

JY-Pol 접합백신으로 유도된 항폐렴구균 항체의 보호효과

이주희 · 한용문[#]

동덕여자대학교 약학대학

(Received November 9, 2004; Revised December 2, 2004)

Antibody Induced by the JY-Pol Pneumococcal Conjugate Protects Mice Against Systemic Infection Due to *Streptococcus pneumoniae*

Jue-Hee Lee and Yongmoon Han[#]

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

Abstract — We previously reported that *Streptococcus pneumoniae* capsule attached to the surface protein (JY-Pol) was protective to systemic pneumococcal infection. The JY-Pol antigen induced IgM, IgG, and IgA in mice and provoked cell-mediated immunity. In this current study, we investigated the effect of anti JY-Pol antiserum and monoclonal antibody C2 (MAb C2) specific for the JY-Pol antigen against the pneumococcal disease. Mice that were given the antiserum survived longer than mice that received antiserum pre-absorbed with *S. pneumoniae* cells or DPBS as a negative control. Heat-treated anti JY-Pol antiserum resulted in survival rates similar to intact fresh JY-Pol antiserum. MAb C2 isolated from JY-Pol-immunized mice also enhanced resistance of naive mice against the pneumococcal disease. This protection by MAb C2 appeared to be mediated by opsonization as determined in a RAW 264.7 monocyte/macrophage cell line. Epitope analysis showed that MAb C2 epitope consisted of glucuronic acid and glucose that blocked the interaction of JY-Pol to the C2. Taken together, these data indicate that the antiserum induced by the JY-Pol, a naturally pneumococcal conjugate formula, mediated the protection by passive transfer, which was confirmed by protective effect of MAb C2.

Keywords □ *S. pneumoniae*, JY-Pol, antiserum, opsonization, epitope, mice

폐렴구균은 사망률 1위¹⁻³⁾를 차지하는 급성 호흡기 질환을 일으키며 폐렴(pneumonia), 균혈증(bacteremia), 수막염(meningitis), 중이염(otitis media), 부비동염(sinusitis) 등을 유발하는 Gram 양성 세균으로, 특히 항생제에 대한 내성이 높아 발병률과 사망률이 대단히 높다.^{1,2,4)} 전 세계적으로 두 살 미만의 유아에서만 매년 100만 명 이상의 사망이 보고되고 있다.^{1,5,6)} 이런 이유로 백신 예방에 많은 의존을 하고 있는데 기존의 폐렴 예방용 다당류(Capsular pneumococcal polysaccharide) 백신은 주로 2세 미만의 유아와 노약자 등에서는 효력이 매우 약하다.^{5,6)} 그 이유는 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. 협막의 존재에 따라 발병력과 관계가 있는

협막 다당물질은 주요한 발병인자로서,⁹⁾ 이 물질의 항식균작용(anti-phagocytic activity)은 폐렴구균의 발병력 결정에 중요한 요소로 고려된다.¹⁰⁾ 최근에는 이와 같이 주요 항원요소에 단백질 성 물질을 부착하여 소위 접합백신을 제조하기도 한다. 그러나 이 경우는 비용이 많이 드는 단점이 있다. 이런 점에서 폐렴구균의 협막 다당물질과 표면단백질이 자연적으로 부착된 항원물질의 분리는 접합백신 제형 비용 절감 이외에도 T-림프구 의존성 반응도 유도 될 수 있는 점이 고려된다. 예로서, 폐렴구균 표면단백질로는 대표적 발병성인자인 PspA(Pneumococcal surface protein A), CbpA(Choline-binding protein A), PsaA(pneumococcal surface adhesin A), 그리고 autolysin(LytA) 등이 있다.^{11,12)}

본 실험실에서는 이 협막 다당물질과 표면 단백질이 자체적으로 부착되어 있는 항원 물질(JY-Pol)을 분리하여 이 항원이 생쥐에서 IgM뿐만 아니라 IgG와 IgA를 생성하여 T-림프구 의존성을 유도 할 수 있음을 알 수 있었다.¹³⁾ JY-Pol 백신은 능동면역 방법으로 폐렴구균으로 기인된 전신감염에 효능이 있음을 관찰되었으며, 세포매개성 면역반응이 관여함이 측정되었으나 항체

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

로 인한 직접적인 보호효과는 규명되지 않았다.

