

Polymyxin B의 腸系細菌抗原에 對한 抗體產生 增強作用에 關한 研究*

朝鮮大學校 藥學大學 微生物學教室

<指導 全 燕 基**教授>

李 在 九

—Abstract—

Studies on the Enhancing Effect of Polymyxin B on the Antibodies Response of Enterobacterial Antigens

Jae Koo Lee

*Department of Microbiology, Chosun University College of Pharmacy,
Kwangju, Republic of Korea*

(Director: Prof. Doki Chun,**M.D.)

Department of Bacteriology, Kyungpook National University School of Medicine, Taegu

Various kinds of antibiotics are generally believed to have inhibitory effects on the antibody response. However, as polymyxin B which belongs to the cyclic polypeptide group of antibiotic was found to have some enhancing effects on the antibody response of rabbits to enterobacterial common antigen (CA) under specified conditions, experiments were carried out on this problem with the following results.

1. When mixture of polymyxin B and CA derived from *Salmonella typhimurium* (STM) was treated 30 minutes at 37°C and injected three times into rabbits by intravenous route, the antibody response to CA was weaker than rabbits injected CA only.
2. Mixture of polymyxin B and CA showed a marked antibody production when injected into rabbits primed with small amounts of heat-extracted antigen of STM, while the injection of CA alone showed low titers of response.
3. Mixture of polymyxin B and heat-extracted CA-containing antigen of *Escherichia coli* 014 also showed a increased antibody production than CA alone in rabbits primed with antigen of STM.
4. The effect of polymyxin B appeared in different ways. This antibiotic did not enhance the CA antibody response in rabbits primed with small amounts of *E. coli* 0111 and 055, but enhance in rabbits primed with *Shigella flexneri*.
5. No enhancing effect on the antibody response was observed by polymyxin B in rabbits primed with CA.
6. No enhancing effect on the antibody response was also noted in rabbits primed with STM antigen in case polymyxin B and CA were administered simultaneously but in veins of different places.
7. Bacitracin did not enhance the CA antibody response in primed rabbits with STM antigen, but neomycin slightly enhance the response.

* 本報의 要旨는 1970年 5月 大韓微生物學會 春季學術大會에서 發表하였음

** 慶北大學校 醫科大學 細菌學教室

8. Lipopolysaccharide showed no priming effect on the CA antibody response, and no enhancement of the CA antibody response in rabbits primed with STM.

9. The priming effect of STM antigen against CA antibody response was very weak as compared with the effect of CA derived from STM antigen.

結 論

動物體內에 導入된 異物은 그 性狀과 導入方法에 따라 體內에서 各種反應을 일으키며 抗原性을 가진 物質 일 때는 抗體產生을 招來하게 된다. 이러한 抗體는 免疫의 重要한 要素로서 侵入하는 病原菌의 體內 他器管에의 傳播의 抑制, 繁殖阻止등을 招來하거나 殺菌作用을 나타내서 疾病의 經過를 輕하게 하거나 또는 感染成立을 阻止하므로써 動物體에 有益한 役割을 한다. 그러나 때에 따라서는 產生된 抗體가 體內에서 抗原과 反應을 일으켜 個體에 害로운 過敏反應이 나타나는 일이 있고 또는 臟器移殖에 있어서 移殖된 組織의 抗原에 대하여 產生된 抗體가 拒否反應의 主要原因이 된다. 이렇게 抗體產生이 動物體에 有益 또는 有害한 作用을 하기 때문에 意圖하는 바에 따라서 抗體產生을 抑制시키거나 또는 增強시키려고 하는 研究가 많이 進陞되어 있다.

抗體產生의 抑制는 免疫現象을 理論적으로 追究하는 見地에서 많이 研究되고 있고 또 前述한 바와 같이 實地面에서 過敏性反應을 防止하고 臟器移殖에 있어서의 拒否反應을 豫防하는 見地에서 많이 研究되고 있는 바 주로 두가지 方向으로 追究되고 있다. 하나는 抗原投與와 併行하여 그 前後에 또는 同時에 다른 物質을 作用시키는 方法이며 다른 하나의 方法은 抗原을 여러가지 物質과 混合하여 動物에 投與하는 方法이다. 前者의 境遇를 보면 各種放射線¹⁻⁴⁾을 照射하면서 抗原을 投與하여 그動物의 抗體產生이 非照射動物에 比하여 어떻게 抑制되는가를 보는 方法이 있고 또 各種化學物質 및 酸素⁵⁻⁸⁾, 抗生物質⁹⁻¹⁴⁾, 細胞成分 또는 菌體物質¹⁵⁻²⁵⁾ 등을 動物에 投與하면서 抗體產生에 미치는 影響을 보며 血清 또는 免疫血清 特別히 抗淋巴球血清을 併用하여²⁶⁻³⁰⁾ 그 效果를 보는 方法등이 많이 研究되어 있는 바 研究者의 意圖하는 바에 따라서 作用시키는 因子가 다르며 結果도 研究方法과 作用시키는 因子에 따라서 다르게 나타난다. 後者の 方法에 있어서는 各種化學物質³¹⁻³³⁾, 菌體物質^{34, 35)}, 血清 또는 血清成分^{36, 37)} 등을 抗原과 混合하여 動物에 投與하므로써 이들 物質의 抗體產生 抑制作用을 보는 바 物質에 따라서는 抑制作用이 顯著히 나타나는 것이 있다.

抗體產生을 增強시키는 方法과 因子에 對하여서도 많이 研究되어 있으며 Freund's adjuvant가 免疫抗體產生을 增強시키는 效力이 알려져 있는 事實이며³⁸⁾ DPT로서 混合免疫 또는 alum으로 沈澱시킨 diphtheria toxoid에 依한 免疫도 같은 範圍에 屬하는 方法이다. 近年에 와서는 細菌毒素가 抗體產生을 增強시키는 作用이 있음이 報告되어 있다. 即 菌體毒素가 抗原投與의 前後에 投與되면 抗體產生을 增強시키는 效力이 있음이 報告되어 있다. 即 菌體毒素가 adjuvant作用도 나타냄을 報告하였다. 그러나 大體적으로 抗體產生增強에 關한 研究는 抗體產生抑制에 關한 研究에 比하면 活潑하다고 볼 수 없다.

