

백일해균의 가용성 항원에 관한 연구

A study on the soluble antigen of *Bordetella pertussis*

서울大學校 醫科大學 微生物學教室

崔 成 培

백일해 예방액의 효과에 대한 많은 보고가 있었다. (Kendrick et al. 1939: British Medical Association 1956: Medical Research Council 1951). 그러나 백일해 예방액 접종후 경련성 반응이나 혹은 사망한 보고가 있어 백일해 예방액의 독성에 대하여 우리나라에게 뿐만아니라 외국제제도 문제가 되어 독성에 관한 연구가 많이 시행되어 왔다(Robbin et al. 1950: Banerjea et al. 1962: Munoz et al. 1959).

저자는 전 보고에서 우리나라 백일해 생산 균주들의 성상을 검토하였고(Choi, 1971) 백일해 균을 파괴하여 항원구조를 검토하여 방어성 항원이 균체 내부보다 세포막벽에 위치 하였음을 보고하였다(Choi, 1976).

본 실험에서는 백일해균의 가용성 항원을 추출하기 위하여 sodium desoxycholate로 처리하되 농도 및 pH를 변화시켜 가용성 항원을 추출하여 방어성을 유지하면서 독성을 감소 시킬수 있는 항원을 연구 검토하였고 아울러 48시간 배양과 72시간 배양한 백일해균에서 추출한 가용성 항원의 방어성도 비교 검토하였다.

시험재료 및 방법

1) 균주 :

국립보건연구원에서 분양받은 *B. pertussis* 18380, 10536, 18323 균주를 사용하였다.

2) 동물 :

체중 약 12 gm의 마우스를 사용하였다.

3) 배지 및 배양 :

20%의 양피를 포함한 Bordet-Gengou배지를 사용하여 37°C에서 2~3일 배양되었다.

4) 가용성 항원추출 :

48시간 또는 72시간 배양된 균액을 2.0×10^9 cell/ml에 해당되는 농도로 맞추었고 1% sodium desoxycholate 용액으로 균체를 처리할때 pH를 변화시켰으며 다음 여러농도(1, 0.5, 0.25, 0.15%)의 sodium desoxycholate

로 18시간 동안 처리한 다음 1300 rpm으로 0°C에서 원심 침전하여 상층을 따서 2~3일 dialysis해서 원위에 접종후 면역학적 실험을 하였다.

5) 역가실험 :

전 방법(Choi, 1971)을 따라서 뇌내공격 방어 실험으로 이상의 여러제제들과 동일한 농도의 대조 예방액의 0.5ml로 복강으로 면역한 후 2주에 18323으로 공격하여 2주까지 생사를 관장하며 Wilson Worcester방법(N. I. H. U. S. A. 1956)에 의한 ED₅₀을 산출하여 판정하였다.

6) 독성실험 :

여러제제와 대조들을 2.0×10^9 cell/ml의 농도로 마추어 5마리의 흰쥐에 1ml 씩 복강으로 주입하여 72시간까지 생사를 보았고 48시간, 72시간 후에 평균 체중의 변화로 검토하였다

실험성적

실험 1.

sodium desoxycholate용균시 방어가에 미치는 pH의 영향 ;

1% sodium desoxycholate용액으로 용균시 buffer saline의 pH를 변화시켜 8.5, 8.0, 7.5, 7.0, 6.5로 하여 2°C에서 18시간 용균시킨 다음 추출된 항원으로 면역한후 방어성을 검토한 실험으로 표 1에서 보는바와 같이 pH 8.5에서 방어성이 강했고 8.0, 7.5, 7.0, 6.5의 순서로 pH가 낮아질수록 방어성이 저하되었다.

실험 2.

용균시 sodium desoxycholate의 농도와 배양기간이 방어가에 미치는 영향 :

1%, 0.5%, 0.25%, 0.15%로 변화시켜 용균시 추출한 항원으로 면역하여 얻은 방어성은 표 2에서 보는바와같이 0.5%가 가장 방어성이 높았고, 다음 1%가 비교적 높았다. 72시간보다 48시간 배양한 균에서 추출한 항원의 방어가 더 높았다.

