

칸디다질염에 효과가 있는 단항체에 대한 호중구의 역할

한 용 문*

동덕여자대학교 약학대학

(Received May 6, 2003; Revised June 12, 2003)

A Role of Neutrophils in Anti-*Candida* Monoclonal Antibody Protection Against Vaginal Infection due to *Candida albicans*

Yongmoon Han*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University 23-1 Wolgok-Dong, Sungbuk-Gu, Seoul, Korea 136-714

Abstract — As previously reported, an immunoglobulin M (IgM) monoclonal antibody (MAb) B6.1, specific for a cell wall B-1,2-mannotriose, was protective against vaginal infection due to *Candida albicans* when mice were treated with the antibody. In this study, the role of neutrophil was examined in the protective effect of MAb B6.1 against vaginal infection. To deplete neutrophils, mice were given intravenously rat anti-mouse neutrophilic MAb RB6-8C5 prior to intraperitoneal administration of MAb B6.1 to these mice. The mice were examined for antibody in their reproductive tract. By an ELISA, MAb B6.1 was found in the vaginal homogenates, but no antibody was detected in vaginal lavage materials. The neutropenia was induced by a single dose of the anti-neutrophil antibody, but lymphocytes were also partially depleted. The protective effect of MAb B6.1 was decreased when mice pretreated with MAb RB6-8C5 were given the anti-*Candida* antibody before challenge with *C. albicans* yeast cells intravaginally. These results show that neutrophils are involved in the MAb B6.1 protection against *Candida* vaginal infection.

Keywords □ *Candida albicans*, vaginal infection, anti-*Candida* antibody, neutropenia

*Candida albicans*는 *Candida* species 중 가장 많은 문제를 일으키는 진균으로 소모성 질환인 당뇨병환자와 암환자, 후천성면역결핍(AIDS) 환자와 같이 면역기능이 감소되거나 결핍된 환자에게는 치명적이다.¹⁻⁴⁾ 또한 면역기능이 정상적인 건강한 여성의 경우에도 *C. albicans*로 기인된 질염으로 많은 고통을 겪는다.⁵⁾ 점액성 감염인 칸디다 질염은 전체 여성의 75% 이상이 일생에 최소 한번씩 감염 경험을 하며 이중의 50%는 완치된 후에도 재발되기도 한다.⁶⁾ 치료약물로는 amphotericin B와 azole 계열의 약물인 fluconazole, miconazole 등이 사용되나 완치율이 낮고 내성이 높아서 치료 후에도 재발율이 때문에 새로운 치료방법이 요구되고 있다.

칸디다 질염에 대한 면역기전은 아직까지 확실하게 규명되지 못했으나 체액면역과 세포면역 모두가 관여하는 것으로 추정된다. 예로서 생쥐 질속에 약화 *C. albicans*균으로 면역시킨 후 동

일균으로 감염시켰을 때 체액면역 및 국소적 세포면역이 효과가 있었으며,^{7,8)} 난소를 제거하고 estrogen으로 처리한 쥐(rat)에 항 *Candida* mannan 항체(anti-*Candida* mannan antibody)를 수동 면역 방법으로 투여했을 경우에도 칸디다 질감염에 효과가 있음이 보고 되었다.⁹⁾ 본 연구팀도 *C. albicans* 세포벽 물질인 mannocomplex를 liposome에 삽입한 백신제형으로 생쥐를 면역시키고 *C. albicans*균으로 전신적 또는 질속에 감염시켰을 때 전신감염과 질감염 모두에 효과가 있음을 발표한 바 있다.^{10,11)} 또한, 이 liposome 백신으로 면역된 생쥐로부터 B6.1 단항체(monoclonal antibody)를 분리하여 수동면역 방법으로 그 효과를 측정하였을 때 전신 칸디다증과 칸디다질감염에도 역시 효과가 있음을 보고한바 있다.¹²⁾ 기전규명에서 전신성 칸디다증의 경우는 B6.1 단항체가 opsonin 효과에 의한 호중구(neutrophil)의 탐식작용을 증진시키고¹³⁾ 보체계가 관여함을 밝혔다.¹⁴⁾ 그러나, B6.1 단항체의 칸디다 질염에 대한 이러한 예방효과의 작용기전은 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 항호중구단항체(anti-neutrophil monoclonal antibody)인 RB68C5 단항체^{15,16)}로 처리한 BALB/c 생쥐에 B6.1