近年에 와서 細菌成疾患의 治療에 革命을 招來한 抗生物質은 大體로 그 菌發育抑制作用에 依한 抗體產生量의 低下外에 RNA의 合成을 抑制하고¹⁰⁾ 所謂 immuno-competent Cell의 分離와 繁殖에 抑制적으로 作用하거나¹¹⁾ 또는 免疫抗體合成에 必要한 蛋白質合成을 抑制하므로써^{12, 13)} 抗體產生을 抑制하는 作用을 나타내는 것으로 알려져 있다. Neter等⁴²⁾, Gorzynski 및 Neter⁴³⁾ 등은 polymyxin B, neomycin, paromomycin, streptomycin 등의 抗生物質은 腸系細菌抗原의 赤血球에의 吸着을 阻止하는 作用이 있으나 penicillin, erythromycin 또는 novobioicin은 이러한 作用이 없다고 報告하여 抗生物質에 따라서 그 作用이 다르고 抗生物質中에는 菌體毒素와 相反되는 作用을 하는 것이 있다고 하였으며 Rifkind 및 Palmer⁴⁴⁾는 抗生物質 特別히 cationic cyclic polypeptide에 屬하는 抗生物質인 polymyxin B 등은 腸內細菌 菌體毒素의 孵化雞胎에 對한 毒性을 中和시키는 作用이 있다고 報告하였는 바 이 報告에서 推測컨대 polymyxin B 등은 Suzuki³⁴⁾等 Whang 및 Neter³⁵⁾ 등이 報告한 腸內細菌의 共通抗原에 對한 抗體產生의 菌體毒素에 依한 抑制作用에 어떤 影響을 줄 것으로 生覺되기에 著者는 몇가지 cationic cyclic polypeptide antibiotics를 爲主로 하여 몇가지 物質의 共通抗原에 對한 抗體產生에 미치는 影響을 實驗한 바 있어 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

抗原 : *Salmonella typhimurium* (STM) 抗原으로

는 美國 C. D. C. (Communicable Disease Center)에서 分離받은 STM을 寒天培地에 24時間 培養하여 얻은 菌을 食鹽水에 20mg/ml이 되도록 浮游시켜 100°C에서 60分間 加熱한 다음 4°C에서 10,000 r.p.m.으로 30分間 遠心하여 얻은 上清을 使用하였다.

Escherichia coli 및 *Shigella flexneri* 抗原도 STM 抗原과 同一한 方法에 依하여 얻은 加熱抽出液을 使用하였다. 腸內細菌共通抗原 (enterobacterial common antigen; CA)으로는 STM 上清을 Suzuki等⁴⁶⁾의 方法에 依하여 室溫에서 85%의 ethanol로 20時間 處理한 다음 遠心과 濾過를 反復하여 ethanol 不溶性分層을 除去한 후 ethanol 可溶性分層(ES)의 ethanol을 蒸發시키고 原量이 되도록 蒸溜수에 溶解시킨 것을 供試하였다.

抗生物質 : Polymyxin B는 Polymyxin B sulfate인 aerosporin (Burroughs Wellcome & Co.)을 供試하였으며 高濃度의 phosphate buffered saline(buffer) 溶液을 調製하여 冷藏庫에 保存하고 必要에 따라 適當히 稀釋하여 實驗하였으며 溶液調製後 2週日이 經過한 것은 使用하지 않았다.

Bacitracin은 Chas Pfizer & Co.製品을 使用하였고 neomycin도 neomycin sulfate인 mycifradin (Upjohn Co.)을 使用하였으며 必要에 따라 buffer에 溶解시켰다.

供試動物 : 體重 1.5~2.0 kg의 健康한 家兔를 雌雄을 가리지 않고 免疫에 使用하였으며 3頭를 1群으로 實驗하였다.

免疫方法 : 抗生物質의 效果를 보기 爲하여는 抗原을 buffer 또는 供試抗生物質과 混合하여 37°C에서 30分間 作用시킨 다음 家兔의 耳靜脈에 1.0ml씩(抗原量 0.5 ml) 注射하였으며 注射間隔은 實驗計劃에 따라 多少의 差異가 있다. Priming(以下前處理)의 效果를 보는 實驗에서는 大體로 0, 2, 4日의 3회에 1/20~1/40로 稀釋한 抗原을 1.0 ml씩 注射하여 前處置하고 注射開始後 7日만에 第2次 免疫注射(1.0 ml)를 하였으며 必要에 따라서는 免疫開始後 16日前後에 追加免疫을 하였고 普通의 免疫效果를 보는 實驗에서는 0, 2, 4日의 3회에 限하여 1/10~1/20로 稀釋한 抗原을 1.0 ml씩 注射하였다.

抗體測定 : 免疫前과 免疫開始後 時日의 經過에 따라 家兔의 耳靜脈에서 少量씩 採血, 血清을 分離하여 血清中の CA 抗體價를 赤血球凝集反應에 依하여 測定하였으며 1群 3頭의 抗體價를 平均하여 그 群의 抗體價를 表示하므로써 抗體產生의 動態를 觀察하였다. 赤血球凝集反應은 Chun 및 Park⁴⁶⁾의 方法에 準하였으며,

方法은 大體로 다음과 같다. Buffer로 3回 洗滌한 2.5%의 家兔赤血球浮游液에 適當量의 抗原을 加하여 37°C에서 60分間 感作시킨後 buffer로 3回 洗滌하여 殘餘 抗原을 除去한 다음 2.5%가 되도록 buffer에 浮游시킨다. 血清을 buffer로 10倍부터 順次 稀釋하여 各管의 內容이 0.2ml가 되도록 넣고 各管에 上記한 抗原 感作赤血球浮游液을 0.1 ml씩 加하여 37°C에 2時間 放置한 다음 管底에 나타나는 赤血球沈渣의 模樣을 보고 Salk의 基準⁴⁷⁾에 따라서 成績을 判定하였으며 抗體價는 陽性反應을 나타내는 血清의 最高稀釋度로 表示하였다. STM 由來의 CA 抗體測定에는 赤血球를 *E. coli* 014 抗原으로 感作하여 使用하였고 *E. coli* 014의 CA 抗體測定에는 *E. coli* 0111 抗原으로 感作하여 使用하였다. 其他 實驗條件과 方法은 必要에 따라서 適宜 記載한다.

