 공정 중 Ty21a가 거의 사멸되지 않고 균을 직접 장용코팅하는 새로운 제조 방법을 확립하였다. 선행 연구에서는 Ty21a의 동결건조 후의 생존율을 높이기 위한 방법을 발표하였다.<sup>18)</sup> 즉, 동결건조 전후의 살아 있는 *S. typhi* Ty21a 세균수의 비(동결건조율)를 측정하여 동결건조를 위해 세균을 수확할 때의 optical density (OD)가 2.5에서 3.0사이일 때 가장 높은 동결건조율을 얻을 수 있음을 밝혔으며, Ty21a를 배양한 후 원심분리하여 얻은 균체를 1차 안정화제로서 8% sucrose 용액에 현탁시키고 mannitol 또는 latose를 부형제로 사용하여 저온 보관시 Ty21a의 안정성이 가장 높음을 밝힌 바 있다. 본 연구에서는 선행 연구에서 밝혀낸 방식으로 동결건조된 *S. typhi* Ty21a를 세 가지 다른 안정화제(첨가제)와 함께 sodium alginate 용액에 가한 후 이를 CaCl<sub>2</sub> 용액에 살포하는 방법으로 미세장용 파립을 제조하고, 인공위액(pH 1.2) 및 인공장액(pH 6.8)에 처리한 후의 집락 생성수(Colony Forming Unit: CFU)를 측정하여 각 첨가제에 따른 제조공정 후의 생존율을 측정하였다. 또한 이러한 미세장용 파립이 실제로 장내에서 흡수되어 생존하면서 면역반응을 일으킬 수 있는지 검증하기 위해, 제조된 미세장용 파립을 생쥐에 투여한 후 생쥐의 간과 비장에서의 Ty21a의 청소율을 측정하였으며 말초 혈액중 림프구에

의한 *in vitro*에서의 특이항체 형성능을 검사하였다. 그리고 야생형 *S. typhi* Ty2에 의한 공격시험에서 생쥐의 생존율을 검사함으로써 최종적으로 백신으로서의 효과를 검증하고자 하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 사용균주 및 실험동물

균주로는 *S. typhi* Ty21a(ATCC33459) 및 *S. typhi* Ty2(ATCC700931)를 Brain Heart Infusion(BHI) 배지(Difco, USA)에 배양하였다.

실험동물로는 5주 또는 9주령의 암컷 BALB/c 생쥐를 대한바이오링크(충북 음성)로부터 구입하여 표준화된 조명 및 온도 조건 하에서 적어도 일주일 간 먹이와 물을 자유롭게 공급하여 사육한 후 사용하였다.

#### *S. typhi* Ty21a의 배양 및 미세 장용 과립의 제조

*S. typhi* Ty21a 미세 장용 과립을 제조하기 위해 먼저 균체를 배양하여 수확하고 동결건조하였는데, 그 방법은 전에 기술한 방법<sup>18)</sup>을 약간 변경하여 사용하였다. 다시 간단하게 기술하면, *S. typhi* Ty21a의 단일 집락을 BHI 배지 100 ml에 접종하고 37°C에서 18시간 진탕 배양한 후 본 배양액 양의 2% 정도를 다시 접종하고 본 배양을 실시하여 610 nm에서 OD값이 2.5~3.0일 때 배양을 정지하였다. 배양액을 6,000 g로 10분간 원심 분리하여 균체를 모으고 8% sucrose 용액에 현탁하여 동결건조하였다. 동결건조된 균체의 중량에 따른 CFU를 측정하였다. 동결건조된 균체를 여러 가지 다른 첨가제(제1형 : 6%(w/w) mannitol+3.4%(w/v) trehalose, 제2형 : 5%(w/w) Poloxamer 407, 제3형 : 10%(w/v) glycerin)와 함께, 안정화제로서 sucrose와 mannitol을 각각 17%(w/v) 및 91%(w/v)가 되도록 첨가한 1.2%(w/v) sodium alginate의 phosphate buffered saline(PBS) 용액에 재현탁한 후 이 현탁액과 동일한 부피의, sucrose와 mannitol을 각각 17%(w/v) 및 91%(w/v) 함유하는 4.4%(w/v) CaCl<sub>2</sub> 용액(pH 7.0)에 살포하여 Ca-alginate microcapsule을 형성하였다(ionotropic gelation). 이것을 20호체를 통과시키고 3배량의 멸균정제수로 세척한 후 Whatman 5B 여과지로 여과하여 여과지 위에 남은 미세 장용 과립을 PBS에 재분산하였다.

