

녹농균에서 정제한 original endotoxin protein의 방어효과 및 면역학적 기전

Protective effect of original endotoxin protein and possible immunological mechanism

서울대학교 의과대학 미생물학교실 · 서울대학교 의과대학 암연구소

최 명 식 · 장 우 현 · 김 의 상

서 론

병원내 기취감염증은 아직도 현대의학이 해결하여야 할 주요한 과제중의 하나이다.

여러 항생물질이 현대의학에 도입됨에 따라 인류는 항생제요법에 의한 병원내 감염증 해결에 희망을 걸었으나 그람양성균에 의한 감염은 감소되는 경향을 보이나, 그람음성균에 의한 감염증은 증가하여 전체 병원내감염의 빈도는 줄어들지 않고 있으며, 또한 항생제의 오용 및 남용으로 내성균주가 증가하는 결과가 초래되고 말았다.

그람음성균에 의한 병원내감염증 중 특히 녹농균감염증은 1960년대 초 처음 관심을 받기 시작한 이래 의학발전으로 저항력이 감퇴된 환자가 치료대상이 되어가는 추세와 더불어 소독제 및 병원내 환경에서의 녹농균의 강한 생존력, 녹농균 감염증의 높은 사망률 등 때문에 중요한 병원내 감염증으로 주목되고 있다. 또한 녹농균은 여러 종류의 항균제에 대하여 고도의 내성을 지니는 경우가 많아 항생제 요법만에 의한 녹농균감염증 치료에 많은 문제점을 남기고 있어 이의 치료대책으로 병원내 환경 및 환자관리개선, 항생제의 적절한 투여, 과립구 주입에 의한 비특이적방어효과 증진과 더불어 면역학적 방법 특히 여러 종류의 백신 및 항혈청등에 의한 치료등 다각적인 시도가 이루어지고 있다(Kislak등, 1964; McNamara 등, 1967; Thoburn 등, 1968; Lowbury등, 1969; Jackson등, 1971; Bennett, 1974; McGowan등, 1975; Reynolds등, 1975; Finland, 1976; Gardner등, 1980; Weinstein 등, 1980).

지금까지의 녹농균증의 예방과 치료에 시도된 면역

학적 방법은 항혈청(Graber등, 1961; Millican등, 1966), 감마글로블린(Millican등, 1957; Fisher등, 1958)을 수동면역하는 방법과 사균(Millican등, 1966; 김등, 1982), 다가사균(장등, 1982), 다가내독소(Alexander등, 1971), 다가세균추출물(Miler등, 1977), 리보솜(Liberman, 1978), 다당체(Pier등, 1978), 섬모(Holder등, 1982) 등으로 능동면역하는 방법을 들 수 있으며 각각 녹농균에 의한 이환율 또는 사망률의 감소등을 보고하고 있다.

그러나 수동면역은 그 효과가 오래가지 못하는 단점이 있고 능동면역의 경우 병원환경에 따라 상재하는 녹농균의 혈청형이 다양하여(Lany등, 1978) 전 혈청형의 녹농균중에 효과적인 백신으로 사용하기 위해서는 전 혈청형의 사균전체 또는 그 추출물을 혼합하여야 하는 경향이 있어 그 부작용등의 문제가 지적되고 있다(Pennington, 1974; 장등, 1982).

Original endotoxin protein(OEP)은 1975년 Homma 등이(Abe등, 1975; Homma등, 1976) 녹농균의 자가분해물질에서 분리한 단백질 함량이 많은 세포벽 추출물로서, O항원(lipopolysaccharide: LPS) 집종은 같은 혈청형의 녹농균중에 대해서만 방어효과를 보이는데 비하여 OEP는 공통방어항원으로 작용하여 전 혈청형의 녹농균중에 방어효과가 있고 발열능이나 치사능등 독성은 낮다고 보고하고 있다.

따라서 저자는 OEP결정의 전 혈청형의 녹농균에 대한 방어효과와 면역학적기전을 알아 볼 목적으로 서울대학병원에서 분리한 녹농균으로 실험적으로 화상열 일킨 생쥐에서 전혈청형의 녹농균중에 대한 OEP의 방어효능을 검정하고 OEP가 체액성 면역반응 및 말초혈액내 다핵중성구의 식균능 및 살균능에 미치는 영향에 대한 실험을 시행하여 보고하는 바이다.

† 접수일자 : 1983. 12. 20.

* 이 논문은 1982년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

재료 및 방법

1. 균 주

OEP제조 균주는 Homma strain인 *P. aeruginosa* N-10을 분양받아 사용하였으며 방어효능검정 및 응집항체가 측정에 사용한 균주는 서울대학교병원 임상검체에서 분리한 녹농균종 A형은 Pa-13, B형은 Pa-4, C형은 Pa-29, D형은 Pa-48, E형은 Pa-16, F형은 Pa-9, G형은 Pa-55, H형은 Pa-79, I형은 Pa-49, J형은 Pa-84, K형은 Pa-80, L형은 Pa-83, M형은 Pa-85를 각각 임의 선정하여 사용하였다.

2. OEP백신 제작

Homma등의 (Homma등, 1976)방법에 따라 제작하였으며 그 방법을 요약하면 합성배지에서 37°C, 3일간 진탕배양한 *P. aeruginosa* N-10 균배양액에 톨루엔을 증축하여 37°C에서 2일간 정치, 균의 자가분해물질을 얻은 후, 그 여과액에 50%가 되게 ZnCl₂를 가하여 단백질을 침전시키고 20% Na₂HPO₄로 침전물을 삼출한 후 삼출물을 2차 증류수로 투석하였다.

투석한 삼출물은 재차(NH₄)₂SO₄를 가하여 침전시키고 10,000 RPM, 30분 원심분리하여 얻은 침전물을 pH 8.0, 0.1M Tris-HCl완충액으로 용해시킨 후 2차 증류수로 투석하여 조제 OEP를 제작하였다.

제작한 조제 OEP는 pH 8.0, 0.1M Tris-HCl 완충액으로 평형을 시킨 DEAE Sephadex A50(Sigma, Lot No. 91F-0216)에 통과시킨 후 NaCl을 0M에서 1M까지 지속적 농도경사를 두어 각 농도에 대한 분획을 얻어 radial gel diffusion 방법으로 검정하여 정제 OEP를 제작하였다.

이때 OEP는 0.3M~0.45M NaCl 농도의 분획에서

분리 되었다(Fig. 1 참조).

