

다가녹농균백신의 방어효과와 면역학적 기전

Polyvalent *Pseudomonas* Vaccine—Effects and Immunologic Mechanisms of Protection

서울大學校 醫科大學 泌尿器科學 教室

李 相 殷 · 金 英 均

서 론

항균제는 감염성질환의 치료에 커다란 도움을 주고 있으나 한편으로는 항균제 내성균주의 유행과 더불어 병원내감염(hospital infection)이라는 새로운 양상의 감염질환을 초래하고 있다. 일반적으로 전입원환자의 5~15%를 차지하고 있는(Feingold, 1970) 병원내감염은 아직도 해결하지 못하고 있는 중요한 과제로, 과거에는 주원인균이 그람양성균이었으나 근간에는 새로이 개발된 항생제 사용으로 인하여 그람양성균에 의한 병원내감염 빈도는 현저하게 감소하고, 상대적으로 그람 음성균에 의한 병원내감염 빈도가 증가하고 있다(Feingold, 1970). 이 중에서도 녹농균에 의한 병원내감염은 점차로 증가하고 있으며 대체로 병원내감염의 원인균 중에서 약 10%를 차지하고 있다(Feingold, 1970; McGown 등, 1975; Gardner 등, 1980). 녹농균의 가장 흔한 감염원은 비뇨기계이며 수술창, 하부호흡기, 화상, 피부 및 혈액도 중요한 원천으로 되어 있는데, 그 특유한 내인성내성(intrinsic resistance)과 R-plasmid매개로 인한 내성균으로 변이하여 항생제에 대한 저항이 높아 녹농균에 의한 폐혈증의 빈도는 감소되고 있지 않으며(McNamara, 1967) 이로 인한 사망율이 70%에 달하고 있다(Flick and Cluff, 1976). 더구나 녹농균감염은 면역학적 기능이 저하된 환자나 해부학적 구조의 이상에 의한 기능저하가 있는 환자에게 흔히 발생하기 때문에 효과적인 치료는 선행질환에 대한 치료를 비롯한 숙주의 자연적인 방어기전을 함진시키는 방법이 가장 중요하다 할 수 있다. 그러나 선행질환의 치유가 어렵고 항생제의 치료가 비효과적인 녹농균감염증에 대한 예방 및 치료를 위해서 감염환자의 저항력을 증진시키는 방법을 이용해야 하기 때문에 단독으로 또는 항균제요법과 병합하여 사용할 수 있는 면역학적 방

법에 대한 연구가 크게 관심을 끌고 있다. 즉, 중독한 증상을 나타내어 임상적으로 문제가 되는 그람음성간균은 일반적으로 면역요법에 저항함으로써 효과적으로 숙주방어기전을 증진시킬 수는 없으나 이들 가운데서 표면항원에 대한 항체가 형성되어 효과적인 opsonin으로서 작용할 수 있거나 또는 그에 대한 세포성면역을 유발시킬 수 있는 균종이 있다면 그 균은 면역학적 치료에 적절한 대상이 될 수 있다. 일찌기 녹농균에 대한 면역학적요법의 발상은 다양한 혈청형 및 독소의 분리와 더불어 병인성에 있어서 녹농균의 다양한 항원성분들의 역할이 밝혀짐으로써 시작되었고(Verder and Evans, 1961; Liu and Bates, 1961), 면역학적 방법으로 항혈청, 감마글로불린을 투여하는 수동면역이 있으나(Millican 등 1957; Millican and Rust, 1960; Graber 등 1961; Lieberman 등, 1979) 이는 단점이 많으며 그 적용이 제한되어 있다. 능동면역은 생균(Walker 등, 1964) 사균(Millican 등, 1966; Jones and Lowbury, 1972; 김 등, 1982) LPS(lipopolysaccharide)(Alexander 등, 1971; Young 등, 1973), 세포벽추출물(Miler 등 1977; Jones 등, 1979), 리보솜(Lieberman, 1978), PS(polysaccharide)(Pier 등, 1978) 및 섬모(Holder 등, 1982) 등이 있으나 이들은 일반적으로 동종의 혈청형에만 특이하게 방어효과가 있는 단점이 있다.

본지자는 서울대학교병원 임상검사과에서 분리된 137 균주의 녹농균을 대상으로 혈청형을 결정하고 장(1982) 등에 의하여 보고된 녹농균의 교차항원에 대한 분석을 토대로 2종의 다가녹농균백신을 회색, 제조하여 녹농균에 대한 방어효과와 그 면역학적 기전을 실험적으로 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 녹농균의 혈청형검사

슬라이드 응집반응법으로 서울대학교병원에 내원한 환자의 임상검체에서 분리한 총 137균주를 대상으로

† 1984년 7월 5일 접수

혈청형을 결정하였으며, 이때 사용한 표준혈청은 녹농균 진단용 면역혈청(日本國 デカソ 生研株式会社, 제조번호: 389)이다.

2. 다가녹농균 백신제조

다양한 혈청형의 교차반응정도를 고려하고 모든 분리균주의 항원에 대하여 높은 응집항체를 나타낼 수 있게 A형은 Pa-13, B형은 Pa-4, C형은 Pa-29, D형은 Pa-48, F형은 Pa-9, G형은 Pa-55, H형은 Pa-79, I형은 Pa-49, K형은 Pa-80 및 L형은 Pa-83의 10가지 균주를 선정하여 다가녹농균백신을 제조하였다.

이들을 모두 함께 혼합할 경우 각 항원성분이 희석되는 단점과 항원간의 경쟁으로 인한 항체가의 감소등의 문제점이 있을 것으로 사료되어 다가녹농균백신은 각각 절반씩 2종으로 나누었다. 즉 다가녹농균백신-I은 A형(Pa-13), C형(Pa-19), D형(Pa-48), G형(Pa-55) 및 I형(Pa-49)을, 다가녹농균백신-II는 B형(Pa-4), F형(Pa-9), H형(Pa-79), K형(Pa-80) 및 L형(Pa-83)의 열처리한 사균항원을 동량혼합제조한 것이다.

