

난황항체 및 첨가제를 이용한 헬리코박터 파이로리의 부착 억제

구재경·*최태부
건국대학교 미생물공학과
(접수 : 2000. 11. 27., 게재승인 : 2001. 1. 22.)

Studies on Adherence Inhibition and Detachment of *Helicobacter pylori* Using Egg Yolk IgY and Additives

Jae-Kyoung Koo and Tae-Boo Choe*
Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Whayang-dong, 1, Seoul 143-701, Korea
(Received : 2000. 11. 27., Accepted : 2001. 1. 22.)

H. pylori is known to be a key pathogen of chronic gastric and duodenal ulcers. Bacterial adhesion to hosts is an essential step for bacterial infection and the inhibition of this adhesion provides a possible method for the treatment of the infection. The inhibitory effect of antibody IgY, produced from immunized hens with *H. pylori* antigen, was studied *in vitro*. The inhibition of *H. pylori* adhesion to AGS was as high as 90% using 0.5mg/ml of IgY, and almost 80% of the detachment was also achieved. The inhibitory effect of adhesion-inhibition candidates was investigated. Additives in combination with IgY increased the adhesion-inhibiting effect by about 30-50%. However, the adhesion molecules of *H. pylori* were varied and complex, therefore the further studies are necessary to develop an adhesion inhibitor and effective enough to be employed for the treatment of *H. pylori*, *in vivo*.

Key Words : *Helicobacter pylori*, IgY, AGS, inhibition of adhesion, detachment

서론

일반적으로 미생물, 특히 병원균이 pathogenicity가 지기 위해서는 숙주에 colonization을 해야한다. Colonization을 하기 위한 조건으로는 대체로 다음의 3가지가 있다. 첫째, 균이 특정한 substratum에 부착할 수 있어야 하며, 둘째, 균이 증식 또는 생육할 수 있는 충분한 영양이 확보되어야 하고, 그리고 마지막으로 자신의 생육에 불리한 물리적·화학적 스트레스에 대한 저항성이 있어야 한다는 것이다(1). 이와 같이 colonization의 첫 단계가 바로 숙주세포에 대한 부착이라고 할 수 있다. 병원성 미생물들이 숙주내의 특정한 부위에 주로 colonization 하는 것도 이러한 미생물이 가지는 부착에 관여하는 adhesin과 숙주세포의 표면에 존재하는 adhesion receptor의 모델로 잘 설명될 수 있다. 이렇게 특정 미생물이 colonization 하는 부위가 특이적인 것을 tissue tropism이라고 한다. 한편, 위염, 위궤양 및 위암의 원인균(2~6)으로 알려진 *Helicobacter pylori*는 조직학적 연구의 결과, 위 상피세포(gastric epithelial cell) 및 점막층(mucus layer)에 주로 결합하

는 것이 밝혀졌다. 즉, *H. pylori*는 주로 위 상피세포 및 mucus에 대하여 host-tissue tropism을 보인다. *E. coli*에 의한 요도염의 경우에도 *E. coli*의 host epithelium에의 부착능력이 감염에 원인이 된다고 보고되었으며(7, 8) 동물모델에서 adhesin에 대한 항체를 이용한 치료효과도 조사되었다. 이러한 방법으로 *H. pylori*의 숙주세포의 부착에 관여하는 adhesin에 대한 항체를 이용한 adhesion-based vaccine 등의 개발도 가능할 것이다.

한편 암탉의 blood serum내의 IgG는 난황을 통하여 획득된 면역기능을 후대에 물려준다는 특성이 있다. 전에는 주로 rabbit에서 얻어지던 anti-HRV antibody를 난황을 이용할 경우에는 약 30배 이상의 수율이 증가되며 rabbit은 blood serum을 얻어내기 위해서 죽어야하지만 계란은 그렇지 않기 때문에 환경 및 동물 보호의 면에서도 유리하다고 할 수 있다. 이러한 난황항체의 장점을 이용하여 본 연구에서는 *H. pylori*의 부착을 억제하고 또 이미 부착된 균을 탈착시키기 위한 방법으로 난황(卵黃, egg yolk) 항체를 이용하였다. 아직까지 *H. pylori*의 위벽세포에 대한 결합에 관여하는 정확한 물질이나 기전이 완전히 밝혀져 있지는 않지만 hemagglutination 및 세포결합 실험을 기본으로 한 연구의 결과, *H. pylori*의 부착에 관여하는 몇 가지 특성을 정리하여보면, 3' sialyllactose(NeuAc2-3Galβ1-4Glc; 3' SL)를 인지하여 결합하거나(9,10) 당지질에 sulfated oligosaccharide가 결합한 형태

*Corresponding Author : Department of Microbial Engineering,
Konkuk University, Whayang-dong, 1, Seoul 143-701, Korea
Tel : +82-2-450-3523, Tel : +82-2-3436-5594
E-mail : tbchoe@kkucc.konkuk.ac.kr