정제한 OEP는 단백질이 다량 함유된 물질로 LPS에 비해 2-keto-3-deoxy octonate의 함량이 약 1/8정도였으며, 총 탄수화물 함량도 LPS는 건조무게의 36%인 반면 OEP에는 건조무게의 약 4.5%정도였다.

3. 면역방법 및 방어효과 검정

12~15gm 순계 ICR 생쥐를 암수 구별없이 사용하였으며 complete Freund's adjuvant와 동량 혼합한 정제 OEP을 생쥐당 5μg씩 복강내 면역하고 면역 3주 후 정제 OEP 5μg을 생쥐 복강내 재면역 하였다. 마지막 면역 7일 후, 생쥐 등쪽을 80°C 물에 5초동안 담구어 화상을 입히고 화상 직후에 녹농균으로 복강내 공격하였다.

방어효과검정은 각 혈청형의 녹농균을 균주에 따라 10배, 10^{1/2}배 또는 10^{1/4}배 계단희석으로 5개농도의 녹농균 부유액을 제조하고 정상생쥐에 화상만을 입힌 대조군과 OEP로 2회 면역하고 화상을 입힌 면역군에 각각 한공격군주당 5개 균농도를 10마리의 생쥐를 한 실험군으로 정하여 총 13가지 녹농균주를 대조군과 면역군에 공격하여, 공격 10일후까지의 생존율을 관찰, Spearman-Kaber법으로 LD₅₀을 산정하고 그 95% 신뢰한계를 구해 유의성을 검정하였다.

4. 응집항체가 측정

2배 계단희석한 OEP면역생쥐혈청(25마리 혈청혼합) 및 정상생쥐혈청에 동량의 열처리 사균을 응집원으로 가하고 37°C 항온수조에서 2시간 반응시킨 후 4°C에서 24시간 정치하고 결과를 판독하였다.

5. 다핵중성구의 식균능

다핵중성구의 식균능(phagocytic activity)은 complete Freund's adjuvant와 동량 혼합한 OEP를 토끼당 3mg씩 3번, 2주 간격으로 피하면역한 토끼와 정상토끼의 말초혈액을 사용하여 측정하였다. 이들의 말초혈

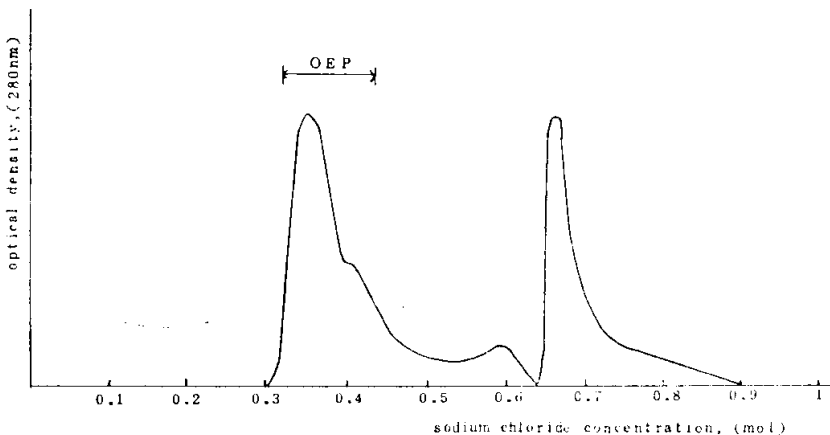


Fig. 1. DEAE-sephadex A-50 column chromatography of crude OEP derived from *P. aeruginosa* N-10.

액 0.5ml에 5×10^7 /ml로 조정된 Pa-13 녹농균부유액 0.5ml 및 자기 혈청 0.2ml를 혼합하여 37°C 항온수조에서 반응시키면서 0분, 30분, 60분에 각각 20 μ 씩을 취하여 3장의 도말스라이드를 제작하고 Giemsa염색하여 현미경하에서 ($\times 1,000$) 200개의 다핵중성구를 세어 이중 식균한 다핵중성구의 수를 측정하여 평균 및 표준편차를 산정하고 정상토끼와 OEP면역토끼의 말초혈액 다핵중성구의 식균능 차이의 유의성을 student-t 법으로 검정하였다.

한편 다핵중성구의 비특이적 탐식능을 검정하기 위해 균부유액 대신 직경이 1.09 μ 의 라텍스입자(7×10^7 /ml) 부유액 0.5ml를 첨가하여 같은 방법으로 탐식능을 측정하였다.

6. 다핵중성구의 살균능 측정

다핵중성구의 식균능 측정과 같은 방법으로 실험군 및 대조군을 반응시키면서 0분, 30분, 60분에 각각 0.1ml씩을 취하여 9.9ml의 증류수에 희석한 후 vortex로 30초간 진탕하여 삼투압쇼크로 적혈구 및 다핵중성구를 파괴하고 10배 계단희석하여 세균집락측정법으로 생존수를 측정 그 평균 및 표준 편차를 구해 student-t 법으로 유의성을 검정하였다.

각 실험군 및 대조군의 살균능측정은 3회씩 시행하였으며 각회마다 세균집락측정은 3번 시행하였다.

7. 항혈청의 살균능 측정법

OEP로 면역한 토끼혈청, Pa-13균으로 흡수한 OEP 면역 토끼혈청 및 Pa-13균으로 흡수한 정상토끼의 혈청 0.3ml에 3.8×10^8 /ml의 Pa-13 균액을 0.1ml를 가하고 4°C에서 24시간 반응시킨 후 실험군을 정하여 Kolmer 식염수에 1 : 10 희석한 guinea pig혈청(GIBCO, Lot No. 8111521) 또는 Kolmer식염수만을 0.22ml 첨가하여 37°C 항온수조에서 2시간 반응시키고 10배 계단희석하여 세균집락측정법으로 생존수를 측정, student-t 법으로 통계적 유의성을 검정하였다.