<1977年 2月 7日 接受>

Table 1. Influence of pH of desoxycholate solution on the release of mouse protective antigen from *B. pertussis*.

pH of desoxycholate lysis	Dose per mouse		*S/N	proportion	ED ₅₀ limits pecfed 1SD	Potency multiple	Unit per ml
	ml	dil					
8.5	0.1	10	15/16	0.94	0.01596 (72-134)	1.11	8.9
	0.02	50	7/16	0.44			
	0.004	250	4/16	0.25			
8.0	0.1	10	14/16	0.88	0.0200 (72-139)	0.89	7.1
	0.02	50	7/16	0.44			
	0.004	250	3/16	0.19			
7.5	0.1	10	13/16	0.85	0.0254 (70-144)	0.70	5.6
	0.02	50	6/16	0.38			
	0.004	250	3/16	0.19			
7.0	0.1	10	13/16	0.85	0.03628 (70-144)	0.492	3.93
	0.02	50	4/16	0.25			
	0.004	250	2/16	0.13			
6.5	0.1	10	11/16	0.69	0.0455 (70-143)	0.392	3.136
	0.02	50	5/16	0.31			
	0.004	250	1/16	0.06			
control vaccine	0.1	10	15/16	0.94	0.0178 (76-131)	1.00	8.0
	0.02	50	8/16	0.50			
	0.004	250	2/16	0.13			

*S/N : Surrviving/Total mice Challenged

Table 2. Effect of desoxycholate concentration and the age of culture on the release of mouse protection antigen from *B. pertussis*.

Concentration of desoxycho- late	age of culture	Dose per mouse		*S/N	proportion	ED ₅₀ limited specified 1SD	potency multiple	unit per ml
		ml	dill					
1%	48hr	0.1	10	15/16	0.94	0.0145 (74-135)	1.38	11.04
		0.02	50	9/16	0.56			
0.004		250	3/16	0.19				
1%	72hr	0.1	10	14/16	0.88	0.0223 (74-134)	0.89	7.12
		0.02	50	7/16	0.44			
0.004		250	2/16	0.13				
0.5%	48hr	0.1	10	16/16	1.00	0.1618 (73-136)	1.96	15.68
		0.02	50	9/16	0.56			
0.004		250	5/16	0.31				
0.5%	72hr	0.1	10	14/16	0.88	0.0200 (74-134)	1.00	8.00
		0.02	50	7/16	0.44			
0.04		250	3/16	0.19				
0.25%	48hr	0.1	10	13/16	0.85	0.0254 (70-144)	0.78	6.24
		0.02	50	6/16	0.38			
0.004		250	3/16	0.19				
0.25%	72hr	0.1	10	14/16	0.88	0.02760 (76-131)	0.72	5.76
		0.02	50	6/16	0.38			
0.004		250	1/16	0.06				

0.125%	48hr	0.1 0.02 0.004	10 50 250	14/16 5/16 2/16	0.88 0.31 0.13	0.02760 (74-135)	0.72	5.76
	72hr	0.1 0.02 0.004	10 50 250	13/16 5/16 3/16	0.85 0.31 0.19	0.02895 (70-144)	0.69	5.52
control vaccine		0.1 0.02 0.004	10 50 250	14/16 8/16 2/16	0.88 0.50 0.13	0.0200 (74-134)	1.00	8.00

*S/N: Surviving/Total mice challenged

실험 3.

가용제제들의 독성 :

0.5%, 1%의 sodium desoxycholate 용액에 의한 추출액과 비가용성 침전물로 대조와 비교하여 독성을 검토하였다. 표 3에서 보는 바와같이 0.5%, 1% sodium desoxycholate 용액으로 처리하여 추출한 항원에서 비교적 독성이 약하였고 비가용성 침전물에서 독성이 강하게 나타났다.

Table 3. Toxicity of pertussis soluble antigen

Concentration	Mice alive/mice injected at 72hr.	Average weight change	
		24hr.	72hr.
soluble extract 0.5%	5/5	(g) -0.5	+1.3
insoluble 0.5%	2/5	-1.5	-0.8
soluble extract 1.0%	5/5	-0.8	-0.3
insoluble 1.0%	3/5	-1.3	-0.6
control vaccine	5/5	-1.0	+0.4

After intraperitoneal injection of 1.0ml equivalent to 20×10^9 cells

고 안

백일해 예방액의 독성제거에 대한 많은 연구가 시행되어 왔음에도 아직 응용단계에 이르지 못하였고 예방액 개량이 쉽게 이루어 지지 못하고 있다. 본 연구는 전연구(Choi, 1971; Choi, 1976)에 이어서 좀더 예방액의 효과를 유지하면서 독성을 저하 시킬수 있는 예방액을 연구코저 가용성 항원을 추출하여 연구 검토하였던 것이다. 전 연구자들이(Robbin et al, 1950) alcohol, 증류수등을 사용하여 방어성 항원을 잘 추출하였으나 독성문제를 확실한 방법으로 제거치 못하였다.