#### 미세 장용 과립 제조 공정 후 *S. typhi* Ty21a의 생존율 시험

미세 장용 코팅 공정을 거친 후 살아남은 Ty21a의 수를 검사하기 위해, 제조된 미세 장용 과립 일정량을 취하여 인공 장액에 처리하고, 인공 장액 중에 유리되어 나온 Ty21a 액 일정량을 BHI 고체 배지에 도말하여 CFU를 측정한 후 이것을 제조된 미세 장용 과립의 g당 세균수(AG)로 표시하였다. 또한, 제조된 알긴산 코팅이 백신을 경구투여하였을 때 거치게 되는 위액에 대해 Ty21a를 보호하여 장까지 생존 상태로 도달시킬 수 있는지를 검사하기 위해 제조된 미세 장용 과립 일정량을 취하여 인공 위액에 처리하고 이어서 인공 장액에 처리한 후, 인공 장액 중에 유리되어 나온 Ty21a 액 일정량을 BHI 고체 배지에 도말하여 CFU를 측정한 후 이것을 제조된 미세 장용 과립의 g당 세균수(AG+AD)로 표시하였다. 인공 위액(pH 1.2, 2.0 g NaCl, 7.0 ml HCl in 1 L 증류수) 처리는 37°C, 300 rpm에서 1시간, 인공 장액(pH 6.8, 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.0236 M NaOH) 처리는 37°C, 300 rpm에서 30분간 시행하였다.

(AD)에 대한(AG+AD)의 %비로서 위액에 대한 저항성(gastro-resistance, %)을 계산하였으며, 또한 동결건조 직후의 세균수에 대한(AG+AD)의 %비로서 제조 공정중 생존율(%)을 측정하였다.

제조 공정 후 *S. typhi* Ty21a의 생존율이 가장 높게 나타난 micro-bead의 첨가제를 선택하여 뒤에 이어지는 실험에 쓰일 micro-bead의 제조에 사용하였다. 또한 이와 같이 제조한 micro-bead 중에 존재하는 *S. typhi* Ty21a의 세균수는 본 란에 기재한 것과 동일한 방법을 사용하여 측정하였다. CFU를 측정한 후 생쥐에 투여할 용량에 알맞도록 미세 장용 과립을 희석하는 데는 PBS를 사용하였다.

#### 생쥐의 간과 비장에서 *S. typhi* Ty21a의 생존율 시험

미세 장용 과립 형태로 제조된 Ty21a 백신이 장까지 도달한 후 흡수되어 생존할 수 있는지를 시험하기 위해 생쥐에 Ty21a 백신을 경구투여한 후 생쥐의 간과 비장 중에 잔존하는 Ty21a의 세균수를 검사하였다. 5주령 암컷 BALB/c 생쥐를 5마리씩 3개군으로 나누고 2×10<sup>7</sup> CFU의 생 *S. typhi* Ty21a를 각 군마다 복강주사(투여용량 0.5 ml) 하였을 때(Ti)와 경구투여

(투여용량 0.2 ml) 하였을 때(To), 그리고  $2 \times 10^7$  CFU의 코팅된 *S. typhi* Ty21a를 경구투여(투여용량 0.2 ml) 하였을 때(Vo), 각각 투여 후 24시간 간격으로 각 군에서 한 마리씩의 간과 비장을 적출하여 Ty21a의 잔존수를 검사하였다. 적출한 간과 비장을 PBS에 세척하고 잘게 썰어 5 ml의 PBS에 현탁한 다음, glass bead가 든 멸균된 flask에 옮겨 37°C, 140 rpm에서 30분간 진탕하여 균질화하였다.

이렇게 만든 균질화물을 각각 100  $\mu$ l씩 취하여 BHI 고체배지 표면에 도말하여 37°C에서 18시간 배양한 후 집락 생성 여부로 그 수를 확인하였다.

#### 말초 혈액 림프구(Circulating peripheral blood lymphocyte, PBL)에 의한 IgA 반응시험

경구투여한 Ty21a 미세 장용 코팅 백신에 대한 항체 생성율을 측정하기 위해, 백신을 투여받은 생쥐의 혈액 중에 존재하는 림프구(Circulating peripheral blood lymphocyte, PBL)를 분리하여 *in vitro*에서의 *S. typhi* LPS 특이 항체(IgA) 생성율을 ELISA 방법에 의해 검사하였다(Forrest의 방법<sup>19</sup>)을 약간 변형하여 사용). 9주령 암컷 BALB/c 생쥐를  $1 \times 10^7$  CFU의 코팅된 *S. typhi* Ty21a로 3회 48시간 간격으로 경구 투여하여 면역시켰다. 대조군에는 같은 용량의 PBS를 투여하였다. 마지막 경구 투여 후 10일째 되는 날에 생쥐에 ketamine hydrochloride(Ketalar(r) 염산 케타민 50 mg/ml, 유한양행) 0.1 ml을 복강주사하고 ether를 흡입시켜 마취한 후 생쥐의 간정맥으로부터 0.7 ml의 혈액을 채취하였다. 헤파린(녹십자) 처리한 혈액 샘플을 Ficoll-Paque(r)(Amersham Pharmacia Biotech, Korea) 위에 조심스럽게 가하고 원심분리하여 얻은 lymphocyte를 10%의 FBS를 함유하는 RPMI1640 배지로 재현탁하였다.