계속된 본 연구에서는 항 JY-Pol 항체의 수동면역에 의한 보호 효과 여부를 조사하고 JY-Pol로 면역된 생쥐에서 hybridoma fusion 방법으로 단항체를 분리한 후 이 단항체의 수동면역 효과를 검색하였다. 또한 항체의 항원기(epitope)분석을 하여 보호 작용기전을 조사하였다.

실험 방법

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.

동물

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

백신제형 제조

폐렴구균 다당류 항원 추출은 기존의 알려진 방법^{14,15)}을 부분적으로 변경하여 추출하였다.¹³⁾ 간략히 기술하면, *S. pneumoniae* Serotype 4(ATCC)를 5% CO₂ 존재 하에 BHI 액체배지에서 배양하고 phenol(최종 농도 0.1%)을 첨가해서 24시간 후에 실온에서 배양한 후 상등액을 수집하고 이 상등액에 sodium acetate와 ethanol 첨가해서 침전을 수집하고 chloroform을 첨가하여 chloroform 용해 부분을 제거한 한 다음 수용성 부분을 수집하여 동결건조하였다. 분리된 *S. pneumoniae* 핵막다당물질(JY-Pol)의 탄수화물 함유량을 phenol-sulfuric acid 정성 및 정량 방법¹⁹⁾으로 검색하였으며 단백질 함량은 BCA(Bicinchoninic acid) 정량 Kit(Pierce, Rockford, USA)을 사용하여 측정하였다.

JY-Pol의 백신제형은 JY-Pol을 Alum(Pierce)에 점차적으로 상호 혼합하여 실온에서 일정기간 반응시킨 후 원심분리 방법으로 DPBS(Dulbecco's phosphate buffer saline solution; Sigma, St. Luis, Mo, USA)로 세척하고 멸균된 DPBS에 현탁시켜 제조하였다.

항 JY-Pol 항체의 효과

JY-Pol/Alum으로 면역된 생쥐에서 anti JY-Pol sera를 수집하

여 전처리 없이 BALB/c 생쥐에 복강으로 투여하거나, 열처리로 사멸된 폐렴구균과 혼합 반응하여 항체를 제거한 후 투여하고 살아 있는 폐렴구균을 이 생쥐들에 정맥주사로 전신감염 시켜서 이 생쥐들의 생존시간을 측정하였다. 음성 대조군 생쥐는 antiserum 대신 완충용액(DPBS)만 투여하고 폐렴구균으로 접종된 후 실험군의 생존율과 비교하였다.

단항체 분리 및 효능검사

JY-Pol/Alum 백신으로 면역시킨 생쥐의 비장(spleen)을 적출하여 perfusion 방법으로 비장세포(splenocytes)를 수집하여 SP2/0 myeloma cells(ATCC)과 혼합한 후 PEG(polyethylene glycol)를 첨가하여 융합된 항체분비세포를 HAT 배양액에 첨가하여 선별하였다.^{16,17)} 융합된 세포들은 제한희석법(Limited dilution method)으로 분류하고 분류된 세포를 각각 배양하여 항체생성 유무는 ELISA 방법으로 검색하였다. 항체를 생성하는 hybridoma cells를 대량으로 배양하고 이 배양액을 수집한 후 ammonium sulfate를 첨가하여 침전된 부분을 분리하여 투석법으로 세척하여 단항체를 수집하였다. 획득한 단항체를 재차 ELISA 방법으로 JY-Pol 항원에 대한 양성반응을 확인하였다.

선정된 단항체(MAb C2)를 생쥐의 복강 내로 투여하고 폐렴구균을 정맥주사로 감염시켜서 이 생쥐들의 생존시간을 측정하였다. 대조군 생쥐는 단항체 대신 완충용액(DPBS)만 투여받고 폐렴구균으로 접종된 실험군의 생존률과 비교하였다.

