

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※ **發展對抗綠膿桿菌感染之免疫療法** ※
※ Development of Immunotherapy against ※
※ *Pseudomonas aeruginosa* Infection ※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

1

一、中文摘要：

綠膿桿菌為革蘭氏陰性桿菌，在自然界中分佈很廣，是目前院內感染之主要致病菌。但此菌極易產生抗藥性引起治療上之困難，故發展免疫治療法來預防、治療綠膿桿菌感染，以取代傳統的抗生素療法，是近年來對抗綠膿桿菌感染主要研究的方向。而由臨床統計資料顯示綠膿桿菌最常感染燒傷病人，是燒傷病人治療時最大的困擾。本計劃以燒傷小老鼠的動物模式，探討如何依據已知之綠膿桿菌致病機制，發展出更安全、有效的免疫治療法。我們模擬臨床治療時之可行方法，直接在老鼠皮膚燒傷處先皮下注射家兔抗綠膿桿菌各種主要致病因子的抗血清，同時亦在健康皮膚處注射多價的抗綠膿桿菌融合疫苗，評估此種局部被動免疫療法及接種融合新疫苗在預防、治療綠膿桿菌感染的效果。

已知綠膿桿菌會分泌多種有毒物質，其中以綠膿桿菌外毒素 A (PE)之毒性最強，而其所分泌會破壞組織的水解酵素中，則以彈性蛋白酵素(Elastase) 的活性最強。本計劃亦利用遺傳工程技術，大量純化無毒性之綠膿桿菌 PE 類毒素(toxoid)、彈性蛋白酵素及在綠膿桿菌 17 種不同血清型的細胞壁上抗原性均相同之綠膿桿菌外膜蛋白 I 和 F，再將各種純化蛋白免疫家兔，以製備有中和毒性作用、或加強巨噬細胞吞噬作用之抗血清，我們會評估這三類抗血清對燒傷老鼠進行局部被動免疫(passive local immunotherapy)的治療效果。同時我們亦以遺傳工程技術，將外膜蛋白 I、F 和彈性蛋白酵素的基因依序接於已刪除毒性區域 III 之綠膿桿菌外毒素 A (PE Δ III)之羧基端，以製造綠膿桿菌融合新疫苗(recombinant hybrid vaccine)。結合多種可刺激宿主產生有保護作用之抗原，來製造融合疫苗是目前細菌疫苗發展的新趨勢。本計劃之完成除可提供燒傷病人最佳之治療方法，亦可進一步瞭解綠膿桿菌所分泌之各種毒素在其致病機制中所扮演之角色，尤其重要的是本計劃的完成已證實此融合新疫苗能刺激患者產生全方位對抗致病菌之免疫能力，故本計劃兼具基礎及臨床應用之雙重意義。

關鍵詞：綠膿桿菌、燒傷老鼠、局部被動免疫療法、融合疫苗。

Abstract：

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen which has become a major cause of nosocomial infections. Therapy for *P. aeruginosa* infection is hindered by its well-known antibiotic resistance. Thus, a potential therapeutic alternative to antibiotic drugs is the development of immunotherapy through either passive or active immunization. Since the leading cause of morbidity and mortality in severe burn wound patients is infection of *P. aeruginosa*, we have used a mouse burn wound infection model to evaluate the efficacy of passive local immunotherapy and active immunization by a new hybrid vaccine against *P. aeruginosa*.

The pathogenesis of *P. aeruginosa* is multifactorial; this bacteria is invasive and toxigenic after infection. The most potent cytotoxic agents produced by *P. aeruginosa* is *Pseudomonas* exotoxin A (PE) and hydrolytic enzyme elastase. In this study, we have used genetic engineering technique to purify nontoxic PE, elastase and the outer membrane proteins I and F (OprI and OprF) of *P. aeruginosa*. Rabbit antiserum against

PE, elastase, OprI or OprF has been administrated directly to the burned wounds inoculated with lethal doses of *P. aeruginosa*. The survival rate and quantification of *P. aeruginosa* in local burned skin and systemic liver tissue have been measured. In addition, a more potent vaccine containing the receptor binding, membrane translocation domains of PE, elastase and the outer membrane proteins I and F of *P. aeruginosa* have been constructed. We have demonstrated that this chimeric protein may induce antibodies not only neutralizing the toxicity of PE and elastase but also preventing the colonization of *P. aeruginosa* by fixing the complement and promoting the opsonophagocytic activity of macrophages. Therefore, this study has supplied the burned patients an effective treatment, and also gave us more evidences to understand the pathogenesis of *P. aeruginosa* infection. Especially, it is a good example to show us the potential of a new hybrid vaccine against infectious agent.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, burned mice, passive local immunotherapy, recombinant hybrid vaccine.