한편, *Salmonella typhimurium*으로부터 얻은 LPS (Sigma, USA)를 pH 9.6의 carbonate-bicarbonate coating buffer에 희석하여 5  $\mu$ g/ml 농도가 되게 하고, 이 용액을 96 well microtiter plates(Corning Costar, USA)에 가한 후(100  $\mu$ l/well) 4°C에서 하룻밤동안 배양하였다. coating solution을 제거하고 0.05% Bovine serum albumin(BSA)의 PBS 용액 100  $\mu$ l를 각 well에 가하여 실온에서 45분간 blocking한 다음 0.1%의 Tween20을 함유한 PBS(PBS-T) 100  $\mu$ l씩으로 3회 세척하였다.

앞에서 RPMI 1640(10% FBS) 배지로 적당히 희석한 PBL 100  $\mu$ l를 각 well에 가하고(blank에는 RPMI 1640(10% FBS) 배지만을 가하였다) 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 16시간동안 배양한 다음 PBS-T로 세척하였다. peroxidase conjugated goat anti mouse IgA(KPL, Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.)를 2.5% FBS를 함유하는 PBS-T로 1:25,000 배로 희석한 것 100  $\mu$ l를 각 well마다 가하고 37°C에서 1시간 30분 배양한 후 다시 PBS-T로 3회 세척하였다. 기질로서 0.05 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0(Sigma, USA)에 0.4 mg/ml 농도로 녹인 o-phenylenediamine (Sigma, USA)을 각 well마다 100  $\mu$ l씩 가하고 상온에서 13분간 반응시키고 3 N-HCl 25  $\mu$ l를 가하여 반응을 중지시킨 후 ELISA reader(Bio. Tek Instruments, Inc., USA)를 사용하여 405 nm에서 OD를 측정하였다. 2회 실험하였다.

#### 야생형 *S. typhi* Ty2에 의한 공격시험

미세 장용 코팅된 Ty21a 백신을 생쥐에 경구투여하였을 때 야생형 *S. typhi* Ty2의 공격에 대해 보호 면역을 나타내는지 시험하였다. 5주령 암컷 BALB/c 생쥐에 대해  $1 \times 10^7$  CFU의 코팅된 *S. typhi* Ty21a를 48시간 간격으로 3회 경구투여하였다(투여용량 0.2 ml). 비면역 대조군에는 PBS를 동일 용량 투여하였다. 마지막으로 경구투여한 지 4주후에 0.5 ml의 PBS에 현탁한  $2 \times 10^6$  CFU의 야생형 *S. typhi* Ty2를 복강주사하고 열흘간 생쥐의 생존 여부를 관찰하였다. 면역군 및 비면역군 모두 Ty2에 의한 공격시험을 하지 않는 대조군을 두고, 여기에 대해서는 Ty2 대신 PBS만을 복강주사하였다. 2회 시험하였다.

#### 실험결과

##### 제조공정중 Ty21a의 생존율 및 제조된 Microbeads의 위액에 대한 저항성

동결건조한 Ty21a를 Ca-alginate에 의해 미세 코팅하는 제조 공정 과정에서 첨가하는 첨가제의 종류에 따라 인공 위액 처리 및 인공 장액 처리에 대한 저항성에 차이가 있었다(Table I). 먼저, 위액 및 장액을 처리한 후의 생균수(AG+AI)에 대한 위액 처리 후의 생균수(AI)의 비(위액 저항성, %)를 보면, 6%(w/w) mannitol+3.4%(w/v) trehalose(제1형)를

**Table I** – Viability in the manufacturing process and gastro-resistance of Ty21a micro-beads

Formulation <sup>a)</sup>	AI (CFU/g) <sup>b)</sup>	AG+AI (CFU/g) <sup>c)</sup>	Gastro-resistance (%) <sup>d)</sup>	Viability(%) in the manufacturing process <sup>e)</sup>
I	$3.5 \times 10^{10}$	$2.5 \times 10^{10}$	71.4	14.6
II	$4.2 \times 10^{10}$	$4.0 \times 10^{10}$	95.2	17.5
III	$7.1 \times 10^{10}$	$6.4 \times 10^{10}$	90.1	29.6

<sup>a)</sup>Formulation I : 6% (w/v) mannitol+3.4% (w/v) trehalose, Formulation II : 5% (w/v) Poloxamer 407, Formulation III : 10% (w/v) Glycerin

<sup>b)</sup>AI is the number of live *S. typhi* Ty21a after artificial intestinal juice treatment only.

<sup>c)</sup>(AG+AD) is the number of live *S. typhi* Ty21a after artificial gastric juice treatment followed by artificial intestinal juice treatment.