實驗成績

Polymyxin B의 赤血球感作에 미치는 影響 : Polymyxin B가 抗原과 結合하여 赤血球感作을 抑制함이 報告되었으므로⁴⁹⁾ 이를 確認하기 爲하여 polymyxin B와 CA를 混合하여 37°C에 30分間 作用시킨 다음 赤

Table 1. Inhibitory effect of rabbit erythrocyte modification of CA by polymyxin B

Polymyxin B	Titers (reciprocal)
800 mcg/ml	<10
400	20
200	40
100	40
50	80
25	160
12.5	320
6.25	640
3.1	1,280
Control	1,280

Antigen=CA (*S. typhimurium*, ethanol soluble).

Serum= anti-*S. typhimurium* (E. S.) serum.

Nine parts of polymyxin B were mixed with one part of CA and treated at 37°C for 30 minutes.

血球를 感作시켜 CA 免疫血清과 赤血球凝集反應을 實施 反應價를 봄으로서 CA의 赤血球 感作이 미치는 polymyxin B의 影響을 본바 第1表와 같이 12.5 mcg/ml의 濃度에서 抗原感作能이 1/4로 低下되며 800

Table 2. Effect of polymyxin B on CA antibody response of non-primed rabbits

Immunization	Days after initiation of immunization				
	0	8	10	13	15
	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)				
CA+Polymyxin B (1,000 mcg/ml)	<10	53	427	133	133
CA+Polymyxin B (100 mcg/ml)	<10	80	640	320	213
CA+Buffer	<10	73	1,067	533	320

↑₃

CA=ethanol soluble antigen (1:10, *S. typhimurium*).

Polymyxin B=final concentration.

↑₃=three injections on days of 0, 2 and 4.

Table 3. Effect of Polymyxin B on CA antibody response of primed rabbits

Immunization		Days after initiation of immunization				
		0	7	10	13	15
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)				
<i>S. typhimurium</i> supernate	CA+Polymyxin B(5,000mcg/ml)	<10	<10	107	240	320
	CA+Polymyxin B(1,000mcg/ml)	<10	<10	31	100	154
	CA+Buffer	<10	<10	12	26	23

↑₃ ↑₁

CA=ethanol soluble antigen (1:10, *S. typhimurium*).

↑₃=three injections on days of 0, 2, and 4.

↑₁=secondary injection.

Table 4. Effect of polymyxin B on CA antibody response of primed rabbits

Immunization		Days after initiation of immunization					
		0	9	11	14	17	21
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)					
<i>S. typhimurium</i> supernate	CA+Polymyxin B(1,000mcg/ml)	<10	<10	60	120	160	2,560
	CA+Polymyxin B (100mcg/ml)	<10	<10	20	17	33	427
	CA+Buffer	<10	<10	10	10	10	160

↑₃ ↑₁ ↑₁

mcg/ml의 濃度는 抗原의 赤血球感作用을 完全히 阻止하며 polymyxin B의 赤血球感作用阻止能이 相當히 强하였다.

Polymyxin B가 非處置家兔의 CA 抗體產生에 미치는 影響: 家兔를 抗原으로 前處置하지 않고 CA와 polymyxin B를 混合하여 3回 免疫하면서 抗體產生을 본바 그 結果는 第2表와 같이 100mcg/ml의 polymyxin B는 CA의 抗體產生에 別影響을 주지 않으며 다만 量이 많아 1,000 mcg/ml일때 多少 抑制作用이 있는 것 같다.

Polymyxin B가 前處置家兔의 CA 抗體產生에 미치는

影響: 前處置한 動物과 非處置動物에 있어서의 抗體產生의 樣相이 다르게 나타나는 일이다. 따라서 前處置한 家兔에서의 CA 抗體產生에 對한 polymyxin B의 影響을 보기 爲하여 STM 抗原으로 3回 前處置 免疫한 다음 CA에 polymyxin B를 混合하여 注射하면서 抗體價의 變動을 본바 그 代表的인 結果는 第3表와 같이 CA만으로 第2次免疫한 것보다 CA와 polymyxin B를 混合하여 免疫한 것에 있어서 抗體價가 約 10倍內外 더 높게 나타났다. 따라서 前處置한 家兔에 있어서는 polymyxin B가 CA의 抗體產生을 顯著히 增強함을 알 수 있었다. 그러나 1,000 mcg/ml의

Table 5. Effect of polymyxin B on antibody response of primed rabbits to CA(*E. coli* 014)

Immunization		Days after initiation of immunization					
		0	7	10	13	16	20
Primary	Secondary	mean hemagglutinin titers (reciprocal)					
<i>S. typhimurium</i> supernate	<i>E. coli</i> 014+Polymyxin B(5,000mcg/ml)	<10	<10	76	352	202	1,066
	<i>E. coli</i> 014+Buffer	<10	<10	55	175	110	373

Mixture of *E. coli* 014 and polymyxin B was turbid.

Table 6. Effect of polymyxin B on CA antibody response of rabbits primed with *E. coli* and *Sh. flexneri*

Immunization		Days after initiation of immunization					
		0	7	9	12	15	18
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)					
<i>E. coli</i> 0111 supernate	CA+Polymyxin B (5,000mcg/ml)	<10	<10	<10	320	120	120
	CA+Buffer	<10	<10	23	347	240	193
<i>Sh. flexneri</i> 3 supernate A	CA+Polymyxin B(5,000mcg/ml)	<10	<10	<10	213	87	120
<i>Sh. flexneri</i> 3 supernate B	CA+Polymyxin B (5,000mcg/ml)	<10	<10	<10	128	85	80
<i>Sh. flexneri</i> 3 supernate A	CA+Buffer	<10	<10	13	23	<10	<10

A and B indicate different preparations.