를 가지고 있는 sulfatides 등에 결합을 하며, 또한 동물세포의 세포막 lipid 성분인 phosphatidyl ethanolamine(PE)이나(11) fucosylated 된 blood group oligosaccharide Lewis^b antigen (12-14), laminin, collagen과 같은 basement membrane, mucin, heparan sulfate, unspecified neuraminidase insensitive ligand 등에 결합한다는 보고가 있었다(15). 또 sulf기가 함유되지 않은 당지질의 경우에도 galactosylceramide, gangliosylceramide 등이 *H. pylori*의 위벽세포에 대한 결합을 저해한다고 보고되었다(16). 또한 *H. pylori*가 결합하는 위벽 세포에 당을 modification시키는 sodium periodate 등으로 처리할 경우, 결합력이 감소하는 것으로 보아 세포 표면에 존재하는 carbohydrates가 어떤 식으로든 *H. pylori*와 위벽 세포에 결합하는 것에 관여하는 것은 확실하다고 하겠다. 하지만 기술한 바와 같이 결합 저해 실험을 통하여 연구된 여러 가지 물질들이 실험 조건, 사용된 *H. pylori* 균주, 모델링에 사용한 세포주, 심지어는 *in vitro*에서 *H. pylori*의 passages에 따라서도 차이가 있어서 아직까지 그 기전을 정확하게 설명하기는 어렵다. 근래에는 *H. pylori*의 adhesin으로서 HSP(heat shock protein)이 부착에 관여한다는 여러 가지 보고(20)가 있으며 그 중에서 HSP60(heat shock protein 60kDa)에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

본 연구에서는 이러한 보고들을 기초로 하여 분자 내에 sulfur, lactose, galactose, fucose 또는 sialyl기 등을 함유하는 여러 가지의 기지의 물질, 식품 및 해양 유기체의 추출성분 및 *H. pylori*에 대한 난황항체를 이용하여 위벽세포에 대한 *H. pylori*의 결합을 저해함으로써 감염의 초기단계에서 *H. pylori*가 위벽세포에 부착하는 것을 억제하고 나아가서는 감염된 *H. pylori*를 탈착시킴으로서 향후 *H. pylori*와 관련된 위장질환의 감염 예방 및 치료에 이용하고자 하였다.

실험재료 및 방법

사용 균주

공시 균주로는 *Helicobacter pylori* NCTC11637과 ATCC43526을 사용하였으며 한편 현대 중앙병원에서 내시경 검사 시 *H. pylori* 감염환자로부터 분리된 조직에서 *H. pylori*를 순수 분리하여 분리 균주로 사용하였다.

사용 배지

계대 배양을 위한 액체 배지로는 brucella broth배지를 이용하였으며 이때 5%의 FBS(fetal bovine serum)을 첨가하여 37°C, 10% CO₂ 상태에서 배양하였다. 또 한 균주의 단기 보존 및 CFU(colony forming unit)를 측정하기 위한 고체배지로는 BAP(blood agar plate, Becton Dickinson, USA) 및 CBA(columbia blood agar, Difco, USA))를 이용하여 10%CO₂, 37°C에서 배양하였다.

세포주

*H. pylori*의 부착 정도를 조사하기 위해서 AGS(Human gastric adenocarcinoma), NIH-3T3(mouse fibroblast), C6(glioma cell) 등의 세포주를 사용하였다. 각 세포주들은 RPMI1640 배지에 10%의 FBS(fetal bovine serum)을 첨가하여 배양을

하였으며 이들 세포주는 모두 부착성 세포이므로 0.25%의 trypsin-EDTA solution을 사용하여 세포를 떼어낸 후 계대하여 사용하였다.

면역 접종 항원

항원 후보물질로는 *H. pylori*의 whole cell과 외막단백질(outermembrane protein)를 사용하였다. 외막단백질의 분리는 다음과 같은 방법으로 하였다. 우선 *H. pylori* 배양액을 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 회수한 균체를 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 3회 재현탁과 원심분리를 반복하여 세척한 후 최종적으로 20ml의 buffer에 균체를 현탁시킨다. 30초씩 4회 정도 초음파처리(Ultra sonicator model 4710, Cole-parmer Instrument Co.)로 균체를 파쇄한 후, DNase (0.1 mg)와 RNase (0.5 mg)를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨다. 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 파쇄되지 않은 균체를 제거한 다음, 회수한 상등액을 100,000×g로 30분간 초원심분리(Centrifuge T-1170, Kontron Instruments)하여 total membrane을 침전시켰다. 얻어진 membrane은 막지질을 분해하기 위하여 2% sodium laurylsarcosine이 함유된 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 20 mL로 현탁시킨 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 액을 100,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 침전시켜서 외막단백질을 회수한다. 외막단백질은 초순수에 현탁시켜 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

면역 접종

면역 접종은 생후 약 100-150일 정도의 닭에 NCTC11637 균체 및 균체로부터 분리한 항원의 단백질 농도를 100 µg/kg 정도로 FCA(Fruend's complete adjuvant)와 함께 근육 주사를 하였다. 1차 접종은 complete adjuvant를 사용하고 2, 3차 접종은 incomplete adjuvant를 사용하였다. 면역 접종은 2주 간격으로 3회 접종하며 3회 접종한 후 1주 후에 1회 boosting 하였다.