<sup>d)</sup>% ratio of (AG+AD) vs. AI

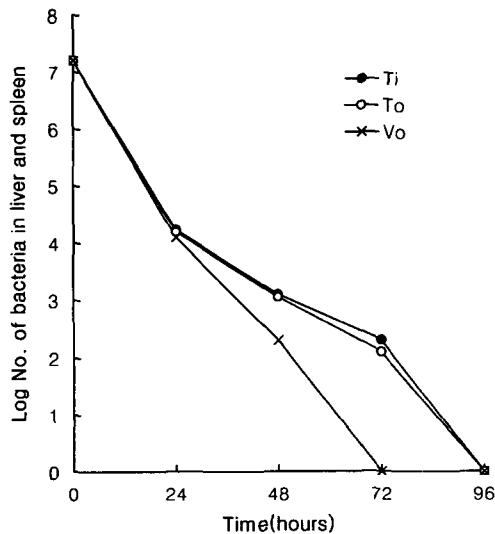
<sup>e)</sup>% ratio of (AG+AI) vs. the number of Ty21a at immediately lyophilized state

첨가제로 사용하였을 때는 가장 낮은 위액 저항성 (71.4%)을 보였으나, 제 2형(5%(w/w) Poloxamer 407) 및 제 3형(10%(w/v) glycerin)에서는 각각 95.2% 및 90.1%로서 위액에 대한 저항성이 비교적 높은 것으로 나타났다. 또한, micro-bead 제조 이전의 g당 균수와(AG+AD)를 비교하여 생존율을 산출한 결과, 제 1형의 경우 가장 낮은 생존율을 보였으며 (14.6%) 제3형은 생존율이 가장 높게 나타났다 (29.6%). 한편 제2형의 경우, 위액에 대한 저항성이

95.2%로 가장 높은 데 비해 제조 공정에 의한 생존율은 17.5%로 비교적 낮았다.

#### *S. typhi* Ty21a의 제형 및 투여 경로에 따른 간과 비장에서의 생존율

5주령 암컷 BALB/c 생쥐에  $2 \times 10^7$  CFU의 Ty21a를 투여한 후 24시간 간격으로 간과 비장을 적출하여 간과 비장 내에 존재하는 Ty21a의 생균수를 조사한 결과가 Fig. 1에 제시되어 있다. 먼저 24시간째에는 Ty21a의 생균을 복강주사(Ti) 하였을 경우에  $2.35 \times 10^4$  CFU로서 가장 많은 Ty21a균이 검출되었고, 코팅 백신을 경구투여하였을 경우(Vo)와 생균을 경구투여하였을 경우(To) 각각  $1.95 \times 10^4$  CFU 및  $1.35 \times 10^4$  CFU로서 To의 경우에는 Ti의 경우에 비해 약 57%에 해당하는 균이 간과 비장에 잔존하는 반면, Vo의 경우에는 83%가 잔존하여 코팅된 백신을 경구투여함으로써 장에서의 균 생존율이 향상되었음이 확인되었다. 이러한 경향은 48시간째에 더욱 뚜렷하여졌는데, Ti에서는  $1.35 \times 10^3$  CFU가 검출되었고 To에서는  $0.4 \times 10^3$  CFU가 검출되어 To의 경우 Ti에 비해 약 30%만이 생존하는데 반해 Vo에서는  $1.05 \times 10^3$  CFU로서 Ti의 77.8%에 해당하는 균이 생존하여 24시간째의 생존율과 비슷한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 72시간째에는 Ti에서  $3.5 \times 10^2$  CFU가 잔존하였고 To에서는 균이 검출되지 않은 데 비해 Vo에서는  $1.0 \times 10^2$  CFU의 균이 잔존하여 여전히 항원 제공의 기능을 하고 있음을 보여주었다. 96시간째에는 Ti 및 Vo 모두 균이 검출되지 않았다.



**Fig. 1** – Clearance of *Salmonella typhi* Ty21a in liver and spleen of mice after oral administration of alginate-coated Ty21a. Closed circle (Ti) indicates viable cell number after intraperitoneal administration of uncoated Ty21a measured at the indicated time point. Open circle (Vo) and Cross (To) indicate viable cell numbers after oral administration of coated and uncoated Ty21a measured at the indicated time points, respectively.