각 균주를 열처리한 사균항원의 제조방법은 2%가 되게 neopepton을 첨가한 brain heart infusion (BHI) broth에 녹농균주를 식균하고 37°C에서 24시간 진탕배양한 후, 멸균생리식염수로 3번 세척하고(5,000RPM, 30분), 생리식염수로 650mm에서 Optical density(O.D.)가 0.73되게 균부유액을 제조하였다. 제조한 균부유액을 100°C에서 3시간 가온처리한 후, Fluid thioglycolate배지에 식균, 37°C에서 48시간 배양하여 멸균여부를 점검하고 merthiolate를 1:10,000되게 첨가한 후 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

3. 응집항체가 추정 및 다가녹농균 백신의 방어효과와 검증

1) 실험동물; 생후 6주 순계 ICR생쥐를 암수 구별없이 사용하였다.

2) 면역방법; ICR생쥐 복강내로 다가녹농균백신-I 및 II를 0.1ml씩 교대로 2일 간격으로 각 2차례씩 총 4회 면역하였다. 대조군은 0.1ml의 생리식염수를 같은 방법으로 투여하였다.

3) 응집항체가의 측정; 마지막 면역한 후 4일째에 다가녹농균으로 면역한 생쥐(25마리) 및 대조군(25마리)의 혈청을 얻어, 2배 계단희석법으로 동량의 열처리한 사균을 가하여 37°C항온수조에서 2시간 반응시킨 후 4°C에서 24시간 정지하여 침전여부를 판독, 역가를 결정하였다.

4) 화상유발방법; 백신을 투여한 4일 후 생쥐의 등쪽털을 깎아 80~85°C의 물에 5초동안 담그어 2도화상을 입혔으며 화상면적을 체표면의 약 20%되게 조정하

였다.

5) 녹농균 공격방법; 13개 혈청형의 녹농균부유액을 각각 O.D.(590mm)가 $2.7(3 \times 10^9)$ Cell/ml되게 제조하여 A, E, I, J, K형은 10배, B, F, G, H형은 $10^{1/2}$ 배, C, D, L, M형은 $10^{1/4}$ 배 계단희석하여 5개 종류의 다른 농도의 녹농균부유액을 제조하고, 다가녹농균백신으로 미리 면역한 생쥐군과 화상만을 입힌 대조군에 각각의 공격균주당 5종류의 균농도를 농도당 10마리의 생쥐에 공격하였다. 공격은 생쥐당 0.1ml씩의 균액을 화상 후, 즉시 복강내로 하였고, 집락측정법으로 제조한 균부유액내의 실제 공격균수를 결정하였다.

6) 백신효능의 유의성 분석; 면역군 및 대조군의 생리생존수를 공격 후 10일까지 관찰하여 Spearman-Kärbar법으로 LD₅₀를 산정하고, 그 95% 신뢰한계구간을 구해 면역군과 대조군의 LD₅₀ 사이의 유의성을 검정하였다.

4. 가토에서의 녹농균 항혈청 제조

교차응집반응이 비교적 적은 Pa-4 및 Pa-9균주로 650mm에서 O.D.가 0.73되게 열처리한 사균을 각각 제조하고, 토끼(2.5kg)의 귀정맥에 각각 0.5ml, 1ml, 2ml, 3ml씩 4일 간격으로 면역하고 18일째 채혈하여 항혈청을 얻었다. 이를 millipore(pore size: 0.22 μ)여과기로 여과, 멸균한 후 서로의 교차응집반응이 없음을 확인하고 -50°C에서 보관하며 사용하였다. 이들 항혈청에서 동종항원에 대한 응집항체가는 각각 512였다. Pa-4로 흡수한 항 Pa-9혈청은 항 Pa-9혈청과 Pa-4열처리사균(60°C에서 2시간 정지)을 동량 가하여 37°C항온수조에서 3시간 반응시키고 10,000 RPM, 30분 원심분리한 후 상청액을 얻어 냉동건조하였다. 이를 2배 희석하여 증류수로 녹인 후 millipore여과기로 여과시켜 멸균후 -50°C에서 보관하며 사용하였다.

5. 녹농균항혈청에 의한 수동면역의 방어효과에 대한 검증

항 Pa-4혈청, 항 Pa-9혈청 및 Pa-4흡수 항 Pa-9혈청은 ICR생쥐의 꼬리 정맥을 통해 0.4ml씩 각 50마리에 1회 수동 면역하고, 면역 1일 후 화상을 입힌 다음 녹농균 공격을 시행하여 대조군과 비교하였다. 공격군은 Pa-4 녹농균부유액을 $10^{1/2}$ 씩 계단희석하여 5개 농도의 녹농균부유액을 제조하고, 각 면역군에 농도당 10마리의 생쥐에 공격하였으며, Spearman-Kärbar법으로 LD₅₀를 산정하고 95% 신뢰한계구간을 구하여 면역군과 대조군의 LD₅₀ 사이의 유의성을 검정하였다. 제조된 균부유액내의 공격균수는 집락측정법으로 결정하였다.

6. 생체의 혈액, 간, 비장 및 피부에서의

녹농균수 측정

항 Pa-4혈청, 항 Pa-9혈청, Pa-4흡수 항 Pa-9혈청을 0.4ml씩 각각 수동면역한 면역군과 대조군에 면역 1일 후 3의 방법으로 화상을 입히고, 화상부위에 피하주사로 0.1ml의 Pa-4균액(2.24×10^5 /ml)을 공격하였다. 공격 1일 후 무균적으로 혈액, 비장, 간 및 피부부를 얻어 집락측정법으로 균수를 측정하였다.

혈액의 균수를 측정할 때는 혈액 0.1ml을 0.9ml의 멸균된 증류수에 희석 후 30초간 진탕하고 멸균생리식염수로 계단희석하였으며, 비장, 간, 피부는 멸균생리식염수가 미리 담긴 원추형 원심분리용시험관에 넣어 부피를 측정하고, 멸균처리한 Omnimixer(Sorvall)로 최대속도에서 2분간 균질액을 만든 후 계단희석하여 집락측정법으로 균수를 산정하였다. 모든 측정은 3마리에서 얻은 장기를 혼합하여 균질액을 만든 후 3회씩 접체를 얻어 그 평균치로 균수를 결정하였다.