난황 항체의 분리

회수한 계란을 날짜별로 냉장 보관하였다가 난황만을 분리하여 증류수와 1:1의 부피로 혼합한다. 여기에 λ-carrageenan (1 mg/mL in DW) 용액을 2배로 첨가한 후 실온에서 30분간 방치한다. 원심분리 후 상등액을 취하여 Whatman No.2. paper로 filtration한 다음 통과된 액을 19% sodium sulfate를 첨가하여 염출을 한다. 다시 원심 분리하여 침전물을 회수하여 PBS에 재현탁 시키고 sodium sulfate를 이용하여 다시 염출과 원심 분리를 한다. PBS에 재현탁된 시료를 10mM PBS로 투석을 행한다.

항체의 역가 측정

SRID(single radial immuno-diffusion)를 이용하여 총 항체의 양을 측정하였고 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 등의 면역학적인 방법으로 면역 접종을 실시한 군과 대조군의 *H. pylori*에 대한 특이항체의 상대적인 농도 및 역가를 비교 측정하였다.

천연물에서의 추출

알려진 *H. pylori*의 부착에 관여하는 물질과 비슷한 구조 및 조성을 함유하는 물질 중에서 달걀 흰자의 조정제를 통하여 부착 저해 후보 물질을 얻어서 부착 저해 실험을 수행하였다. 또한, 비교적 sulf기 및 당을 함유하는 지질이 많은 해양 유기체로부터 유효 성분을 추출하기 위해서 에탄올을 이용하였다.

추출물의 세포독성 측정

추출된 성분이 세포에 독성이 있는지를 확인하기 위해 96-well에서 24시간 전배양하여 부착된 AGS에 추출물을 농도별로 첨가하여 2시간 반응시킨 후 다시 새로운 배지로 교환하여 24시간 더 배양을 한 다음 각 well에 뉴트랄 레드(neutral red, NR) assay를 통해 세포독성을 측정하였다(18).

세포주에 따른 *H. pylori*의 결합력 조사

*H. pylori*의 세포주에 따른 결합의 정도를 알아보고 향후 부착 억제 실험에 사용할 *in vitro*에서의 조건을 확립하기 위하여 AGS(Human gastric adenocarcinoma), NIH-3T3(mouse fibroblast), C6(glia cell) 등 각기 origin이 다른 세포주를 이용하여 *H. pylori*의 결합력을 조사하였다.

***H. pylori*의 부착 저해 실험**

우선 AGS를 96well에 2×10^5 /mL의 농도로 100 μ L 씩 각 well에 분주하여 24시간 동안 전배양을 하여 AGS의 단일층을 형성하게 한다. *H. pylori*를 10^8 CFU/mL의 농도로 PBS에 재현탁 시킨 후 전배양한 AGS의 monolayer에 첨가한다. 추출된 추출물을 200 μ g/mL의 농도로 첨가하여 120분간, 37 $^{\circ}$ C, 10% CO₂ 상태에서 반응을 시킨다. 반응 후 AGS에 부착되지 않은 *H. pylori*를 제거하기 위해서 PBS로 3회 세척 후 urease 측정용 배지(UDM; pH6.8, urease detection medium)를 각 well에 100 내지 200 μ L 씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 *H. pylori*의 농도를 측정한다. 이때 (+)대조군으로는 추출물을 첨가하지 않고 *H. pylori*만 첨가한 실험군을 사용하며 (-)대조군으로 AGS만 있는 실험군을 사용한다. urease 측정법, ELISA법 및 FACS(fluorescence activated cell sorter) 등을 사용하여 결합된 *H. pylori*의 양을 측정하였다.

***H. pylori*의 탈착 실험**

이미 부착된 *H. pylori*를 추출물을 이용하여 탈착시키는 실험을 통하여 감염의 치료에 응용하고자 부착저해 실험과 같은 방법으로 전배양된 AGS와 *H. pylori*를 반응시켜 부착시킨 후, 첨가물질들을 이용하여 이미 위벽세포와 결합된 *H. pylori*를 위벽세포로부터 탈착하는 실험을 하기와 같이 실시한다. 우선 AGS를 96well에 2×10^5 /mL의 농도로 100 μ L 씩 각 well에 분주하여 24시간 동안 전배양을 하여 AGS의 monolayer을 형성하게 한다. 48시간 배양한 *H. pylori*를 원심 분리, 재현탁된 *H. pylori*를 10^8 CFU/mL의 농도로 전배양한 AGS의 monolayer에 첨가한다. 37 $^{\circ}$ C, 10% CO₂ 상태에서 2시간 정도 반응시킨 후 부착되지 않은 *H. pylori*를 3회 세척한다. 여기에 다시 추출물을 및 첨가물질을 200 μ g/mL의 농도로 첨가하여 1내지 2시간 37 $^{\circ}$ C, 10% CO₂ 상태에서 반응시