二、緣由與目的：

綠膿桿菌為革蘭氏陰性桿菌，在自然界中分佈很廣，是目前院內感染之主要致病菌⁽¹⁾。臨床治療時，綠膿桿菌極易產生抗藥性，引起治療上之困難⁽²⁾，一旦此菌侵入患者組織或血液後，常出現急性肺炎或菌毒血症(bacteremia)⁽³⁾。已知綠膿桿菌在繁殖過程中，會產生多種和致病性有關之毒素和水解酵素，我們針對綠膿桿菌所分泌毒性最強之綠膿桿菌外毒素 A (*Pseudomonas* exotoxin A; PE)，以遺傳工程技術刪除此毒素羧基端三十八個胺基酸，使 PE 之毒性完全喪失，但仍保有大部份抗原性，使其成為無毒性之 PE 類毒素(toxoid)。動物實驗證明此類毒素可有效刺激動物產生中和 PE 毒性之抗體⁽⁴⁾，但無法阻止此菌在病人體內繁殖，破壞組織細胞。所以我們進一步將二種綠膿桿菌外膜蛋白 I、F 和無毒性之 PE 結合而製造綠膿桿菌新疫苗 PEIF，此融合蛋白不但可刺激免疫後之動物產生中和 PE 毒性的抗體且可產生具調理作用之抗體，會和侵入之多種血清型綠膿桿菌細胞表面結合，固定補體，破壞綠膿桿菌，並可加強巨噬細胞之吞噬作用，多管齊下，達到最好之免疫效果⁽⁵⁾。外膜蛋白 I、F 是綠膿桿菌細胞表面的主要抗原，和脂多醣(lipopolysaccharide)比較，外膜蛋白 I、F 不但無毒性且在各不同型綠膿桿菌的細胞壁上抗原變異小，很適合取代脂多醣刺激宿主產生可和綠膿桿菌細胞表面結合的抗體⁽⁶⁾。我們曾以燒傷老鼠的動物模式來測試此新疫苗的有效性，實驗結果雖證實可增加燒傷老鼠的存活率。但在實驗設計上，我們先以綠膿桿菌新疫苗 PEIF 免疫老鼠，六星期後當老鼠體內產生抗體後，再進行燒傷老鼠的實驗，這和臨床實際發生燒傷感染的情況有別。雖然我們證實了 PEIF 確可刺激宿主產生有保護作用的抗體，但因為綠膿桿菌對免疫力正常的健康人是沒有致病性的，我們不需要將綠膿桿菌疫苗接種列入常規的疫苗接種項目中，也就是說燒傷病患不會在事前就接種過綠膿桿菌疫苗，待燒傷後再進行主動免疫接種疫苗時，往往緩不濟急。

靜脈注射免疫球蛋白(intravenous immunoglobulin, IVIG)已被用來治療、預防多種傳染病^(7,8)，但 IVIG 須使用同種動物免疫球蛋白，否則易產生血清病(serum sickness)的副作用，同時燒傷處的組織壞死，血管堵塞，不但阻礙抗生素的擴散，且由靜脈注射的免疫球蛋白往往也無法有效到達細菌感染部位⁽⁹⁾。近年來有人提倡使用局部被動免疫療法(Passive local immunotherapy) 來克服免疫球蛋白擴散不良的限制，使抗體可直接、快速在感染部位發揮殺菌作用^(10,11)。而且因為是局部在皮膚傷口處使用抗血清，和 IVIG 相比，較不易產生急性過敏反應。本計畫的第一部份即是依據已知綠膿桿菌主要致病因子，利用遺傳工程技術，大量純化無毒性之綠膿桿菌 PE 類毒素(toxoid)、彈性蛋白酶及抗原性穩定之綠膿桿菌外膜蛋白 I 和 F，再將各種