Table 7. Effect of polymyxin B on CA antibody response of *E. coli*-primed rabbits

Immunization		Days after initiation of immunization				
		0	7	9	12	15
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)				
<i>E. coli</i> 0111 supernate	CA+Polymyxin B (5,000 mcg/ml)	<10	<10	25	307	140
	CA+Buffer	<10	<10	28	243	205
<i>E. coli</i> 055 supernate	CA+Polymyxin B (5,000mcg/ml)	<10	<10	27	107	80
	CA+Buffer	<10	<10	17	127	47

polymyxin B는 5,000 mcg/ml에 비하여 抗體產生增強作用이 弱하였다.

第4表는 第2次 免疫을 한후 9일에 CA와 polymyxin B 混合液으로 追加免疫한 結果인 바 追加免疫에 있어서도 抗體가 多量으로 產生되어 polymyxin B의 抗體產生增強作用이 顯著하였다. 또한 100 mcg/ml의 polymyxin B도 多少의 增強作用을 나타냈다.

Polymyxin B가 前處置한 家兎의 *E. coli* 014 CA 抗體產生에 미치는 影響: Ethanol 可溶性인 STM의 CA에 對한 polymyxin B의 影響이 ethanol 不溶性인 *E. coli*

014의 CA에서도 같이 나타나는 것을 보기 위하여 STM으로 前處置한 다음 *E. coli* 014 抗原과 polymyxin B를 混合하여 第2次 및 追加免疫을 하고 *E. coli* 0111 抗原을 使用하여 CA 抗體를 檢査한 代表的인 結果는 第5表와 같이 *E. coli* 014의 CA에 對하여도 polymyxin B가 抗體產生 增強能力을 나타내나 ethanol 可溶性인 STM 由來의 CA에 對한 作用보다는 弱하게 나타남을 보았다(Table 4, 5).

前處置하는 抗原에 따르는 polymyxin B의 影響: 上述한 實驗은 모두 STM 抗原으로 前處置한 成績인 바

Table 8. Effect of polymyxin B on CA antibody response of rabbits primed with CA alone and CA-polymyxin B mixture

Immunization		Days after initiation of immunization				
		0	7	10	13	16
Primary	Secondary	Mean CA hemagglutinin titers(reciprocal)				
CA+Buffer	CA+Polymyxin B	<10	<10	53	240	66
CA+Polymyxin B	CA+Polymyxin B	<10	<10	60	200	40
CA+Buffer	CA+Buffer	<10	<10	30	150	135
		↑ ₃	↑ ₁			

Polymyxin B=5,000mcg/ml.

Table 9. Effect of *S. typhimurium* supernate and CA on the priming of CA antibody production in rabbits

Immunization		Days after initiation of immunization				
		0	4	7	8	11
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)				
<i>S. typhimurium</i> Supernate (1/12.5)	CA(1/10)	<10	<10	40	40	40
Supernate (1/25)		<10	<10	13	33	87
Supernate (1/50)		<10	<10	<10	20	63
CA(A) (1/50)		<10	<10	93	480	640
CA(B) (1/50)	CA(1/10)	<10	<10	40	180	400
Buffer		<10	<10	<10	15	13
		↑ ₃	↑ ₁			

S. typhimurium supernate=heat-killed supernate of *S. typhimurium*.

A and B indicate different lots prepared from same supernate.

CA(A) was prepared from supernate lot used.

Minimum inhibitory conc. =*S. typhimurium* 1/32, CA(A) 1/64, CA(B) 1/64

CA를 함유하는 다른腸內細菌抗原으로 前處置하면 어떤 結果가 나타나는가를 보았다. 即 *E. coli* 0111 또는 *Sh. flexneri* 3으로 3回 前處置한 다음 CA와 polymyxin B를 混合하여 第2次 免疫을 하면서 抗體價의 變動을 본 結果는 第6表와 같다. *E. coli* 0111 抗原으로 前處置한 家兎에서는 polymyxin B가 CA의 抗體產生에 아무런 影響을 주지 못하나 *Sh. flexneri* 3 抗原으로 前處置한 家兎에 있어서는 相當히 顯著한 增強作用을 나타낸다.

第7表에서는 다른 lot의 *E. coli* 0111 抗原으로 再試함과 同時에 *E. coli* 055 抗原도 供試하였던바 055 抗原으로 前處置한 家兎에서는 0111에서와 같이 polymyxin B가 CA 抗體產生作用에 影響을 주지 못하였다 (Table 6, 7).

CA로 前處置한 家兎에서의 polymyxin B의 影響: 前處置하는 抗原에 따라서 polymyxin B의 CA 抗體產生에 미치는 影響이 다름을 보았으므로 CA로 前處置한

때 어떤 影響이 있는가를 보기 爲하여 CA 또는 CA와 polymyxin B 混合溶液으로 3回 前處置한 다음 CA 單獨 또는 CA와 polymyxin B 混合溶液으로 第2次 免疫을 하여 抗體를 測定한 바 第8表와 같이 CA와 polymyxin B 混合溶液으로 前處置하여도 抗體產生에는 CA 單獨으로 前處置한 것과 別差異가 없었고 CA로 前處置하여도 polymyxin B는 抗體產生에 影響을 주지 못하였다.

STM 抗原과 CA의 前處置能: STM으로 前處置할 때 polymyxin B의 影響이 크게 나타나므로 STM 抗原과 CA로 前處置할 때 第2次 免疫에 주는 影響이 어떻게 다른가를 보기 爲하여 STM 또는 CA로 3回 前處置한 다음 CA로 第2次 免疫을 하여 CA 抗體產生을 比較하였으며 第9表에 代表的인 成績을 例示하였다. 各抗原調製에 있어서 同一한 量의 關係를 維持하도록 留意하였고 一部는 同一材料에서 出發하였기 때문에 STM 抗原 1/50에 함유되어 있는 CA 量은 CA 1/50과 同量인데 表를 보면 STM으로 前處置한 때의 第2次 免疫後

Table 10. Effect of polymyxin B injected separately on CA antibody response of rabbits

Immunization		Days after initiation of immunization					
		0	7	9	12	15	18
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)					
<i>S. typhimurium</i>							
Supernate A	CA+Polymyxin B (5,000mcg/ml)	<10	<10	<10	53	53	47
Supernate B	CA+Polymyxin B (5,000mcg/ml)	<10	<10	<10	65	65	NT
Supernate C	CA+Buffer	<10	<10	<10	83	83	43

CA was injected in an ear vein and polymyxin B or buffer were injected simultaneously in another ear vein.
NT=not tested.