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

단항체를 투여해서 *C. albicans*로 기인된 캔디다 질감염 예방효과 여부를 측정하였다. 실험결과는 RB6-8C5 단항체 처리로 인하여 호중구가 감소되었을 때 B6.1 단항체의 항캔디다 질감염효과는 B6.1 단항체만 투여받은 생쥐(대조군) 보다 그 예방효과가 77% 이상 감소되었다. 이 결과는 B6.1 단항체의 캔디다 질감염 예방의 작용기전에 호중구가 관여함을 보여준다.

재료와 방법

균주와 배양조건

C. albicans 균주는 이전의 많은 실험에서 그 특성이 규명된 CA-1 strain^{11,12,14,17}를 사용하였으며 37°C에서 GYEP(Glucose-Yeast Extract Peptone) 액체배지에서 24시간 배양한 효모형태(blastoconidial form)의 세포를 멸균된 인산완충용액 [DPBS (Dulbecco's phosphate saline solution); pH 7.4; Sigma, St. Louis, USA]으로 세척하여 사용하였다. 세포수는 hemocytometer로 측정하였다.

동물

본 실험에서는 6-8주된 BALB/c 암컷 생쥐(Charles River Lab, MA, USA)를 *C. albicans*로 감염시키기 76시간 전 estradiol (Sigma)를 피하주사하여 pseudoestrus¹² 상태로 한 후에 사용하였다.

단항체(monoclonal antibodies)

*C. albicans*로 기인된 생쥐의 캔디다 질감염에 효력이 있는^{11,12} Immunoglobulin M(IgM) B6.1 단항체를 사용하였다. 이 B6.1 단항체는 *C. albicans*로 인한 전신감염에도 효과가 입증된 항체^{10,14}로서 이 단항체의 epitope는 *C. albicans* 세포벽 물질인 mannoprotein complex에 존재하는 β 1,2-trimannose 이다.¹⁷ 이 B6.1 단항체는 serum-free 조건하에서 우리 실험실에서 생산되었다. 호중구(neutrophils)를 제거하기 위하여 anti-mouse neutrophil 효과가 있는 IgG2b RB68-C5(anti-Gr-1) 단항체^{15,16}가 사용되었으며 용량은 생쥐 한 마리당 25 μ g씩 정맥주사로 투여되었다. 이 용량은 전신캔디다증 연구과정에서 neutropenia 상태를 조사한 결과를 근거로 하였다.¹⁸ RB6-8C5 항체는 Cutler 교수(Louisiana State University/School of Medicine, USA)로부터 공급 받았다.

IgM B6.1 단항체의 복강주사후 질내부 유입 검색 - (ELISA)

IgM B6.1 단항체를 복강으로 투여한 생쥐의 질(vagina) 내부에 이 B6.1 단항체의 존재여부 검사는 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) 방법으로 검색했다. 이 ELISA 방법은 이전의 실험에서 규명된 방법¹⁹을 사용하였다. 시료는 B6.1

항체를 투여 받은 생쥐의 질(vagina)을 4시간 후에 적출하여 인산완충용액(DPBS) 1 ml을 첨가하고 glass homogenizer로 분쇄한 후 생성된 여액에서 B6.1 단항체 존재여부를 검색하였다.