결 과

1. OEP의 녹농균증에 대한 방어효과

화상 직후 생쥐의 복강내로 녹농균을 공격하여 실험적으로 녹농균증을 유발하고 OEP로 면역한 생쥐와 정상대조군에서 LD₅₀의 차이를 95% 신뢰구간을 정하여 본 바 두 실험군에서 LD₅₀와 신뢰구간을 산정할 수 있었던 B, D, G, H, I, J, K, L 및 M형의 녹농균의 공격에 대해, OEP면역생쥐에서는 정상생쥐에 비해 유의한 LD₅₀의 증가가 관찰되었으며 OEP면역생쥐에서 LD₅₀의 값이 너무 높아 측정 범위를 벗어나 LD₅₀를 정하지

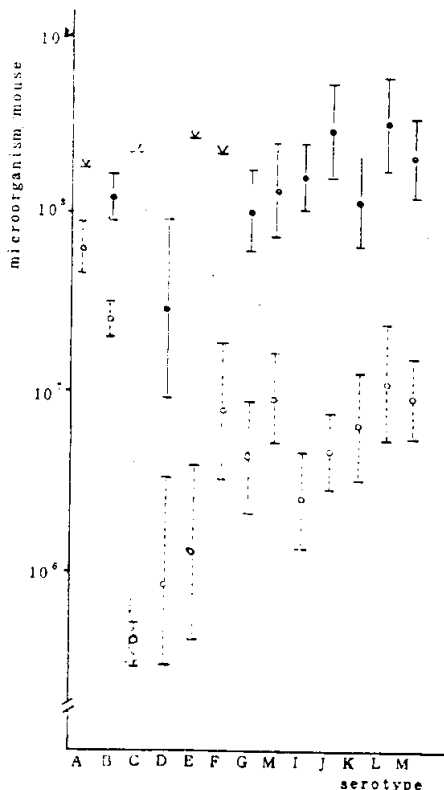


Fig. 2. Protective effect of OEP vaccine on pseudomonas infection in burned mouse.

⬇: Vaccinated group. LD₅₀ and 95% confidence interval.

○: Nonvaccinated group. LD₅₀ and 95% confidence interval.

못했던 A형, C형, E형 및 F형의 공격에 대해서도 OEP면역 생쥐의 LD₅₀는 정상 생쥐의 LD₅₀ 및 그 95% 신뢰구간을 훨씬 벗어나고 있어서 OEP면역 생쥐에서 대조군에 비해 전 혈청형의 녹농균공격에 대한 유의한 생존율의 증가가 관찰되었다(Fig. 2 참조).

2. OEP면역혈청의 녹농균에 대한 응집항체가

OEP면역생쥐혈청은 A형의 Pa-13, D형의 Pa-48, E형의 Pa-16, G형의 Pa-55 및 J형의 Pa-84의 5개 혈청형의 녹농균에 대해서는 정상 생쥐혈청에 비해 응집가가 4배이상 상승됨이 관찰되었다. 또한 H형의 Pa-79, I형의 Pa-49, K형의 Pa-80, L형의 Pa-83 및 M형의 Pa-85의 5개 혈청형의 녹농균에 대해서는 응집가가 2~3배 상승됨이 관찰되었으며 B형의 Pa-4, C형의 Pa-29 및 F형의 Pa-9의 3개 혈청형의 녹농균에 대하여는 응집항체가의 상승이 관찰되지 않았다(Table 1 참조).

3. OEP면역 토끼 혈청의 녹농균 살균능에 미치는 영향

Table 1. Agglutination titer of the OEP vaccinated mouse serum

Agglutinogen (serotype)	agglutinin titer	
	OEP vaccinated	control
Pa-13(A)	128	0
Pa- 4(B)	0	0
Pa-29(C)	0	0
Pa-48(D)	512	0
Pa-16(E)	64	0
Pa- 9(F)	0	0
Pa-55(G)	16	0
Pa-79(H)	8	0
Pa-49(I)	4	0
Pa-84(J)	16	0
Pa-80(K)	16	4
Pa-83(L)	4	0
Pa-85(M)	8	0

Pa-13 균으로 흡수한 정상토끼 혈청과 녹농균을 4°C에서 24시간 반응시킨 후, 1:10 희석 guinea pig 혈청을 첨가하고 2시간 반응시킨 결과, 반응전 ml당 6.5×10^7 개 집락에서 57%가 감소된 ml당 2.8×10^7 개 집락이 관찰되었다.

반면 OEP면역 토끼혈청(항 Pa-13 응집혈청가 1:16) 녹농균을 4°C에서 24시간 반응시킨 후 1:10 희석한 guinea pig 혈청을 2시간 반응시킨 결과 96.4%가 감소된 ml당 2.4×10^6 개 집락이 관찰되었다.

한편 Pa-13 균액으로 흡수한 OEP면역 토끼혈청과 녹

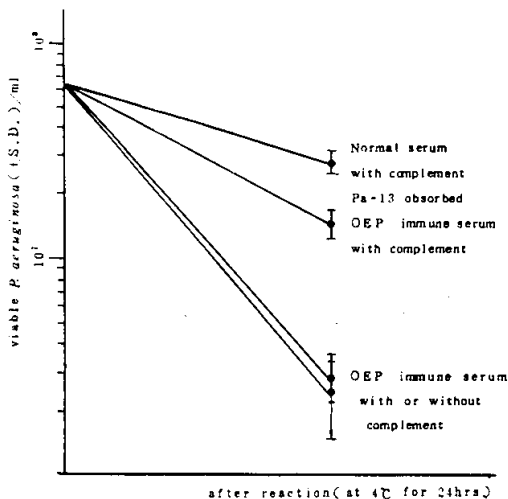


Fig. 3. Quantitation of viable *P. aeruginosa*(Pa-13) after reaction with OEP immune rabbit serum.

농균을 4°C에서 24시간 반응시킨 후, 1:10 희석 guinea pig 혈청을 2시간 반응시킨 결과 78%의 집락수가 감소된 ml당 1.45×10^7 집락수가 관찰되어 흡수하기 전에 비해 집락수의 감소가 유의하게 억제되었다($p < 0.01$). 그러나 OEP면역 혈청과 녹농균을 4°C에서 24시간 반응시킨 후 guinea-pig 혈청대신 Kolmer 식염수를 첨가한 후 2시간 반응시켜도 95.7%의 집락수가 감소된 ml당 2.8×10^6 의 집락이 관찰되어 guinea pig 혈청의 첨가와 관계없이 집락수의 감소가 관찰됨을 보아 집락의 감소는 용균에 의한 것이 아니라 응집항체에 의한 응집현상으로 오는 것이라고 해석할 수 있었다(Fig.3 참조).