Table 11. Effect of bacitracin on CA antibody response of primed rabbits

Immunization		Days after initiation of immunization				
		0	7	9	12	15
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)				
<i>S. typhimurium</i> supernate						
	CA+Bacitracin (1,000mcg/ml)	<10	<10	※		
	CA+Bacitracin (100mcg/ml)	<10	<10	<10	33	25
	CA+Buffer	<10	<10	13	30	30

Bacitracin=final concentration.

※=All rabbits died after injection of CA-bacitracin mixture.

의 CA 抗體產生은 CA 前處置에 比하여 越等히 낮으며 CA의 4倍量의 STM을 前處置에 使用하여도 CA보다 顯著히 弱한 前處置能밖에 發揮하지 못하였다 (Table 8, 9).

CA와 Polymyxin B를 別途로 注射할 때의 結果: Polymyxin B가 CA와 結合하므로써 CA의 抗原能에 影響을 주어 抗體產生을 增強시키는지 또는 polymyxin B가 宿主에 影響을 주어서 抗體產生이 增強되는가를 보기 爲하여 家兎를 STM으로 前處置한 다음 CA와 polymyxin B를 同時에 各各 左右耳靜脈에 別途로 注射하여 CA만 注射한 것과 結果를 比較하였던바 第10表와 같이 이런 方法에서는 抗體產生은 CA 單獨注射와 差異가 없고 polymyxin B를 CA 注射前 또는 後에 1~2日 間隔을 두고 注射하여도 같은 結果를 얻었으므로 polymyxin B는 CA와 混合함으로써 비로소 抗體產生增強作用을 나타낼을 알 수 있었다.

Bacitracin이 前處置家兎의 CA 抗體產生에 미치는 影響: Polymyxin B가 cyclic polypeptide에 屬하는 抗生物質이기 때문에 같은 系列의 抗生物質인 bacitracin이 polymyxin B와 같은 作用이 있는가를 보기 爲하여 STM으로 3回 前處置한 家兎를 CA와 bacitracin 混合溶液으로 第2次 免疫을 한 結果는 第11表와 같이 1,000 mcg/ml의 bacitracin 存在下에서는 供試家兎가

注射後 2日以內에 全部 斃死하고 100 mcg/ml의 濃度에서는 CA의 抗體產生에 影響을 주지 못하였다. 따라서 cyclic polypeptide에 屬하는 抗生物質全部가 polymyxin B와 같은 作用이 있다고 볼 수는 없을 것 같다 (Table 10, 11).

Neomycin이 CA 抗體產生에 미치는 影響: Oligosaccharide에 屬하는 neomycin이 CA 抗體產生에 어떤 影響을 주는가를 보기 爲하여 STM으로 前處置한 다음 CA와 neomycin의 混合溶液을 第2次注射에 使用하였던바 그 結果는 第12表와 같이 5,000 mcg/ml의 neomycin은 多少의 CA 抗體產生增強作用이 있는 것 같으나 1,000 mcg/ml의 polymyxin B에 比하면 顯著히 낮으며 1,000 mcg/ml의 neomycin은 全然 增強作用이 없었다. 또한 第13表에서 보는 바와 같이 neomycin을 CA와 混合하여 前處置하지 않은 家兎에 注射하면 CA 抗體產生增強作用이 나타나지 않았음은 polymyxin B의 境遇와 같다.

LPS로 前處置할 때의 結果: STM代身 Difco會社 製品인 *S. enteritidis* lipopolysaccharide (LPS)로 家兎를 3回 前處置한 다음 polymyxin B가 CA 抗體產生에 미치는 影響을 보았던바 第14表와 같이 LPS로 前處置한 家兎에서는 polymyxin B의 效果가 나타나지 않았으며 LPS는 菌體毒素에서 大部分의 CA를 除去

Table 12. Effect of neomycin and polymyxin B on CA antibody response of primed rabbits

Immunization		Days after initiation of immunization					
		0	7	10	12	15	21
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)					
<i>S. typhimurium</i> supernate	CA+Neomycin (5,000 mcg/ml)	<10	<10	40	160	106	4,266
	CA+Neomycin (1,000 mcg/ml)	<10	<10	27	133	93	2,133
	CA+Polymyxin B (1,000 mcg/ml)	<10	<10	100	320	256	6,800
	CA+Buffer	<10	<10	30	120	60	2,266
		↑ ₃		↑ ₁		↑ ₁	

Table 13. Effect of neomycin on CA antibody response of non-primed rabbits

Immunization	Days after initiation of immunization				
	0	8	10	13	15
	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)				
CA+Neomycin (5,000 mcg/ml)	<10	40	533	340	230
CA+Neomycin (100 mcg/ml)	<10	33	340	660	340
CA+Buffer	<10	107	320	480	130
↑ ₃					

Table 14. Effect of polymyxin B on CA antibody response of LPS-primed rabbits

Immunization		Days after initiation of immunization				
		0	7	9	11	13
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)				
LPS	CA+Polymyxin B (5,000 mcg/ml)	<10	<10	<10	20	10
	CA+Buffer	<10	<10	<10	15	10

LPS=lipopolysaccharide derived from *S. enteritidis*.

Table 15. Effect of lipopolysaccharide on CA antibody response of rabbits

Immunization		Days after initiation of immunization			
		0	8	12	14
Primary	Secondary	Mean hemagglutinin titers (reciprocal)			
<i>S. typhimurium</i> supernate	CA+LPS (1,000mcg/ml)	<10	<10	200	200
	CA+Buffer	<10	<10	160	240

하고 精製한 것이기 때문에 當然한 結果라고 하겠다.

LPS의 CA 抗體產生에 미치는 影響: STM으로 前處置한 家兎를 CA와 LPS의 混合溶液으로 第2次 疫을 한 結果는 第15表와 같이 LPS가 CA의 抗體產生에 別다른 影響을 주지 못하였다.

總括 및 考察

各種 抗生物質이 O抗原과 結合하여 抗原에 依한 赤

血球感作을 阻止하므로써 赤血球凝集反應을 阻害하나 腸內細菌의 共通抗原인 CA에 對하여서는 阻害作用이 그다지 크지 않는 것으로 報告되어 있다⁴²⁾.