결 과

1. 서울대학교병원에서 분리한 녹농균의 혈청형 양상

서울대학교병원에 내원한 환자의 임상검체에서 분리한 녹농균은 총 137균주로 이를 대상으로 슬라이드 응집반응법에 의해 혈청형을 정하였다. 분리된 녹농균은 전혈청형에서 다양하게 분포하는 양상을 보였다. G형이 23주(17%)로 가장 높은 분리 빈도를 보였으며 B형 21주(15%), C형 18주(13%), E형 17주(12%)의 순으로 분리 빈도를 보였다.

한편 혈청형을 정할 수 없었던 균주는 11주(8%)에서 분리되었으며 여러 혈청형의 항혈청에 응집을 보인 균주도 2주 분리되었다(표 1).

2. 다가녹농균백신의 방어효과

모든 혈청형에 응집항체가 나타낼 수 있게 균주를 선정하고 항원경쟁 및 희석도를 고려하여 두 종류의 백신을 제조 면역 후, 면역군 및 대조군에서 13종의 혈청형에 대한 LD₅₀을 비교하여 녹농균에 대한 다가녹농균백신의 방어효과를 검정하였다.

면역군에서의 녹농균에 대한 LD₅₀은 대조군에 비해 적게는 2배(D형)에서 높게는 320배(I형) 증가하였다(표 2). 한편 95% 신뢰구간을 산정하여 면역군과 대조군에서 LD₅₀로 유의성을 검정한 결과 A형(Pa-13), E형(Pa-16) 및 J형(Pa-84)을 제외하고는 모든 혈청형의 녹농균주에서 LD₅₀가 대조군에 비해 면역군에서 현저하게 증가하였다. 즉 다가녹농균백신으로 면역한 군에서 대조군에 비해 녹농균의 공격에 대한 생존율이

Table 1. Serotype of *P. aeruginosa*

| Serotype of <i>P. aeruginosa</i> | No. of <i>P. aeruginosa</i> | Frequency of <i>P. aeruginosa</i> |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| A | 11 | 8% |
| B | 21 | 15% |
| C | 18 | 13% |
| D | 5 | 4% |
| E | 17 | 12% |
| F | 7 | 5% |
| G | 23 | 17% |
| H | 5 | 4% |
| I | 2 | 1% |
| J | 6 | 4% |
| K | 3 | 2% |
| L | 2 | 1% |
| M | 4 | 3% |
| Untypable | 11 | 8% |
| Polyagglutinable | 2 | 1% |
| Utotal | 137 | |

높았다(표 2, 그림 1).

3. 다가녹농균백신으로 면역한 혈청의 녹농균주에 대한 응집항체가

다가녹농균백신의 면역에 대한 응집항체의 상승과 LD₅₀로 관찰한 방어효과와의 상관관계를 알아보기 위하여 방어효과를 평가한 실험방법과 동일하게 면역한 실험군에서 혈청을 제조하여 녹농균에 대한 항체가 대조군과 비교 측정하였다. 그 결과 모든 혈청형의 녹농균에 대한 응집항체는 각각에서 2배이상으로 역가가 상승되었다(표 3).

그러나 응집항체가 4로 미약한 상승을 보인 C형(Pa-29), E형(Pa-16), G형(Pa-55), K형(Pa-80), L형(Pa-83), 및 M형(Pa-85) 중에서 E형(Pa-16)을 제외한 나머지 균주에서는 유의한 녹농균에 대한 LD₅₀의 상승이 관찰되는 결과 또한 J형(Pa-84)의 경우엔 응집항체가 512인데도 유의한 LD₅₀의 상승이 관찰되지 않은 점으로 보아 응집항체의 상승만으로는 다가녹농균백신의 방어효과를 설명할 수 없을 것으로 추정되었다(표 2, 3). 즉 녹농균의 0항원에 대한 응집항체의 상승만으로는 다가녹농균백신의 방어효과를 설명할 수가 없다.

4. 수동면역에 의한 표면항원의 방어항원성 분석

응집항체가(표면 0항원에 대한 항체가)가 다가녹농균백신의 녹농균주에 대한 방어효과와 전부를 설명하

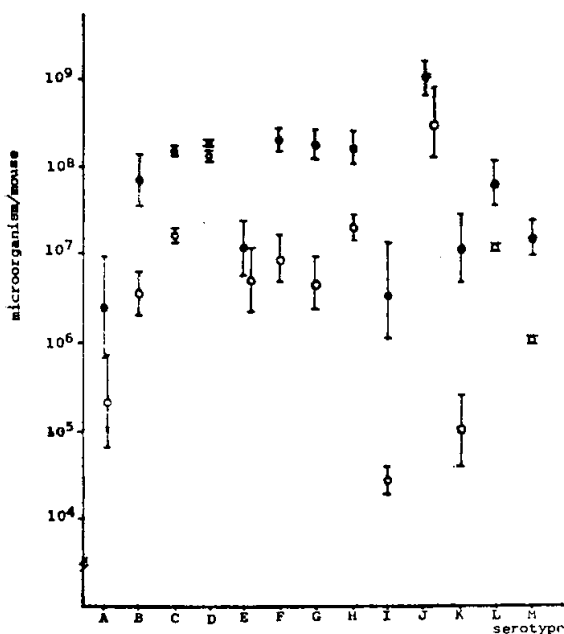
Table 2. Protective effect of polyvalent *Pseudomonas* vaccine on *Pseudomonas* in burned mouse