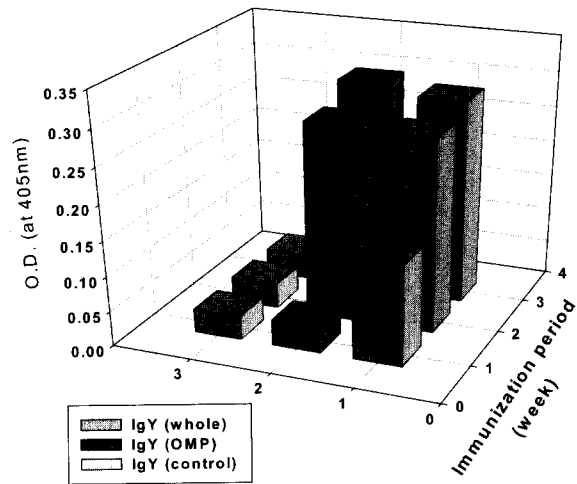


Figure 1. The changes of IgG concentration against *H. pylori* in blood serum according to immunization period.

Whole: immunized with *H. pylori* whole cell, OMP: immunized with *H. pylori* OMP, Control: non-immunized

킨다. 이렇게 반응을 시킨 후 AGS세포에 부착되었다가 떨어져 나온 *H. pylori*를 제거하기 위해서 3회 세척 후 잔존하는 *H. pylori*의 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

접종 시기에 따른 혈청 내 IgG의 역가 측정

닭에 면역 접종을 하면서 *H. pylori* 항원의 면역 접종 횟수에 따른 닭 혈액내 IgG의 변화를 항혈청을 이용한 ELISA법으로 측정한 결과는 Figure 1과 같다. 사용한 항원은 *H. pylori* 균체 또는 외막단백질이였다. 면역화 하지 않은 군에서는 혈청내 IgG의 농도 변화가 거의 없는 반면에 균체 및 외막 단백질로 면역 접종을 한 군에서는 면역 접종 횟수에 따른 IgG 항체의 증가가 현저하게 나타났다. 3차 접종 후에는 면역 접종을 하지 않은 군에 비해 10배 이상의 *H. pylori*에 대한 항체가 생산되는 것을 확인할 수 있었다. 1차 접종 후에 균체를 접종한 군이 외막 단백을 접종한 군보다 IgG가 많이 생산된 것은 LPS(lopopolysaccharide)등 균체가 가지는 여러 가지의 물질에 의한 면역촉진 효과에 의한 것으로 사료된다.

난황 항체의 정제

난황 항체를 λ -carrageenan을 이용하여 수용성 단백질인 IgY를 난황의 인지질 및 lipoprotein으로부터 분리하는 방법을 이용하여 정제한 결과 약 70-75% 정도의 순도로 IgY가 조정제 되었으며 이렇게 조정제된 난황 항체를 이용하여 부착 저해 및 탈착에 관한 실험을 진행하였다. Caprylic acid 및 증류수를 사용하여 난황항체를 정제한 경우에도 λ -carrageenan과 비슷한 정도의 정제도를 보였다(data not shown).

세포주에 따른 *H. pylori*의 결합력

*In vitro*에서의 *H. pylori*의 부착 저해실험을 수행하기에 앞서 우선 세포주에 대한 *H. pylori*의 결합력을 비교하기 위해

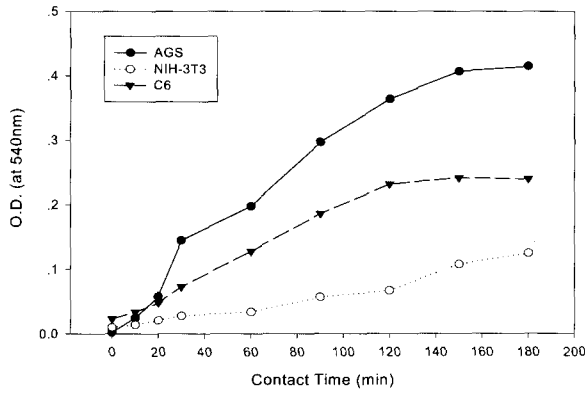


Figure 2. Adhesion of *H. pylori* to various cell type, AGS(Human gastric adenocarcinoma), NIH-3T3(mouse fibroblast), C6(glial cell)

서 AGS, C6, NIH-3T3 등의 세포주를 이용하여 실험한 결과, 각 세포주 별로 반응 시간의 증가에 따라 결합이 증가하는 양상을 보였으며 대체로 3시간 정도 후에는 saturation 되는 것으로 보였다(Figure 2). 세포주에 따라서 O.D.값의 차이를 보인 것은 *H. pylori*의 binding affinity 및 monolayer culture 시 세포주의 농도 차이에 기인한 것으로 보인다. 본 실험에서 well내의 동물 세포의 농도는 AGS가 가장 낮았지만 높은 발색도를 보인 이유는 AGS에 대한 *H. pylori*의 결합력이 크기 때문으로 사료된다. 반면에 C6나 NIH-3T3는 높은 세포 농도에 불구하고 낮은 발색도를 보여서 *H. pylori*의 결합력이 약한 것으로 보인다.