그러나 本實驗의 結果를 보면 12.5 mcg/ml의 polymyxin B는 赤血球凝集價를 1/4로 低下시키고 800 mcg/ml는 CA의 吸着을 完全히 阻止하며 또 CA와 混合하여 疫할때는 polymyxin B도 다른 抗生物質에서 보는바와 같이 抗體產生을 多少 抑制한다. 몇가지

抗生物質의 抗體產生抑制作用은 研究되어 있으나³⁹⁻⁴⁰ polymyxin B의 抗體產生抑制作用은 詳細히 알려져 있지 않으며 다만 polymyxin B가 菌體毒素의 毒性을 中和시킨다는 Neter等³⁰ 또는 Rifkind 및 Palmer⁴⁰ 등의 報告에서 미루어 生覺컨대 polymyxin B가 CA 抗原의 活性部分과 結合하므로써 抗體產生을 抑制하며 이 부분이 菌體毒素의 毒性을 나타내는 부분과 관련이 있지 않은가 生覺된다.

그러나 奇異한 所見은 STM 抗原 등으로 前處置한 家兔에서는 CA와 polymyxin B의 混合溶液이 抗體產生을 增加시키므로써 非處置家兔와 相反되는 所見을 나타내는 點이다. STM 抗原은 CA를 含有하며 赤血球 凝集反應 등으로 抗體와 反應하는 能力만을 가지고 있으나^{46, 49} 이로서 免疫하면 CA 抗體는 產生되지 않는다. 그러나 STM으로 前處置하면 本成績에서 보는 바와 같이 CA 前處置에 比하여 越等히 弱하기는 하나 第2次 免疫에서 CA 抗體產生을 增強시키는 素地를 이루는 것으로 볼 수 있다. 이러한 CA 抗體를 產生하지 못하는 STM의 CA 免疫에 對한 前處置效果가 어떤 機轉에 依하여 이루어지는 가는 確言하기 어렵다. 그러나 STM가 CA 抗體產生에는 直接關與하지는 않으나 前處置에 依하여 所謂 immunocompetent인 細胞를 選擇하여 抗體產生能을 增加시키기 때문에 CA에 依한 第2次 免疫에서 免疫效果가 나타나는 것으로 推測할 수 있다⁵⁰.

前處置한 家兔에서만 polymyxin B가 CA 抗體產生 增加作用을 하는 理由는 究明되지 않았으나 如何間 特別히 抗體產生에 直接 關與하지 않는 STM으로 前處置할 때만 polymyxin B가 增強作用을 나타내고 CA로 前處置할 때 增強作用을 나타내지 않음은 前處置가 이에 따르는 免疫의 複雜한 機轉을 말해주는 것 같다. CA와 polymyxin B를 同時에 그러나 混合하지 않고 別途로 注射할 때는 增強作用이 나타나지 않으니 polymyxin B가 家兔의 組織 特別히 lymphoid tissue等 抗體產生細胞系에 어떤 作用을 하거나 또는 抗體 產生을 阻害하는 因子를 中和하여서 抗體產生이 增強되는 것으로는 볼 수 없으며 增強作用이 CA와 結合한 狀態에서만 볼 수 있으니 STM으로의 前處置가 CA와 polymyxin B 混合物에 特殊한 抗體產生條件을 提供하는 것 같다.

STM 由來의 CA 外에 *E. coli* 014가 保有하는 ethanol 不溶性 CA에 있어서도 程度의 差異는 있으나 polymyxin B가 抗體產生을 增強시키는 作用도 있었으므로 polymyxin B가 STM 抗原系와 어떤 特殊한 關係가 있는 것 같기도 生覺된다. 그러나 前處置에 作用

하는 抗原에 따라서 polymyxin B의 第2次 免疫에 미치는 影響이 다르며 *E. coli* 0111과 055 抗原으로 前處置할 때는 效果가 없으나 *Sh. flexneri*로 前處置할 때는 抗體產生이 增強되니 前處置에 使用하는 抗原의 種類가 重要한 意義를 가진 것으로 生覺된다. 本實驗의 範圍內에서 보면 前處置의 效果가 微弱하게 나타나는 抗原을 使用할 때 polymyxin B의 作用이 크게 나타나는 것 같으나 이 成績만 가지고는 確言하기 어렵다.

Polymyxin B가 cyclic polypeptide에 屬하기 때문에 同群의 다른 抗生物質의 效果를 보기 爲하여 bacitracin을 供試한바 毒性이 強하여 高濃度에서의 作用은 볼 수 없었으며 低濃度에서는 效果가 없었다. Rifkind 및 Palmer⁴⁰에 依하면 같은 cyclic polypeptide 物質中에서도 bacitracin, capreomycin, gramicidin, viomycin 등은 endotoxin을 中和하는 能力이 없으나 polymyxin colistin tyrocidine 등은 中和能이 있다고 하니 物質에 따라서 다르며 따라서 抗體產生에 미치는 影響도 다른 것으로 生覺된다. Neomycin은 oligosaccharide에 屬하는 物質이나 弱한 作用이 있으니 많은 抗生物質을 試驗하면 다른 系列의 物質에서도 polymyxin B와 같은 作用을 하는 것이 있을 것으로 生覺된다.

菌體毒素가 adjuvant 作用이 있음이 알려져 있으나³⁹⁻⁴¹ 反面 이 物質이 免疫體產生을 抑制함이 報告되어 있어^{34, 35} 相反되는 所見이기 때문에 菌體毒素인 lipopolysaccharide의 前處置效果 및 STM 前處置家兔에서의 CA 抗體產生에 미치는 影響을 본바 lipopolysaccharide는 아무런 影響을 미치지 못함을 알았다.

前述한 바와 같이 前處置家兔에서의 polymyxin B의 CA 抗體產生 增強作用의 機轉은 알 수 없으나 免疫學의 으로 大端히 興味있는 所見이며 各方面으로 더 詳細히 追究하므로써 免疫機轉 究明에 도움이 될 것으로 期待되며 實際面에서 免疫體產生이 좋지 못한 抗原으로 免疫할 때는 polymyxin B를 併用하므로써 좀더 좋은 成果를 얻을 수 있을 것으로 期待된다.