면역조직화학 방법(Immunohistochemistry)

ELISA 방법의한 B6.1 단항체 존재여부를 확인하기 위하여, 위에 기술한 것과 동일한 방법으로 처리된 또 다른 생쥐 그룹에서 질(vaginas)을 적출하여 냉각절편(cryosectioning)한 후 immunohistochemistry 방법으로 질조직내의 B6.1 단항체 분포를 조사하였다. 이 immunoperoxidase 염색은 본 연구팀에서 이전에 발표한 방법을 사용하였다.¹⁹ 간략하게 기술하면 이 염색에서는 Horseradish peroxidase로 결합된 goat anti-mouse Ig (Sigma)이 2차 항체(secondary antibody)로 사용되었고 기질로는 OPD(o-phenylenediamine.2HCl)(Sigma)가 사용되었으며 발색정지는 10% H₂SO₄를 첨가하여 96-well 측정기(Biorad, CA, USA)로 490 nm에서 그 발색정도를 측정하였다.

RB6-8C5 항체의 호중구 감소효과 및 B6.1 항체에 대한 영향

항호중구 RB6-8C5 단항체의 호중구 감소 효과 확인은 다음과 같이 측정하였다. BALB/c 생쥐에 RB6-8C5 단항체를 상기 언급한 바와 같이 25 μ g씩 정맥으로 투여하였다.¹⁸ 대조군은 이 항체를 희석할 때 사용된 인산완충용액(DPBS)만 투여 받았다. 24시간 후 각 생쥐의 꼬리 동맥으로부터 채혈하고 hemocytometer를 사용해서 순환계의 백혈구수를 측정하고 호중구의 숫자는 도말법(blood smear)으로 피를 슬라이드에 도말한 후 Hema-3 염색 kit(Biomedical sciences, NJ, USA)으로 측정하였다. RB6-8C5 항체의 B6.1 항체에 대한 영향은 RB6-8C5 항체를 먼저 생쥐에 투여하고 24시간 후에 B6.1 항체를 이 생쥐에 투여하여 위와 동일한 방법으로 호중구의 감소여부를 측정하였다.

호중구의 역할검사

Pseudoestrus 상태의 BALB/c 생쥐를 5마리씩 한 그룹으로 하여 한 그룹은 RB6-8C5 단항체를 투여 받고 다른 그룹은 멸균된 인산완충용액만을 투여 받았다. 24시간 후에 모든 생쥐들은 B6.1 단항체를 200 μ l씩 복강내(intraperitoneal administration)로 투여 받고 4시간 후에 각 생쥐마다 5×10^4 *C. albicans* yeast cells를 질속으로 주입하여 감염시켰다. 감염 48시간 후 이 생쥐들의 질(vagina)을 적출하여 1 ml 인산완충용액을 첨가 후 glass homogenizers로 분쇄하고 분쇄액(vaginal fluids)을 희석하여 Mycobiotic Agar 배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 평판배지(pour plate) 방법으로 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 균락수(colony forming unit; CFU)를 집계하여 B6.1 단항체의 효과 감소 여부를 측정하였다.

통계

Student-t 통계 방법이 사용되었으며, 대조군과 실험군의 유효 평가시 *P*-values가 0.05 보다 낮을 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

질근육(myometrium)에서 B6.1 단항체가 검색됨

IgM B6.1 단항체를 투여 받은 BALB/c 생쥐의 질(vagina)을 적출하여 glass homogenizer로 분쇄한 여액을 ELISA 방법으로 검색하였을 때 B6.1 단항체가 검색된 반면 B6.1 항체 대신 인산 완충용액(DPBS)을 투여 받은 생쥐(대조군)에서는 흡광도가 거의 없었다(Fig. 1). 그러나 질을 적출하기 전에 B6.1 단항체를 투여받은 생쥐들에서 채취된 질 분비물(vaginal lavage)을 동일한 ELISA 방법으로 검색하였을 때 B6.1 단항체는 검색되지 않았다.

