

쌀 항원의 면역학적 특성과 보리, 밀가루 및 메밀 항원과의 교차 반응에 관한 면역학적 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실

이기영 · 이수영 · 정병주 · 김규언 · 김동수

서 론

우리 주위에는 헤아릴 수 없을 정도로 많은 종류의 항원이 존재하고 있는데, 나라에 따라서 알레르기 질환을 흔히 유발시키는 식품 항원이 차이가 있을 수 있다. 이는 각 민족간에 존재할 수 있는 유전적인 요소의 차이 뿐 아니라, 식습관의 차이에 따라서 흔히 접촉할 수 있는 식품 항원이 각각 다르기 때문이다¹⁾.

쌀 알레르기는 서양인에서는 극히 드물며 소아에서 이에 대한 보고는 쌀에 의한 위장관증²⁾, Quincke's edema³⁾와 보체가 감소되었던 쌀 알레르기⁴⁾ 등 극소수의 증례보고와 성인 식품알레르기 환자에서 제거식의 효과를 연구한 논문⁵⁾에서 보고되었을 뿐이다. 그러나 서양인이 주식으로 하고 있는 밀은 알레르기 질환을 비교적 잘 유발시킨다^{1,6)}. 서양인에서 쌀 알레르기가 거의 없다고 보고된 것은 쌀의 항원성이 다른 식품항원에 바해서 낮거나, 혹은 쌀이 흔히 섭취되는 식품이 아니므로 그 접촉빈도가 낮았기 때문으로 추정할 수 있다. 최근

일본에서 잘 낫지 않는 아토피성 피부염 환자들을 대상으로 RAST를 실시하여 본 결과, 상당 수의 환자에서 쌀 항원에 양성반응이 나오는 것을 관찰할 수 있었는데^{7,8)}, 이는 쌀이 아토피성 피부염의 원인이 될 수 있음을 시사해 주고 있다.

식품알레르기의 진단은 원인이 되는 식품을 금식시킨 후 증상이 호전되면 유발시험을 실시하는 것이 가장 좋은 방법이다^{1,5)}. 그런데 쌀과 같은 주식인 알레르기 질환의 원인이 되는 경우에는 쌀을 대신해서 주식으로 섭취할 수 있는 대체식이 꼭 필요한데, 이 대체식은 쌀과 교차반응이 없어야 할 뿐 아니라 영양분이 충분해야 하며 손쉽게 구할 수 있고 맛이 좋아서 환자가 먹기 쉬워야 한다⁹⁾. 보리, 밀 및 메밀은 우리나라에서 쉽게 구할 수 있는 곡물이며, 환자가 섭취하기에 비교적 좋은 식품이기 때문에 쌀 알레르기 환자에서 대체식으로 우선 먼저 생각할 수 있다. 이에 저자들은 쌀, 보리, 밀 및 메밀로부터 항원을 추출하여 이들 사이의 교차반응을 알아보아, 이러한 곡물에 알레르기 반응을 보이는 환자에서 진단을 위한 식품제거시험시 안전한 기본식품을 발견하고 치료시의 대체식 개발을 목적으로 본 연구를 시행하였다.

*본 연구는 1992년도 연세대학교 의과대학 교수 연구비의 보조로 이루어졌음.

방 법

1. 항원의 추출

쌀, 보리, 밀 및 메밀을 이용하여 밥을 지은 후 각각 100g 씩을 얻어 1:10w/v의 phosphate buffered saline(PBS, NaCl 6.8g, Na_2HPO_4 1.48g, KH_2PO_4 0.43g/ H_2O 1 L, pH 7.5)과 함께 warring blender로 잘 섞어서 4°C에서 3일간 보관하였다. 각각을 18,000g로 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었으며 이를 1회 반복하였다. 이들 상층액을 여과공의 크기가 6,000~8,000 daltons인 투석막으로 증류수에 3일간 투석하였고, 이를 다시 -70°C에 냉동하여 냉동건조하였다. 이렇게 제조된 항원으로 쌀 620ug/ml, 보리 468ug/ml, 밀 631ug/ml, 메밀 620ug/ml 농도의 stock solution을 만들어 실험에 이용하였다.

2. 항 체

상기의 방법으로 제조된 각각의 항원 1ml씩을 동량의 Complete Freund's adjuvant로 증축하여 4마리의 Newzealand white rabbit에 주 1회씩 6주간 피하주사하였다. 6주후 토끼의 혈관으로부터 혈청을 얻어 각각의 항원에 대한 항체가 형성되었음을 면역효소법(ELISA)과 double diffusion gel precipitation(DDGP)을 이용하여 확인한 후 토끼를 희생시켜 혈청을 얻어 실험에 이용하였다.