ELISA 방법에 의한 anti JY-Pol 항체의 Isotyping

JY-Pol을 20 µg/ml 농도로 carbonate 완충용액에 용해하여 96-well plate에 100 µl씩 담은 후 냉장고에서 24시간 배양한 후 Tris 완충용액(Sigma)으로 세척하고 수집된 혈청을 1/50으로 희석하여 100 µl씩 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 3시간 배양 후 Tris 완충용액으로 세척하였다. 그 다음 anti-mouse IgM, anti-mouse IgG, 또는 anti-mouse IgA(Sigma)를 넣고 1시간 배양한 다음, 세척하고 OPD(O-phenylenediamine; Sigma)를 넣고 20분 동안 반응시킨 후에 색깔 변색은 황산으로 정지시켰다. 변색 정도는 plate reader(Bio-Tek, England)로 490 nm에서 측정하였다.

MAb C2의 작용기전 검사

MAb C2의 작용기전을 RAW 264.7 macrophage cell line을 사용하여 opsonization 효과를 검사하였다. RAW 264.7 macrophage는 한국세포주은행(KTCC)에서 구입하였으며 10% FBS(Hyclone, Logan, UT, USA)와 penicillin(100 µg/ml) 및 streptomycin(100 µg/ml)가 함유된 RPMI 1640(Sigma) 배지를 사용하여 37°C에서 5% CO₂ 배양기(Vision Scientific Co. Korea)에서 배양하여 사용하였다.¹⁸⁾ 실험방법은 MAb C2와 폐렴구균을 먼저 혼합하여 일정시간 배양한 후 항체를 제거하고 이 macrophage와 작용시켜

탐식작용 증진효과를 역상현미경으로 관찰하였다. 반응 배양액은 원심분리하여 상등액을 수집하여 일정하게 희석하여 blood agar 배지에 접종하여 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 colony forming units(CFU)를 측정하였다. 대조군은 normal mouse serum으로 처리한 균을 동일하게 처리하였다.

MAb C2의 항원기 검색

S. pneumoniae serotype 4의 핵막은 glucuronic acid와 glucose가 반복으로 연결되어 구성된 것으로 문헌에 보고된 바 있다.^{19,20} 이를 근거로 하여 본 실험에서 분리된 MAb C2의 항원기가 anti-serotype 4를 인식할 수 있는지의 여부를 조사하였다. 이 실험에서는 glucuronic acid(GA; Sigma)와 glucose(G; Sigma)를 1 ml DPBS에 각각 100 µg씩 용해한 후 다양한 용량에서 이 혼합액을 고정된 용량의 MAb C2와 각각 반응시킨 후 JY-Pol로 coating된 Latex-beads(JY-Pol-beads)로 반응시켰다. 이 때 GA/G의 혼합액과 JY-Pol-beads의 반응에서 항원-항체의 응집(agglutination) 반응이 없으면 GA/G가 MAb C2의 항원기로서 이 항체의 결합 부위가 선점되어 JY-Pol과의 결합이 방해된 것으로, 즉 MAb C2의 항원기가 GA와 G로 구성되어 있는 것으로 추정할 수 있다. 이 실험에서 사용된 MAb C2는 DPBS로 1/10 또는 1/20로 희석하여 실험하였다.

통계

생존률의 통계적 유의성은 Kaplan-Meier Test 방법(Systat 7.0; New Statistics for Windows; SPSS, Chicago, IL, USA)으로 산출하였다. 대조군과의 비교하였을 때 P 값이 0.05 보다 적을 경우는 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

Anti JY-Pol serum의 효과

JY-Pol로 면역된 생쥐에서 분리시켜 전처리 없는 antiserum 또는 열로 처리된 antiserum을 투여 받고 폐렴구균으로 감염시킨 수동면역(passive immunization) 효과 조사결과는 45일간 생존 시간 관찰에서 생쥐들의 평균생존률(MST; Mean survival times)이 각각 35.4±14.6과 32.6±18.4일이며 항체를 제거시킨 혈청 또는 음성대조군의 경우는 각각 9.8±2.3과 7.8±2.2 일로서 항체를 투여 음성대조군과 비교할 때 대략 25일에서 28일 정도 생존시간이 더 긴 것으로 관찰되었다(Fig. 1). 흡착에 의해 항체가 제거된 혈청을 투여 받은 생쥐군의 생존률은 음성대조군의 생존률과 거의 유사하였으며 반복된 실험결과에서도 거의 동일한 결과를 얻었다. 이 결과는 폐렴구균 전신감염에 대하여 항체에 의한 보호효과가 있음을 알 수 있다. 이 anti JY-Pol serum에는 IgM이 주성으로 함유되어 있으며 IgG와 IgA가 또한 포함되어 있음