#### PBL에 의한 *in vitro*에서의 *S. typhi* LPS 특이 항체 IgA 생성능

**Table II** – Specific *in vitro* anti-typhoid IgA antibody responses by peripheral blood lymphocytes

Samples	OD <sub>490</sub>		
	1st experiment	2nd experiment	
Control	1	0.095	0.108
	2	0.033	0.109
	3	ND*	0.037
mean ± SD	0.064 ± 0.044	0.085 ± 0.041	
Sample	1	0.410	0.922
	2	1.198	0.934
	3	0.077	0.911
	4	0.711	0.947
	5	0.465	0.944
	6	1.112	1.929
	7	0.946	0.956
	8	0.773	0.948
	9	1.353	2.023
	10	1.558	1.969
	11	0.870	1.959
	12	2.188	2.006
	13	0.324	0.942
	14	ND*	0.938
mean ± SD	0.922 ± 0.571	1.310 ± 0.517	

\*ND : Not done

미세장용코팅된 *S. typhi* Ty21a를 48시간 간격으로 3회 투여한 9주령 암컷 BALB/c 생쥐에서, PBL에 의한 IgA 항체 생성능을 ELISA 방법에 의해 측정된 결과가 Table II에 명시되어 있다. 1회 실험 및 2회 실험 모두 PBS만을 투여한 대조 쥐보다 평균 약 15.5배 높은 IgA 항체 생성율을 보였다. 제1회 실험에

서는 미세장용코팅된 Ty21a를 투여한 13개 개체 중 한 개체를 제외(OD 0.007)하고 모두 의미있는 IgA 생성율을 나타내었으며, 제2회 실험에서는 14개 개체 모두가 0.9를 넘는 높은 OD값을 나타내었다.

**야생형 *S. typhi* Ty20에 의한 공격시험에서의 생존율**

미세 장용 과립 형태로 제조한 *S. typhi* Ty21a 백신을 5주령 암컷 BALB/c 생쥐에 48시간 간격으로 3회 면역화한 지 4주 후에  $2 \times 10^6$  CFU의 야생형 *S. typhi* Ty2를 복강주사하고 열흘동안 생존 여부를 관찰한 결과가 Table III에 제시되어 있다. 제1회 시험에서는 면역 후 공격시험한 10마리 중 5마리가(50%), 제2회 시험에서는 15마리 중 13마리가(86.7%) 살아남았다. 반면, 코팅된 Ty21a 대신 PBS만을 경구투여한 비면역 대조군에서는, Ty2에 의한 공격에서 모두 죽거나(제2회 시험) 열 마리 중 한 마리를 제외하고 모두 생존하지 못하였다(제1회 시험). 면역군이나 비면역군 모두 Ty2에 의한 공격을 받지 않은 경우에는 100%의 생존율을 나타내었다.

**고 찰**

본 연구에서 미세장용코팅시 첨가제로 사용한 glycerin은 코팅 공정 및 위산에 의한 균의 불활성화를 저지하였다. glycerin은 다가알콜류로서 체내 분야에서 가소제로 사용되는 물질이며, 본 연구에서는 미세 장용 코팅 과정의 첨가제로 쓰여 알긴산과 칼슘 이온간의 교차결합 생성시 신축성을 부여함으로써 더욱

**Table III** – Survival response in BALB/c mice orally immunized with coated Ty21a

Experiment	vaccine	Vaccinate dose	Challenge dose	No. of survivors /No. of total
1	Immune	$1 \times 10^7$ CFU	$2 \times 10^6$ CFU	5/10
		$1 \times 10^7$ CFU	ND*	4/4
	Non-immune	ND*	$2 \times 10^6$ CFU	1/10
		ND*	ND*	5/5
2	Immune	$1 \times 10^7$ CFU	$2 \times 10^6$ CFU	13/15
		$1 \times 10^7$ CFU	ND	5/5
	Non-immune	ND*	$2 \times 10^6$ CFU	0/5
		ND*	ND*	5/5

Mice were orally immunized 3 times every 48 hours with  $1 \times 10^7$  CFU coated Ty21a or with PBS as non-immune. 4 weeks after the immunization, the mice were intra-peritoneally challenged with  $2 \times 10^6$  CFU Ty2. The survival was scored for 10 days.

\*ND : Not done

안정된 코팅을 촉진하였을 것으로 보인다.