난황 항체를 이용한 *H. pylori*의 부착 저해

항체는 항원에 대한 특이성을 가지며 항원에 특이적으로 결합을 한다. 이러한 원리로 *H. pylori*에 대한 항체는 *H. pylori*에 대해 특이적으로 결합이 가능하며 이렇게 항체와 결합이 된 *H. pylori*는 상대적으로 숙주세포와 결합할 수 있는 ligand의 수가 감소하여 숙주세포에 대한 결합력이 감소하게 될 것이다. 난황 항체에 의한 부착 억제 실험 결과는 Figure 3과 같다. 닭의 면역접종에서 항원으로 균체NCTC11637(whole)를 이용했을 때가 외막 단백질만을 이용했을 때 보다 우수했다. 비교적 낮은 농도의 난황 항체(0.5 mg/mL)에서도 균체의 경우 90% 가량이 그리고 외막 단백질의 경우 60%가량의 *H. pylori*가 부착 억제 현상을 보였다(Figure 3A). 그러나 면역접종을 하지 않은 난황 항체는 약 28%의 억제율을 보여 위암 세포주에 대한 *H. pylori*의 부착 억제가 특이적 항체에 의해 이루어졌음을 알 수 있다. 그러나 부착 대상 균주를 ATCC43526으로 바꾸면 억제 정도는 균체를 항원으로 면역화한 경우가 77%, 외막 단백질로 면역화한 경우가 58% 정도로 각각 낮아져 부착에 이용된 균주가 항원으로 사용된 균주와 다를 경우 항체에 의한 부착 억제 정도가 약간의 차이를 나타냈으며(Figure 3B) 위궤양 환자의 위에서 분리한 균주를 실험에 이용했을 경우에는 균주에 따른 부착 억제 정도가 더욱 심하게 변화하는 양상을 보였는데(data not shown) 이를 극복하기 위한 실험이 앞으로 진행되어야 할 것으로 보인다.

첨가 물질에 따른 *H. pylori*의 부착 저해

NCTC11637 균주를 이용하여 여러 가지 물질을 이용한

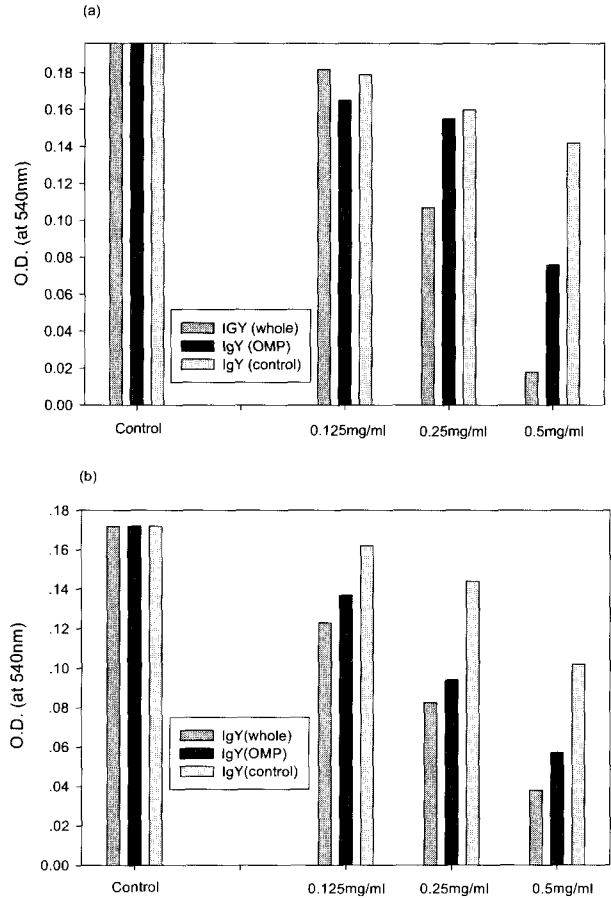


Figure 3. Binding inhibition of *H. pylori* to Human gastric adenocarcinoma cell line AGS, using IgY, (a) : NCTC11637 (b) : ATCC43526 Whole: immunized with *H. pylori* whole cell, OMP: immunized with *H. pylori* OMP, Control: non-immunized

*H. pylori*의 부착 저해 실험을 하였다. Fibronectin 및 amgel 등과 같은 extracellular matrix의 성분 물질도 실험을 하였는데 0.5mg/ml의 난황 항체와 같이 첨가한 경우, fibronectin은 0.1mg/ml의 농도에서 70%내외, mucosal aceton powder는 1mg/ml의 농도에서 75%, chitosan은 1mg/ml의 농도에서 50%, hyaluronic acid는 0.5 mg/mL의 농도에서 약 60% 정도의 부착 저해를 보이는 것으로 나타나서 대체로 난황 항체를 같이 첨가한 경우에는 증식 억제의 경우와는 달리 첨가물질만을 사용한 경우보다 더 좋은 효과를 나타냈다(Figure 4). 달걀에서 분리된 glycoprotein인 GP1의 경우에는 1mg/ml의 농도에서 70-80% 정도의 부착 억제를 나타냈는데 GP1은 fibronectin등의 basement membrane 성분에 비해서 경제적이므로 실용화의 면에서 훨씬 유리하다고 생각된다.

