

## 폐렴구균 전신감염에 대한 협막·표면단백질 접합백신의 효과

한용문<sup>#</sup> · 이주희

동덕여자대학교 약학대학

(Received November 1, 2004; Revised November 24, 2004)

### A Pneumococcal Conjugate Vaccine Formula Induces Protection in Mice Against Disseminated Disease due to *Streptococcus pneumoniae*

Yongmoon Han<sup>#</sup> and Jue-Hee Lee

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

**Abstract** — In the present work to determine effect of a *Streptococcus pneumoniae* conjugate vaccine, *S. pneumoniae* capsule attached to the surface protein (JY-Pol) was examined. This JY-Pol contained approximately 92% and 6% carbohydrate and protein, respectively. Gel electrophoresis revealed the presence of the surface protein in the JY-Pol. By the double immunodiffusion and isotyping ELISA analyses, administration of JY-Pol that was adsorbed to alum adjuvant (JY-Pol/Alum) into mice induced IgM, IgG, and IgA specific for the *S. pneumoniae* capsule. The ATCC capsular polysaccharide adsorbed to alum (ATCC-Pol/Alum) provoked only IgM in mice. In survival tests, mice that were immunized with the JY-Pol/Alum before intravenous challenge with live *S. pneumoniae* survived entire period of 46 day-observation, whereas all mice that received ATCC-Pol/Alum or only diluent instead of the vaccination died within 5 and 12 days, respectively. Results from footpad-edema test showed that JY-Pol/Alum formula provoked the cellular immunity as determined by swelling of the mouse footpad. These data indicate that the naturally conjugated JY-Pol enhances resistance of mice against disseminated pneumococcal disease due to *S. pneumoniae* by both humoral and cellular immune responses.

**Keywords** □ *S. pneumoniae*, pneumococcal capsule, surface protein, conjugate vaccine, humoral and cellular immune responses

폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)은 협막으로 싸여있는 Gram 양성세균으로 내기성 혐기성균(aerotolerant anaerobe)이다. Catalase 음성으로 배양조건이 까다로우며 CO<sub>2</sub> 하의 혈액 배지에서 가장 잘 자라며, 혈액배지에서 β-용혈성인 *Streptococcus* Group A와 달리 α-용혈성(α-hemolysis) 집락을 형성하고, 담즙용해성(bile solubility)과 optochin(ethyl hydrocupreine hydrochloride)에의 감수성이 있어 다른 연쇄상 구균과 구별할 수 있다.<sup>1)</sup> 또한 자가용해성(autolysis)이 있어서 배양이 오래된 집락에서는 집락 중앙이 함몰되는 것을 관찰할 수 있다.

폐렴구균의 대표적인 발병성인자(virulence factor)로 pneumolysin, neuraminidases, hyaluronidase, 표면단백질(surface protein)인 PspA(Pneumococcal surface protein A), CbpA

(choline-binding protein A), PsaA(pneumococcal surface adhesinA), 그리고 autolysin(LytA) 등이 포함되어 있다.<sup>2,3)</sup> 이 중 PspA는 lactoferrin 결합성 단백질로 폐렴구균에 의한 보체활성화를 억제 한다.<sup>4,5)</sup> 폐렴구균의 협막다당물질(capsular polysaccharides)은 주요한 발병인자로 알려져 있다.<sup>6)</sup> 협막다당물질의 양은 발병력과 직접적으로 관계가 있고,<sup>7,8)</sup> 이것의 항식균작용(antiphagocytic activity)은 폐렴구균의 발병력을 결정하는 데에 중요한 요소로 고려 된다.<sup>9)</sup>

폐렴구균은 세균성 급성 호흡기 질환을 일으켜 사망률 1위<sup>10-12)</sup>를 차지하며 폐렴 이외에도 균혈증(bacteremia), 수막염(meningitis), 중이염(otitis media), 부비동염(sinusitis) 등을 유발하는 균으로, 특히 항생제에 대한 내성이 높아 발병률과 사망률이 대단히 높다.<sup>10,11,13)</sup> 한 예로, 전 세계적으로 두 살 미만의 유아에서만 매년 100만 명 이상의 사망이 보고되고 있다. 이런 이유로 백신에 의한 예방에 많은 의존을 하고 있다. 기존의 폐렴 예방용 다당류(capsular pneumococcal polysaccharide) 백신은 주로 2세 미만

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195  
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