B6.1 단항체는 질조직내의 myometrium에 분포

Immunohistochemistry 검색결과 B6.1 단항체는 질조직을 구성하고 있는 myometrium(M)에 분포되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 한편, B6.1 단항체를 투여하지 않은 생쥐의 질에서는(대조군) 이 실험배경(background)만 확인 되었다(Fig. 2B).

Anti-neutrophil RB6-8C5 단항체 자체는 B6.1 단항체에 영향이 없음

호중구의 *C. albicans*로 기인된 질감염에 대한 효과를 검사하기 전에 RB6-8C5 단항체의 호중구 감소 효과를 먼저 조사하고 이 항체의 B6.1 단항체에 끼치는 영향 여부를 검사하였다. RB6-

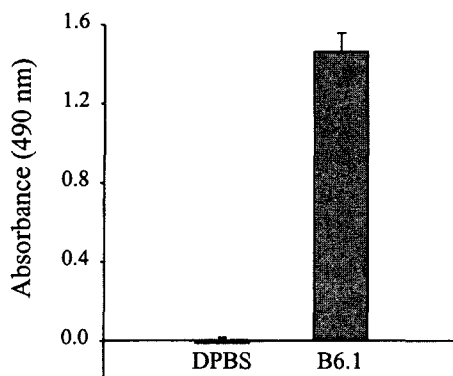


Fig. 1 – MAb B6.1 detection in vaginal tissue homogenates. Vaginas from pseudoestrus BALB/c mice were collected 4 h after intraperitoneal injection (i.p.) of MAb B6.1, washed with sterile DPBS, homogenized, and the fluid portion was tested for antibody by ELISA. Control mice received the DPBS (diluent buffer solution). The ELISA results displayed that detected in the extract. Bars showed standard error.

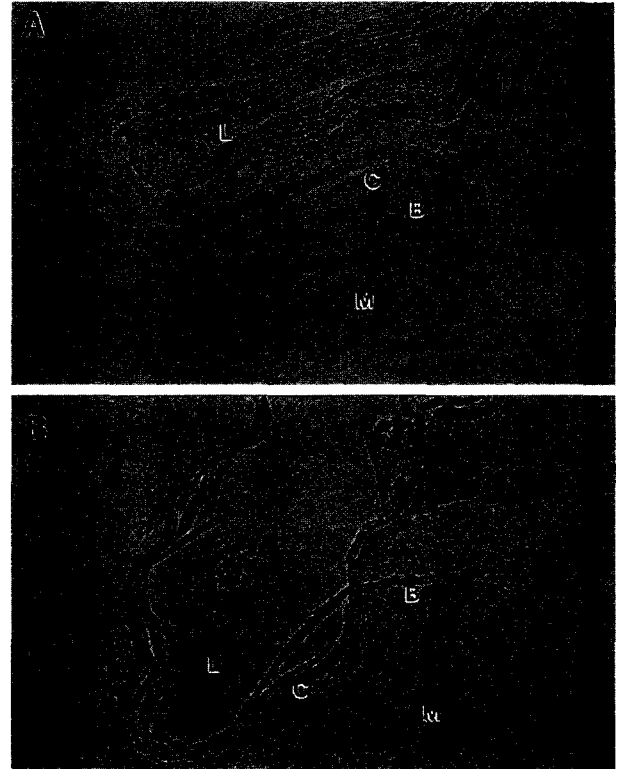


Fig. 2 – MAb B6.1 is found in the vaginal myometrium. Vaginas from pseudoestrus BALB/c mice were cryosectioned and immunostained. In all panels, L: Lumen; C: stratum compactum; B: stratum basalis; M: myometrium. Panel (A). MAb B6.1 is localized in the myometrium. Panel (B). Mice given DPBS showed only background.