한편 부착 억제 물질의 선별 실험에서 어느 정도 효과를 나타낸 물질들과 난황 항체(1 mg/mL)를 함께 첨가하여 전반적인 부착 억제의 정도를 조사하였다(Figure 5). 무와 마늘의 열수 추출물의 경우에도 다른 정제된 물질에 비해서 상대적으로 낮기는 하지만 난황 항체와 함께 투여된 경우 저해를 하는 것으로 나타났다. 역시 fibronectin이 가장 좋은 억제 효과를 보였으나 가격 경쟁력의 측면에서 달걀에서 분리된 GP1이 더욱 유리하리라고 사료된다.

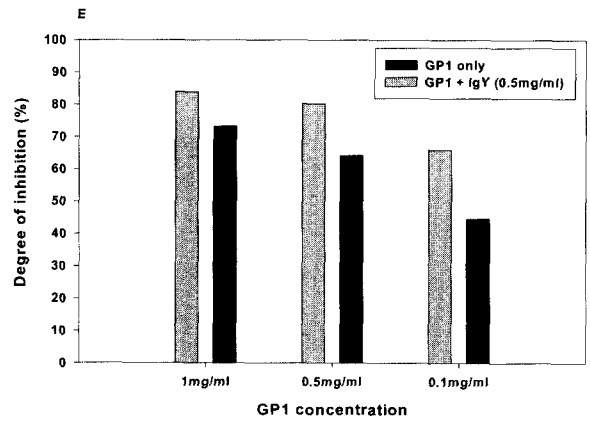
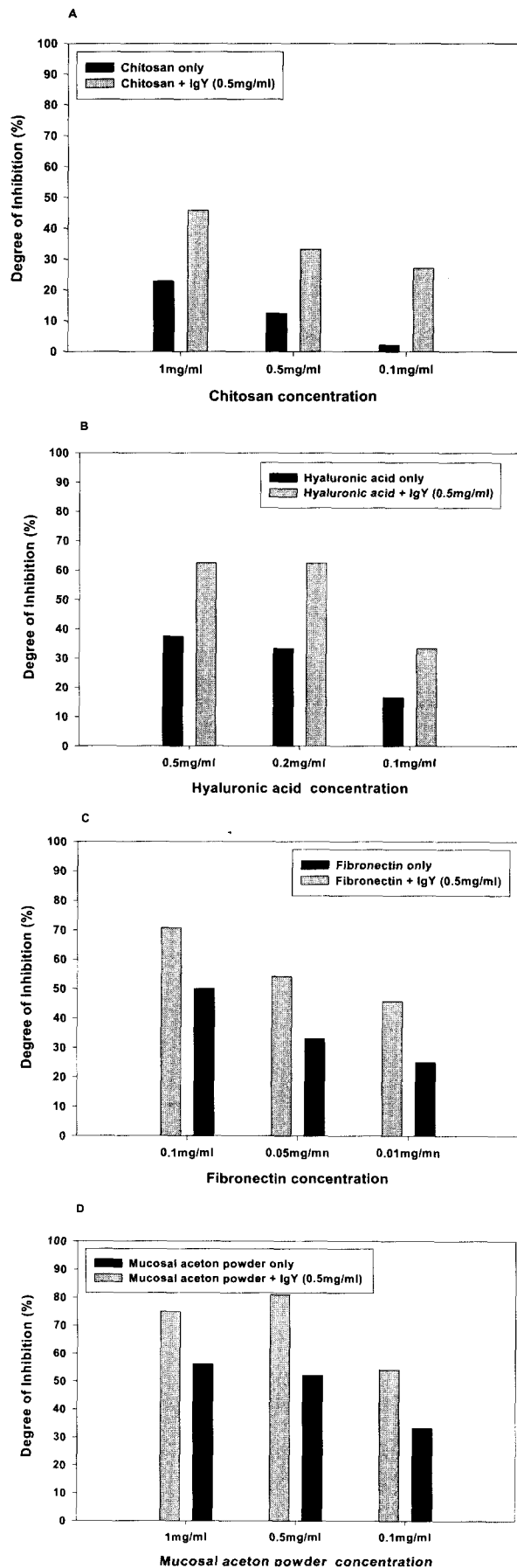


Figure 4. Binding inhibition of *H. pylori* to AGS by various materials A: chito-oligosaccharide B: hyaluronic acid(HA) C: fibronectin D: mucosal acetone powder E: GP1

