

비경구 투여한 *Streptococcus mutans* 균체 및 Glucosyltransferase에 대한 마우스의 면역항체반응

양규호 · 정 미 · 정 진³ · 장미영¹ · 오종석¹ · 나희삼¹ · 강인철² · 이현철¹

전남대학교 치과대학 소아치과학교실, 치의학연구소, 구강미생물학교실²
의과대학 미생물학교실¹, 부산대학교 치과대학 구강미생물학교실³

국문초록

치아우식증을 예방하기 위한 백신연구를 위하여 주원인균인 *Streptococcus mutans* 균체항원과 이 균에서 분리한 glucosyltransferase (GTF)를 항원으로 하고 이에 면역조절기능이 있는 retinoic acid (RA)를 첨가하여 투여경로와 백신조성이 이들 항원에 대한 면역반응에 미치는 영향을 실험하였다.

균체항원(Ingbritt strain)을 마우스의 피하에 Complete Freund's Adjuvant와 함께 투여하여 생산되는 혈청내 응집항체는 serotype e (LM-7)와는 강한 교차반응을 보였으나 serotype f (OMZ-175)와는 거의 교차반응을 일으키지 않았다. 면역혈청내 항-GTF 및 항-Ag I/II 항체중 항-GTF IgA는 피하로 투여시 전혀 검출되지 않았으나 이에 RA를 첨가하면 다량의 항체 생산을 관찰하였고 그 정도는 경구투여시의 생산량을 능가하였다. GTF를 alum과 함께 투여하여 생산되는 혈청내 항-GTF 항체중 IgM은 피하로 투여시 상당량이 검출되었고 RA를 첨가하면 그 생산이 증가되었으며 경구로 투여시 대조군에 비하여 약간 증가를 보였으나 피하투여시의 그것에는 미치지 못하였다. GTF-특이 IgG는 경구투여시는 전혀 검출되지 아니하였고, 피하투여시에만 현저한 증가를 보였으며, RA첨가는 이에 영향을 미치지 못하였다. 항-GTF IgA는 피하로 투여시 전혀 검출되지 아니하였으나 이에 RA를 첨가하면 증가된 항체생산을 관찰하였고 그 정도는 경구투여시의 생산량을 능가하였다.

이상의 실험성적은 GTF에 대한 항체생산은 투여경로와 항원의 종류에 따라 다양한 반응을 나타내며 RA는 이를 백신에 첨가하면 피하경로를 이용하여 면역하더라도 경구투여와 유사한 IgA-매개 면역반응으로 조절시킬 수 있는 가능성을 나타내었다.

주요어 : *Streptococcus mutans*, Glucosyltransferase (GTF), Retinoic acid, IgA

I. 서 론

치아우식증을 예방하기 위한 백신연구는 주 원인균인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)로부터 분리한 항원들, 특히 Ag I/II¹⁻³⁾ 와 B, P1, PAC 로 일컫는 세포표면단백항원^{1,4)} 그리고 glucosyltransferase (GTF)⁵⁾ 등에 대한 면역반응에 관한 연구가 관심있게 이루어져 왔다. 균체항원을 경구로 투여하면 타액내에 IgA생산을 유도하게 되며 치아우식발생이 상당히 감소하며⁶⁻⁸⁾, GTF나 Ag I/II에 대한 분비성 IgA (secretory IgA) 생산을 유도하기 위해서도 반드시 경구면역이어야 하며 이 항체는 이들 원인균의 집락형성과 치아우식을 함께 억제함을 보고하였다⁹⁻¹¹⁾. 그러나 경구로 투여된 항원은 소화효소에

의해 쉽게 파괴되기도 하고¹²⁾, 면역학적 관용을 일으키는 문제점들이 있다. 최근에는 이를 보완하기 위하여 투여항원을 cholera toxin B subunit^{3,9)} 나 liposome에 결합시키거나^{13,14)} muramyl dipeptide와 같은 adjuvant를 시도하기도 하였다¹⁵⁾. 면역반응에서 그 반응양상을 크게 좌우하는 것은 cytokine들의 복잡한 network와 관련하여 항원자체의 성분이나 제공된 항원을 주로 인식하는 조력 T세포의 종류에 따라 달라질 수 있다고 믿고 있으며¹⁶⁾, 이는 결국 신경면역내분비 상호조절 (neuroimmunoenocrine interaction)과 직결되어 있다¹⁷⁾.

따라서 저자들은 치아우식증을 면역학적으로 예방하기 위한 첫시도로서 항원 GTF를 포함한 백신조성에 면역조절제 retinoic acid (RA)를 추가하고 투여경로를 비경구적으로 투여

*이 논문은 1994년 전남대학교병원 임상연구소 학술연구비에 의하여 연구되었음.