| Challenge strain (serotype) | LD ₅₀ in immune mice | | LD ₅₀ in non-immune mice | | |
|-----------------------------|---------------------------------|--|-------------------------------------|--|----|
| | Mean | 95% C.I. | Mean | 95% C.I. | |
| Pa-13 (A) | 2.9 × 10 ⁶ | 9.6 × 10 ⁶ —7.3 × 10 ⁵ | 2.1 × 10 ⁵ | 7.6 × 10 ⁵ —5.5 × 10 ⁴ | NS |
| Pa-4 (B) | 8.4 × 10 ⁷ | 1.4 × 10 ⁸ —5.2 × 10 ⁷ | 4.8 × 10 ⁶ | 7.8 × 10 ⁶ —2.6 × 10 ⁶ | S |
| Pa-29 (C) | 1.4 × 10 ⁸ | 1.9 × 10 ⁸ —1.1 × 10 ⁸ | 2.0 × 10 ⁷ | 2.5 × 10 ⁷ —1.6 × 10 ⁷ | S |
| Pa-48 (D) | 2.7 × 10 ⁸ | | 1.4 × 10 ⁸ | 1.8 × 10 ⁸ —1.1 × 10 ⁸ | S |
| Pa-16 (E) | 1.6 × 10 ⁷ | 3.3 × 10 ⁷ —7.3 × 10 ⁶ | 6.2 × 10 ⁶ | 1.1 × 10 ⁷ —3.1 × 10 ⁶ | NS |
| Pa-9 (F) | 2.9 × 10 ⁸ | 4.4 × 10 ⁸ —1.9 × 10 ⁸ | 1.3 × 10 ⁷ | 2.3 × 10 ⁷ —7.1 × 10 ⁶ | S |
| Pa-55 (G) | 2.8 × 10 ⁸ | 4.3 × 10 ⁸ —1.8 × 10 ⁸ | 6.2 × 10 ⁶ | 9.9 × 10 ⁶ —3.9 × 10 ⁶ | S |
| Pa-79 (H) | 2.2 × 10 ⁸ | 4.4 × 10 ⁸ —1.1 × 10 ⁸ | 3.5 × 10 ⁷ | 5.1 × 10 ⁷ —2.2 × 10 ⁷ | S |
| Pa-49 (I) | 4.5 × 10 ⁶ | 1.9 × 10 ⁷ —1.1 × 10 ⁶ | 1.4 × 10 ⁴ | 3.3 × 10 ⁴ —6.2 × 10 ⁴ | S |
| Pa-48 (J) | 1.2 × 10 ⁹ | 2.0 × 10 ⁹ —7.1 × 10 ⁸ | 5.4 × 10 ⁸ | 9.5 × 10 ⁸ —3.0 × 10 ⁸ | NS |
| Pa-80 (K) | 1.7 × 10 ⁷ | 5.5 × 10 ⁷ —7.9 × 10 ⁶ | 1.4 × 10 ⁵ | 4.6 × 10 ⁵ —4.0 × 10 ⁴ | S |
| Pa-83 (L) | 9.6 × 10 ⁷ | 1.4 × 10 ⁸ —6.8 × 10 ⁷ | 1.7 × 10 ⁷ | 2.0 × 10 ⁷ —1.5 × 10 ⁷ | S |
| Pa-85 (M) | 2.1 × 10 ⁷ | 4.4 × 10 ⁷ —1.1 × 10 ⁷ | 1.1 × 10 ⁶ | | S |

C.I. : Confidence interval.

S : Significant compared with non-immune.

NS : Not significant compared with non-immune.



● : Vaccinated group, LD₅₀ and 95% confidence interval.

○ : Non-vaccinated group, LD₅₀ and 95% confidence interval.

Fig. 1. Protective effect of polyvalent pseudomonas vaccine on *Pseudomonas* infection in burned mouse.

Table 3. Agglutination titer of the immune and non immune ICR mouse sera

| Antigen (Serotype) | Agglutination titer | |
|--------------------|---------------------|-----------|
| | Immune | Non-immun |
| Pa-13 (A) | 16 | 4 |
| Pa-4 (B) | 8 | 0 |
| Pa-29 (C) | 4 | 0 |
| Pa-48 (D) | 128 | 0 |
| Pa-16 (E) | 4 | 0 |
| Pa-9 (F) | 8 | 0 |
| Pa-55 (G) | 4 | 0 |
| Pa-79 (H) | 8 | 0 |
| Pa-49 (I) | 32 | 0 |
| Pa-84 (J) | 512 | 32 |
| Pa-80 (K) | 4 | 0 |
| Pa-83 (L) | 4 | 0 |
| Pa-85 (M) | 4 | 0 |

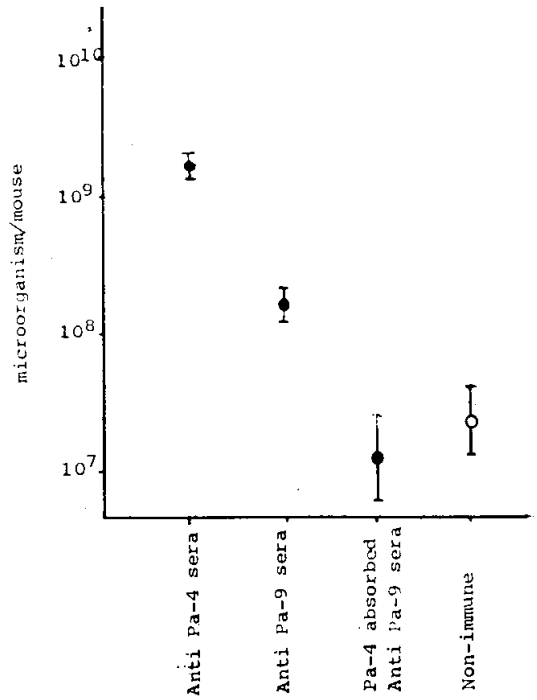
기에는 미흡한 실험결과를 얻어 녹농균 0항원외의 다른표면항원이 방어항원의 역할을 할 수 있는가 알아보기 위하여 토끼의 녹농균항원청으로 수동면역한 면역군에서 녹농균에 대한 방어효과를 분석 검토하였다. 즉 0항원의 교차반응이 없는 Pa-4와 Pa-9와 균주를 선정하

여 토끼의 녹농균항혈청(항 Pa-9혈청 및 항 Pa-4혈청)을 제조하여 상대 항원에 대해서는 응집항체를 보이지 않음을 확인한 후 이들 녹농균항혈청을 수동면역하고 면역군 및 대조군에 화상을 입힌 다음 Pa-4균을 복강내 공격하였다. 그 결과 항 Pa-4혈청으로 수동면역한 후 Pa-4를 공격한 군에서는 Pa-4의 LD₅₀가 2.7×10⁹이었으나 대조군에 Pa-4를 공격한 군에서는 Pa-4의 LD₅₀가 3.9×10⁷으로 항 Pa-4혈청을 수동면역한 군에서 LD₅₀가 유의하게 상승되어 있어 Pa-4공격에 대한 방어력이 증가되었다. 한편 항 Pa-9혈청을 수동면역한 후 Pa-4를 공격한 실험군에도 Pa-4에 대한 LD₅₀는 1.6×10⁸을 보여 대조군에 비해 Pa-4공격에 대하여 유의하게 방어력이 증가되었다.