4. OEP면역이 다핵중성구의 녹농균 식균능에 미치는 영향

OEP 면역토끼 및 정상토끼의 말초혈액내의 다핵중성구의 식균능을 비교해 본 결과 정상토끼의 말초혈액내의 다핵중성구는 균과 반응 즉시 2.7%가 녹농균을 식균하고 있었으나 30분 후에는 24.2%, 1시간 후에는 28.9%로 증가하였다. 그러나 이에 비하여 OEP 면역토끼의 말초혈액내 다핵중성구는 반응 즉시 2.4%, 30분후에는 64%, 1시간후에는 75.4%가 녹농균을 식균하고 있어 OEP 면역토끼에서 정상토끼에 비해 30분 및 1시간 후 모두에서 녹농균에 대한 식균능의

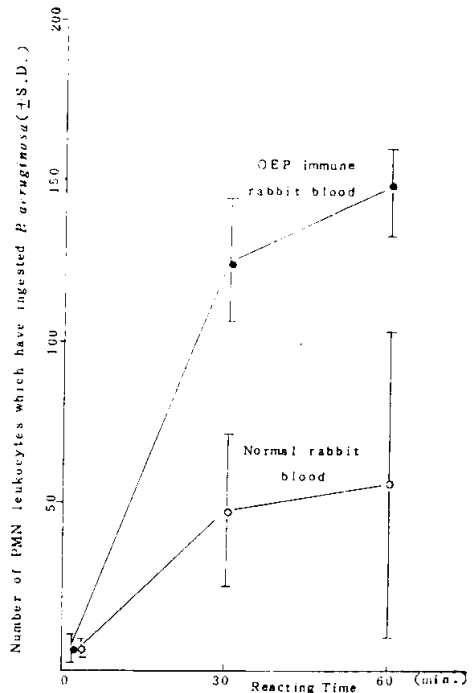


Fig. 4. Number of *P. aeruginosa* (Pa-13)-ingesting PMN leukocytes from OEP immune or normal rabbit blood at 37°C.

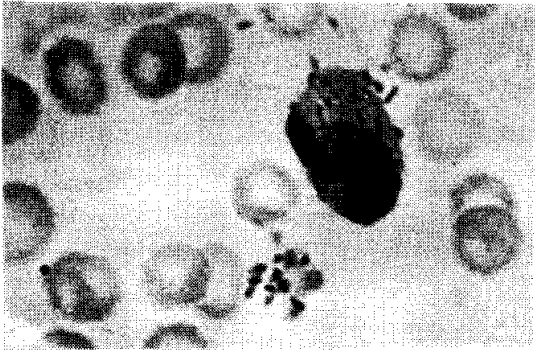


Fig. 5. Rabbit polymorphonuclear leukocyte has ingested *P. aeruginosa*.
(Giemsa staining $\times 1,000$)

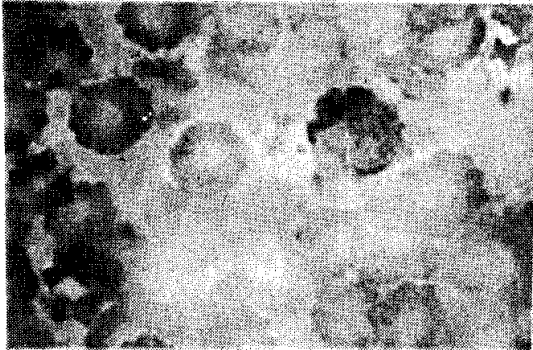


Fig. 6. Rabbit polymorphonuclear leukocyte has ingested latex particle.
(Giemsa staining $\times 1,000$)



Fig. 7. Aggregated leukocytes appeared after reaction with *P. aeruginosa*. This aggregate consists of polymorphonuclear leukocytes and large monocytes that have ingested *P. aeruginosa*.
(Giemsa staining $\times 1,000$)

유의한 증가가 관찰되었다($p < 0.01$) (Fig. 4, 5 참조). 그러나 OEP 면역토끼 및 정상토끼의 말초혈액내 다핵중성구의 비특이적 탐식능을 알아보기 위해 라텍스워

자와 반응시킨 결과 OEP 면역토끼 및 정상토끼 모두에서 반응시간에 관계없이 5%이하의 다핵중성구에서만 라텍스입자의 탐식이 관찰되어 OEP에 의한 비특이적 탐식능의 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 6 참조).

한편 다핵중성구의 식균능을 알아본 결과에서 보면 녹농균과의 반응시간이 지날수록 균과 다수의 다핵중성구가 서로 모이는 경향을 보였으며 이러한 응집과속에는 monocyte가 같이 존재하고 있는 양상을 보였다(Fig. 7 참조).

5. OEP면역이 다핵중성구의 녹농균 살균능에 미치는 영향

OEP로 면역한 토끼의 말초혈액내의 다핵중성구에 의한 녹농균 살균능을 정상과 비교 측정한 결과를 보면 정상토끼의 말초혈액내에서는 반응 즉시 ml당 2.6×10^7 되게 존재했던 녹농균이 반응 30분 후에는 ml당 2.2×10^7 으로 약 15%의 감소만 관찰되었으며 1시간 후에도 ml당 2.0×10^7 으로 약 23%의 감소만 관찰되었다. 반면 OEP면역 토끼의 말초혈액내에서는 반응 즉시에는 ml당 3.0×10^7 되게 존재했던 녹농균이 반응 30분후에는 ml당 9.7×10^5 으로 약 94.4%의 균의 감소가 관찰되어 30분 및 1시간후 모두에서 정상에 비해 유의한 생존수의 감소가 관찰되었다($p < 0.01$) (Fig. 8. 참조). 한편 OEP 면역토끼의 혈청내에 존재하는 응집항체에 의한 응집현상때문에 생길수 있는 집락수의 감소를 배제할 목적으로 말초혈액 대신에 생리식염

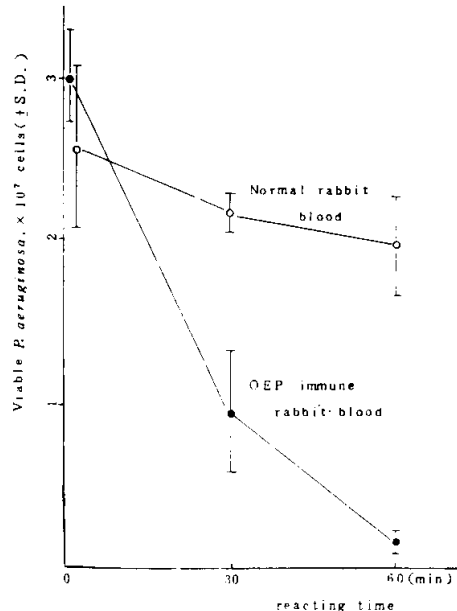


Fig. 8. Intracellular killing of *P. aeruginosa* (Pa-13) by PMN leukocytes from OEP immune and normal rabbit at 37°C.