본 연구에서 제조한 장티푸스 백신의 유효성을 검증하기 위해 생쥐를 실험동물로 선택하였는데, *S. typhi*는 철저히 사람에게만 병원성이 있는 세균이지만, 생쥐에 있어서 사람에서의 병리 현상과 상관성이 높은 감염 증상을 나타내므로, 장내 세균에 대한 면역 실험에 생쥐가 쓰여져 왔다.<sup>20)</sup> 또한 사람이나 생쥐 모두 *S. typhi*에 감염되면 간과 비장의 macrophage 내에 균이 증식한다는 특성이 있다. 한편, Ty21a의 안전성에 관한 Germanier와 Furer의 실험에서,<sup>15)</sup> Ty21a를 생쥐에 비경구로 1,000배 높은 용량을 투여하였을 때도 독성이 있는 parent strain(Ty2)보다 간과 비장에서 훨씬 빨리 소실된다고 보고된 바 있다. 이와 같이 Ty21a의 간과 비장에서의 짧은 생존 기간은 parent strain(Ty2)에 비해 안전성을 의미하기도 하지만 Ty21a에 의한 항원 제공 기능을 할 수 있는 기간이기도 하다. 본 연구에서는 제조된 미세 장용 코팅의 항원 제공 기능을 증명하기 위해, Ty21a균을 복강주사한 후 (Ti) 생쥐의 간과 비장에서의 생존 균수를 대조군으로 하고 Ty21a균을 경구투여하였을 때(To)와 비교하여 코팅 백신을 경구투여하였을 경우(Vo)의 생존 균수를 검사하였다(Fig. 1). 그 결과 Vo에서는 72시간째까지도 Ti와 비슷한 경향으로 세균수가 검출되었지만, To는 48시간째부터 균수가 급격히 감소하여 72시간째에는 완전히 소실되었다. 이러한 결과는 Ty21a균에 미세 장용 코팅을 가함으로 인해 Ty21a균이 장까지 도달하는 동안 산에 의한 파괴로부터 안전하게 보호되었다는 것을 의미하며, 소장 점막의 Peyer's patch로부터 흡수되어 항원을 제공할 수 있는 만큼 충분히 살아있을 수 있음을 의미한다. 반면 Ty21a 생균을 그대로 경구투여한 경우에는 장까지의 생존율이 낮을 뿐만 아니라 살아서 장에 도달한다 할지라도 생존 기간이 짧아 항원 제공 기능을 충분히 발휘할 수 없음을 알 수 있다.

병원성 장티푸스균이 사람에게 침투하여 병을 일으키는 기전을 살펴보면 그에 대한 가장 효과적인 방어 방법을 찾을 수 있다. *S. typhi*는 소화관을 통해 체내로 유입되는데, 섭취된 균은 대부분이 위산에 의해 불활성화되고 여기서 살아남은 균이 소장 점막의 Peyer's patch로 침입한다. Peyer's patch는 B 및 T 림프구와 macrophage를 함유하는 림프조직의 종합체이며, 이것의 표면을 둘러싸고 있는 특화된 상피세포들(follicle associated epithelial cell, 또는 microfold

(M) cell)이 *S. typhi* 균을 탐식하여 밑에 있는 림프조직으로 전달해준다. 여기서 *S. typhi*는 macrophage에 의해 탐식되는데, 이는 macrophage의 사멸 이전에 저항하여 오랫동안 phagocyte의 cytoplasm 내에서 증식하며 림프절, 비장, 간, 그리고 골수에까지 축적된다. 이것이 담즙을 통해 지속적인 장내 재감염을 일으키며 1~2주만 지나면 혈류에까지 침투하여 임상적 병증, 즉 계속되는 고열과 두통, 오심, 복통, 설사 등을 나타내는 것이다. 이러한 장티푸스균이 소장점막으로 침입하는 것을 최일선에서 저지하는 것이 바로 장내 항체이다. 장내 면역에 가장 중요한 역할을 담당하는 항체는, 국소적으로 생성, 분비되는 secretory IgA class이다.<sup>21)</sup> 이들은 장내 단백 분해 효소에 대해 저항성이 크며<sup>22)</sup> systemic immune system과 독립적으로 점막 표면에서 면역반응을 일으킨다.

국소적인 장내 면역반응을 일으키기 위해서는 항원이 소장내 림프조직인 Peyer's patch에 도달해야만 한다.<sup>23)</sup> 이러한 목적을 달성하기 위해 경구 투여 백신 개발 분야에서 종합체에 의한 미세 코팅이나 미세 캡슐화와 관련한 여러 연구가 진행되고 있다.<sup>24-28)</sup> 그 중에서 장티푸스 백신 분야에서는 phosphoryl choline 항원을 poly(lactide-co-glycolide) microsphere 형태로 생쥐에서 경구투여한 연구가 보고되었으나,<sup>25)</sup> 본 연구에서는 살아있는 Ty21a 균을 항원 캐리어로 사용하므로, 제조 과정에서 유기 용매나 고온을 필요로 하지 않는 알긴산 microsphere를 백신 전달 물질로 선택하게 되었다. 알긴산은 수용성 환경에서 교반하에 칼슘 이온과 반응하여 교차결합을 이룸으로써 마이크로캡슐을 생성한다. 본 연구에서 사용한 미세장용캡슐은 위산에 대하여 90% 이상의 저항성을 나타내었으며 이는 Moldoveanu 등이 여러 동물에 대해 실험한 결과와 일치한다.<sup>28)</sup>

경구 항원 전달을 위해 알긴산 마이크로 캡슐을 사용하는데 있어 주요 장점이라 할 수 있는 것은 가격이 저렴하고 제조방법이 용이하며 천연 고분자이므로 생체 적합성이 뛰어나다는 것이다. 생성된 마이크로캡슐은 그 크기가 1  $\mu\text{m}$  미만으로부터 30  $\mu\text{m}$  이상인 것들도 있지만 평균 15  $\mu\text{m}$  정도 된다고 보고되었다.<sup>29)</sup> 일반적으로 크기가 5~10  $\mu\text{m}$ 인 과립이 Peyer's patch 내에 머물러 면역반응을 일으킨다고 알려져 있으나,<sup>29)</sup> 그보다 큰 particle과 함께 투여하여 면역반응이 증강되었다는 보고도 있다.<sup>30)</sup>