따라서 Pa-4의 0항원과 교차응집반응이 없는 항 Pa-9혈청을 수동면역하여도 Pa-4의 공격에 대한 방어효과가 있어 이것이 0항원 이외의 표면항원에 대한 항혈청 성분에 의한 것인지 또는 면역반응에 관계없이 혈청내에 존재하는 비특이적인 감염억제성분에 의한 것인지를 분석하기 위해 흡수 실험을 시행하였다. 즉 Pa-4 흡수 항 Pa-9혈청을 생쥐에 면역한 후 위와 같은 방법으로 Pa-4로 공격하였다. 그 결과 Pa-4흡수 항 Pa-9혈청으로 수동면역한 실험군에서 Pa-4에 대한 LD₅₀가 2.0×10⁷으로 대조군에 비하여 유의한 차이가 없어 Pa-4에 의하여 항 Pa-9 혈청내에서 방어효과를 보이는 성분이 흡수되는 결과를 얻었다. 따라서 녹농균증에 대한 다가녹농균 백신에 의한 방어효과는 0항원뿐 아니라 다른 표면항원 성분도 방어항원으로 작용할 것으로 시사되는 실험결과를 얻었다(표 4, 그림 2).

5. 다가녹농균백신이 녹농균증에 대한 방어효과를 나타내는 감염단계 분석

다가녹농균백신의 면역에 의해 나타나는 녹농균증에 대한 방어효과가 녹농균감염시 어느 단계에서 이루어지는가를 검토하기 위해 항 Pa-4혈청, 항 Pa-9 혈청



⊙: Immunized group, LD₅₀ and 95% confidence interval.
 ○: Non-immunized group, LD₅₀ and 95% confidence interval.

Fig. 2. Protective effect of passive immunization with anti-pseudomonas rabbit sera on *Pseudomonas* infection.

및 Pa-4흡수 항 Pa-9 혈청으로 각각 수동면역한 군에서 면역 1일 후 대조군과 더불어 화상을 입히고 즉시 화상부위에 Pa-4균액을 공격한 다음 24시간 후에 혈액, 비장, 간 및 피부내 균수를 측정하였다. 그 결과 공격군주에 대한 항혈청인 항 Pa-4혈청으로 수동면역한 군 및 Pa-4의 0항원에 교차반응이 없는 항 Pa-9 혈청으로

Table 4. Protective effect of passive immunization with anti-*Pseudomonas* rabbit sera on *Pseudomonas* infection with Pa-4 strain

| | LD ₅₀ of Pa-4 | 95% C.I. | |
|-------------------------------------|--------------------------|---|----|
| Anti Pa-4 rabbit sera | 2.7 × 10 ⁹ | 3.6 × 10 ⁹ - 2.1 × 10 ⁹ | S |
| Anti Pa-9 rabbit sera | 1.6 × 10 ⁸ | 2.4 × 10 ⁸ - 1.0 × 10 ⁸ | S |
| Pa-4 absorbed Anti Pa-9 rabbit sera | 2.0 × 10 ⁷ | 4.0 × 10 ⁷ - 9.6 × 10 ⁶ | NS |
| Non-immune | 3.9 × 10 ⁷ | 6.1 × 10 ⁷ - 2.5 × 10 ⁷ | |

C.I. : Confidence interval.

S : Significant compared with non-immune.

NS : Not significant compared with non-immune.

Table 5. Quantitation of *P. aeruginosa* in the blood, spleen, liver and skin after challenge with 2.24×10^4 Pa-4

| | Microorganisms($\times 100$) | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| | Blood | Spleen | Liver | Skin |
| Anti Pa-4 rabbit sera | $2.0 \pm 0.8^*$ | $3.3 \pm 0.6^*$ | $12 \pm 6.0^*$ | >500 |
| Anti Pa-9 rabbit sera | $5.0 \pm 1.4^*$ | $32 \pm 4.2^*$ | $8.6 \pm 3.0^*$ | >500 |
| Pa-4 absorbed Anti Pa-9 rabbit sera | $10 \pm 4.6^*$ | $66 \pm 9.6^*$ | $260 \pm 11^*$ | >500 |
| Non-immune | 59 ± 17 | >500 | >500 | >500 |

number : Mean \pm 2 S.E.

* : $p < 0.01$ compared with each value of non-immune.

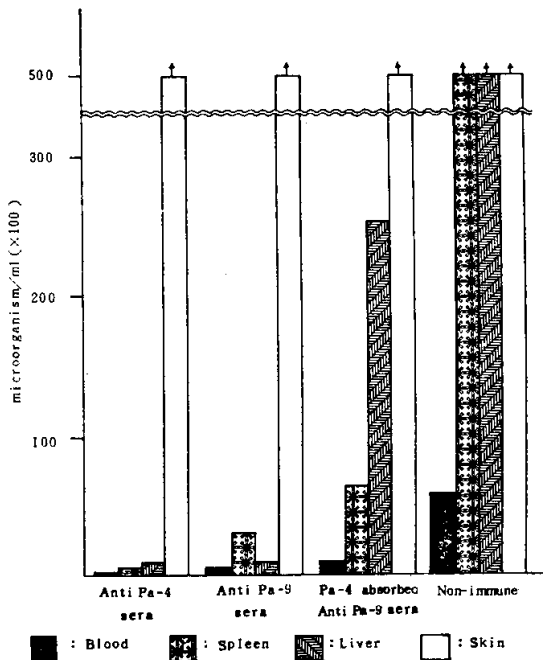


Fig. 3. Quantitation of *P. aeruginosa* in the blood, spleen, liver and skin after challenge with 2.24×10^4 Pa-4.

수동면역한 군 모두에서 전신감염을 의미하는 혈액, 비장, 간내의 공격균수가 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 ($P < 0.01$) 감소되었다. 또한 Pa-4 흡수 항 Pa-9 혈청으로 면역한 군에서도 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 혈액, 비장, 간내 균수의 감소를 나타내어 다가녹농균백신이 비특이적인 방어기전을 함진시켰다고 추측할 수 있었다.