結 論

各種 抗生物質은 大體로 抗體產生을 抑制하는 作用이 있음이 알려져 있으나 cyclic polypeptide에 屬하는 polymyxin B는 enterobacterial common antigen (CA)의 抗體產生을 增強시키는 作用을 나타내는 일이 있기에 이에 對하여 몇가지 實驗을 하였다.

1. *Salmonella typhimurium* (STM) 由來의 CA와 polymyxin B를 混合하여 家兔를 免疫하면 CA 抗體產

생이 抑制된다.

2. STM 加熱抽出抗原으로 priming(前處置)한 다음 CA 와 polymyxin B 를 混合하여 免疫하면 CA 抗體產生이 增強된다.

3. STM 抗原으로 前處置한 家兔에서는 polymyxin B 는 *Escherichia coli* 014 由來의 CA 抗體產生도 增強시킨다.

4. 前處置하는 抗原에 따라서 polymyxin B 의 作用이 다르며 *E. coli* 0111 및 055 로 前處置하면 CA 抗體產生增強作用이 나타나지 않으나 *Shigella flexneri* 3 으로 前處置하면 增強作用이 나타난다.

5. CA 로 前處置하면 抗體產生增強作用이 나타나지 않는다.

6. STM 抗原으로 前處置한 家兔에 CA 와 polymyxin B 를 同時に 別途로 注射하면 抗體產生 增強作用이 나타나지 않는다.

7. Bacitracin 은 CA 抗體產生增強作用이 없었으나 neomycin 은 多少 있었다.

8. 菌體毒素인 lipopolysaccharide 는 前處置效果가 없었고 CA 抗體增強作用도 없었다.

9. STM 抗原은 CA 에 比하여 顯著히 弱하나 CA 抗體產生에 對한 前處置效果를 나타냈다.

(끝으로 本論文作成에 있어 指導와 原稿의 校訂을 하여 주신 慶北大學校 醫科大學 細菌學教室 主任 全熙基 教授님에게 衷心으로 感謝를 드립니다.)

REFERENCES

- 1) Silverman, M. S. and Chin, P. H.: *Quantitative serological determination of antibody formation of X-irradiated rabbits.* *J. Immunol.*, **73**: 120-124, 1954.
- 2) Makela, O. and Nossal, G. J. V.: *Accelerated breakdown of immunological tolerance following whole body irradiation.* *J. Immunol.*, **88**: 613-620, 1962.
- 3) Haniszko, J. and Suskind, R. R.: *The effect of ultraviolet radiation on experimental cutaneous sensitization in guinea pig.* *J. Invest. Dermat.*, **40**: 183-191, 1963.
- 4) Rosoff, C. B.: *The role of intestinal bacteria in the recovery from whole body irradiation.* *J. Exptl. Med.*, **118**: 935-943, 1963.
- 5) Thompson, G. R. and Bartholomew, L.: *The*

effect of chloquine on antibody production. *Univ. Mich. Med. Cent. J.*, **30**: 227-230, 1964.

- 6) Samuelson, J. S., Stewart, P. B., Kraft, S. C. and Farr, R. S.: *The effectiveness of acriflavine and ineffectiveness of proflavine as immunosuppressant agents.* *J. Immunol.*, **95**: 314-322, 1965.
- 7) Ben-Efraim, S. and Liacopoulos, P.: *Inhibition, no-effect or enhancement of immune responses following injection of mixtures of immunogenic and non-immunogenic synthetic polypeptides.* *Immunol.*, **12**: 517-524, 1967.
- 8) Mowbray, J. F. and Schaland, J.: *Inhibition of antibody production by ribonuclease.* *Immunol.*, **11**: 421-426, 1966.
- 9) Kinsky, S. C., Luse, S. A., Zopf, D., van Deen, L. L. M. and Haxby, J.: *Interaction of filiclin and derivatives with erythrocyte membranes and lipid dispersion: Electron microscope observations.* *Biochim. Biophys. Acta*, **135**: 844-861, 1967.
- 10) Claman, H. N. and Bronsky, E. A.: *Inhibition of antibody production and acquired immunologic tolerance by actinomycin.* *J. Immunol.*, **95**: 718-721, 1965.
- 11) Cirkovic, D. M. and Simic, M. M.: *Effects of actinomycin D on the primary hemolysin response in rats.* *J. Immunol.*, **99**: 327-332, 1967.
- 12) Karp, R. D. and Bradley, S. G.: *Effect of immunosuppressive agents on normal phage-neutralizing antibody in the mice.* *J. Bacteriol.*, **96**: 1931-1934, 1968.
- 13) Freedman, H. H., Fox, A. E. and Willis, R. S.: *Influence of Chloramphenicol and cetophenicol on antibody formation.* *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **129**: 796-799, 1968.
- 14) Weisberger, A. S. and Daniel, T. M.: *Suppression of antibody synthesis by Chloramphenicol analags.* *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **131**: 570-575, 1969.
- 15) Friedman, H.: *Prevention of immunologic unresponsiveness to shigella antigens in normal mice by homologous spleen cell transplants.* *J.*