純化蛋白免疫家兔，以製備有中和毒性作用、固定補體或加強巨噬細胞噬菌作用之抗血清，我們將先評估這三類抗血清對燒傷老鼠進行局部被動免疫的治療效果。

本計畫第二部份的目標則是繼續發展有效的綠膿桿菌新疫苗，依據已知之綠膿桿菌致病機制，以期製備出有全方位保護效果之綠膿桿菌融合新疫苗。我們已將外膜蛋白 I、F 的基因依序接於已刪除毒性區域 III 之綠膿桿菌外毒素 A (PE Δ III) 之羧基端⁽⁵⁾，PEIF 具有 815 個氨基酸，分子量為 90KD，而彈性蛋白酶分子的分子量為 37KD。我們曾嘗試將彈性蛋白酶的基因再依序接於 PEIF 之羧基端，此 PEIFL 的質體雖構築成功，但因分子量太大，在 *E.coli* 無法大量表現。本計畫重新檢討如何構築既保有各致病因子重要之 B cell epitopes，又能成功地在 *E.coli* 中大量表現的融合蛋白。我們仍將已刪除毒性區域 III 之綠膿桿菌外毒素 A (PE Δ III) 的基因置於融合蛋白的 N 端，因為綠膿桿菌外毒素 A 的區域 Ia 為受體結合區，而區域 II 則為移位區，二者不但可有效刺激宿主產生可中和綠膿桿菌外毒素 A 的抗体，還可以更有效率的將此融合蛋白帶入細胞。而外膜蛋白 I 是綠膿桿菌細胞壁上之脂蛋白，蛋白部份只有 64 個氨基酸，有報告以抗外膜蛋白 I 的單源抗体找到兩個主要的 B cell epitopes，一位於 N 端，但另一則只認全長的外膜蛋白 I⁽¹²⁾，所以我們亦保留全長的外膜蛋白 I 將其接於 PE(Δ III) 的 C 端。而以單源抗体找到的外膜蛋白 F 之 B cell epitopes 則都位於此蛋白的 C 端^(13,14)，因此我們選用外膜蛋白 F 之氨基酸 190 至 350 片段。最後考量彈性蛋白酶的 active site 及 neutralizing epitopes 的位置^(15,16)，我們選用彈性蛋白酶的片段則由氨基酸 220 至 420。此重新構築的綠膿桿菌新疫苗 PEIFL 包含約 830 個氨基酸，分子量約為 91KD。

三、結果與討論：

1. 綠膿桿菌主要致病因子 PE 類毒素(toxoid)、彈性蛋白酶及外膜蛋白 I 和 F 融合蛋白之純化： 為了方便融合蛋白的純化，本計劃選用帶 His-tag 的表現載體 pET-15b 系列來表現構築的融合蛋白。經 IPTG 刺激後這些融合蛋白一般均會在大腸桿菌 *E. coli* strain BL21(DE3) 中大量產生，形成不可溶的包涵體(inclusion bodies)，而且在其胺基端均帶有 6 個組胺酸，所以可先用超音波震盪法將大腸桿菌打破，再以 6M 尿素溶解包涵體，接著利用 Novagen 公司的 Ni⁺²-charged His-Bind 層柱來純化帶有 His-Tag 的融合蛋白，最後再用透析法去除尿素，以 Amicon 公司的過濾膜來濃縮純化蛋白質。被成功送入載體 pET-15b 中⁽²⁾。而彈性蛋白酶及外膜蛋白 I 和 F 之基因則是抽取綠膿桿菌標準菌株 PAO1(ATCC 15692) 的染色體 DNA(genomic DNA) 後，以 PCR 的方法來增殖。總之，表現這三種融合蛋白的質體已構築完成，而純化該蛋白質的條件亦已設立。
2. 將各種純化蛋白免疫家兔製備抗血清並以酵素免疫吸附作用(ELISA) 來決定免疫血清中各種抗體的效價：

我們將融合蛋白與 Freund's complete adjuvant 充分混合，皮下接種在家兔背部六處不同位置，每組二隻，每隻接種 200 μ g 純化蛋白。在第 21 和 35 天再分別追加注射 300 μ g 和 400 μ g/rabbit 與 Freund's incomplete adjuvant 充分混合之融合蛋白。免疫後家兔分別在第 42、60 天採血，分離血清並純化免疫球蛋白，並以酵素免疫吸附作用(ELISA)測定抗體效價。