8C5를 BALB/c 생쥐에 투여한 후 말초 순환계의 전체 백혈구 (Total WBC)의 숫자를 측정하였을 때 1 mm^3 내에 4,500 정도의 백혈구가 존재 하였으며, DPBS만 투여 받은 대조군과 비교하였을 경우 35% 정도의 감소가 있었다(Fig. 3A). 이는 전체 백혈구 수에 대한 호중구의 비율을 비교할 때 타당성이 있는 것으로 여겨진다.²⁰⁾ 호중구 수를 조사하였을 때 이 항호중구항체 (RB6-8C5 항체)로 처리된 생쥐에서는 95% 이상의 호중구가 감소되었다(Fig. 3B). 이 모든 경우에서 B6.1 단항체가 생쥐내부에 존재 하더라도 RB6-8C5 단항체의 호중구 감소효과에는 영향이 없었다(Fig. 3A 및 3B).

호중구 제거시 B6.1 항체의 칸디다 질감염에 대한 예방효과가 감소됨

정상적인 BALB/c 생쥐(RB6-8C5 항체로 처리되지 않은 생쥐 그룹)에 B6.1 단항체를 투여한 경우 vaginal CFU는 대략 $165 \times 10^4/\text{g}$ 인 반면 투여 받지 못한 생쥐그룹은 vaginal CFU가 평균 $37 \times 10^4/\text{g}$ 으로 77% 이상의 vaginal CFU 감소가 있었다. 이는 B6.1 항체가 *C. albicans*로 인한 칸디다 질감염에 효과가 있음을

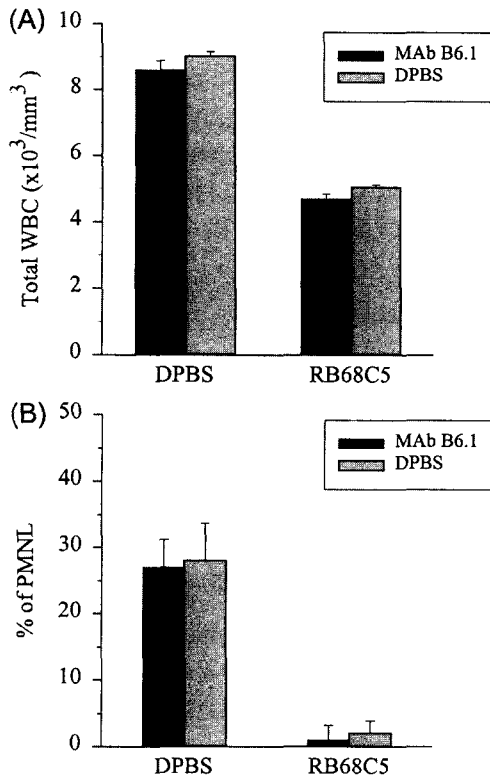


Fig. 3 - Effect of intravenous administration of the anti-neutrophil MAb RB6-8C5 on peripheral blood leucocytes (WBC) (A) and neutrophils (polymorphonuclear leucocytes; PMNL) (B) in the presence of MAb B6.1. Pseudoestrus BALB/c mice were treated with the anti-neutrophil antibody before the i.p. administration of MAb B6.1, and total WBCs and neutrophils (PMNLs) were enumerated. The MAb RB6-8C5 depleted neutrophils, which did not affect activity of the MAb B6.1 in the animals. Bars showed standard error.

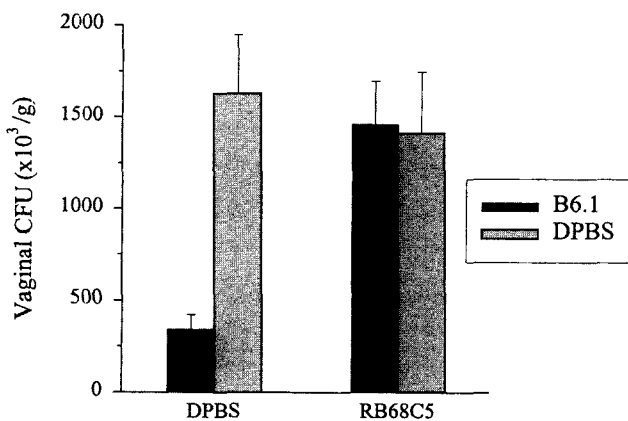


Fig. 4 - Prophylactic effect of MAb B6.1 against the vaginal infection was demolished under the neutropenic condition. Whereas no prophylactic effect of B6.1 was observed when the mice were pre-treated with RB6-8C5 before the B6.1 treatment, mice untreated with the anti-neutrophil antibody were protected against the vaginal infection. Bars showed standard error.