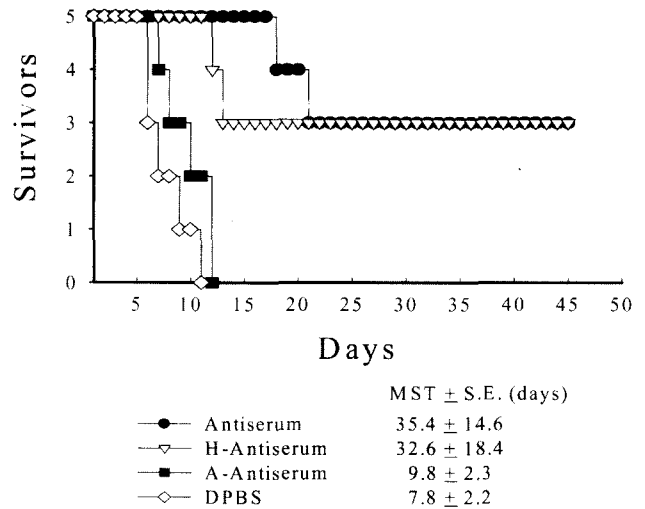


Fig. 1 – Anti JY-Pol antiserum enhances the resistance of mice against disseminated pneumococcal infection. Mice were given intact anti JY-Pol antiserum (antiserum), heated anti JY-Pol antiserum (H-antiserum), preabsorbed anti JY-Pol antiserum (A-antiserum), or DPBS (diluent) before i.v. infection with live *S. pneumoniae* cells. Their survival rates were measured. Results showed that mice given intact antiserum or H-antiserum survived longer than mice that received A-antiserum or DPBS (diluent). Difference between intact antiserum-received mice groups and DPBS-given mice were statistically significant ($P < 0.05$).

이 ELISA 방법으로 검색되었다(data not shown). 이 결과는 이전의 본 실험실의 실험결과와 동일하였다.¹³⁾

MAb C2의 수동면역 효과

단항체 분리에서 두 종류의 단항체가 분리되었으며 이 중에서 ELISA 방법으로 IgM으로 확인된 MAb C2의 효과를 검색하였다. 즉, 단항체 C2를 투여 받고 폐렴구균으로 감염시켜 35일간 생존시간 측정한 결과에서 MAb C2를 투여 받은 생쥐들의 평균 생존률은 28.0±11.0일이며 대조군의 경우는 8.4±1.7일로서 20일 정도 생존기간이 연장됨을 알 수 있었으며, 실험군과 대조군의 생존률 결과의 차이는 통계적으로 유의성이 있었다($P < 0.05$) (Fig. 2). 이 실험결과는 JY-Pol 접합백신으로 유도된 항 JY-Pol 항체는 폐렴구균으로 유발된 전신감염에 대하여 효과가 있음이 재차 확인되었다.

MAb C2의 opsonization 효과

RAW 264.7 macrophages를 MAb C2로 전처리된 폐렴구균의 탐식이 현미경 하에서 관찰되었다(data not shown). 측정결과 폐렴구균이 MAb C2와 반응하고 일정기간 동안 macrophages의 탐식작용 후 상등액에 잔류된 폐렴구균의 세포수는 6.1 ± 1.2 (mean±S.E.) $\times 10^4$ 이었으며 MAb C2와 전처리 없이 macrophages와 반응 후 잔류된 폐렴구균의 세포수는 $(45 \pm 3.6) \times 10^4$ 으로 대