수를 균액과 섞은 후 면역혈청을 실험군과 같은 양을 첨가한 경우, 반응중시 ml당 2.2×10^7 에서 반응 30분, 1시간 후에 각각 ml당 3.3×10^7 및 2.6×10^7 로, 적어도 균의 감소는 관찰되지 않았다.

고 안

기회감염이란 정상숙주보다는 주로 저항력이 감퇴된 숙주에 한정하여 발생하거나 더 자주 또는 더 심한 감염양상을 보이는 감염증을 말하며 엄밀한 의미에선 병원내감염과 다르나 기회감염의 경우, 많은 경우가 병원내 감염이어서 구별하여 쓰지 않는 경우도 있다. 이러한 병원내 감염증의 발생빈도는 보고자에 따라 다르나 병원 입원환자의 3.5%에서 15.5% 정도로 보고하고 있다(Kislak 등, 1964; McNamara 등, 1967; McGowan 등, 1975). 그 주요 원인균은 1940년대까지는 주로 Group A hemolytic streptococcus였으나 페니실린이 도입됨에 따라 1950년대에는 *S. aureus*가 주된 치명적 원인균으로 분리되었고 aminoglycoside나 methicillin의 개발 및 사용에 따라 최근에는 점차 저항력이 떨어진 숙주에서의 병원내 감염의 원인균으로 그람 음성 간균의 분리빈도가 높아지고 있으며 특히 녹농균은 패혈증의 원인균으로 그 분리빈도가 높아지고 높은 사망율을 보여 관심을 집중시키고 있다(McNamara 등, 1967; Finland, 1970; Bennett, 1974; Reynolds 등, 1975; Flick 등, 1976). 이러한 녹농균감염의 예방 및 치료대책으로 병원내 환경 및 환자관리개선, 항생제의 적절한 투여 및 과립구의 주입등이 시도되고 있다. 이중 항생제요법의 경우 gentamicin, carbenicillin, amikacin, cephalexin 등의 전신적 투여가 시행되고 있으나 균자체가 항생제에 대하여 본질적으로 감수성이 낮다는 점, plasmid 매개 내성균주가 증가하고 있다는 점 및 고농도 항균제 투여에 따르는 항생제의 부작용 문제 등 때문에 녹농균에 의한 병원내 감염증을 항생제 요법만으로 해결하기 힘든 문제점이 있어, 최근 면역학적 방법에 의한 치료대책이 모색되고 있다(Lowbury 등, 1969; Jackson 등, 1971; Reynolds 등, 1975; Stamm 등, 1977; Gardner 등, 1980; Weinstein 등, 1980). 사람의 감마글로브린(Millican 등, 1957; Fisher 등, 1958), 사람의 항녹농균혈청 및 각종 동물에서 얻은 항녹농균혈청(Millican 등, 1960) 등을 사람 또는 생쥐에 수동면역 시켜 녹농균에 대한 방어효과를 본 결과 이환율과 사망율을 낮출 수 있었으나 항체의 역가가 생체내에 남아있지 않으며 이질단백투여에 의한 부작용등 수동면역법 자체

의 한계점이 문제로 지적되고 있다. 한편 능동면역의 경우 사균(Millican 등, 1966; 김 등, 1982) 또는 녹농균 배양액(Carney 등, 1968), 다당체(Pier 등, 1978), 섬모(Holder 등, 1982) 및 리보솜(Liberman, 1978) 및 외독소A(Pavlovski 등, 1981) 등을 백신으로 하여 동물실험을 시행하던 동종 세균감염에 대해서는 높은 방어효과를 나타내었다. 그러나 녹농균은 환경에 따라 서식하는 혈청형이 다양하여(Lany 등, 1978)한 균종의 사균 또는 추출물을 이용한 백신으로는 모든 혈청형의 녹농균증에 대한 방어 효과를 제공하기에는 문제가 있었다. 따라서 모든 혈청형의 녹농균증을 예방 및 치료할 목적으로 개발된 7개 혈청형에서 분리한 LPS를 혼합한 다가백신(Pennington, 1974), 10개 혈청형의 열처리사균 다가백신(Alexander 등, 1971), 10개 혈청형의 녹농균에서 얻은 세포벽추출물 혼합다가백신(Miler 등, 1977) 등이 사람 및 실험동물에서 모든 혈청형의 녹농균에 대한 이환율을 떨어뜨리거나 생존율을 높일 수 있는 것으로 보고되었다. 그러나 이들 다가백신의 경우 모든 혈청형의 녹농균증에 대하여 예방 및 치료효과를 나타내나 많은 양의 LPS 또는 사균을 혼합하여야 하므로 그에 따른 부작용도 간과할 수 없으며 그 예로서 백혈병 환자에 LPS백신을 사용할 때 부작용이 너무 심한 것 등이 보고되고 있다.

한편 1975년 Abe 등은 OEP가 녹농균의 자가분해 물질에서 분리된, 주로 단백질로 구성된 물질로서 LPS에 비해 치사량이나 발열성이 100배정도 적고 그람 음성균의 감염에 대해 비특이적 방어작용이 있는 물질이라고 보고하였다. LPS가 같은 혈청형의 녹농균 감염에 대해서만 방어효과를 보이는데 반하여 OEP는 모든 혈청형의 녹농균증에 대해 방어효과를 나타낸다고 주장하였다(Homma 등, 1976; Abe 등, 1977). 따라서 저자는 서울대학교 병원에서 분리한 13개 혈청형의 녹농균에 대해 OEP가 공통방어 항원으로 작용할 수 있는가를 검토하고 그 가능한 면역학적 기전의 본태를 알아보고자 실험을 진행하였다.

우선 Homma strain인 *P. aeruginosa* N-10 균주의 자가분해배양액에서 OEP를 정제하였다. 우리가 얻은 정제 OEP는 단백질이 다량 함유된 물질로 2-keto-3-deoxy octonate의 양은 LPS에 비해 약 1/8이며 총 탄수화물함량도 약 4.5% 정도였다. 따라서 소량의 LPS가 분리되지 않은 채로 단백질 성분에 남아있는 것으로 보인다.