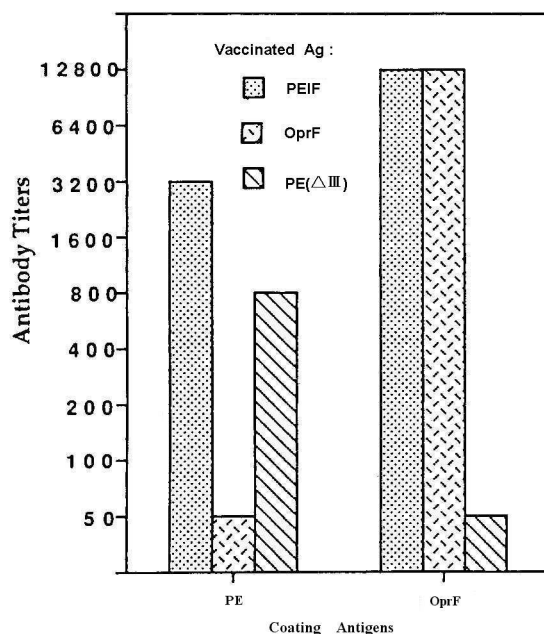


Fig.1A 抗體對純化之PE和OprF效價，by ELISA

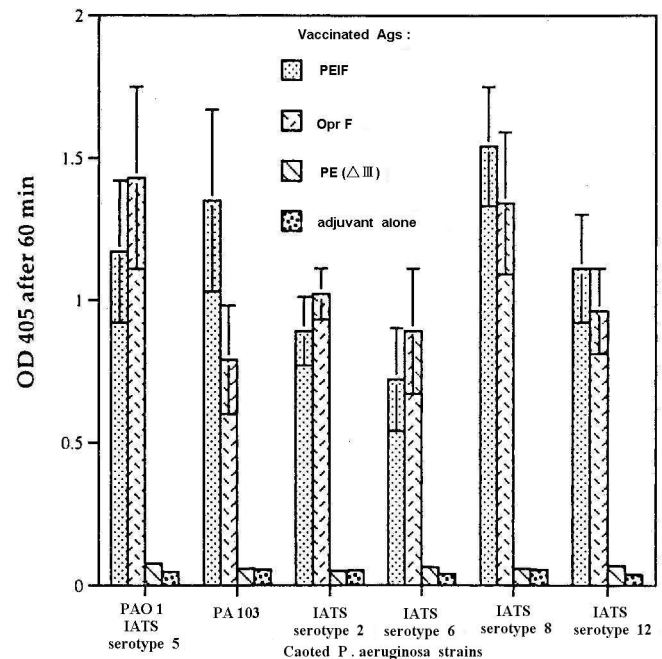


Fig.1B 抗體對 P.aeruginosa 六不同免疫型菌株之OD405

3. 燒傷老鼠的動物模式：

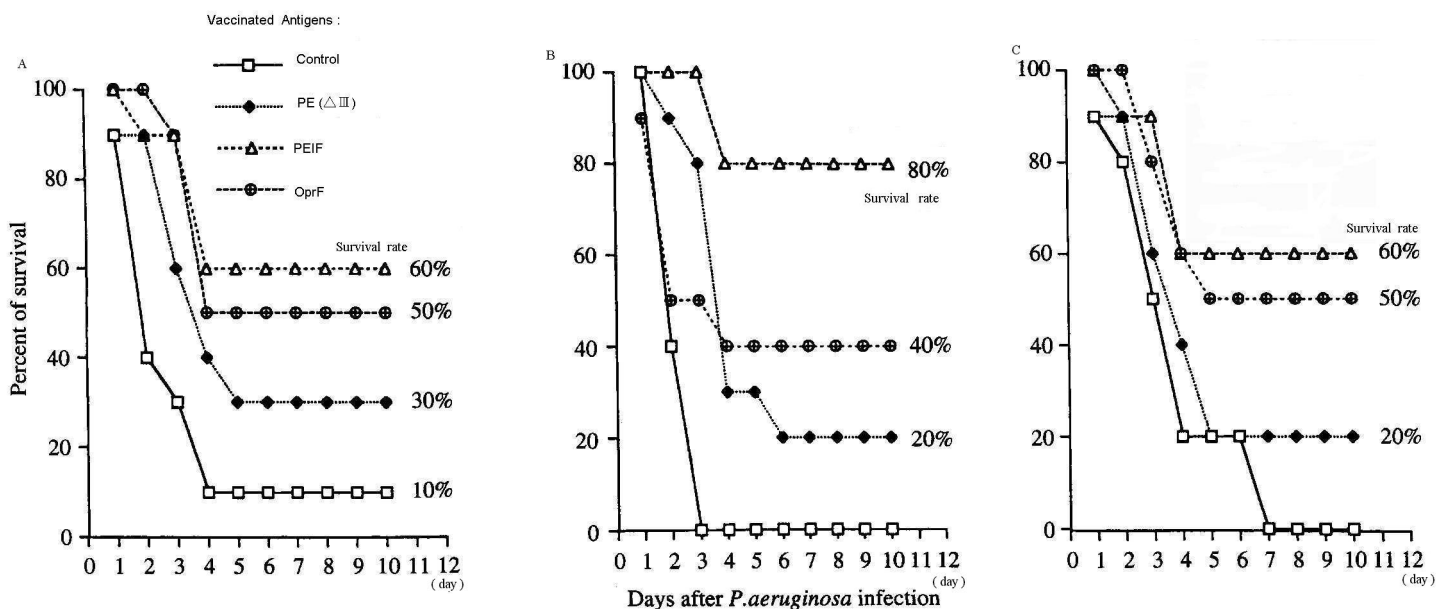
本實驗是參考 Holder 所用的方法。各組 BALB/c 小白鼠先注射 sodium pentobarbitol (0.71 μ g/g)將老鼠麻醉，剃掉老鼠背部的毛。將一塊防火隔熱的 Teflon 中間開一長方形空窗(35 x 25 mm)，緊貼於剃掉毛的老鼠背上，滴 0.5ml 95%酒精後，點火燃燒空窗下的老鼠皮膚，正確計時 15 秒，此時該老鼠約有 30%的皮膚被燒傷。燒傷後即刻腹腔注射 0.5ml 生理食鹽水，補充水份。實驗進行前，先計算各種綠膿桿菌菌株，對燒傷小白鼠的 LD₅₀。將小白鼠燒傷後，皮下接種 0.2 ml 2 倍 LD₅₀ 的各綠膿桿菌菌株於燒傷部位，觀察這些老鼠的存活率，每天上、下午各記錄一次，持續觀察 10 天；未接種綠膿桿菌的燒傷老鼠應百分之百存活。

4. 局部被動免疫療法效果之評估：