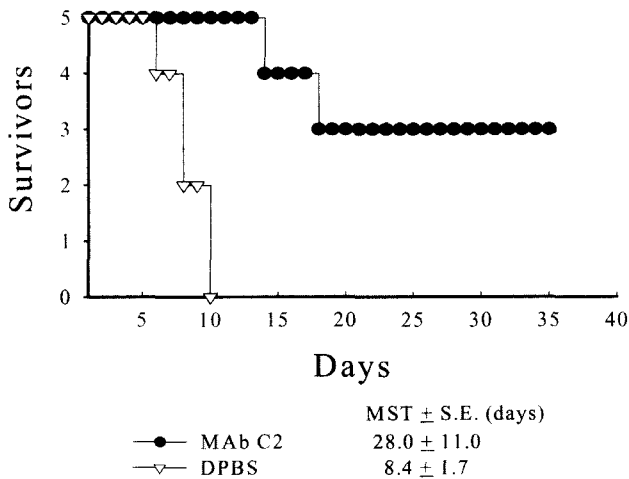


Fig. 2 – MAb C2 is protective against the pneumococcal infection. Mice given MAb C2 survived much longer than mice that received DPBS instead of MAb C2. These results showed that antibody induced by JY-Pol antigen was responsible for the protection. Difference between the two groups were significant ($P < 0.05$).

Table I – Enhancement of phagocytosis of *S. pneumoniae* by MAb C2

	Number of colony forming units per ml
MAb C2/SP* ¹ cells/macrophages	$(6.1 \pm 1.2) \times 10^4$
NMS* ² /SP cells/macrophages	$(45 \pm 3.6) \times 10^4$

Difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$).

*¹SP stands for *S. pneumoniae*.

*²NMS stands for normal mouse serum.

*³(Mean ± SE).

략 87% 이상 감소함을 알 수 있었다(Table I). 이 결과는 MAb C2의 작용기전의 하나로서 이 항체의 opsonin에 의한 macrophages 탐식으로 인한 폐렴구균의 수효가 감소된 것으로 이는 MAb C2가 opsonin 효과가 있음을 알 수 있다. 이 두 그룹의 차이는 통계상으로 유의성($P < 0.05$)이 있는 것으로 여겨진다.

MAb C2의 항원기 특성규명

MAb C2를 GA/G 혼합액과 먼저 반응시킨 후 JY-Pol과 혼합하였을 때 항원-항체 응집반응이 일어나지 않았다. 이 결과는 JY-Pol의 MAb C2 항원기 결합 부위인 glucuronic acid(GA)와

Table II – Analysis of MAb C2 epitope

	Glucuronic acid plus glucose in DPBS				
	none	10	20	40	80
MAb C2 (1/20 dilution)	+* ¹	+	.* ²	-	-
MAb C2 (1/10 dilution)	+	+	+	+	-

*¹(+) indicates presence of agglutination.

*²(-) indicates absence of agglutination.

glucose(G) 물질에 먼저 결합되어 MAb C2와 JY-Pol의 반응이 억제된 것으로 추정되는 것으로, 이는 MAb C2의 항원기가 glucuronic acid와 glucose로 구성되어 있음을 의미한다(Table II).

고 찰

백신 개발에서 면역성(Immunogenicity)을 획득하기 위하여 다양한 방법이 사용되는데 대표적인 방법으로 보조제 첨가, 항원의 변조(예 : conjugation, carrier 부착) 등의 면역조절방법 등이 적용된다.^{21,22} 본 연구에서는 협막을 인식하고, T-lymphocyte의 존성이 있는 협막성물질인 JY-Pol로 유도된 항체의 효과를 조사하였다. 이 JY-Pol은 자연적으로 협막의 탄수화물과 자체의 단백질이 결합된 접합백신(Conjugate vaccine) 형태(13)로서, 협막을 분리하여 BSA(bovine serum albumin) 또는 tetanus toxoid 등의 타종(heterogeneous) 단백질을 결합한 접합백신^{22,23}처럼 효과가 있는지의 여부를 조사하였다.

실험결론은 JY-Pol/Alum 백신으로 면역시킨 생쥐에서 분리된 antiserum은 폐렴구균 전신감염에 효과가 있었다. 이 결과는 JY-Pol 항원은 보호효과가 있는 항체를 생성하는 것으로 규명되었으며, 또한 *S. pneumoniae* IgM MAb C2의 폐렴구균 전신감염에 대한 보호효과는 항체에 의한 것으로 확인되었다. 이는 협막과 표면 단백질이 자연적으로 접합된 JY-Pol 백신제형의 제조가 까다로운 공정과정과 고가의 비용이 요구되는 다른 종류의 폐렴용 접합백신^{21,22}에 비하여 경제적인 측면에서도 저렴한 장점이 있다. 작용기전면에서도 항체의 주효효과인 opsonin작용에 의한 macrophage의 탐식작용 증진 밝혀져 JY-Pol로 유도된 항체의 효능이 인위적으로 제조된 접합백신과 그 차이가 없는 것으로 사료된다.