일반적으로 항 Pa-4 혈청으로 면역한 군, 항 Pa-9 혈청으로 면역한 군, Pa-4 흡수 항 Pa-9 혈청으로 면역한 군, 대조군의 순으로 혈액, 비장, 간내의 공격균수가 증가하는 경향이 있었다. 그러나 공격부위에서 감염성립

여부를 검토하기 위하여 공격부위의 피부내에서 공격균수를 측정한 결과 면역군 및 대조군 모두에서 공격균양 보다 많은 균수가 계수되어 다가녹농균백신의 녹농균증에 대한 방어효과는 감염부위의 국소적인 감염성립을 방지하기 보다는 국소적 감염이 전신적 감염으로의 이환을 억제하리라는 실험 결과를 얻었다(표 5, 그림 3).

고 안

최근에 녹농균에 의한 병원내 기회감염증은 그 빈도가 증가하고 있으며 이로 인한 사망률도 증가하고 있는 추세를 보이고 있다(McNamara 등, 1967; Feingold, 1970; McGowan 등 1975; Gardner 등, 1980).

Bennett(1974)는 9만명의 입원환자를 대상으로 녹농균에 의한 병원내감염 빈도를 조사한 결과, 요로감염이 1,000명당 2.9명으로 수술창감염, 호흡기감염, 화상감염, 피부감염 및 혈액감염에 비하여 가장 높은 빈도를 보인다고 보고했다.

일반적으로 녹농균은 병원내 환경에서 높은 생존율 때문에 감염원으로부터 환자를 보호하는데 어려움이 있고(McNamara 등, 1967; Anderson 등, 1973) 새로운 항생제를 개발하여 치료에 적용하여도 내인성 저항과 R-plasmid 전달에 의한 내성 획득이 용이하여 곧 내성균주가 발현됨으로서 항생제요법의 한계점이 들어나 녹농균감염증에 대한 새로운 예방 및 치료대책이 요구되고 있다(Lowbury 등, 1969; Finland, 1970; Jackson and Riff, 1971; Weinstein 등, 1980). 이의 한 방법으로 면역학적 방법의 적용이 여러 연구자들에 의해 시사되어 왔다(Reynolds 등, 1975; Stamm, 1977).

녹농균에서 10여종의 다양한 혈청형의 분리 및 각 항원들의 역할이 밝혀짐으로서 녹농균에 대한 면역요법이 기초가 되었다고 할 수 있다(Verder and Evans, 1961; Liu 등, 1961).

면역요법으로 수동면역의 경우 방어효과는 있으나 면역한 항원형 또는 감마글로불린이 생체내에서 대사되어 그 효과가 오래 지속되지 못하며 이질단백의 투여에 의한 부작용등의 단점이 있고(Pennington, 1974), 능동면역의 경우 병원환경에 따라 상재하는 녹농균의 혈청형이 다양하기 때문에 한 균주에서 제작된 백신으로는 전혈청형의 녹농균감염증에 효율적으로 대처하는 데는 미흡한 점이 있다(김등, 1982). 그러나 다가백신은 전혈청형의 녹농균주에 특이한 효과가 인정되나 많은 양의 사균 및 균추출물을 사용함으로써 심한 부작용이 예상되어 실제로 인체에 적용하기에는 문제점이 있어, 저자는 서울대학교병원에 내원한 환자의 임상검체에서 분리한 녹농균 혈청형의 분포 및 빈도를 조사하고 이들 균주중 교차반응이 비교적 적은 10종의 균주를 선정하였다. 이 녹농균 균주를 열처리하여 죽인 균부유액을 희석혼합하여 다가녹농균백신을 제조하고 이 백신의 녹농균감염증에 대한 방어효과를 실험적으로 검정하고, 녹농균 표면항원이 방어작용에 관여하는 기전과 생체내에서 감염과정중 어느 단계에서 방어작용이 관여하는가를 밝히어 서울대학교병원에 발생하는 녹농균감염증 환자에 대한 효율적 치료 및 예방대책을 수립하는데 기본지식을 제공하고자 실험을 시행하였다.

서울대학교병원에서 분리한 총 137균주의 녹농균은 13가지 혈청형 모두가 분리되어 그 분포가 다양하였으며, G형, B형, C형, E형, A형, F형, D형, J형, M형, K형, I형, L형의 순으로 분리되었다. 일반적으로 임상검체에서 많이 분리된다는 B형, G형, E형, C형, I형 중에서(Lany and Bergan, 1978) I형을 제외하고는 같은 경향으로 높게 분리되었으나 I형은 1%밖에 분리되지 않았다.

한편 장(1982)등이 1982년에 시행한 서울대학교병원에서 분리한 녹농균의 혈청형과 비교할 때 일반적으로 비슷한 양상을 보였으나 본실험에서는 G형이 제일 많이 분리되었다. 또한 범용집균주도 2주 분리되어 다른 보고자(Lany and Bergan, 1978)에 비해 적은 양상을 보였다.

다가녹농균백신의 방어효과는 면역균과 대조군에서 균공격 10일 후에 LD₅₀로 측정 비교한 결과, 면역군은 대조군에 비하여 총 10개 혈청형의 녹농균에서 LD₅₀가 유의하게 증가되었으며 나머지 3개 혈청형에서도 대조군에 비하여 LD₅₀가 통계적으로 유의하지는 않았지만 증가된 양상을 보였다(표 2). 따라서 다가녹농균백신으로 면역한 군에서는 실험적으로 유발한 모든 혈청형의 녹농균공격에 대하여 방어력이 증강되어 있는 실험 결과를 얻었다.

그러나 다가녹농균백신은 녹농균의 표면 0항원의 다양성에 근거를 두어, 다양한 0항원 모두에 특이하게 면역반응을 나타낼 수 있게 제작되었으나, 항 0혈청가(응집항체가)와 방어력 사이에는 뚜렷한 상관관계가 관찰되지 않아 녹농균감염에 대한 다가녹농균백신의 면역방어기전은 0항원에 특이한 면역반응외에 다른 항원에 의한 면역반응도 참여한다는 사실을 시사하는 실험 결과를 얻었다.