의 유아와 노약자 등에게는 효력이 매우 약하다.<sup>14,15)</sup> 이는 면역계 미성숙과 약화 때문에 T-림프구 비의존성 반응(T-lymphocyte independent response)으로 항체가 생성되어도 면역기억(Immune memory)이 없어 효과가 낮고 지속적인 예방효과가 없기 때문이다. 이런 이유로 새로운 폐렴구균 백신개발이 집중적으로 연구되고 있다.<sup>12,16)</sup> 특히, 새로운 종류의 백신으로 T-lymphocyte 의존성 백신개발은 중요 할 것으로 고려된다. 또 다른 발병인자인 pneumolysin은 독성이 매우 높아서 항원으로서 용량조절이 어렵다. 그래서 pneumolysin 생성이 약화된 균주 또는 생성하지 못하는 변종을 이용한 생균백신이 연구되고 있지만 약화 생균백신의 큰 단점인 인체 내에서의 병원성 회복으로 인해 질병을 일으킬 수 있는 단점이 있다.

이런 점을 고려하여 본 연구에서는 폐렴구균의 핵막과 표면단백질을 함유하고 있는 항원물질을 분리하여 폐렴구균 전신감염에 대한 효과를 조사하였다.

## 재료 및 실험방법

### 균주 및 배양조건

*S. pneumoniae* Serotype 4는 ATCC(American Tissues and Cell Cultures)에서 구입하여 혈액배지(Blood agar; Becton Dickinson Co.)와 BHI(Brain Heart Infusion; Difco, USA) 액체 배지를 이용하여 37°C에서 배양하여 사용하였다. ATCC capsular polysaccharide(ATCC-pol)도 ATCC에서 구입하여 본 실험에서 추출 분리된 capsular polysaccharide와 비교하였다.

### 동물

6주령의 inbred BALB/c 암컷(female) 생쥐는 Charles River 연구소에서 구입하여 사용하였으며, 이 동물들은 고압멸균한 filtertop cage에서 멸균한 물과 사료(Orient Co., Seoul, Korea)를 자유롭게 먹게 하고, 항원조와 공기여과장치가 완비된 청결한 동물 사육실에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물사육실은 온도 25°C, 상대습도 50~60%로 유지하고, 조명은 12시간마다 낮과 밤이 반복되도록 조절하였다.

### 시료

Trypan Blue(T-6146), DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline; D-8662), phenol(P-4161), OPD(O-phenylenediamine; D-8662), sodium acetate(S-7670), chloroform(C-2432), polyacrylamide(A-3553), Bis(M-7279), Tris-HCl(T-3253), Tris-Base(T-1503), sodium dodecyl sulfate(SDS; L-4509), ammonium sulfate(A-3678), TEMED(T-9281), glycine(G-8898), 2-mercaptoethanol(M-6250), dithiothreitol(DTT; D-9779)]와 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)에 사용되는 항체[goat

anti-mouse IgA(M-8769), goat anti-mouse IgG(M-1397), rabbit anti-goat antibody(whole molecule; A-5420), rabbit anti-goat IgM(M-8644), 그리고 antimouse polyvalent immunoglobulin (A-0412)]는 모두 Sigma에서 구입하였고 ethanol과 sulfuric acid는 Aldrich에서 구입해서 사용하였다.

### 폐렴구균 다당류 항원 추출

폐렴구균 다당류 항원 추출은 기존의 알려진 방법<sup>17,18)</sup>을 부분적으로 변경하여 추출하였다. 즉, *S. pneumoniae* Serotype 4(ATCC)를 BHI 액체배지에 접종하여 5% CO<sub>2</sub> 존재 하에 37°C에서 96시간 동안 배양하고 phenol(최종 농도 0.1%)을 첨가하여 24시간 실온에서 배양한 후 원심분리하여 세포를 제거하고 상등액을 수집하였다. 이 상등액에 초산나트륨과 에탄올을 첨가 후 흰색 침전을 수집하여 멸균수로 세척하고 클로로포름을 첨가하여 클로로포름 용해 부분을 제거한 후 다음 수용성 부분을 수집하여 동결건조 하였다. 분리된 *S. pneumoniae* 핵막다당물질(JY-Pol)의 탄수화물 함유량을 phenol-sulfuric acid 정성 및 정량방법<sup>19)</sup>으로 검색하였으며 단백질 함량은 BCA(Bicinchoninic acid) 정량 Kit(Pierce, Rockford, USA)을 사용하여 측정하였다. 추출된 JY-Pol의 단백질 성상을 검색하기 위하여 Lamml<sup>20)</sup>의 방법에 근거하여 불연속 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 방법을 사용하였다. Molecular marker는 Sigma에서 구입하였으며, 시료는 각 well에 10 µl씩 넣었으며 200 volt에서 전기영동을 시행하였다.