Ty21a 백신의 효과를 검증하는 데 있어 과거에는 면역화한 혈액이나 장액 중에 존재하는 *S. typhi* 항원에 특이한 IgA를 측정하는 방법을 사용하였지만,<sup>10)</sup> 본 연구에서는 면역화한 지 열혈이 지난 생쥐의 말초 혈액 중의 림프구를 분리하여 이를 적당한 환경하에서 배양한 후 이들로부터 생성되는 IgA를 ELISA 방법에 의해 측정하였다. 그 결과 Ty21a 미세장용캡슐을 투여한 생쥐의 PBL에서 *S. typhi* LPS에 특이한 IgA가 PBS를 투여한 대조군 생쥐에서보다 15배 높게 생성되었다. 이것은 이들 PBL 중에는 Peyer's patch로부터 Ty21a를 탐식한 macrophage가 제공한 항원에 의해 분화되어 혈류로 나온 림프구가 포함되어 있다고 해석될 수 있다. 이들 림프구는 다시 면역반응이 시작된 원래 점막층(lamina propria)으로 돌아가게 되는데 여기서 어떤 특이 수용체간의 상호작용이 관여하는 것으로 생각되고 있다.<sup>31)</sup> Lamina propria에서 plasma cell은 primary IgA를 생성하고 이어서 T세포 매개 면역반응이 일어나게 된다. 따라서 점막면역에 관여하는 림프구로부터의 IgA 생성능을 검사함으로써 혈액 중 존재하는 IgA나 점막에서 생성, 분비되는 secretory IgA 자체의 농도를 측정하는 것과 상관성이 큰 결과를 얻을 수 있으며,<sup>19)</sup> 실제로 장액을 채취하여 sIgA 농도를 측정하였을 때의 높은 false negative response rate(20%)을 극복할 수 있는 방법이라고 사료된다.<sup>32)</sup> 결국 PBL에 의한 높은 IgA 생성율은 미세장용코팅한 Ty21a가 장관의 Peyer's patch에서 탐식되어 강력한 국소 면역반응을 일으킬 수 있음을 시사하며, 이러한 결과로 Ty21a에 의한 공격시험에서 50~86.7%의 높은 생존율을 보였다고 결론지을 수 있다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1998년도 보건복지부(HMP-98-DA-80026) 연구 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Institute of Medicine. New vaccine development : establishing priorities, vol II. *Disease of importance in developing countries*. Washington DC. National Academy press, Appendix D-14, Prospects for immunizing against *Salmonella typhi*, 1-10 (1986).
- 2) Edelman, R., Levine, M. M. : Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 329 (1986).
- 3) Levin, M. M., Grados, O., Gilman, R. H., Woodward, W. E., Solis-Plaza, R., Waldman, W. : Diagnostic value of the Widal test in areas endemic for typhoid fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**, 795 (1978).
- 4) Taylor, D. N., Pollard, R. A., Blake, P. A. : Typhoid in the United States and the risk to the international traveler. *J. Infect. Dis.* **148**, 599 (1983).
- 5) Hejfec, L. B., Salmin, L. V., Lejtman, M. Z., Kuz'minova, M. L., Vasil'eva, A. V., Levina, L. A., Bencianova, T. G., Pavlova, E. A., Antonova, A. A. : A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. *Bull. World. Health. Organ.* **34**, 321 (1966).
- 6) Hornick, R. B., Greisman, S. E., Woodward, T. E., DuPont, H. L., Dawkins, A. T., Snyder, M. J. Typhoid fever : pathogenesis and immunologic control. 2. *N. Engl. J. Med.* **283**, 739 (1970). Review.
- 7) Woodruff, B. A., Pavia, A. T., Blake, P. A. : A new look at typhoid vaccination. Information for the practicing physician. *JAMA.* **265**, 756 (1991). Review.
- 8) Acharya, I. L., Lowe, C. U., Thapa, R., Gurubacharya, V. L., Shrestha, M. B., Cadoz, M., Schulz, D., Armand, J., Bryla, D. A., Trollfors, B. : Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **317**, 1101 (1987).
- 9) Klugman, K. P., Gilbertson, I. T., Koornhof, H. J., Robbins, J. B., Schneerson, R., Schulz, D., Cadoz, M., Armand, J. : Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet.* **2**(8569), 1165 (1987).
- 10) Bartholomeusz, R. C., Labrooy, J. T., Johnson, M., Shearman, D. J. C., Rowley, D. : Gut immunity to typhoid vaccine Ty21a. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 67 (1986).
- 11) Robbins, F. C. : Polio-historical. In: Plotkin, S. A., Mortimer, E. A., editors. *Vaccines*. Philadelphia, PA: Saunders, p. 137 (1994).
- 12) Quiding, M., Nordstrom, I., Kilander, A., Andersson, G., Hanson, L. A., Holmgren, J., Czerkinsky, C. : Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody



- responses and interferon-gamma production and evokes local immunological memory. *J. Clin. Invest.* **88**, 143 (1991).
- 13) Kantele, A., Arvilommi, H., Jokinen, I. : Specific immunoglobulin-secreting human blood cells after peroral vaccination against *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.* **153**, 1126 (1986).
  - 14) Offit, P. A., Clark, H. F., Kapikian, A. Z. : Vaccines against rotavirus. In: Levine, M. M., Woodrow, G. C., Kaper, J. B., Cobon, G. S. editors. *New generation vaccines*. 2nd ed., New York: Marcel Dekker, p. 437 (1997).
  - 15) Germanier, R., Furer, E. : Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of gal E mutants of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **4**, 663 (1971).
  - 16) Gilman, R. H., Hornick R. B., Woodard, W. E., DuPont, H. L., Snyder, M. J., Levine, M. M., Libonati, J. P. : Evaluation of a UDP-galactose-4-epimeraseless mutant of *Salmonella typhi* as a live oral vaccine. *J. Infect. Dis.* **136**, 717 (1977).
  - 17) Levine, M. M., Ferreccio, C., Cryz, S., Ortiz, E. : Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in randomised controlled field trial. *Lancet.* **336**, 891 (1990).
  - 18) 김세란, 박동우, 전홍렬, 김희준, 한성순, 김기호, 김홍진 : *Salmonella typhi* Ty21a의 동결건조와 안정성. *약학회지* **43**, 793 (1999).
  - 19) Forrest, B. D. : Identification of an intestinal immune response using peripheral blood lymphocytes. *Lancet.* **1**, 81 (1988).
  - 20) Collins, F. M. : Mechanisms in antimicrobial immunity. *J. Reticuloendothel. Soc.* **10**, 58 (1971).
  - 21) Mestecky, J., McGhee, J. R. : Immunoglobulin A (IgA) : molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* **40**, 153 (1987). Review.
  - 22) Underdown, B. J., Schiff, J. M. : Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* **4**, 389 (1986). Review.
  - 23) McGhee, J. R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M. T., Eldridge, J. H., Hirasawa, M., Kiyono, H. : The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine.* **10**, 75 (1992). Review.
  - 24) Jones, D. H., McBride, B. W., Thornton, C., O'Hagan, D. T., Robinson, A., Farrar, G. H. : Orally administered microencapsulated *Bordetella pertussis* fimbriae protect mice from *B. pertussis* respiratory infection. *Infect. Immun.* **64**, 489 (1996).
  - 25) Allaoui-Attarki, K., Pecquet, S., Fattal, E., Trolle, S., Chachaty, E., Couvreur, P., Andreumont, A. : Protective immunity against *Salmonella typhimurium* elicited in mice by oral vaccination with phosphorylcholine encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infect. Immun.* **65**, 853 (1997).
  - 26) Moldoveanu, Z., Novak, M., Huang, W. Q., Gilley, R. M., Staas, J. K., Schafer, D., Compans, R. W., Mestecky, J. : Oral immunization with influenza virus in biodegradable microspheres. *J. Infect. Dis.* **167**, 84 (1993).
  - 27) Weng, C. N., Tzan, Y. L., Liu, S. D., Lin, S. Y., Lee, C. J. : Protective effects of an oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine against experimental infection in pigs. *Res. Vet. Sci.* **53**, 42 (1992).
  - 28) Bowerstock, T. L., HogenEsch, H., Suckow, M., Porter, R. E., Jackson, R., Park, H., Park, K. : Oral vaccination with alginate microsphere systems. *J. Control. Release* **39**, 209 (1996).
  - 29) Neutra, M. R., Giannasca, P. J., Frey, A., Zhou, F., Giannasca, K. T. : Transport of antigens and microorganisms by M cells, Proceedings of Mucosal Immunity: New Strategies for Protection Against Viral and Bacterial Pathogens. Keystone, CO, J1-002, p. 232 (1995).
  - 30) Eldridge, J. H., Staas, J. K., Meulbroek, J. A., McGhee, J. R., Tice, T. R., Gilley, R. M. : Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol. Immunol.* **28**, 287 (1991).
  - 31) Butcher, E. : The regulation of lymphocyte traffic. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **128**, 85 (1986). Review.
  - 32) Forrest, B. D. : Effects of sample processing on the measurement of specific intestinal IgA immune responses. *Vaccine.* **10**, 802 (1992).