위의 방법으로 정제한 OEP를 ICR 생쥐 한 마리당 $5\mu\text{g}$ 씩 2회 면역하고, 면역 7일 후 화상을 입힌 생쥐에 각 혈청형의 녹농균을 부강내로 주입하였을 때 대조군

에 비하여 모두 LD₅₀의 유의한 상승이 관찰되었다. 따라서 OEP는 서울대학교 병원의 임상검체에서 분리되는 모든 혈청형의 녹농균에 대한 방어효과를 숙주에게 제공하는 것으로 생각되어, 안전성을 좀 더 고려한 후에 실제로 사용해 볼 수 있는 실험결과로 사료된다.

이러한 방어효과가 나타나는 기전을 알아보기 위하여 우선 같은 방법으로 25마리의 생쥐를 OEP로 면역시키고 이들의 혈청을 얻어 혼합한 후 각 혈청형의 열처리사균의 응집항원에 대한 응집항체가를 조사하였다. 그 결과 총 13개 혈청형의 녹농균중 5개 혈청에 대하여는 정상토끼 혈청에 비해 4배 이상의 응집역가의 상승, 5개 혈청형에 대하여는 2~4배의 역가가 상승하였고 반면 응집역가의 상승이 없었던 혈청형도 3개가 관찰되었다.

위의 결과에서 면역한 녹농균의 OEP가 서로 O항원 혈청형이 다른 10개의 녹농균에 대한 응집항체가를 상승시킴을 볼 때 OEP는 O항원 성분과 다른, 대부분의 녹농균 세포벽 표면에 존재하는 항원성분이거나, 또는 몇몇 혈청형의 O항원 성분과는 교차반응을 보이는 항원성분이기 때문에 여러 혈청형의 녹농균에 대한 응집항체가를 상승시킨 것으로 추정할 수 있다.

OEP항원의 본태가 그 어느 것에 속하는 것인지는 추후 연구의 대상이 되어야 할 것이나 OEP가 모든 혈청형 녹농균에 대한 방어효과를 나타내는 기전은 녹농균중의 예방과 치료에 있어서 중요한 의미가 있다고 판단되고, 적어도 그 일부는 응집항체가의 상승에 기인할 것이라는 가정을 토대로 실험을 진행하였다. 토끼에 OEP를 면역하여 항 OEP혈청을 제조하였는데 이 항혈청은 A형 녹농균인 Pa-13 열처리 사균항원에 대하여 1:16의 응집항체가를 나타내었다.

또한 이 항혈청의 보체매개 살균능을 알아 본 결과 Pa-13 균주의 생균수가 정상토끼 혈청보다 항 OEP 혈청에 의하여 더 많이 감소되며 Pa-13균액으로 항 OEP 혈청을 흡수하였을 경우 Pa-13 균주의 생균수의 감소 현상이 소실됨을 관찰하였으나(Fig. 3) 항 OEP 혈청의 Pa-13 균주 생균수 감소효과가 보체로 사용한 1:10 guinea pig 혈청 첨가와 무관하였기 때문에 항 OEP 항체가 녹농균을 직접 살균하기 때문에 백신효과를 나타낸다고 보기는 어렵다고 하겠다. 따라서 다른 작용 기전으로 백신효과를 설명해야 하나 항 OEP 항체가 Pa-13 균주에 대한 응집효과도 가지고 있다는 사실이 항 OEP항체가 거식세포나 다핵증성구의 Pa-13 균주 식균작용을 도울 가능성을 시사하므로 이에 대한 검정 실험을 실시하였다.

OEP 면역토끼의 말초혈액과 Pa-13 균액을 37°C에서

1시간 작용시킨 결과, 면역한 토끼의 다핵증성구는 75.4%가 Pa-13 균을 식균하고 있는 반면 대조군의 다핵증성구는 28.9%만이 Pa-13을 식균하고 있어 유의한 식균능의 증가가 관찰되었다. 그러나 면역토끼의 다핵증성구라 할지라도 라텍스입자의 탐식은 증가하지 않고 있는 점으로 보아 항 OEP 항혈청은 Pa-13 균주에 대한 항체매개 살균작용은 없으나 Pa-13 균주에 대한 다핵증성구의 식균능 촉진작용은 있다는 것을 확인할 수 있었다.

한편 OEP 면역토끼의 말초혈액내의 다핵증성구는 균에 대한 식균능 뿐 아니라 살균능도 증가되어, 정상토끼 말초혈액과 Pa-13균액을 1시간 반응시켰을 경우 생균집락수가 약 23.0% 감소하였으나 면역토끼 말초혈액과 반응시켰을 경우에는 약 94.4%의 생균집락수의 감소를 보여 OEP 면역토끼 다핵증성구의 녹농균에 대한 살균능이 유의하게 증가되어 있음을 관찰하였다.

따라서 OEP에 의한 모든 혈청형 녹농균에 대한 방어효과와 일부는 응집항체가 상승에 의한 균의 응집으로 식세포인 다핵증성구 및 거식세포에 쉽게 식균될 수 있게 하는 것과 OEP 자체가 식세포의 살해능을 증진시킨데 기인할 것으로 사료되나, 응집항체가가 관찰되지 않았던 혈청형의 녹농균에 대하여도 방어효능이 있었던 점, OEP 면역혈청을 Pa-13 균액으로 흡수하여도 생균집락수의 감소가 완전히 억제되지 못한 점등을 고려하면 위의 기전 이외에도 OEP가 비특이적 면역증강제로 작용할 수 있는 가능성도 있어 OEP가 T 림프구에 미치는 영향, OEP의 비특이적 B 림프구 활성화작용 등 여러 면역기구의 활성화에 미치는 영향을 좀 더 탐구, 이에 관한 지식을 축적하여, 녹농균중 예방을 위하여 OEP백신을 임상적으로 사용 가능케 할 토대를 마련해야 할 것으로 사료된다.

요 약

녹농균은 병원내 기회감염의 주요 원인균의 하나로 여러 항생제에 대한 본질적 감수성이 낮고 고도의 항생제 내성균주의 출현으로 항생제 요법에 의한 치료에 많은 문제점을 주고 있다.