### 항체생성 및 면역효과 검색

JY-Pol의 항원성(Immunogenicity)을 검색하기 위하여 JY-Pol/Alum을 BALB/c 생쥐에 복강 투여하였다. 이 JY-Pol/Alum 백신 제형은 JY-Pol을 Alum(Pierce)에 점차적으로 혼합하여 실온에서 일정기간 반응시킨 후 원심분리 방법으로 멸균된 DPBS로 세 번 세척하고 재차 DPBS에 현탁시켜 생쥐 한 마리당 0.2 ml씩 복강 투여 하였다. 면역는 일정한 접종계획에 따라 시행하였다. 1차 면역 접종된 생쥐를 3번 더 동일한 투여경로로 boosting을 한 후 항체생성 유무를 검사하였다. 항원성의 또 다른 비교를 위하여 폐렴구균을 열로 처리하여(Heat-killed *S. pneumoniae*; HKSP) BALB/c 생쥐를 면역시켜 그 항체 생성을 비교하였다. 항체 생성 검사는 면역된 생쥐의 꼬리 동맥에서 채혈 후 혈청을 수집하여 JY-Pol로 coating된 latex-beads(JY-Pol latex beads)를 사용한 항원 항체 반응과 ELISA 방법으로 검색하였다. 생성된 항체의 Isotyping는 Double Immuno-diffusion(Ouchterlony) 방법<sup>21)</sup> 및 ELISA 방법<sup>22)</sup>으로 검색하였다. 이 ELISA에서 항원은 JY-Pol (2 µg/well)로 coating하여 사용하였으며, isotyping ELISA에서는 anti JY-Pol antiserum을 이용한 sandwich ELISA 방법을 적용하였다.

### ELISA 및 double immunodiffusion

ELISA 방법은 JY-Pol 1 mg을 10 ml 인산완충용액에 용해하여 96-well plate에 100  $\mu$ 씩 담은 후 냉장고에서 24시간 배양하고 Tris 완충용액으로 세척하고 수집된 혈청을 DPBS로 1/50으로 희석하여 100  $\mu$  넣고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 배양 후 Tris 완충용액으로 세척하였다. 그 다음 anti-mouse polyvalent Ig's를 넣고 1시간 배양한 다음, 세척하고 OPD를 넣고 20분 동안 반응 시킨 후에 색깔 변색은 황산으로 정지시켰다. 변색 정도는 plate reader(Bio-Tek, England)로 490 nm에서 측정하였다. Isotyping ELISA는 JY-Pol이 coating된 96-well plate에 희석된 혈청을 넣고 위와 같이 처리한 후 염소에서 생산된 antimouse IgG, antimouse IgM, antimouse IgA를 1:1000으로 희석하여 각각 반응시킨 후 Tris 완충용액으로 세척하고 anti-goat IgG, anti-goat IgA, 그리고 anti-goat IgM 으로 처리한 다음 상기에 기술한 방법으로 OPD를 넣고 변색유무를 plate reader로 측정하였다.

Double immunodiffusion 방법은 agarose(SeaKem, FMC, Germany)를 DPBS에 넣고 용해시킨 후 직경 5 cm plate에 부은 다음 실온에서 응고시킨 후에, 직경 0.4 mm well을 만든 다음 중앙에 위치한 well에는 면역 혈청을 주입하고 주변에는 1:100으로 희석한 anti-IgG, anti-IgA, 그리고 anti-IgM을 20  $\mu$ 씩 주입하고 실온에서 48시간 반응 후에 항원-항체 반응으로 형성된 밴드 유무를 검사하였다.

항체 역가와 종류는 anti JY-Pol antiserum을 DPBS로 계대 희석하여 측정하였다. 이 때 사용된 항원인 JY-Pol은 latex beads에 coating하여 사용하였다. 항체 역가는 JY-Pol latex beads와 상기 기술된 ELISA 방법으로 항체생성 역가를 검색하였다.

### JY-Pol/Alum 효과 검사

BALB/c 생쥐를 JY-Pol/Alum으로 상기 기술한 방법과 동일하게 면역시킨 후 BHI broth에서 배양한 폐렴구균을 DPBS으로 세척한 후 일정량(10<sup>7</sup> cells/mouse)을 이 생쥐의 꼬리정맥으로 주사하여 전신감염 시켰다. 대조군은 Alum만 투여한 후 동일한 방법으로 감염시킨 후 생존시간을 측정하여 이 협막 백신의 효과를 검사하였다. 효과 측정은 생존율의 평균생존시간(Mean Survival Times; MST)으로 평가하였다.