본 실험에서는 sodium desoxycholate를 사용하여 용균시 용액의 pH 8.5에서 0.5% sodium desoxycholate의 농도로 처리하여 얻은 항원으로서 방어성을 상당히

유지할 수 있었으며 독성을 상당히 제거 할 수 있었다. sodium desoxycholate 용액으로 백일해균을 처리한 후 원심침전하여 침강된 침전물 속에 독성이 함유되어 제거된 것으로 사려되었다. Barta(1963)의 성적과 유사하였다. 그러나 histamine-sensitizing property는 본 실험에서 취급하지 못하였다. 우선 방어성과 histamine 감작성이 동질성 혹은 분리가능성 여부의 검토가 선행되어야 하겠으므로 본 실험에서 배제 시킨 것이다. 본 실험에서 sodium desoxycholate로 백일해 균을 처리하여 방어성을 유지하면서 독성을 제거 시킬 수 있는 조건을 검토한 것이다. histamine-sensitizing property의 제거 가능성 여부의 검토는 앞으로 시행되어야 할 것이다.

총 괄

백일해 균을 2,3일 배양후 채취한 균들을 sodium desoxycholate 용액으로 처리하여 가용성 항원을 얻어 실험하되 백일해균 가용시 pH의 변화와 sodium desoxycholate의 농도 변화로 각각의 가용성 항원을 추출하여 방어성과 독성을 검토하여 아래와 같은 성적을 얻었다.

1. sodium desoxycholate 용액의 농도를 0.5%로 하고 pH를 8.5로 하여 백일해 균을 처리하였을 때 방어성을 유지하면서 독성을 저하 시킬 수 있는 가용성 항원을 얻을 수 있었다.

2. sodium desoxycholate 용액 농도를 0.5%로 하여 48시간 배양균에서 추출한 항원이 72시간 배양균에서 추출한 항원보다 방어성이 높았다.

ABSTRACT

A Study on the soluble antigen of *Bordetella pertussis*

Sung-Bae Choi

Dept. of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University

It was well established that the inoculation of

pertussis vaccine was capable of reducing the incidence of whooping cough.

However, complete elimination of toxicity of pertussis vaccine was not succeeded yet.

Thus this experiment was carried out to reduce the toxicity of pertussis vaccine.

This paper described the conditions under which sodium desoxycholate may be used to liberate the the soluble protective antigen in nontoxic form and the potency of protective antigen liberated from both 48 hrs. and 72 hrs. pertussis cultures.

Results were as follows:

1. The liberation of soluble protective antigen from pertussis cells in non-toxic form was possible using both optimal concentration (0.5%) and pH(8.5) of sodium desoxycholate solution.

2. The protective antigen liberated from 48hrs. pertussis culture at 0.5% sodium desoxycholate solution exhibited a greater degree of potency than that liberated from 72hrs. cultures.

REFERENCES

Banerjea, A., and Munoz, J.: *Antigens of Bordetella pertussis II purification of heat labile toxin*, *J. Bact.*, 84 : 269, 1962.

Barta, G.: *Soluble Protective Antigen from Bordetella Pertussis prepared with sodium desoxycholate*. *J. Immun.*, 90, 72, 1963.

British Medical Association: *Vaccination against whooping cough*, *Brit. Med. J.*, 2 : 454, 1956.

Choi, S. B.: *A study on the antigenicities of Bordetella pertussis strain*, *J. Int. Med.*, 14 : 9, 1971.

Choi, S. B.: *A study on the Antigenic Activities of Cell Wall and Protoplasm of Bordetella Pertussis*, *The Seoul J. Med.*, 17, 1, 1976.

Kendrick, P.L., and Eldering, G.: *A study on the active immunization against pertussis*, *Amer. J. Hyg.*, 29, 133, 1939.

Medical Research Council: *The prevention of whooping cough by vaccination*, *Brit. M. J.*, I : 1464, 1951.

Munoz, J., E. Ribí, and C.L. Larson.: *Antigen of Bordetella pertussis*, *J. Immun.*, 83 : 496, 1959.

N. I. H. U. S. A. *Application of the method proposed by Wilson & Worcester for determining the ED₅₀ to the evaluation of the potency of pertussis vaccine*, 1956.

Robbins, K.C., and Phillemer, L.: *The separation of a protective antive antigen from a toxin-producing strain of Hemophilus pertussis*, *J. Immun.*, 65 : 393, 1950.