하면서 IgA생산의 변화를 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1) 실험균주.

S. mutans (Ingritt strain)를 Brain Heart Infusion (BHI) 배지에서 37°C 24시간 배양후 6,000g로 원심하였고 이를 다시 37% formaldehyde를 가하여 고정하였고 PBS로 세척후 흡광도 (660 nm파장)에 의하여 농도를 결정한 다음 균체 항원으로 사용하였다.

2) 실험동물.

생후 8주 - 12주된 정상 BALB/c 마우스를 사용하였다. 실험 중 모든 마우스들은 항온 (22±2°C) 항습 (55%) 및 무균여과 환풍장치내에서 사육하였다.

3) 시약 및 배지.

Retinoic acid (RA, all-trans), complete Freund's adjuvant, 2-mercaptoethanol, sodium pyrophosphate, peroxidase-labeled anti-IgM (μ chain) antibody, peroxidase-labeled anti-IgG (γ chain) antibody, peroxidase-labeled anti-IgA (α chain) antibody, diaminobenzidine(DAB)은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하고, 세포배양을 위한 fetal calf serum(FCS), L-glutamine, 그리고 RPMI 1640배지는 GIBCO사 (Grand Island, NY, USA) 제품을, 세균배양을 위한 Brain Heart Infusion (BHI)배지는 Difco사 (Detroit, MI, USA) 제품을 사용하였다.

4) GTF, Ag I/II항원.

항원-특이 항체측정과 마우스를 면역하기 위한 면역원으로 사용한 단백질항원 Ag I/II는 미국 Alabama대학의 Russell교수로부터 제공받은 것으로 이는 *S. mutans* IB-162균을 배양한 상청액에서 분리, 정제한 것이다^{1,18)}. 또 GTF는 미국 Forsyth Dental Center의 Smith박사로부터 제공받은 것으로 이는 *S. sobrinus* (strain 6715, serotype g)로부터 분리한 것이다⁷⁾. 이들 항원을 각각 이미 제조된 alum (aluminum hydroxide) 과 혼합하거나 alum 및 RA를 함께 혼합하였는데 0.25 ml내의 항원, alum, 및 RA의 최종농도는 각각 5 μ g, 60 μ g 및 10 μ g 이 되게 하였다.

5) 면역과 항체역가 측정.

면역원으로는 상기의 균체항원과 GTF를 각각 사용하였고 각 항원에 alum 또는 면역조절제인 RA를 추가하기도 하였고 이를 다시 투여경로를 달리하여 상호 비교하였다. 즉 항원의 조성/투여 경로에 따라 마우스를 4군으로 구별하였는데 제 1군(항원+alum)-피하 투여; 제 2군(항원+alum+RA)-피하 투여; 제 3군(항원+alum)-경구투여; 제 4군 (항원을 투여하지 않은

대조군)으로 하였다. 10일 간격으로 백신을 3회 투여 후 7일후에 꼬리를 절단하여 혈액을 채취하였고 carbachol (10mg in 0.1ml PBS)을 복강내에 투여하여 타액을 채취하였다. 각 실험군의 5마리로부터 채취한 혈액은 함께 합하여 응고시킨 다음 원심분리하여 타액과 함께 항체검사시까지 -20°C에 냉동 보관하였다. 이때 각 군은 5마리씩으로 하였다. 각군의 면역혈청내 항체가를 측정하기 위하여는 일차로 응집반응을 이용하였는데 균체로 면역한 혈청과 GTF로 면역한 혈청을 two-fold dilution법과 tube agglutination법을 사용하였고 교차반응등을 관찰하기 위하여는 흡수시험을 함께 시행하였다. 면역효소법에 의한 항체가측정은 혈청내의 GTF-특이 항체를 IgM, IgG, 그리고 IgA를 구별하여 검출하기 위하여 peroxidase-부착 anti-mouse IgM, IgG, 또는 IgA를 사용한 sandwich법을 사용하였다.

III. 실험성적

1) *S. mutans*(Ingritt strain)균체에 의한 면역과 응집역가 반응.

S. mutans(Ingritt strain)균체를 Complete Freund's Adjuvant(CFA)와 함께 투여하여 생산된 혈청을 2배 계단 희석하면서 Ingritt strain과 LM-7 및 OMZ-175와 반응시켜 응집역가를 측정하였던바 Table 1에서와 같이 경구투여군에서는 거의 검출되지 아니한 반면 피하투여군에서는 1:2560의 높은 응집역가를 나타내었고 이에 RA를 첨가하면 응집역가는 오히려 감소하였다. 또 *S. mutans*균체로 면역하여 생산된 항체는 LM-7과는 강한 교차반응을 보였으나 OMZ-175와는 거의 교차반응을 일으키지 않았다. 이를 다시 GTF 및 Ag I/II를 이용하여 흡수반응을 시행한 후 다시 관찰한 응집반응결과는 Table 2에서와 같이 Ag I/II에 의하여 흡수반응 후 응집역가는 상당히 감소하였으나 GTF에 의하여 흡수반응 후에는 응집역가에 전혀 변화를 일으키지 아니 하였다.