### 세포면역성(Cell-Mediated Immunity) 효과조사

BALB/c 생쥐를 JY-Pol/Alum으로 상기 기술한 동일한 방법으로 면역시킨 후 생쥐 발바닥(footpads)에 JY-Pol/Alum을 10  $\mu$  투여한 다음 24시간과 48시간 후 footpads의 부종정도를 Dial gauger(Mitutoyo; Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다. 대조군 생쥐는 Alum 또는 DPBS만 투여 받았다.

### 통계

생존율의 통계적 유의성은 Kaplan-Meier Test 방법(Systat 7.0; New Statistics for Windows; SPSS, Chicago, IL, USA)으로 산출하였으며, 그 이외의 통계분석은 Student's *t* test 방법을 적용하였다. 대조군과의 비교하였을 때 *P* 값이 0.05 보다 작을 경우는 유의성이 있는 것으로 판정 하였다.

## 결 과

### 폐렴구균 협막 다당물질 분리 및 특성규명

분리된 *S. pneumoniae* 협막 다당물질(JY-Pol)을 ATCC에서 구입한 *S. pneumoniae* 협막 다당물질(ATCC-Polysaccharide; ATCC-Pol)과 비교한 결과는 다음과 같았다(Table I). JY-Pol에는 탄수화물이 92% 정도 함유되어 있으며 이 함유량은 ATCC-Pol을 사용하여 비교하였을 때 별 차이가 없음을 알 수 있었다. BCA protein 정량 방법으로 단백질 함유량을 측정하였을 때 JY-Pol이 5%로 ATCC-Pol의 4%에 비해 다소 높은 것으로 분석되었다.

### JY-Pol의 항폐렴구균 항체생성 유도성

분리된 JY-Pol의 항체 유도성을 조사하기 위하여 JY-Pol/Alum으로 BALB/c 생쥐를 여러 농도에서 면역 접종한 후 항체생성 유무를 응집(agglutination) 반응으로 확인하고, 항체생성 정도는 ELISA로 측정하였다. 이 ELISA 결과에서 JY-Pol/Alum은 ATCC-Pol 보다 10배 이상으로 항원-항체 응집반응이 있는 것으로 측정

Table I – Analyses of carbohydrate and protein amounts in the JY-Pol

	JY-Pol <sup>1</sup>	ATCC-Pol <sup>2</sup>
Carbohydrate (Phenol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	92%	94%
Protein (BCA Assay)	6%	4%

<sup>1</sup>JY-Pol means *S. pneumoniae* capsular polysaccharide isolated in this work.

<sup>2</sup>ATCC-Pol means *S. pneumoniae* capsular polysaccharide purchased from the ATCC.

Table II – JY-Pol/Alum induces humoral immune response in BALB/c mice

Antiserum	Dilutions <sup>1</sup>				
	0	50	500	5000	50000
Anti HKSP <sup>2</sup>	+	+	+	-	-
Anti JY-Pol <sup>3</sup> /A <sup>4</sup>	+	+	+	+	-
Anti ATCC-Pol <sup>5</sup> /A	+	+	+	-	-

<sup>1</sup>The dilutions indicate reciprocal numbers of the actual dilution factors.

<sup>2</sup>HKSP stands for heat-killed *S. pneumoniae*.

<sup>3</sup>JY-Pol means *S. pneumoniae* capsular polysaccharide isolated in this work.

<sup>4</sup>The A stands for alum.

<sup>5</sup>ATCC-Pol means *S. pneumoniae* capsular polysaccharide purchased from the ATCC.

**Table III** – JY-Pol/Alum vaccine formula provokes high titers of IgM and IgG as determined by ELISA method

	IgA	IgG	IgM
NMS <sup>1</sup>	0.369±0.019	0.341±0.015	0.583±0.057
α-HKSP <sup>2</sup>	0.477±0.15	1.112±0.065	1.279±0.036
α-JY-Pol <sup>3</sup> /A <sup>4</sup>	0.469±0.025	0.615±0.073	1.428±0.020
α-ATCC-Pol <sup>5</sup> /A	0.348±0.046	0.378±0.046	1.349±0.045

Note: These values were calculated as mean±SE. Each of the antisera were significantly different to a corresponding value of the NMS ( $P<0.05$ ).