저자들은 녹농균의 자기분해산물에서 정제한 original endotoxin protein의 전 혈청형의 녹농균에 대한 방어효과와 그 면역학적 기전의 본태를 알아 보고자 OEP를 생쥐당 5μg씩 2회 면역한 ICR 생쥐에 화상을 입힌 후 13개 혈청형의 녹농균을 공격하여 생존율을 10일간 관찰하고, LD₅₀를 산정하여 OEP의 방어효과를 검정하고 OEP가 체액성면역반응 및 말초혈액내 다핵증성구

의 식균능 및 살균능에 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 서울대학교 병원에서 분리한 13개 혈청형의 녹농균 공격에 대해 OEP면역 생쥐에서 대조군에 비해 유의한 LD₅₀의 증가가 관찰되었다.

2. OEP 면역생쥐 혈청내에는 녹농균에 대한 응집항체가 정상생쥐혈청에 비해 A형(Pa-13), D형(Pa-48), E형(Pa-16), G형(Pa-55) 및 J형(Pa-84)은 4배 이상, H형(Pa-79), I형(Pa-49), K형(Pa-80), L형(Pa-83) 및 M형(Pa-85)에 대해서는 2~3배 상승되었으나 B형(Pa-4), C형(Pa-29) 및 F형(Pa-9)의 3개 혈청형에 대해서는 차이가 없었다.

3. 녹농균을 OEP 면역토끼혈청과 4°C에서 24시간 반응시키면 녹농균의 생균집락수는 96.4% 감소되었다. 그러나 OEP 면역토끼 혈청을 Pa-13균으로 흡수 후 반응시키면 78.0%만 감소되어 집락의 감소가 흡수에 의해 억제되었다.

4. 정상 토끼의 말초혈액과 Pa-13 균액을 37°C에서 반응시키면 반응 30분 및 1시간후에서 24.2% 및 28.9%의 말초혈액내 다핵중성구가 녹농균을 식균한데 비해 OEP 면역토끼의 말초혈액내 다핵중성구는 64.0% 및 80.0%가 녹농균을 식균하였다.

5. 정상 토끼의 말초혈액과 Pa-13 균액을 37°C에서 30분 및 1시간 반응시키면 반응전에 비해 15.0% 및 23.0%의 생균수가 감소하는 데 비해 OEP 면역토끼 말초혈액과 Pa-13 균액을 반응시키면 30분 및 1시간후에 68.0% 및 94.0%의 유의한 생균수의 감소가 관찰되었다.

—ABSTRACT—

Protective effect of original endotoxin protein and possible immunological mechanism

**Myoung Sik Choi. Woo Hyun Chang.
Ik Sang Kim**

*Department of Microbiology and Cancer Research
Institute, College of Medicine, Seoul National
University*

Pseudomonas aeruginosa has been known as one of the major causative microorganisms of the opportunistic infection. However, a variety of chemotherapeutic measures have been found to be unsatisfactory because

of its intrinsic resistance to most of currently used chemotherapeutic agents and of its ability to acquire antimicrobial resistance.

Therefore, immunological measures have been tried as an alternative approach to prevent *pseudomonas* infection.

In this study, original endotoxin protein(OEP), which was purified from autolytic culture lysates of *P. aeruginosa* N-10, was studied with respect to its preventive effect in *pseudomonas* infection and its possible mechanisms of action.

The preventive effect was evaluated by comparing LD₅₀ of *P. aeruginosa* in burned mice with or without OEP immunization (5μg/mouse, twice).

The protective mechanism of OEP was studied in the aspect of the humoral immune response and phagocytic and bactericidal activities of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the immunized mice.

The results were as follows.

1. LD₅₀ of *P. aeruginosa* was significantly (over the 95% confidence interval) increased in the OEP immune ICR mice, against challenge with 13 serotypes of *P. aeruginosa* isolated from clinical specimen of Seoul National University Hospital.
2. After OEP immunization, rising of agglutinin titer to 10 kinds of *P. aeruginosa* serotype were observed.

Ten serotypes was as follow; A(Pa-13), D(Pa-48), E(Pa-16), G(Pa-55), H(Pa-79), I(Pa-49), J(Pa-84), K(Pa-80), L(Pa-83), and M(Pa-85).

But agglutinins to 3 kinds of *P. aeruginosa*, serotype B(Pa-4), C(Pa-29) and F serotype (Pa-9) were not observed.

3. Only 5.6% of *P. aeruginosa* were survived after reacting with the OEP immune rabbit serum with complement for 24 hrs, at 4°C.

Decreasing viable *P. aeruginosa* after reacting with the OEP immune rabbit serum was partially inhibited by absorbing the OEP immune serum with Pa-13.

4. When rabbit peripheral blood was reacted with Pa-13 (5×10⁷ microorganism/ml) for 1 hour at 37°C, phagocytic activity was found in 80.0% of polymorphonuclear leukocytes from OEP immune rabbit and 28.9% from normal rabbit.

5. Number of viable *P. aeruginosa* was decreased to 6% after reacting with the OEP immune rabbit blood for 1 hour at 37°C, in contrast it was decreased to 77% in normal rabbit blood.