2) *S. mutans*(Ingritt strain)균체에 의한 면역과 항-Ag I/II 및 항-GTF 항체생산.

*S. mutans*균체를 Complete Freund's Adjuvant(CFA)와 함께 투여하여 생산된 혈청을 2배 계단 희석하면서 항-GTF 및 항-Ag I/II항체를 ELISA법에 의하여 조사하였던 바 Fig. 1과 Fig. 2에서와 같이 항-GTF 및 항-Ag I/II 항체중 IgM과 IgG는 피하로 투여시 약간 검출되었으나 경구투여시는 전혀 검출되지 아니 하였으며 RA첨가는 오히려 그 생산을 억제하였다. 항-Ag I/II IgA는 피하투여시 약간 검출되었으나 경구투여시는 검출되지 아니하였고 항-GTF IgA는 피하로 투여시 전혀 검출되지 아니 하였으나 이에 RA를 첨가하면 상당한 항체의 생산을 관찰하였고 그 정도는 경구투여시의 생산량을 능가하였다.

Table 1. Agglutination titer of sera form mice immunized with *S. mutans* (Ingbritt stain)

Antigen	Group	Serum dilution (fold)								
		40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
Ingbritt (serotype c)	I	+	+	+	+	+	+	+	±	-
	II	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	III	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	IV	±	-	-	-	-	-	-	-	-
LM-7 (serotype e)	I	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	II	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OMZ-175 (serotype f)	I	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	II	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Group I: Formalin-fixed bacteria + Complete Freunds Adjuvant (CFA), s.c. injection.

Group II: Formalin-fixed bacteria + CFA + RA, s.c. injection.

Group III: Formalin-fixed bacteria, intragastric ingestion

Group IV: untreated

+ : positive, ± : weakly positive, - : negative

Table 2. Agglutination titer of immune sera form mice immunized with *S. mutans* Ingbritt stain after absorption with AgI/II and GTF

Antigen	Group	Absorbed with	Serum dilution								
			40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
Ingbritt	I	AgI/II	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	II	AgI/II	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	III	AgI/II+GTF	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	IV	AgI/II+GTF	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LM-7	I	AgI/II	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	II	AgI/II	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	III	AgI/II+GTF	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	IV	AgI/II+GTF	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Group I: Formalin-fixed bacteria + Complete Freunds Adjuvant (CFA), s.c. injection.

Group II: Formalin-fixed bacteria + CFA + RA, s.c. injection.

Group III: Formalin-fixed bacteria, intragastric ingestion

Group IV: untreated

+ : positive, ± : weakly positive, - : negative

3) GTF에 의한 면역과 항-GTF 항체생산.

GTF를 alum과 함께 투여하여 생산되는 혈청내 항-GTF 항체를 ELISA법에 의하여 조사하였던 바 Fig. 3에서와 같이 항-GTF 항체중 IgM은 피하로 투여시 상당량이 검출되었고 RA를 첨가하면 그 생산이 증가되었으며 경구로 투여시 대조군에 비하여 약간 증가를 보였으나 피하투여시의 그것에는 미

치지 못하였다. GTF-특이 IgG는 경구투여시는 전혀 검출되지 아니하였고, 피하투여시에만 현저한 증가를 보였으며, RA 첨가는 이에 영향을 미치지 못하였다. 항-GTF IgA는 피하로 투여시 전혀 검출되지 아니하였으나 이에 RA를 첨가하면 증가된 항체생산을 관찰하였고 그 정도는 경구투여시의 생산량을 능가하였다.