- Immunol.*, **92**:201-207, 1964.
- 16) Friedman, H.: *Immunological tolerance to microbial antigens. I. Absence of specific antibody-containing cells in lymphoid tissue of mice injected at birth with shigella soluble antigen.* *J. Bacteriol.*, **92**:390-397, 1966.
 - 17) Friedman, H.: *Immunological tolerance to microbial antigens. II. Suppressed antibody plaque formation to shigella antigens by spleen cells from tolerant mice.* *J. Bacteriol.*, **92**:820-827, 1966.
 - 18) Malakian, A. and Schwab, J.H.: *Immunosuppressant from group A streptococci.* *Science*, **159**:880-881, 1968.
 - 19) Calne, R. Y., Wheeler, J. R. and Hurn, B. A. L.: *Combined immunosuppressive action of phytohemagglutinin and azathioprin (Imuran) on dogs with renal homotransplants.* *Brit. Med. J.*, **2**:154-155, 1965.
 - 20) Jennings, J. F. and Oates, C. M.: *Studies on the nonspecific depression of the immune response.* *J. Exptl. Med.*, **126**:557-564, 1967.
 - 21) Lozzio, B. B.: *Depression of reticuloendothelial phagocytic activity by phytohemagglutinin.* *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **126**:435-438, 1967.
 - 22) Spreafico, F. and Lerner, E. M.: *Suppression of the primary and secondary immunoresponse of the mouse by phytohemagglutinin.* *J. Immunol.*, **98**:407-416, 1967.
 - 23) Elves, M. W.: *On the mechanism of action of phytohemagglutinin on immunological reactions.* *Int. Arch. Allergy*, **33**:353-367, 1968.
 - 24) Chan, P. C. Y.: *Immunosuppressive action of phytohemagglutinin.* *Int. Arch. Allergy*, **36**:486-496, 1969.
 - 25) Thompson, R. and Fishel, C. W.: *Inhibition of antibody formation by homologous tissue factors.* *J. Immunol.*, **94**:379-384, 1965.
 - 26) Sims, F. H. and Freeman, J. W.: *The depression of the immune response by serum protein fractions.* *J. Immunol.*, **96**:175-183, 1966.
 - 27) Levi, M. I., Kravtsov, F. E., Levova, T. M. and Fomenko, G. A.: *The ability of maternal antibody to increase the immune response in infans.* *Immunol.*, **16**:145-148, 1969.
 - 28) Greaves, M. F., Tursi, A., Playfair, J. H. L., Torrigiani, G., Zamir, R. and Roiff, I. M.: *Immunosuppressive potency and in-vitro activity of antilymphocytic globulin.* *Lancet*, **II**(7585):68-72, 1969.
 - 29) Stanbridge, E. J. and Pekins, F. T.: *Tumor nodule formation as an in vitro measure of the suppression of cellular immune response by anti-lymphocytic serum.* *Nature*, **221**:80-81, 1969.
 - 30) Davis, R. C. and Lewis, J. L., Jr.: *The effect of adult thymectomy on the immunosuppression obtained by treatment with antilymphocytic serum.* *Transplant.*, **6**:879-884, 1969.
 - 31) Whang, H. Y. and Neter, E.: *Immunosuppression by endotoxin and its lipid A component.* *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **124**:919-924, 1967.
 - 32) Whang, H. Y. and Neter, E.: *Effect of cholesterol on immunogenicity of common enterobacterial antigen.* *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **128**:956-959, 1968.
 - 33) Whang, H. Y. and Neter, E.: *Inhibition by cordiolipin of antibody response to bacterial antigens.* *J. Immunol.*, **100**:501-506, 1968.
 - 34) Suzuki, T., Whang, H. Y., Gorzynski, E. A. and Neter, E.: *Inhibition by lipopolysaccharide (endotoxin) of antibody response of rabbit to common antigen of enterobacteriaceae.* *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **117**:785-789, 1964.
 - 35) Whang, H. Y. and Neter, E.: *Further study on effect of endotoxin on antibody response of rabbit to common antigen of enterobacteriaceae.* *J. Immunol.*, **98**:948-957, 1967.
 - 36) Whang, H. Y. and Neter, E.: *Antigen-associated immunosuppressant effect of serum on immune response.* *Science*, **163**:290-291, 1969.
 - 37) Whang, H. Y., Chun, D. and Neter, E.: *Immunosuppression by antigen-associated human serum alpha-one protein.* *J. Immunol.*, **103**:824-827, 1969.
 - 38) Bernstein, I. L. and Malkiel, S.: *A Study of diverse humoral antibody systems following a*

- single injection of Freund's incomplete adjuvant
J. Allergy, **35**:390-398, 1964.
- 39) Kind, P. and Johnson, A.G.: *Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation. I. Time limitation of enhancing effect and restoration of antibody formation in X-irradiated rabbits.* *J. Immunol.*, **82**:415-427, 1959.
- 40) Merrit, K. and Johnson, A.G.: *Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation. V. The influence of endotoxin and 5-fluoro-2-deoxyuridine on the primary antibody response of BALB mouse to a purified protein antigen.* *J. Immunol.*, **91**:266-272, 1963.
- 41) Schenck, J.R., Hargie, M.P. Brown, M.S., Ebert, D.S., Yoo, A.L. and McIntire, F.C.: *The enhancement of antibody formation by Escherichia coli lipopolysaccharide and detoxified derivatives.* *J. Immunol.*, **102**:1141-1142, 1969.
- 42) Neter, E., Gorzynski, E.A., Westphal, O. and Lüderitz, O.: *The effect of antibiotics on enterobacterial lipopolysaccharides (endotoxins), hemagglutination and hemolysis.* *J. Immunol.*, **80**:66-72, 1958.
- 43) Gorzynski, E.A. and Neter, E.: *Influence of polymyxin B and normal rabbit serum on erythrocyte modifying capacity of common enterobacterial antigens.* *J. Bacteriol.*, **91**:2110-2111, 1966.
- 44) Rifkind, D. and Palmer, J.D.: *Neutralization of endotoxin toxicity in chick embryos by antibiotics.* *J. Bacteriol.*, **92**:815-819, 1966.
- 45) Suzuki, T., Gorzynski, E.A. and Neter, E.: *Separation by ethanol of common and somatic antigens of enterobacteriaceae.* *J. Bacteriol.*, **88**:1240-1243, 1964.
- 46) Chun, D. and Park, B.: *Demonstration of Shigella flexneri antigens by means of hemagglutination test.* *J. Infect. Dis.*, **98**:82-87, 1956.
- 47) Salk, J.E.: *A simplified procedure for titrating hemagglutination capacity of influenza virus and the corresponding antibody.* *J. Immunol.*, **49**:87-98, 1944.
- 48) Kunin, C.M., Beard, M.V. and Halmagyi, N. E.: *Evidence for a common hapten associated with endotoxin fractions of E. Coli and other enterobacteriaceae.* *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **111**:160-166, 1962.
- 49) Whang, H.Y. and Neter, E.: *Immunological studies of a heterogenetic enterobacterial antigen (Kunin).* *J. Bacteriol.*, **84**:1245-1250, 1962.
- 50) Weisser, R.S., Myrvik, Q.N. and Pearsall, N. N.: *Fundamental of Immunology*, Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., U.S.A., 1969.