REFERENCES

- Abe, C., Shionoya, H., Hirao, Y., and Homma, J.Y.: *Common Protective Antigen (OEP) of Pseudomonas aeruginosa*. *Japan. J. Exp. Med.*, 45:355-359, 1975.
- Abe, D., Tanamoto, K., and Homma, J.Y.: *Infection Protective Property of the Common Antigen (OEP) of Pseudomonas aeruginosa and Its Chemical Composition*. *Japan. J. Exp. Med.*, 47:393-402, 1977.
- Alexander, J.W., Fisher, M.W. and MacMillan, B. G.: *Immunological Control of Pseudomonas Infection in Burned Patients: A Clinical Evaluation*. *Arch. Surg.*, 102:31-35, 1971.
- Bennett, J.V.: *Nosocomial Infections due to Pseudomonas*. *J. Infect. Dis.*, 130(suppl.):4-7, 1974.
- Carney, S.A. and Jones, R.J.: *Biological and Immunological Properties of Culture Filtrates of Virulent and Avirulent Strains of Pseudomonas aeruginosa*. *Br. J. Exp. Path.*, 49:395-410, 1968.
- 장우현, 최명식, 이광호, 석종성: 녹농균증에 대한 다 가녹농균 백신효과의 실험적 연구. 서울의대학술지, 23:436-442, 1982.
- Finland, M.: *Changing Ecology of Bacterial Infections as Related to Antibacterial Therapy*. *J. Infect. Dis.*, 122:419-431, 1970.
- Fisher, M.W. and Manning, M.C.: *Studies on the Immunotherapy of Bacterial Infections. I. The Comparative Effectiveness of Human r-Globulin against Various Bacterial Species in Mice*. *J. Immunol.*, 81:29-35, 1958.
- Flick, M.R. and Cluff, L.E.: *Pseudomonas Bacteremia, Review of 108 Case*. *Am. J. Med.*, 60:501, 1976.
- Gardner, P., Bennett, J.V., Burk, J.P., McGowan, J.E., Jr. and Wenzel, R.P.: *Nosocomial Management of Resistant Gram-Negative Bacilli*. *J. Infect. Dis.*, 141:415-417, 1980.
- Graber, C.D., Cummings, D., Vogel, E.H., Jr. and Tumbusch W.T.: *Measurement of the Protective Effect of Antibody in Burned and Unburned Patients' Sera for Pseudomonas aeruginosa Infected Mice*. *Texas, Rep. Biol. Med.*, 19:268-276, 1961.
- Holder, I.A., Wheeler, R. and Montie, T.C.: *Flagellar Preparations from Pseudomonas aeruginosa: Animal Protection Studies*. *Infect. Immun.*, 35:276-280, 1982.
- Homma, J.Y., Abe, C., Okada, K., Tanamoto, K. and Hirao, Y.: *The Biological Properties of the Protein Moiety of Endotoxin of Pseudomonas aeruginosa in Animal, Plant, and Microbial toxins, Vol. 1*, edited by Ohsaka, A., Hayashi, K. and Sawai, Y., Plenum, New York, 1976.
- Jackson, G.G. and Riff, L.J.: *Pseudomonas Bacteremia: Pharmacologic and Other Bases for Failure of Treatment with Gentamicin*. *J. Infect. Dis.*, 124 (Suppl.): 185-191, 1971.
- 김종화, 김진영, 최명식, 장우현: 녹농균감염에 대한 동종 백신 효과에 관한 실험적 연구. 대한 이비인후과 학회지, 23:236-248, 1982.
- Kislak, J.W., Eickhoff, T.C., and Finland, M.: *Hospital-Acquired Infections and Antibiotic Usage in the Boston City Hospital, January, 1964*. *N. Engl. J. Med.*, 271:834-835, 1964.
- Lany, B. and Bergan, T.: *Serological Characterization of Pseudomonas aeruginosa*, in *Method in Microbiology, Vol. 10*, edited by Bergan, T. and Norris, J.R., Academic Press, London, 1978.
- Lieberman, M.M.: *Pseudomonas Ribosomal Vaccines: Preparation, Properties, and Immunogenicity*. *Infect. Immun.*, 21:76-86, 1978.
- Lowbury, E.J.L., Kidson, A., Lilly, H.A., Ayliffe, G.A.J. and Jones, R.J.: *Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to Antibiotics: Emergence of Strains Highly Resistant to Carbenicillin*. *Lancet*, ii:448-452, 1969.
- McGowan, J.E., Jr., Barnes, M.W. and Finland, M.: *Bacteremia at Boston City Hospital: Occurrence and Mortality during 12 Selected Years (1935-1972), with Special Reference to Hospital-Acquired Cases*. *J. Infect. Dis.*, 132:316-335, 1975.
- McNamara, M.J., Hill, M.C., Balows, A., and Tucker, E.B.: *A Study of the Bacteriologic Patterns of Hospital Infections*. *Ann. Intern. Med.*, 66:480-488, 1967.

- Miler, J.M. Soilsbury, J.F., Jones, R.J., Roe, E.A. and Lowbury, E.J.L.: *A New Polyvalent Pseudomonas Vaccine*. *J. Med. Microbiol.*, **10**:19-27, 1977.
- Millican, R.C., Rust, J. and Rosenthal, S.M.: *Gamma Globulin Factors Protective against Infections from Pseudomonas and Other Organisms*. *Science*, **126**: 509-511, 1957.
- Millican, R.C. and Rust, J.D.: *Efficacy of Rabbit Pseudomonas Antiserum in Experimental Pseudomonas aeruginosa Infection*. *J. Infect. Dis.*, **107**: 389-394, 1960.
- Millican, R.C., Evans, G. and Markley, K.: *Susceptibility of Burned Mice to Pseudomonas aeruginosa and Protection by Vaccination*. *Ann. of Surg.*, **163**:603-610, 1966.
- Pavlovski, O.R., Edman, D.C., Leppla, S.H., Wretling, B., Lewis, L.R. and Martin, K.E.: *Protection Against Experimental Pseudomonas aeruginosa Infection in Mice by Active Immunization with Exotoxin A Toxoids*. *Infect. Immun.*, **32**:681-689, 1981.
- Pennington, J.E.: *Preliminary Investigations of Pseudomonas aeruginosa Vaccine in Patients with Leukemia and Cystic Fibrosis*. *J. Infect. Dis.*, **130** (Suppl.): S159-S162, 1974.
- Pier, G.B., Sidberry, H.F., Zolyomi, S. and Sadoff, J.C.: *Isolation and Characterization of a High-Molecular-Weight Polysaccharide from the Slime of Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, **22**: 908-918, 1978.
- Reynolds, H.Y., Levine, A.S., Wood, R.E., Zierdt, C.H., Dale, D.C. and Pennington, J.E.: *Pseudomonas aeruginosa Infections: Persisting Problems and Current Research to Find New Therapies*. *Ann. Intern. Med.*, **82**:819-831, 1975.
- Stamm, W.E., Martin, S.M. and Bennett, J.V.: *Epidemiology of Nosocomial Infections Due to Gram-Negative Bacilli: Aspects Relevant to Development and Use of Vaccines*. *J. Infect. Dis.*, **136** (Suppl.): S151-S160, 1977.
- Thoburn, R., Fekety, F.R., Jr., Cluff, L.E. and Melvin, V.B.: *Infections Acquired by Hospitalized Patients*. *Arch. Int. Med.*, **121**:1-10, 1968.
- Weinstein, R.A., Nathan, C., Gruensfelder, R., and Kabins, S.A.: *Endemic Aminoglycoside Resistance in Gram Negative Bacilli: Epidemiology and Mechanisms*. *J. Infect. Dis.*, **141**:338-345, 1980.