每組燒傷老鼠皮下接種 LD₁₀₀ 的各綠膿桿菌菌株後三小時，於燒傷部位皮下注射 0.2 ml, 5mg 各種抗綠膿桿菌主要致病因子之免疫球蛋白，每天早晚各注射一次，連續治療三天，記錄這些老鼠的存活率，持續觀察 10 天。本實驗擬分為五大組，除對照組注射未免疫家兔免疫球蛋白，其餘四組分別注射抗 PE 類毒素(toxoid)、彈性蛋白酶、外膜蛋白 IF 融合蛋白及同時注射前述三種免疫球蛋白。而每大組 15 隻 BALB/c

小白鼠又分為三小組，分別注射前述 3 株不同的綠膿桿菌。

本實驗除在 10 天內觀察、記錄各組燒傷老鼠的存活率，並再用 25 隻 BALB/c 小白鼠，分為五大組，燒傷後只感染綠膿桿菌標準菌株 PAO1，如前述用各種免疫球蛋白進行局部被動免疫治療三天後，犧牲老鼠，取其肝臟及燒傷感染處皮膚檢體，稱重後以 0.2 ml 無菌生理食鹽水磨碎(homogenized) 檢體，序列稀釋後塗於綠膿桿菌選擇性培養基 (Centrimide Agar plate)上，定量每克檢體中有多少 CFU (colony forming unit)。此結果可讓我們評估各種免疫球蛋白殺菌和抑制綠膿桿菌由局部傷口蔓延體內的能力。



四、計畫成果自評：

本計畫是利用遺傳工程技術合成包含有 *pseudomonas* exotoxin 片段、elastase、外膜蛋白 I and F 之 Chimeric 疫苗，本計畫進一步證明針對各種病原菌之致病機制，設計製造有效的混合疫苗，此為目前無論研發病毒或細菌疫苗發展的新趨勢。經由 Medline search 後，目前國內外尚無這種四合一的綠膿桿菌新疫苗，故正將實驗結果整理欲申請專利中。