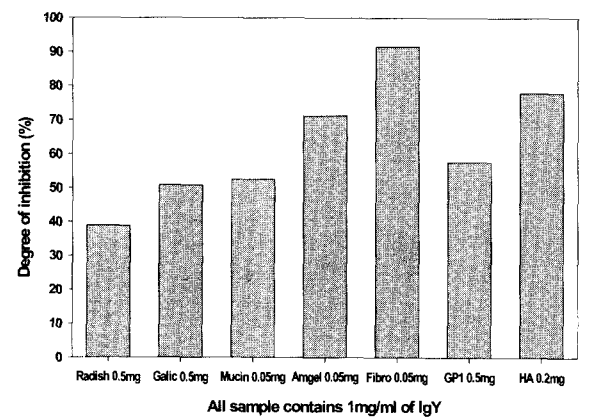


Figure 5. Subset of *H. pylori* binding inhibition using additives plus IgY

난황 항체를 이용한 *H. pylori*의 탈착

*H. pylori*가 위벽 세포에 부착하는 것을 억제하는 것이 감염 예방의 관점에서 의미가 있다면 부착을 저해하는데서 더 나아가 이미 부착된 *H. pylori*를 떼어낼 수 있다면 치료에의 응용이 가능할 것이다. 이러한 관점에서 위암 세포주인 AGS에 이미 부착된 *H. pylori*를 난황 항체를 이용해 탈착이 가능한지 여부를 알기 위해 AGS에 *H. pylori*를 먼저 부착시킨 후 항체가 포함된 PBS를 이용해 탈착시키는 실험을 수행한 결과는 Figure 6과 같다. 사용한 *H. pylori*의 농도는 앞서와 같이 10^8 CFU/mL의 농도였으며 대조군으로는 아무것도 첨가하지 않은 균을 사용하였다. 부착 균주가 NCTC11637일 경우에는 0.5 mg/mL의 난황 항체를 이용하여 부착된 *H. pylori*를 80% 이상 탈착시킬 수 있었으나(Figure 6A) 균주를 ATCC43525로 바꾸면 52%의 *H. pylori*만이 탈착되어(Figure 6B) 항체에 의한 탈착 효과가 줄어들음을 알 수 있다. 대조군의 O.D.값이 부착 실험의 대조군의 수치와 거의 비슷하게 나오는 것으로 보아 *H. pylori*가 부착 후 저절로 떨어지는 경우는 거의 없는 것으로 사료된다.

요 약

H. pylori 유래의 위장 질환에 대한 예방 및 치료에 대체할

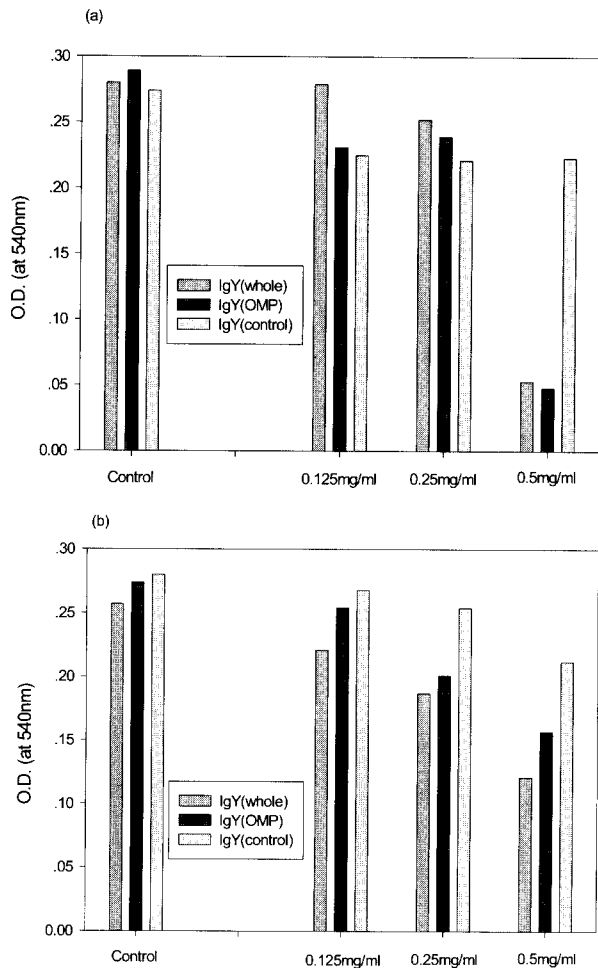


Figure 6. Detachment of *H. pylori* from AGS with various IgY type and concentrations (a) : NCTC11637 (b) ATCC43526

Whole: immunized with *H. pylori* whole cell, OMP: immunized with *H. pylori* OMP, Control: non-immunized