이러한 추정사실을 확인하기 위하여 흡수실험을 포함하여 시행한 수동면역법에 의하여 검정한 결과, 0항원 이외의 표면항원이 다가 녹농균백신의 방어효과에 관여하리라는 사실을 확인하였다(표 4).

이러한 다가녹농균백신이 녹농균증에 대한 방어효과는 일차적 감염장소에 극소적인 효과가 없고 전신적 감염으로의 발전을 억제시키는 실험결과를 얻었으며 그 기전은 면역에 의해 생성된 특이적 항원형이 opsonin으로 작용하여 저식세포 또는 다핵중성구가 식균작용을 원활하게 할 수 있게끔 하는 역할을 담당할 것이라고 사료된다(Young and Armstrong, 1972). 항체생성 즉 체액성 면역반응외에 일시적 遊走阻止작용이 보고됨으로서 세포성 면역반응도 관여할 것이라고 추측된다(Reynold 등 1974).

또한 Pa-4흡수 항 Pa-9 혈청으로 면역한 군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 혈액, 비장, 간에서 균수가 감소한 점으로 미루어 보아(표 5, 그림 3) 다가녹농균백신의 면역으로 인한 숙주의 또다른 방어기전의 증진여부 즉 비특이적 방어기전의 증진됨을 추측할 수 있다. 이러한 비특이적 방어기전에 체액성 면역반응이 관여한다면 어느 항원에 대한 항체가 작용하는지 연구해야 할 과제이며 앞으로 임상적으로 사용할 때 면역하는 적당한 농도, 시기, 면역방법 및 부작용에 관한 연구와 단세포균 항체를 이용한 특이하고 다량의 항체생산에 관한 지식이 축적된다면 인체에 적용 가능성이 높다고 생각된다. 더불어 다양한 녹농균 혈청형에 모두 방어효과가 있으며, 다가녹농균백신에 비하여 부작용이 적고 소량으로 사용할 수 있을 것으로 생각되는 녹농균 공통방어항원에 관한 연구도 해야 할 과제이다.

결 론

병원내 기회감염의 빈도는 한층 더 증가하고 있으며 과거에는 원인균으로 그람양성균인 *Staphylococcus aureus*가 가장 흔하게 분리되었으나 근간에는 그람음성균의 빈도가 압도적으로 증가하고 있으며, 이중에서 본질적으로 항생제에 내성이 있으며 신속히 내성균주가

—ABSTRACT—

Polyvalent *Pseudomonas* Vaccine—Effects and Immunologic Mechanisms of Protection

**Sang Eun Lee and
Young Kyoon Kim**

*Department of Urology, College of Medicine
Seoul National University*

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common pathogens causing nosocomial opportunistic infections.

Rapid emergence of resistant strain and limited success of currently available antibiotic therapy, especially in immunologically compromised patient and anatomically defective patient have led to interest in immunoprophylaxis and immunotherapy for pseudomonas infection.

The potential protective effect of active immunization with diluted heat-killed whole cell polyvalent pseudomonas vaccine against pseudomonas infection was evaluated with a mouse model of experimentally induced burn wound and immunologic mechanisms of the polyvalent pseudomonas vaccine were also studied.

Following results were obtained

1. Among the serotypes of 137 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from SNUH, serotype G was the most frequently isolated strain(17%) and remainder were serotype B(15%), C(13%), E(12%), A(8%), F(5%), J(4%), H(4%), M(3%), L and I in order.

Untypable and polyagglutinable strains were 8% and 1% respectively.

2. Statistically significant protective effect of polyvalent pseudomonas vaccine against pseudomonas infection in immune mice was documented in 10 serotypes except serotype A,E and J compared to non-immune mice. However, some protective effect was demonstrated also in serotype A,E and J though statistically insignificant.

3. There were definite increase of agglutination titers in the immune group but strict correlation between protective effect and agglutination titer was not noted.

발현되는 녹농균감염의 예방 및 치료에 있어서 해결하여야 할 많은 문제점이 있다. 이러한 녹농균감염의 난치성에 대한 해결책으로 많은 연구자에 의해 면역요법의 시도가 시사되어 왔다.

본 저자는 서울대학교병원에 내원한 환자의 임상검체에서 추출한 137균주의 혈청형을 결정하고 장(1982) 등에 의하여 연구된 항원의 교차반응을 토대로 2종의 희석된 다가녹농균백신을 제조하여, 녹농균에 대한 방어효과와 그 면역학적 기전을 실험적으로 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 서울대학교병원에서 분리한 녹농균 총 137주의 혈청형은 G형 23주(17%), B형 21주(15%), C형 18주(13%), E형 17주(12%), A형 11주(8%), F형 7주(5%), J형 6주(4%), H형 5주(4%), D형 5주(4%), M형 4주(3%), L형 2주(1%), I형 2주(1%)의 빈도로 분리되었고 범용집균주를 포함하여 혈청형을 결정할 수 없었던 균주도 13주 있었다.

2. 다가녹농균백신으로 면역한 생쥐군에서 녹농균 13혈청형 A형, E형, J형을 제외한 10혈청형에서 대조군에 비하여 방어효과가 통계적으로 유의하게 있었으며, A형, E형, J형에서도 통계적으로 유의하지는 않았지만 방어효과가 있는 양상으로 나타났다.

3. 능동면역군에서 응집항체가의 상승은 인정되나 방어효과와는 꼭 일치하지 않는 결과를 얻어 응집항체가의 상승만으로는 방어효과를 설명할 수 없었다.

4. 수동면역법으로 주표면항원인 O항원외에 두 균주에서 공통적으로 존재하는 다른 표면항원의 존재를 확인하였고 이의 방어효과도 인정되었다.

5. 항 Pa-4형, 항 Pa-9형으로 면역한 생쥐군에서 혈액, 비장, 간에서 생균의 수가 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이고 피부에서는 면역군, 대조군 모두에서 공적균양보다 많은 균수가 계수되어 다가녹농균백신의 방어효과의 단계는 국소적 감염에서 전신적 감염으로의 이환을 억제한다고 결정지을 수 있었다.