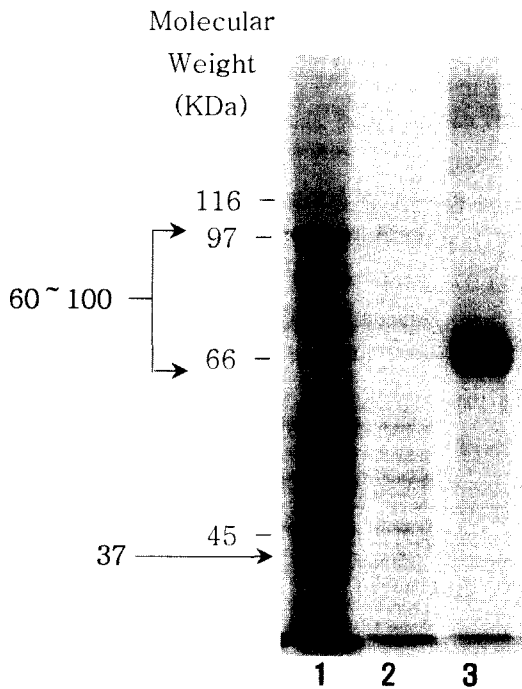
<sup>1</sup>NMS stands for normal mouse serum.

<sup>2</sup>HKSP stands for heat-killed *S. pneumoniae*.

<sup>3</sup>JY-Pol means *S. pneumoniae* capsular polysaccharide isolated in this work.

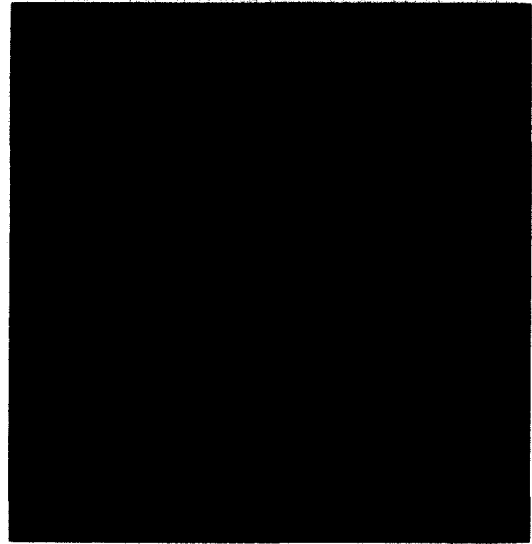
<sup>4</sup>A stands for alum.

<sup>5</sup>ATCC-Pol means *S. pneumoniae* capsular polysaccharide purchased from the ATCC.



**Fig. 1** – Electrophoresis analysis of the JY-Pol. The JY-Pol was analyzed by SDS-PAGE. Results showed that the JY-Pol contained *S. pneumoniae* surface protein besides carbohydrate. The ATCC-Pol also had some protein. Difference of the band intensity between the two samples was due to different amount of these samples applied on to the gel. Band at 37 KDa indicates PsaA and bands ranged from 60 to 100 KDa show PspA. BSA was used as an another molecular marker. Lane: 1. JY-Pol (10 µg); 2. ATCC-Pol (10 µg); 3. BSA (10 µg).

되었으며, 항체역가 측정시 JY-Pol로 면역된 생쥐는 1/5000 희석에서도 반응이 확인되었다. 또 다른 대조군으로, BALB/c 생쥐에 고압멸균으로 사멸된 폐렴구균(Heat-killed *S. pneumoniae*; HKSP)으로 면역된 생쥐에서 분리된 혈청을 사용하였다. 이 경우에도 항체생성 정도는 ATCC-Pol의 항체유도성 결과와 거의



**Fig. 2** – Anti JY-Pol antiserum contains IgM, IgG and IgA as demonstrated by double immunodiffusion method. Anti JY-Pol antiserum reacted with anti-IgM, anti-IgA, and anti-IgG, respectively, forming a band between the antiserum and respective test antibody, whereas the antiserum caused no band against NMS and DPBS that were used as controls. These results confirmed results from the ELISA analysis listed in the Table III. Well : Center, anti-JY-Pol antiserum; 1. NMS (Normal mouse serum); 2. DPBS (diluent; Dulbecco's phosphate buffered saline); 3. anti-IgM; 4. anti-IgA; 5. anti-IgG; 6. none.