수 있는 방법으로 감염 원인균의 부착 억제와 탈착이 가능한 물질의 사용이 타당성 조사 및 그 기초연구를 목적으로 조사하였다. 우선, 닭에 면역접종을 하여 면역접종 횟수에 따른 IgG 항체의 증가를 확인하여 면역접종을 하지 않은 군에 비해 10배 이상의 *H. pylori*에 대한 항체가 생산되는 것을 확인하였다. *H. pylori*가 위 상피세포에 결합하는 현상이 *H. pylori*의 감염에 중요한 첫 단계라는 점에 착안하여 *H. pylori*의 위벽세포에 대한 결합의 특성을 조사하는 한편, 여러가지 부착 억제 후보물질을 이용하여 단독 또는 *H. pylori*에 대한 난황 항체와 함께 *H. pylori*의 부착 억제 정도를 실험하였다. 부착 억제 실험의 결과, 난황 항체를 이용하여 *H. pylori* (NCTC11637, ATCC43526)가 AGS에 부착하는 것을 저해가 가능하였으며 NCTC11637와 ATCC43526 모두 균체 및 외막 단백질로 면역접종하여 생산된 항체의 경우 0.5 mg/mL의 농도로 NCTC11637은 80%, ATCC43526은 60% 정도의 부착 억제를 하는 것으로 나타났다. 탈착 실험의 결과도 면역접종을 실시한 난황 항체가 40-60% 정도의 탈착효과를 보였으며 균체 자체와 외막 단백을 항원으로 사용한 군 사이의 탈착력 차이는 크지 않았다. 그러나 이러한 결과들이 사용 균주에

따라, 특히 분리 균주를 이용한 경우에는 상이한 결과들이 나타나므로 항체를 이용한 경우에는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 그러나 난황 항체는 식품성분의 하나로서 안정성의 면에서 매우 유리하고 대량 생산이 가능하므로 특이적 항체를 많이 생산할 수 있는 항원의 개발과 함께 정제도를 높인다면 더욱 좋은 효과를 기대할 수 있을 것이다. 그러나 외국의 다른 연구에서 보고된 경우와 같이 *in vitro*에서 유효한 물질이 *in vivo*에서 효과가 없는 경우도 종종 보고되고 있어 지금까지 탐색한 물질의 *in vivo*에서의 부착 억제 효과에 대한 진단도 함께 이루어져야 할 것으로 사료되며 또한 앞서 기술한 바와 같이 *H. pylori*의 결합에 관계하는 receptors 및 ligands가 어떤 특정한 한가지가 아니라 여러 가지의 복합적인 물질이 관여하는 것이기 때문에 여기에 대해서는 더 많은 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 연구비 지원(자유공모과제 1998-001-E01381)을 받아 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Itzhak O. and Ronald J. Doyle (1994), Bacterial adhesion to cells and tissue, *Chapman & Hall*.
2. Marshall, B. J. and J. R. Warren. (1984), Unidentified curved bacillus in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet*, ii, 1311-1314.
3. Blaser, M. J. (1990), *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation, *J. Infect. Dis.*, **161**, 626-633.
4. Parsonnet, J., S. Hansen, and L. Rodriguez (1994), *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma, *N. Eng. J. Med.*, **330**, 1267-1271.
5. Moss, S. and Clam, J. (1992), *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position, *Gut*, **32**, 289-292.
6. Warren, J. R. and Marshall B. (1983), Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet*, i, 1273.
7. Mobley H. L, Jarvis K. G, Elwood J.P. (1993), Isogenic P-Fimbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: the role of alpha Gal(1-4) beta Gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol. Microbiol.* **10**:143-155.
8. Westerlund B, Van Die I, Hoekstra W, Korhonen TK. (1993), P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* as multifunctional adherence organelles. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.*, **278**:229-237.
9. Opekun A. R. and El-Zaimaity H. M. (1999), Novel therapies for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.*, **13**(1):35-42.
10. Mysore J. V. and Wigginton T. (1999), Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel anti-adhesion compound. *Gastroenterology.*, **117**(6): 1316-25.
11. Gold B. D., Huesca K., Sherman P. M. and Lingwood C. A. (1993), *Helicobacter mustelae* and *Helicobacter pylori* bind to common lipid receptors *in vitro*. *Infect Immun.*, **61**:2632-2638.
12. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S.,

- (1993), Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, **262**:1892-1895.
13. Stromqvist M, Falk P, Bergstrom S, et al., (1995), Human milk kappa-casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **21**:288-296.
 14. Ilver D, Amquist A, Frick I-M, et al. (1996), The *Helicobacter pylori* blood group antigen binding adhesion. *Gut*, **39**:A55.
 15. Tzouvelelds LS, Mentis AF, Makris AM, Spitiadis C, Blackwell C, Weir DM. (1991), *In vitro* binding of *Helicobacter pylori* to human gastric mucin. *Infect Immun*, **59**:4252-4254.
 16. Slomiany BL, Stomiany A. (1992), Mechanism of *Helicobacter pylori* pathogenesis focus on mucus. *J Clin Gastroenterol*, **14**:S114-S121.
 17. Hata Y, Kita T, Murakami M. (1999), Bovine milk inhibits both adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfatide and *Helicobacter pylori*-induced vacuolation of vero cells. *Dig Dis Sci*, Aug;**44**(8):1696-702.
 18. Bracher M, Faller C, Spengler J, Reinhardt CA, (1987), Comparison of *in vitro* cell toxicity with *in vivo* eye irritation. *Mol Toxicol*, Fall;**1**(4):561-70.
 19. Larsson A, Sjoquist J, (1990), Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **13**(4):199-201.
 20. Yamaguchi A. and Osaki T. (1997), Heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori* is associated with adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells. *J. Med. Microbiol*. **46**(10):825-31.