五、參考文獻：

1. Bo dey GP, Bolivar R, Fainstein V and Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. 1983. Rev. Infect.Dis. 5: 279-313.
2. Hancock, REW. Intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. 1986. J. Antimicrob. Chemother. 18: 653-656.
3. Cryz, S.J. Jr. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* Infections. P.317-351. In R. Germanier (ed.) Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
4. Chen TY, Lin CP, Loa CC, Chen TL, Shang HF, Hwang Jaulang and Hui CF. 1999. A Nontoxic *Pseudomonas* Exotoxin A Induces Active Immunity and Passive Protective Antibody against *Pseudomonas* Exotoxin A Intoxication. J. Biomed. Sci. 1999; 6:357-363.
5. Chen TY, Shang HF, Chen TL, Lin CP, and Hwang Jaulang. 1999. Recombinant Protein

- Composed of *Pseudomonas* Exotoxin A, Outer Membrane Protein I and F as Vaccine against *P.aeruginosa* Infection. Applied Microbiology and Biotechnology (in press)
6. von Specht B. Knapp B. Hungerer K. Lucking C. Schmitt A. Domdey H. 1996. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccine candidates. Journal of Biotechnology. 44(1-3):145-53.
 7. Hammarstrom L, Smith CIE. 1990. The use of intravenous IgG as prophylaxis and for treatment of infections. Infect 18:314-24.
 8. Herrod HG. 1994. Use of intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy in adults. Allergy Proc. 15:309-12.
 9. Duhem C, Dicato MA, Ries F. 1994. Side-effects of intravenous immune globulins. Clin Exp Immunol 97(Suppl.1): 79-83.
 10. Ramisse F, Binder P, Szatanik M, Alonso J-M. 1996. Passive and active immunotherapy for experimental pneumococcal pneumonia by polyvalent human immunoglobulin or F(ab')₂ fragments administered intranasally. J Infect Dis 173: 1123-8.
 11. Barekzi NA, Poelstra KA, Felts AG, Rojas IA, Slunt JB, Grainger DW. 1998. Efficacy of locally delivered polyclonal immunoglobulin against *Pseudomonas aeruginosa* peritonitis in a murine model. Antimicrob Agents Chemotherap 82: 924-9
 12. von Specht B.U., Domedy H, Schodel F, Blum B., Lucking C, Knapp B, Muth G, Hungerer K.D., Broker M. 1994. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccine candidates. Behr.Inst.Mitt.95: 85-96.
 13. von Specht B.U., Knapp B., Muth G., Broker M., Hungerer K.D., Diehl K. D., Massarrat K., Seemann A. Domedy H. 1995. Protection of immunocompromised mice against lethal infection with *Pseudomonas aeruginosa* by active or passive immunization with recombinant *P. aeruginosa* outer membrane F and outer membrane protein I fusion proteins. Infect. Immun. 63: 1855-62
 14. Knapp B. Hundt E. Lenz U. Hungerer KD. Gabelsberger J. Domdey H. Mansouri E. Li Y. von Specht BU. 1999. A recombinant hybrid outer membrane protein for vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 17(13-14):1663-6.
 15. McIver K., Kessler E., Ohman D.E. 1991. Substitution of active-site His-223 in *Pseudomonas aeruginosa* elastase and expression of the mutated lasB alleles in *E.coli* show evidence for autoproteolytic processing of proelastase. J. Bact. 173(24): 7781-9.
 16. Kooi C., Hodges R.S., Sokol P.A. 1997. Identification of neutralizing epitopes on *Pseudomonas aeruginosa* elastase and effects of cross-reactions on other thermolysin-like proteases. Infect. Immun. 65(2): 472-7.
 17. Cryz SJ, Furer E, Cross AS, Wegmann A, Germanier R, Sadorr J. 1987. Safety and immunogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide toxin A conjugate vaccine in humans. J. Clinical Investigation 80: 51-6.
 18. Pier GB., desJardin D., Grout M et al. 1994. Human immune response to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate) vaccine. Infect. Immun. 62: 3972-9.
 19. Jang IJ. Kim IS. Park WJ. Yoo KS. Yim DS. Kim HK. Shin SG. Chang WH. Lee NG. Jung SB. Ahn DH. Cho YJ. Ahn BY. Lee Y. Kim YG. Nam SW. Kim HS. 1999. Human immune response to a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine. Vaccine. 17(2):158-68.