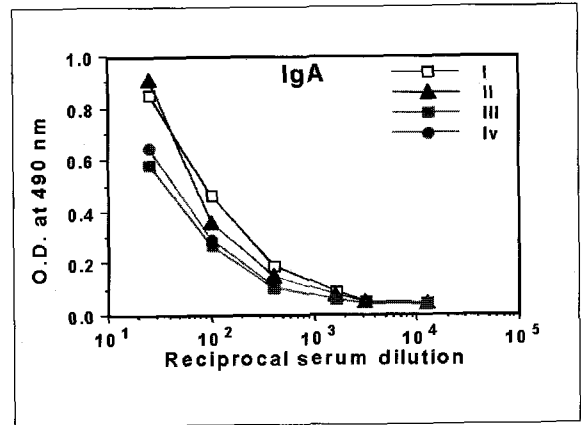
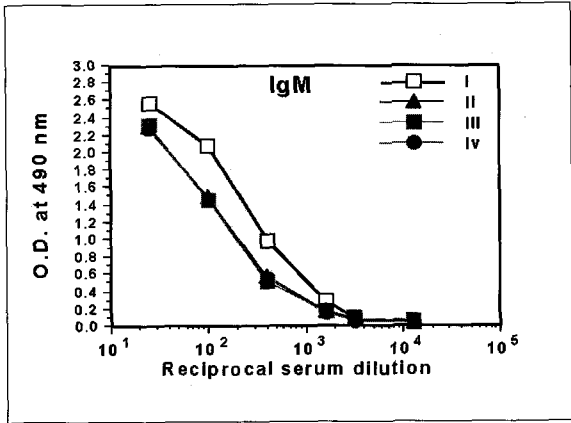


Fig. 1. Serum IgM, IgG, and IgA antibodies to Ag I/II in mice immunized with formalin-fixed *Streptococcus mutans* (Ingbritt strain). Serum antibodies were determined by ELISA assay in four different groups.
 Group I: Formalin-fixed bacteria + CFA, s.c. injection.
 Group II: Formalin-fixed bacteria + CFA+RA, s.c. injection.
 Group III: Formalin-fixed bacteria, intragastric ingestion.
 Group IV: untreated.

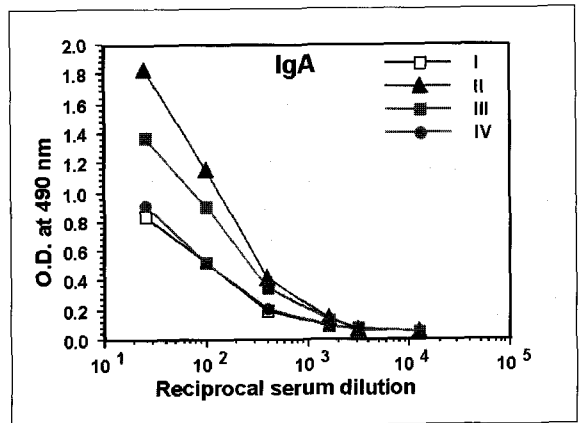
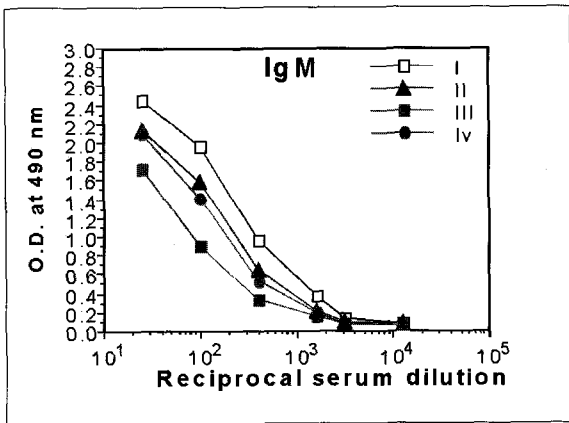
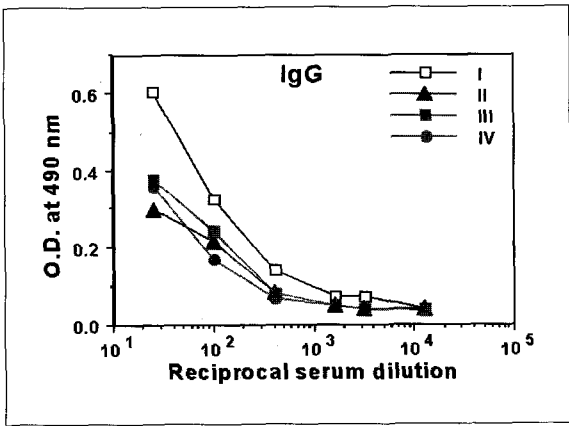
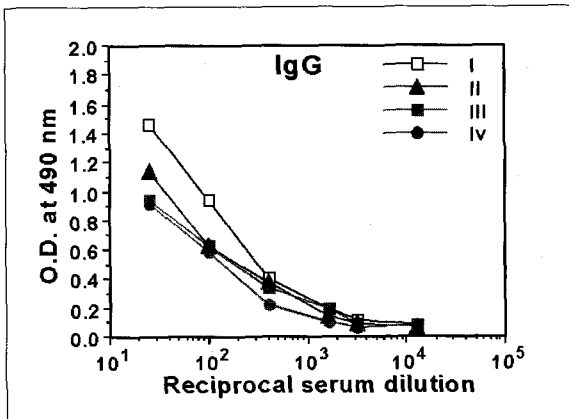


Fig. 2. Serum IgM, IgG, and IgA antibodies to GTF in mice immunized with formalin-fixed *Streptococcus mutans* (Ingbritt strain). Serum antibodies were determined by ELISA assay in four different groups, as described in Fig. 1.