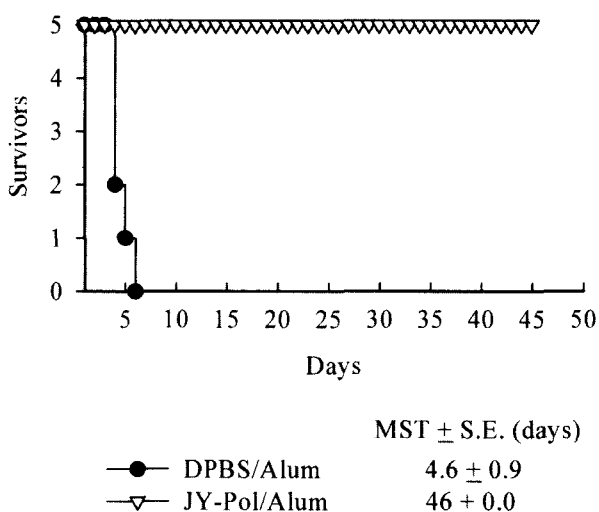
동일하였다(Table II).

#### 항체종류(Isotype) 검색

생성된 anti-JY-Pol antiserum의 항체 종류를 확인 하기위하여 isotyping ELISA 방법을 사용하였다. Isotyping ELISA 결과 anti-JY-Pol antiserum에는 IgM 뿐만 아니라 IgG 이외에도 소량의 IgA도 생성됨을 확인할 수 있었으나, 그 반면에 ATCC-Pol은 오직 IgM만 유도하였다(Table III). 이 ELISA의 측정치[mean+SE(standard error)]를 음성대조군으로 사용된 NMS(normal mouse serum)의 ELISA 배경측정치와 비교하였을 때 각각의 차이는 통계적으로 유의성이 있었다( $P<0.05$ ). 흡광도는 이 결과로 볼 때, JY-Pol에 포함되어 있는 단백질 성분이 IgG 항체도 유도하였을 것으로 추정되며, ATCC-Pol에 함유된 단백질(Table I 참조)은 JY-Pol과 같은 유도성이 없는 것으로 사려 된다. Double Immunodiffusion 방법으로 검색한 결과에서도 JY-Pol은 IgM과 IgG 이외에도 IgA 생성이 확인되었다(Fig. 2).

#### JY-Pol/Alum 백신제형의 전신감염에 대한 효과

JY-Pol/Alum 백신제형(vaccine formula)의 능동면역 효과를 조사하기 위하여 BALB/c 생쥐를 면역시킨 후 폐렴구균으로 감염시켰다. 그 결과 면역된 생쥐는 폐렴구균 전신감염에 예방효과



**Fig. 3** - JY-Pol/Alum vaccine formula protects mice against disseminated infection due to *S. pneumoniae*. All mice that immunized with JY-Pol/Alum before intravenous injection of live *S. pneumoniae* survived during the entire 46 days-observation period, whereas control mice given DPBS/Alum before the challenge died within 6 days. Difference between the two groups was statistically significant ( $P < 0.001$ ).

가 있어 그 생존률이 대조군에 비하여 매우 높음을 알 수 있었다(Fig. 3). JY-Pol/Alum으로 면역된 생쥐는 45일 관찰기간 동안 한 마리도 죽지 않은 반면 DPBS/Alum을 투여 받은 대조 생쥐 그룹은 폐렴구균으로 감염된지 6일 만에 모두 다 죽었다. 평균 생존기간을 비교하면 각각의 경우  $46 \pm 0.0$ [MST(mean survival time)+SE] 일과  $4.6 \pm 0.9$  일로 관찰되었다. 이 두 그룹의 생존율을 비교는 통계적으로 유의성이 있었다( $P < 0.001$ ). ATCC-Pol/Alum으로 면역된 생쥐는 감염 후 10 일 이내에 모두 죽었으며, 사멸된 균(HKSP)도 예방효과는 미미하였다(data not shown).

**작용기전 검사**

JY-Pol/Alum은 폐렴구균 전신감염에 효과가 있음이 관찰되어 이 백신제형의 작용기전을 조사하였다. 먼저 세포면역성 효과 검

색결과 JY-Pol/Alum으로 면역된 생쥐의 족부종을 측정하였을 때, DPBS만 투여 받은 그룹에 비하여 24시간 후에는 47%, 48시간 후에는 31% 정도의 차이가 있음이 측정되어 JY-Pol/Alum vaccine formula는 CMI(Cellular Mediated Immunity) 효과가 있음을 알 수 있었다(Table IV). 또한 이 효과는 ATCC-Pol보다 더 장시간 동안 지속됨이 관찰되었다.