보여준다. 반면에, RB6-8C5 항체로 처리된 생쥐그룹의 경우에는 B6.1 항체의 투여에 관계없이 대략 $135 \times 10^4/g$ 과 $140 \times 10^4/g$ vaginal CFU로 각각 측정되어 호중구가 제거되었을 때 B6.1 항체의 효과가 소실됨을 알 수 있다(Fig. 4).

결론 및 고찰

본 연구에서는 칸디다 질감염에 대한 IgM B6.1 단항체의 예방효과의 기전을 조사하였다. 우선적으로 이 단항체를 복강내로 투여하였을 때 질 근육내 및 질강(vaginal lumen)으로의 분비여부를 조사하였다. 즉, B6.1 항체를 BALB/c 생쥐에 복강내로 투여한 후 질을 적출하여 분쇄한 여액(vaginal homogenates)에서는 ELISA 방법으로 B6.1 단항체가 검출되었으나 질분비물(vaginal lavage)에서는 이 B6.1 단항체가 검출되지 않았다. 면역조직화학(immunohistochemistry) 결과는 B6.1 항체가 질을 형성하고 있는 내피세포 조직의 myometrium에 분포되어 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이는 B6.1 항체가 질내부 조직으로 이동되어 질감염시 *C. albicans* yeast cells이 질조직안으로 침입(infiltration)하였을 때 이 항체와 neutrophils이 합동하여 yeast cells을 탐식작용에 의하여 제거하는 것으로 인식된다. 위의 결과들을 종합하면, IgM B6.1 단항체는 myometrium에 도달하며 이 myometrium을 통과하였다더라도 그 양이 너무 소량(예; picogram 이하)이어서 기존의 ELISA 방법의 검색 한계를 벗어난 것으로 추정된다. 하지만, 많은 양의 항체를 같은 경로로 투여하였을 때 그 결과가 비슷하여 IgM B6.1이 질속(Vaginal lumen)으로 분비되지 못할 수 있음도 고려된다. 이런 이유로 100% yeast cells 제거가 달성되지 못하는 것으로 보여진다(Fig. 4 참조).

생쥐 순환계 내 호중구를 제거시키기 위해 사용된 RB6-8C5 단항체는 B6.1 단항체와 생쥐 내부에 같이 존재할 때도 항체간에는 서로 영향을 주지 않으며, RB6-8C5 단항체의 호중구 감소 효과가 있음을 알 수 있었다. 이러한 호중구 존재여부는 *C. albicans* 질감염에 대한 B6.1 단항체의 항칸디다질감염효과 감소와 관련됨을 알 수 있다. 이것은 RB6-8C5로 호중구가 제거된 생쥐에서는 B6.1 항체를 투여받았을 때도 질감염에 대한 효과가 없으나 호중구가 정상적으로 존재할 경우는 B6.1 항체의 질감염에 대한 효력이 유지되기 때문이다.

이러한 효과는 B6.1 항체가 opsonin을 통한 호중구의 탐식작용 증진에 의한 것으로, 본 연구팀의 이전 *In-Vitro* 연구결과와 상통한다. 즉, *C. albicans* 균이 B6.1 항체로 먼저 처리되고 (opsonization) BALB/c 생쥐에서 분리된 호중구와 혼합했을 때 B6.1 항체로 opsonization된 균은 호중구에 의하여 탐식이 된 후 사멸되거나 opsonization되지 못한 균은 설사 탐식이 되더라도 호중구 내부에서 파괴되지 않음을 전자 현미경하에서 관찰한 결과¹³⁾와 일치한다.