더나가서 보호효과가 있는 MAb C2의 탄수화물 항원기를 단백질화 할 경우에는 T-림프구 의존성에 의한 면역기억력이 증대된 항체유도가 가능한 백신제형 개발이 예상된다. 본 연구실에서는 이런 연구목표를 위해 Phage Display Peptide Library 방법^{24,25}을 이용하여 MAb C2의 항원기를 단백질화하는 연구가 진행 중에 있으며 이 기술은 폐렴구균용 DNA 백신개발에 적용될 수 있을 것으로 여겨진다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년도 식품의약품안전청 독성연구원의 바이오제품의 독성·약리·임상 평가기술개발사업 [바이오 030-032-3]의 연구지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Gregory, B., Lesinski, S., Smithson, L., Srivastava, N., Chen,

- D., Widera, G. and Westerink, J. : 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).
- 2) 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).
 - 3) Lesinski, G. B. and Westerink, M. A. : Vaccines against polysaccharide antigens. *Curr. Drug. Targets. Infect. Disord.* **1**, 325 (2001).
 - 4) 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).
 - 5) Dagan, R. : Pneumococcal conjugate vaccines : The potential to alter antibiotic use and nasopharyngeal carriage. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* **63**, A22 (2002).
 - 6) 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).
 - 7) 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).
 - 8) 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).
 - 9) Magee, A. D. and Yother, J. : Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **69**, 3755 (2001).
 - 10) 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).
 - 11) Mitchell, T. J. : Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res. Microbiol.* **151**, 419 (2000).
 - 12) Jedrzejewski, M. J. : Pneumococcal virulence factors : Structure and function. *Microbio. Mol. Biol. Rev.* **65**, 187 (2001).
 - 13) Han, Y. and L JH. : A pneumococcal conjugate vaccine formula induces protection in mice against disseminated disease due to *Streptococcus pneumoniae*. *Yak Hak Hoe Ji.* (in press) (2004).
 - 14) 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).
 - 15) How, M. J., Brimacombe, J. S. and Stacey, M. : The pneumococcal polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem.* **19**, 303 (1964).
 - 16) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
 - 17) 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).
 - 18) Han, Y., Jin, B. S., Ko, S. K. and Lee, J.-H. : Immunoactivity of ginsenosides re and rg1 that enhances resistance of mice against experimental disseminated candidiasis. *Nat. Prod. Sci.* **10**, 134 (2004).
 - 19) Lesinski, G. B., Smithson, S. L., Srivastava, N., Chen, D., Widera, G. and Westerink, M. A. J. : 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).
 - 20) Robbins, J. B., Austrian, R., Lee, C.-J., Rastogi, S. C., Schiffman, G., Henrichsen, J., *et al.* : Considerations for formulating the second generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J. Infect. Dis.* **148**, 1136 (1983).
 - 21) Malley, R., Morse, S. C., Leite, L. C., Areas, A. P., Ho, P. L., Kubrusly, F. S., Almeida, I. C. and Anderson, P. : Multiserotype protection of mice against pneumococcal colonization of the nasopharynx and middle ear by killed nonencapsulated cells given intranasally with a nontoxic adjuvant. *Infect. Immun.* **2004** **72**, 4290 (2004).
 - 22) Areas, A. P., Oliveira, M. L., Miyaji, E. N., Leite, L. C., Aires, K. A., Dias, W. O. and Ho, P. L. : Expression and characterization of cholera toxin B-pneumococcal surface adhesin A fusion protein in *Escherichia coli*: ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13**, 192 (2004).
 - 23) Richter, M. Y., Jakobsen, H., Birgisdottir, A., Haeuw, J. F., Power, U. F., Del Giudice, G., Bartoloni, A. and Jonsdottir, I. : Immunization of female mice with glycoconjugates protects their offspring against encapsulated bacteria. *Infect. Immun.* **72**, 187 (2004).
 - 24) Smith, G. P. and Scott, J. K. : Peptide-display phage libraries. *Methods Enzymol.* **217**, 228 (1992).
 - 25) Mor, G. : Plasmid DNA : A new era in vaccinology. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1151 (1998).