**고 찰**

항체 생성유도는 이론적으로 고려할 때 항원을 투여하면 항체가 항상 생성되는 것으로 인식되지만 모든 항원이 항체생성을 유도하는 것은 아니다. 그러므로 백신개발에서 면역성(Immunogenicity) 획득을 위해 다양한 방법이 사용된다. 대표적인 방법으로 보조제 첨가, 항원변조 등의 면역조절 방법을 사용한다. 그러나, 항체가 유도되어도 효과가 없으면 의미가 없다. 실제로 대부분 병원성 세균과 진균의 표면은 탄수화물로 구성되어 있어 항체생성이 유도되어도 T-lymphocyte 비의존성으로 인한 specific memory가 결여된 항체의 생성으로 인해 효능이 낮다. 그러므로 표면이 탄수화물인 병원균에 대한 백신개발에는 T-lymphocyte 의존성의 인지의 여부를 항상 고려하여야 한다. 본 연구에서는 협막을 인식하고 T-lymphocyte 의존성이 있는 물질을 항원으로 하여 항체생성 유도성과 예방효과를 조사하였다.

분리된 JY-Pol에는 43 KDa의 폐렴구균 표면단백질이 함유되어 있음이 밝혀졌고 그 이외에도 다른 종류의 표면단백질이 인식되었다. 만약 이 표면단백질이 IgG 생성에 관여하였다면 JY-Pol은 자연적으로 탄수화물과 단백질이 결합된 접합백신(Conjugate vaccine) 형태로 분리된 것으로 고려해 볼 수 있다. 실제로 많은 다른 연구<sup>23,24)</sup>에서 폐렴구균의 협막을 BSA(bovine serum albumin) 또는 tetanus toxoid 등의 타중(heterogeneous)의 단백질을 복잡한 화학적 방법으로 결합한 접합백신을 제조하여 효능을 조사하기도 한다. 이런 점에 비교하면 JY-Pol은 순접제 동종(homogeneous)의 단백질에 결합된 접합백신이라 할 수 있다.

JY-Pol의 예방효과 조사는 생쥐에 폐렴구균을 정맥주사하여 대

**Table IV** - JY-Pol/Alum vaccine also induces cellular immune response in BALB/c mice  
BALB/c mice immunized with

		DPBS/A <sup>1</sup>		JY-Pol <sup>2</sup> /A		ATCC-Pol <sup>3</sup> /A	
		A	DPBS	A	JY-P/A	A	ATCC-P/A
Footpad-Thickness	24 h	70.8±2.9 <sup>4</sup>	66.8±4.1	79.0±2.6	98.3±4.4	75.8±3.0	85.5±3.6
	48 h	64.8±2.0	64.3±1.5	68.5±6.5	84.0±2.6	65.8±2.9	74.0±3.1

Note: These values were calculated as mean±SE. Difference between swelling from JY-Pol/A and swelling from DPBS/A was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>A stands for alum.

<sup>2</sup>JY-Pol means *S. pneumoniae* capsular polysaccharide isolated in this work.

<sup>3</sup>ATCC-Pol means *S. pneumoniae* capsular polysaccharide purchased from the ATCC.

<sup>4</sup>Arbitrary unit.

락 10일 이내에 죽는 전신감염 동물모델을 먼저 설정하여 효과를 측정하였으며 면역효과는 두 가지 측면에서 조사하였다. JY-Pol/Alum으로 면역 후 폐렴구균으로 감염시킨 생쥐는 관찰기간 모두 생존한 반면 대조군의 생쥐는 5일 이전에 모두 치사하였다. 그러나, IgM만을 유도하는 ATCC-Pol/Alum으로 면역된 생쥐는 폐렴구균으로 감염 후 10일 이내에 모두 죽은 결과와 비교하면 JY-Pol/Alum의 예방효과가 매우 우수함을 알 수 있다. 이런 효과 차이는 JY-Pol 항원의 IgG 및 IgA 항체의 유도로 사료된다. 또한, JY-Pol의 세포면역성 효과 여부조사에서 JY-Pol의 경우 24시간 후 생성된 죽부종이 48시간 후에도 지속되어 JY-Pol이 항체 유도성 이외에도 세포매개성 면역효과도 있음이 확인되어 JY-Pol은 폐렴구균 전신성 감염에 체액성 면역과 세포매개성 면역 모두가 작용하는 것으로 사료된다. 결론적으로 자연적으로 폐렴구균 협막과 표면단백질로 구성된 JY-Pol은 일종의 접합백신으로 그 예방효과가 대단히 높으며 이런 점에서 기존의 방법인 협막에 외부단백질을 화학적 방법에 의한 고비용의 인위적인 접합방법과 비교할 때 의미가 있다고 하겠다.