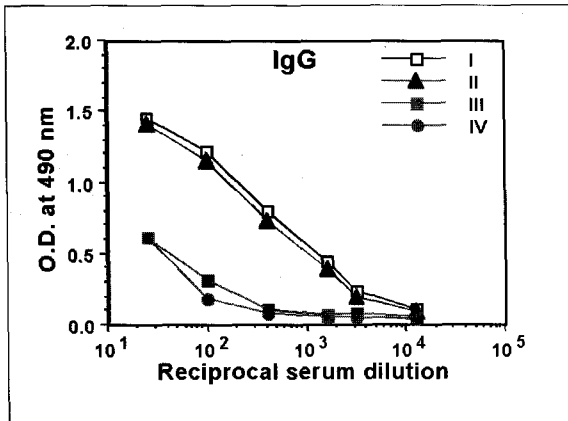
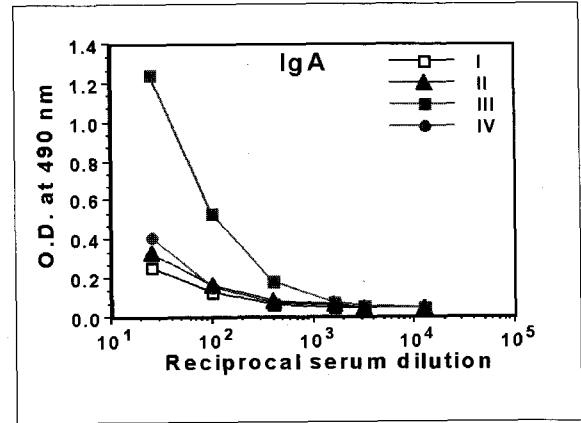
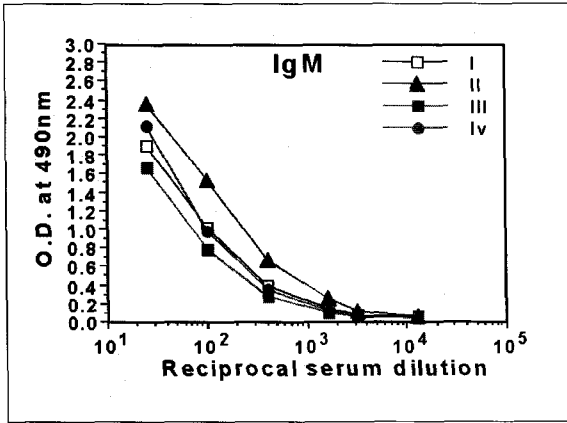


Fig. 3. Serum IgM, IgG, and IgA antibodies to GTF in mice immunized with GTF.

Serum antibodies were determined after 3rd immunization by ELISA assay in four different groups as described in Fig. 3.

- Group I: GTF + Alum, s.c. injection.
- Group II: GTF + Alum + RA, s.c. injection.
- Group III: GTF + Alum, intragastric ingestion
- Group IV: untreated

IV. 고 찰

Sterptococcus mutans (SM)는 치아 우식증을 일으키는 주 원인균으로 이 균에 대한 면역은 치아우식증의 발생을 감소시킬 수 있음이 보고되었다^{6,15,19,20}. 따라서 치아우식증을 예방할 수 있는 백신개발이 활발히 연구되고 있다^{6,13,19,20}. 일반적으로 백신의 효과는 항원의 성분과 투여방법 및 백신조성에 따라 큰 차이를 나타낼 수 있다^{3,11,12}. 항-우식면역과 관련하여 가장 많은 주목을 받고 있는 항원으로는 Ag I/II와 같은 streptococcal surface protein^{1,4,21}과 sucrose로부터 adhesive glucan을 합성하는 glucosyltransferase (GTF)가 있다^{5,20}. 최근까지 항-우식면역을 위하여는 백신투여 경로로는 많은 연구자들에 의해 주로 경구적으로 시행되었다. 그러나 경구적 투여로 면역을 야기시키기 위하여는 다량의 항원이 필요하며 이들 항원이 소화효소에 의해 용이하게 파괴되기도 하고^{18,22} 면역학적 관용을 일으키기도 한다²³. 따라서 최근에는 이를 보완하기 위하여 SM항원에 cholera toxin B subunit^{3,9}나 liposome에 결합시키거나^{13,14} muramyl dipeptide와 같은 adjuvant를 함께 사용하기도 하고 lectin을 시도하기도 하였다⁵. 반면 비경구투여의 경우는 투여방법이 용이하긴 하나 주로 생산되는 항체들이 IgM 또는 IgG이어서 IgA와 관련된 점액성 면역반응과는 상반된 방향으로 조절된다.