결론적으로 본 연구결과는 *C. albicans*로 유발된 칸디다질감염에 호중구가 B6.1 단항체의 항질감염효과에 관여함을 규명하였으며 이는 opsonin 효과 증진에 의한 것으로 사려된다.

문 헌

- 1) Edwards, J. E. : Invasive Candida infections: evolution of a fungal pathogen. *N. Engl. Med.* **324**, 1060 (1991).
- 2) Bodey, G. P. : The emergence of fungi as major hospital pathogens. *J. Hosp. Infect.* **11**, 411 (1988).
- 3) Anttila, V. J., Ruutu, P., Bondestam, S., Jansson, S. E., Nordling, S., Farkkil'a, M., Sivonen, A., Castren, M. and Ruutu, T. : Hepatosplenic yeast infection in patients with acute leukemia: a diagnostic problem. *Clin. Infect. Dis.* **18**, 979 (1994).
- 4) Komshian, S. V., Uwaydah, A. K., Sobel, J. D. and Crane, L. R. : Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev. Infect. Dis.* **11**, 379 (1989).
- 5) Sobel, J. D. : Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **152**, 924 (1985).
- 6) Sobel, J. D. : Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **544**, 547 (1988).
- 7) Fidel, P. L., Lynch, M. E., Conaway, D. H., Tait, L. and Sobel, J. D. : Mice immunized by primary vaginal *Candida albicans* infection develop acquired vaginal mucosal immunity. *Infect. Immun.* **63**, 547 (1995).
- 8) Fidel, P. L., Lynch, M. E. and Sobel, J. D. : Candida-specific cell mediated immunity is demonstrable in mice with with experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.* **61**, 1990 (1993b).
- 9) Cassone, A., Bocanera, M., Adriani, D., Santoni, G. and De Bernardis, F. : Rats clearing a vaginal infection by *Candida albicans* acquire specific, antibody-mediated resistance to vaginal infection to vaginal infection. *Infect. Immun.* **63**, 2619 (1995).
- 10) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
- 11) Han, Y., Ulrich, M. and Cutler, J. E. : *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J. Infect. Dis.* **179**, 1477 (1999).
- 12) Han, Y., Morrison, R. P. and Cutler, J. E. : A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect. Immun.* **66**, 5771 (1998).
- 13) Caesar-TonThat, T. C. and Cutler, J. E. : A monoclonal antibody to *Candida albicans* enhances mouse neutrophil candidacidal activity. *Infect. Immun.* **65**, 5354 (1997).
- 14) Han, Y., Kozel, T. R., Zhang, M. X., MacGill, R. S., Carroll, M. C. and Cutler, J. E. : Complement is essential for protection by an IgM and IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J. Immunol.* **167**, 1550 (2001).
- 15) Czuprynski, C. J., Brown, J. F., Matoushek, N., Wagner, R. D. and Steinberg, H. : Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **152**, 1836 (1994).
- 16) Pekara, L. A., Starr, B. A., Toledano, A. Y. and Schreiber H. : Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 435 (1995).
- 17) Han, Y., Kanbe, T. K., Cherniak, R. and Cutler, J. E. : Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect. Immun.* **65**, 4100 (1997).
- 18) Han, Y. and Cutler, J. E. : Assessment of a mouse model of neutropenia and the effect of an anti-candidiasis monoclonal antibody in these animals. *J. Infect. Dis.* **175**, 1169 (1997).
- 19) Han, Y., van Rooijen, N. and Cutler, J. E. : Binding of *Candida albicans* yeast cells to mouse popliteal lymph node is mediated by macrophages. *Infect. Immun.* **61**, 3244 (1993).
- 20) Opdenakker, G., Fibbe, W. E. and Damme J. V. : The molecular basis of leukocytosis. *Immunol. Today* **19**(4), 182 (1998).