6. Pa-4흡수 항 Pa-9형으로 면역한 군에서도 5와 같은 결과를 얻음으로서 방어효과는 특이적 면역반응의 항진에 의한 것 이외에 비특이적인 방어기전의 항진으로 인한 역할도 추정할 수 있었다.

*본 연구를 위한 서울대학교 의과대학 미생물학교실 장우현교수의 직접 지도에 깊은 감사를 드립니다.

4. Other surface antigen besides O antigen was identified and its protective effect was also observed.

5. Polyvalent pseudomonas vaccine produced protective effect by prevention of systemic dissemination from local infection site.

6. Viewed from inhibitory effect of polyvalent pseudomonas vaccine on systemic dissemination of infection, even in the groups immunized with Pa-4 absorbed anti Pa-9 sera, principal immune response is probably due to specific antibody as opsonin but non-specific defense mechanism seems to play a role in protective effect of polyvalent pseudomonas vaccine.

REFERENCES

- Alexander, J.W., Fisher, N.W. and MacMillan, B.G.: *Immunological control of pseudomonas infection in burn patients: A clinical evaluation. Arch. Surg.*, **102**:31-35, 1971.
- Anderson, R.J., Schafer, L.A., Olin, D.B. and Eickhoff, J.C.: *Septicemia in renal transplantation recipients. Arch. Surg.*, **106**:692-694, 1973.
- Bennett, J.V.: *Nosocomial infection due to pseudomonas. J. Infect. Dis.*, **130**(suppl.):S4-S7, 1974.
- 장우현, 최명식, 이광호, 석종성: 녹농균증에 대한 다가독농균 백신효과의 실험적 연구. 서울의대 학술지, **23**:436-442, 1982.
- Feingold, D.S.: *Hospital acquired infections. New Eng. J. Med.*, **283**:2384-2391, 1970.
- Finland, M.: *Changing ecology of bacterial infections as related to antibacterial therapy. J. Infect. Dis.*, **122**:419-431, 1970.
- Flick, M.R. and Cluff, L.E.: *Pseudomonas bacteremia, review of 108 cases. Amer. J. Med.*, **60**:501-507, 1976.
- Gardner, P., Bennett, J.V., Burke, J.P., McGowan, J.E. Jr. and Wenzel, R.P.: *Nosocomial management of resistant Gramnegative bacilli. J. Infect. Dis.*, **141**:415-417, 1980.
- Graber, D.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.: *Flagella preparation from Pseudomonas aeruginosa: Animal protection studies. Infect. Immun.*, **35**:276-280, 1982.
- Jackson, G.G. and Riff, L.J.: *Pseudomonas bacteremia: Pharmacologic and other bases for failure of treatment with gentamicin. J. Infect. Dis.*, **124**(suppl.):S185-S191, 1971.
- Jones, K.J. and Lowbury, E.J.L.: *Early protection by vaccines against Pseudomonas aeruginosa colonizing burns. Br. J. Exp. Path.*, **53**:659-664, 1972.
- Jones R.J., Roe, E.A. and Gupta, J.L.: *Controlled trials of a polyvalent pseudomonas vaccine in burns. Lancet*, **11**:977-983, 1979.
- 김종화, 김진영, 최명식, 장우현: 녹농균감염에 대한 동종백신 효과에 관한 실험적 연구. 대한이비인후과 학회지, **25**:236-248, 1982.
- 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.
- Lieberman, M.M., Mckissock, D.C. and Wright, G. L.: *Passive immunization against pseudomonas with a ribosomal vaccine-induced immune serum and immunoglobulin fractions. Infect. Immun.*, **23**:509-521, 1979.
- Liu, P.V., Abe, Y. and Bates, J.L.: *The roles of various fractions of Pseudomonas aeruginosa in its pathogenesis. J. Infect. Dis.*, **108**:218-228, 1961.
- 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*, **11**: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., Spilsbury, J.F., Jones, R.J., Roe, E.A. and Lowbury, E.J.L.: *A new polyvalent pseudomo-*

- nas vaccine. J. Med. Microbiol.*, **10**:19-27, 1977.
- Millican, R.C., Evans, G. and Markley, K.: *Susceptibility of burned mice to Pseudomonas aeruginosa and protection by vaccination. Ann. Surg.*, **163**:603-610, 1966.
- Millican, R.C. and Rust, J.D.: *Efficacy of rabbit pseudomonas antiserum in experimental Pseudomonas aeruginosa infections. J. Infect. Dis.*, **107**:389-394, 1960.
- Millican, R.C., Rust, J.D. and Rosenthal, S.M.: *Gamma globulin factors protective against infections from pseudomonas and other organisms. Science*, **126**:509-511, 1957.
- 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., Siderry, H.F. and Sadoff, J.C.: *Protective immunity induced in mice by immunization with high-molecular-weight polysaccharide from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun.*, **22**:919-925, 1978.
- Reynolds, H.Y., Thompson, R.E. and Delvin, H.B.: *Development of cellular and humoral immunity in the respiratory tract of rabbits to pseudomonas lipopolysaccharide. J. Clin. Invest.*, **52**:1351-1358, 1974.
- Reynolds, H.Y., Levine, A.S., Wood, R.E., Zierdt, C.H., Dale, D.C. and Pennington, J.E.: *Pseudomonas aeruginosa infection: Persisting problems and current research to find new therapies. Ann. Intern. Med.*, **82**:819-831, 1975.
- Stamm, W.E., Martin, S.M. and Bennet, 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.
- Verder, E. and Evans, J.: *A proposed antigenic schema for the identification of strains of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis.*, **109**:183-193, 1961.
- Walker, H.L., Mason, A.D. and Raulston, G.L.: *Surface infection with Pseudomonas aeruginosa. Ann. Surg.*, **160**:297-305, 1964.
- 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.
- Young, L.S. and Armstrong, D.: *Human immunity to Pseudomonas aeruginosa. I. In vitro interaction of bacteria, polymorphonuclear leukocytes, and serum factors. J. Infect. Dis.*, **126**:257-276, 1972.
- Young, L.S., Meyer, R.D. and Armstrong, D.: *Pseudomonas aeruginosa vaccine in cancer patients. Ann. Intern. Med.*, **79**:518-527, 1973.