본 연구에서 먼저 균체를 항원으로 면역하였는데 응집반응으로 관찰한 항체역가는 비경구적으로 투여한 실험군에서 경구적

투여군보다 보다 높은 반응도를 보였는데 이는 응집반응이 주로 IgG와 IgM에 의해서 일어남을 감안할 때 경구적 투여는 비경구적 투여시보다 IgG 및 IgM의 생산이 거의 일어나지 않음을 암시하였다. 혈청형이 서로 다른 세균주간에 Ingbritt strain(serotype c)은 OMZ-175 (혈청형 f)와는 거의 교차반응이 일어나지 않으나 LM-7(serotype e)과는 상당한 교차반응이 일어남으로 보아 균체 표면항원의 일부가 유사함을 추측할 수 있었다. 전술한 실험결과를 참조하여 Dr. Smith로부터 제공받은 GTF를 각각 adjuvant의 하나인 alum과 병합하여 백신을 제조하였고 이를 경구적 및 피하주입으로 구분하였고 이에 면역조절기능이 있다고 알려진 RA를 첨가하였는데 GTF에 대한 반응은 피하투여시 RA와 병합투여하면 경구투여시보다 강한 IgA의 생산증가를 보였는데 이는 RA를 첨가한 피하투여가 경구 투여보다도 오히려 강한 IgA항체의 생산증가를 유도하여 점액성 면역의 방향으로 조절할 수 있을 가능성을 보여 주었다. 본 연구에서 다양한 항원과 성분, 투여 경로에 따른 항체의 반응은 IgA, IgM, IgG가 조금씩 다르게 반응하였으나 RA를 첨가하여 피하투여시 비교적 IgA 생산량의 증가가 모두 일정하게 높게 나타나 면역반응의 조절인자로서의 가능성을 시사해 주었다. 본 실험에서는 항원의 경구투여대신 피하투여의 경로를 사용하면서 점액성면역을 유도하기 위하여 면역조절제 RA를 사용하였다. 이는 vitamin A 결핍환자에서 Th2 면역반응의 감소를 관찰하였 Vitamin A투여는 Th2-매개 항체반응을

증강하였으며 RA는 retinoid X receptor를 통하여 일어남을 보고하였다²⁴⁾. 또 Tokuyama 등^{25,26)} RA가 B림프구에 의한 IgA의 생산을 증가시키고 IgA의 isotype switching을 유도함을 보고하였다. 따라서 RA에 의한 생체내 IgA의 생산증가는 Mosmann과 Coffman²⁷⁾이 제창한 Th1/Th2 조절반응에서 조력 T 림프구중 Th2 세포의 활성화와 밀접한 관련이 있을 것으로 보인다. 일반적으로 항원이 체내에 들어오면 항원제공세포를 통해서 조력 T 림프구가 항원을 인식하게 되며 일련의 면역반응이 일어나는데 조력 T 림프구는 다시 Th1과 Th2 세포로 나누어지며 항원성분과 주변면역조절반응에 의하여 Th1/Th2의 비율이 달라지게 되고 결과적으로 최종면역반응양상이 달라지게 된다²⁸⁻³⁰⁾. 즉 Th1 세포는 IL-2와 INF- γ 의 cytosine을 분비하여 macrophage를 activation시켜 세포성 면역방향으로 유도하며 일부항체 IgG2a의 생산을 증가시키는 반면, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10을 분비하면서 mast cell, B세포, eosinophil을 activation하여 IgE를 포함한 IgM, IgA항체를 보다 더 강하게 생산하는 것으로 알려졌다. 결론적으로 최근 치아우식증을 포함한 구강 질환에서 가장 필요로 하는 면역경로를 몇 가지 단점이 있는 경구적 경로를 피해 비경구적 요법으로 점액성 면역을 야기시킬 수 있는 가능성을 조사한 실험으로서 의미가 있다고 할 것이다. 본 연구에 이어서 확인되어야 할 연구는 치아우식 동물모델에서의 실제적으로 치아우식 발생을 어느 정도 억제할 수 있는나이다.

V. 결 론

치아우식증을 예방하기 위한 백신연구를 위하여 주원인균인 *Streptococcus mutans* 균체항원과 이 균에서 분리한 glucosyltransferase (GTF)를 항원으로 하고 이에 면역조절능이 있는 retinoic acid (RA)를 첨가하여 투여경로/백신조성이 이들 항원에 대한 면역반응에 미치는 영향을 실험하였다.