현재 진행되는 연구로, JY-Pol/Alum으로 면역된 생쥐에서 Hybridom fusion 방법으로 단항체를 분리하여 그 효과를 검색하고 탄수화물 항원기를 Phage Display Peptide Library 방법으로 단백질화를 하여 DNA 백신개발을 진행 중에 있다.

## 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 독성연구원의 바이오제품의 독성·약리·임상 평가기술개발사업[바이오 030-032-3]의 연구지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 문헌

- Mundy, L. S., Janoff, E. N., Schwebke, K. E., Shanholtzer, C. J. and Willard, K. E. : Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Optochin, bile solubility, quellung, and the AccuProbe DNA probe test. *Am. J. Clin. Pathol.* **109**, 55 (1988).
- Mitchell, T. J. : Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res. Microbiol.* **151**, 419 (2000).
- Jedrzejewski, M. J. : Pneumococcal virulence factors : structure and function. *Microbio. Mol. Biol. Rev.* **65**, 187 (2001).
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P. H. and Chhatwal, G. S. : Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **67**, 1683 (1999).
- Tu, A. H., Fulgham, R. L., McCrory, M. A., Briles, D. E. and Szalai, A. J. : Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **67**, 4720 (1999).
- Magee, A. D. and Yother, J. : Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **69**, 3755 (2001).
- Kim, J. O. and Weiser, J. N. : Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect Dis.* **177**, 368 (1988).
- MacLeod, C. M. and Krauss, M. R. : Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed *in vitro*. *J. Exp. Med.* **92**, 1 (1950).
- Tuomanen, E. I. and Masure, R. H. : Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. In: *Streptococcus pneumoniae molecular biology and mechanism of disease*. Mary Ann Liebert. New York, 295 (2000).
- Paganin, F., Lilienthal, F., Bourdin, A., Lugagne, N., Tixier, F., Genin, R. and Yvin, J. L. : Severe community-acquired pneumonia: assessment of microbial aetiology as mortality factor. *Eur. Respir. J.* **24**, 779 (2004).
- Ogunniyi, A. D., Giammarinaro, P. and Paton, J. C. : The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed *in vivo*. *Microbiology* **148**, 2045 (2002).
- Lesinski, G. B. and Westerink, M. A. : Vaccines against polysaccharide antigens. *Curr. Drug. Targets. Infect Disord.* **1**, 325 (2001).
- Bosarge, J. R., Watt, J. M., McDaniel, D. O., Swiatlo, E. and McDaniel, L. S. : Genetic immunization with the region encoding the alpha-helical domain of PspA elicits protective immunity against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **69**, 5456 (2001).
- Dagan, R. : Pneumococcal conjugate vaccines: The potential to alter antibiotic use and nasopharyngeal carriage. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* **63**, A22 (2002).
- Pelton, S. I., Dagan R., Gaines, B. M., Klugman, K. P., Laufer, D., O'Brien, K. and Schmitt, H. J. : Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an Interactive Symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Vaccine*. **21**, 562 (2003).
- Lesinski, G. B., Smithson, S. L., Srivastava, N., Chen, D., Widera, G. and Westerink, M. A. : A DNA vaccine encoding a peptide mimic of *Streptococcus pneumoniae* serotype 4 capsular polysaccharide induces specific anti-carbohydrate antibodies in Balb/c mice. *Vaccine* **19**, 1717 (2001).
- Heidelberger, M., Kendall, F. E. and Scherp, H. W. : The specific polysaccharide of Type I, II, and III pneumococcus: A revision of method and data. *J. Exp. Med.* **64**, 559 (1936).

- 18) How, M. J., Brimacombe, J. S. and Stacey, M. : The pneumococcal polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem.* **19**, 303 (1964).
- 19) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350 (1956).
- 20) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
- 21) Ouchterlony, O. : Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: FC Hay and L Hudson, Editors. Practical immunology, Blackwell, Michigan. p. 110 (1976).
- 22) Valadon, P. and Scharff, M. D. : Enhancement of ELISAs for screening peptides in epitope phage display libraries. *J. Immunol. Methods* **197**, 171 (1996).
- 23) Amir-Kroll, H., Nussbaum, G. and Cohen, I. R. : Proteins and their derived peptides as carriers in a conjugate vaccine for *Streptococcus pneumoniae*: self-heat shock protein 60 and tetanus toxoid. *J. Immunol.* **170**, 6165 (2003).
- 24) Ahman, H., Kayhty, H., Lehtonen, H., Leroy, O., Froeschle, J. and Eskola, J. : *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine is immunogenic in early infancy and able to induce immunologic memory. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**, 211 (1998).