1. 균체항원(Ingbritt strain)을 Complete Freund's Adjuvant와 함께 투여하여 생산되는 혈청내 응집항체는 경구투여군에서는 거의 검출되지 아니한 반면 피하투여군에서는 1:2560의 높은 응집역가를 나타내었고 이에 RA를 첨가하면 응집역가는 오히려 감소하였다. 또 균체로 면역하여 생산된 항체는 serotype e (LM-7)와는 강한 교차반응을 보였으나 serotype f (OMZ-175)와는 거의 교차반응을 일으키지 않았다. GTF 및 Ag I/II를 이용하여 흡수반응을 시행한 후 다시 관찰한 응집반응결과는 Ag I/II에 의하여 흡수반응 후 응집역가는 상당히 감소하였으나 GTF에 의하여 흡수반응 후에는 응집역가에 전혀 변화를 일으키지 않았다.
2. 균체항원으로 면역하여 얻은 혈청내 항-GTF 및 항-Ag I/II 항체중 IgM과 IgG는 피하 투여시 약간 검출되었으나 경구 투여시는 전혀 검출되지 아니 하였으며 RA첨가는 오히려 그 생산을 억제하였다. 항-Ag I/II IgA는 피하투여시 약간 검출되었으나 경구투여시는 검출되지 아니 하였고 항-GTF IgA

는 피하로 투여시 전혀 검출되지 아니 하였으나 이에 RA를 첨가하면 상당한 항체의 생산을 관찰하였고 그 정도는 경구 투여시의 생산량을 능가하였다.

3. GTF를 alum과 함께 투여하여 생산되는 혈청내 GTF-특이 IgM은 피하로 투여시 상당량이 검출되었고 RA를 첨가하면 그 생산은 증가되었다. 경구투여시 대조군에 비하여 약간 증가를 보였으나 피하투여시의 그것에는 미치지 못하였다. GTF-특이 IgG는 경구투여시 전혀 검출되지 아니하였고, 피하투여시에만 현저한 증가를 보였다. 항원에 RA를 첨가하면 이에 영향을 미치지 못하였다. GTF-특이 IgA는 피하로 투여시 전혀 검출되지 아니하였으나 이에 RA를 첨가하면 항체 생산의 증가를 관찰하였고 그 정도는 경구투여시의 생산량을 능가하였다.

참고문헌

1. Russell RR: Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol, 114: 109-115, 1979.
2. Russell MW, Harrington DJ, Russell RR: Identity of *Streptococcus mutans* surface protein antigen III and wall-associated protein antigen A. Infect Immun, 63: 733-735, 1995.
3. Toida N, Hajishengallis G, Wu HY, et al.: Oral immunization with the saliva-binding region of *Streptococcus mutans* AgI/II genetically coupled to the cholera toxin B subunit elicits T-helper-cell responses in gut-associated lymphoid tissues. Infect Immun, 65: 909-915, 1997.
4. Forester H, Hunter N, Knox KW: Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol, 129 (Pt 9): 2779-2788, 1983.
5. Russell RR: Glycosyltransferases of *Streptococcus mutans* strain Ingbritt. Microbios, 23: 136-146, 1978.
6. Morisaki I, Michalek SM, Harmon CC, et al.: Effective immunity to dental caries: enhancement of salivary anti-*Streptococcus mutans* antibody responses with oral adjuvants. Infect Immun, 40: 577-591, 1983.
7. Gahnberg L, Smith DJ, Taubman MA, et al.: Salivary-IgA antibody to glucosyltransferase of oral microbial origin in children. Arch Oral Biol, 30: 551-556, 1985.
8. Gregory RL, Michalek SM, Filler SJ, et al.: Prevention of *Streptococcus mutans* colonization by salivary IgA antibodies. J Clin Immunol, 5: 55-62, 1985.
9. Czerkinsky C, Russell MW, Lycke N, et al.: Oral

- administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect Immun*, 57: 1072-1077, 1989.
10. Russell MW, Moldoveanu Z, White PL, et al.: Salivary, nasal, genital, and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the Cholera toxin B subunit. *Infect Immun*, 64: 1272-1283, 1996.
 11. Smith DJ, King WF, Barnes LA, et al.: Facilitated intranasal induction of mucosal and systemic immunity to mutans streptococcal glucosyltransferase peptide vaccines. *Infect Immun*, 69: 4767-4773, 2001.
 12. Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, et al.: Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. *Caries Res*, 33: 4-15, 1999.
 13. Childers NK, Zhang SS, Harokopakis E, et al.: Properties of practical oral liposome-Streptococcus mutans glucosyltransferase vaccines for effective induction of caries protection. *Oral Microbiol Immunol*, 11: 172-180, 1996.
 14. Childers NK, Tong G, Mitchell S, et al.: A controlled clinical study of the effect of nasal immunization with a Streptococcus mutans antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immune responses. *Infect Immun*, 67: 618-623, 1999.
 15. Michalek SM, McGhee JR, Mestecky J, et al.: Ingestion of Streptococcus mutans induces secretory immunoglobulin A and caries immunity. *Science*, 192: 1238-1240, 1976.
 16. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63, 1983.
 17. Rees RC: Cytokines as biological response modifiers. *J Clin Pathol*, 45: 93-98, 1992.
 18. Russell MW, Challacombe SJ, Lehner T: Specificity of antibodies induced by Streptococcus mutans during immunization against dental caries. *Immunology*, 40: 97-106, 1980.
 19. Michalek SM, McGhee JR: Effective immunity to dental caries: passive transfer to rats to antibodies to Streptococcus mutans elicits protection. *Infect Immun*, 17: 644-650, 1977.
 20. Smith DJ: Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13: 335-349, 2002.
 21. Koga T, Yamashita Y, Nakano Y, et al.: Surface proteins of Streptococcus mutans. *Dev Biol Stand*, 85: 363-369, 1995.
 22. McGhee JR, Mestecky J, Arnold RR, et al.: Induction of secretory antibodies in humans following ingestion of Streptococcus mutans. *Adv Exp Med Biol*, 107: 177-184, 1978.
 23. Challacombe SJ, Tomasi TB: Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J Exp Med*, 152: 1459-1472, 1980.
 24. Stephensen CB, Rasooly R, Jiang X, et al.: Vitamin A enhances in vitro Th2 development via retinoid X receptor pathway. *J Immunol*, 168: 4495-4503, 2002.
 25. Tokuyama H, Tokuyama Y: The regulatory effects of all-trans-retinoic acid on isotype switching: retinoic acid induces IgA switch rearrangement in cooperation with IL-5 and inhibits IgG1 switching. *Cell Immunol*, 192: 41-47, 1999.
 26. Tokuyama H, Tokuyama Y: Endogenous cytokine expression profiles in retinoic acid-induced IgA production by LPS-stimulated murine splenocytes. *Cell Immunol*, 166: 247-253, 1995.
 27. Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7: 145-173, 1989.
 28. Coffman RL, Mocchi S, Garra A: The stability and reversibility of Th1 and Th2 populations. *Curr Top Microbiol Immunol*, 238: 1-12, 1999.
 29. Dechene L: TH1/TH2 immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 110: 539-540, 2002.
 30. Koubek K, Spicka I, Filipec M: [The Th1/Th2 paradigm. The role of the Th1 and Th2 lymphocyte subpopulations in the regulation of immune processes]. *Cas Lek Cesk*, 138: 681-685, 1999.

Reprint request to:

Hyun-Chul Lee

Department of Microbiology, Chonnam National University Medical School
5 Hakdong, Donggu, Gwangju 501-190, Korea,
E-mail: hclee@chonnam.ac.kr

Abstract

ANTIBODY PRODUCTION BY PARENTERAL ADMINISTRATION OF
STREPTOCOCCUS MUTANS AND GLUCOSYLTRANSFERASE IN MICE

Kyu-Ho Yang, Mee Chung, Jin Chung³, Mee Young Chang¹, Jong Suk Oh¹, Hee Sam Nah¹,
In Chol Kang² and Hyun Chul Lee¹

*Department of Pediatric Dentistry, Dental Science Research Institute and Oral Microbiology²,
College of Dentistry and Department of Microbiology¹, Medical School, Chonnam National University,
Department of Oral Microbiology³, College of Dentistry, Busan National University*

Streptococcus mutans is known to be a major causative organism of human dental caries. The development of a vaccine against dental caries involves identification of appropriate antigens of mutans streptococci against which protective immune responses can be mounted, and the selection of a method of immunization that will generate sustained levels of protective antibodies. Antigens receiving most attention include streptococcal surface proteins that are involved in attachment to tooth surfaces and glucosyltransferases (GTF) that synthesize adhesive glucans from sucrose. The induction of antibody responses to orally administered antigens is often difficult due to digestive destruction of antigens and immune tolerance. Here we report the induction of antibody responses to an anti-caries vaccine containing retinoic acid (RA).

Subcutaneous immunization with formalin-fixed bacteria or GTF supplemented with RA induced higher serum IgM and IgA responses to GTF compared to oral administration. Antisera induced by Ingbritt strain showed partial cross-reaction with LM-7 strain, but not with OMZ175. These results suggest that subcutaneous immunization with GTF combined with an immunomodulator, RA, may be applied to anti-caries vaccine.

Key words : *Streptococcus mutans*, Glucosyltransferase (GTF), Retinoic acid, IgA