3. Sodium dodesylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

4%의 stacking gel과 12%의 separating gel을 이용하여 시행하였다. 각각의 항원을 35ug/lane씩 시행하였고 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue가 함유된 0.06M/L, Tris HCl(pH 6.8)에 녹여 34mA로 5시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동을 끝낸 gel은 0.1% silver nitrate로 염색하여 항원을 분석하였는데 이때 분자량은 저 분자량의 표준 단백질(Bio Rad. Lab. Richmond, CA)에 의거하여 산출하였다.

4. 면역효소법(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용한 항원-항체 반응억제 시험(ELISA inhibition test)

각각의 항원과 항체의 최적 반응 농도를 알아보기

위하여 점차적으로 농도를 달리하여 ELISA를 시행하였다. 쌀의 경우는 항원은 6.2ug/well부터 0.02ug/well, 항체는 1:100부터 1:1,600v/v의 농도로 시행하였고, 보리의 경우는 각각 $4.7 \sim 0.02 \times 10^{-2}$ ug/well과 1:1,000~1:16,000v/v의 농도로, 밀의 경우는 각각 $14 \sim 0.06 \times 10^{-2}$ ug/well과 1:2,000~1:32,000v/v의 농도로, 메밀의 경우는 각각 $3.1 \sim 0.015 \times 10^{-2}$ ug/well과 1:2,000~32,000v/v의 농도로 시행하였다. 각각의 농도의 항원을 96well EIA plate (Costar)에 넣은 후 37°C에서 16시간 보관한 후 1%의 bovine serum albumin(BSA), PBS-Tween 20 (PBS-T)으로 1시간 처리하여 불필요한 단백질 결합을 차단시킨 다음 세척하였다. 여기에 각각의 농도의 항체를 100ul/well 씩 첨가하여 1시간 반응시킨 후 phosphatase가 부착된 anti-rabbit IgG 항체 (Sigma Co., St. Louis Mo.)를 1:1,000 희석하여 반응시킨 다음 substrate(p-nitrophenyl phosphate disodium, Sigma Co.)를 첨가하여 ELISA reader를 이용하여 410nm에서 흡광도(Optic density, 이하 O.D.)를 측정하였다.

ELISA 결과 각각의 항원과 항체의 반응이 흡광도 1.5~2.0 사이의 적절한 반응을 보인 경우를 택하여 ELISA inhibition test를 시행하였으며, 억제제(Inhibitor)로는 쌀의 ELISA 결과 최적의 반응을 보인 농도인 6.2ug/well의 농도를 stock solution으로 사용하여 1~1:256 농도까지 2배씩 희석시켜 사용하였으며 4종의 억제제는 모두 동량 사용하였다. ELISA inhibition 시험 과정에서 혈청을 각각의 억제제와 실온에서 2시간 미리 반응시킨 후 사용하였고, 그 이외의 과정은 상기와 동일하였으며 얻어진 흡광도로 다음의 공식에 의하여 억제정도를 구하였다. 교차반응의 강약 정도의 각각 동일 항원에 의한 억제 정도와 비교하여 상대적으로 평가하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Uninhibited O.D.} - \text{Inhibited O.D.}}{\text{Uninhibited O.D.}} \times 100$$

결 과

1. SDS-PAGE

쌀, 보리, 밀, 메밀로 밥을 지어, 이로부터 제조한 항원을 이용하여 전기영동을 시행한 결과는 Fig. 1과 같았다. 쌀의 경우는 11개(97.4, 66.2, 58, 45, 29, 25, 21.5, 20.5, 18, 17, 14Kd)의 단백띠를 관찰할 수 있었는데, 이중 분자량 66.2 kd의 단백띠가 강하게 나타났고 그이외의 단백띠는 매우 약하였다(lane B). 보리의 경우도 11개 이상의 단백띠가 관찰되었는데 이중 66.2, 53, 50.5, 45 kd의 단백띠가 강하게 나타났고, 그이외의 단백띠도 쌀에 비하여 비교적 강하였다(lane C). 밀의 경우는 15개 이상의 단백띠를 관찰할 수 있었는데 대부분의 단백띠들이 강하게 관찰 되었고 쌀이나 보리, 메밀에서는 소량 혹은 관찰되지 않은 58, 48.5, 41.5, 40, 37, 34, 25, 22.5, 16.6kd의 단백띠도 강하게 관찰되었다(lane D). 메밀의 경우는 적어도 20개 이상의 단백띠를 관찰할 수 있었는데 이중 62, 36, 25, 16.5, 13 kd의 단백띠가 비교적 강하게 나타났고 기타의 곡류에 비하여 매우 많은 종류의 단백이 분리되었다(lane

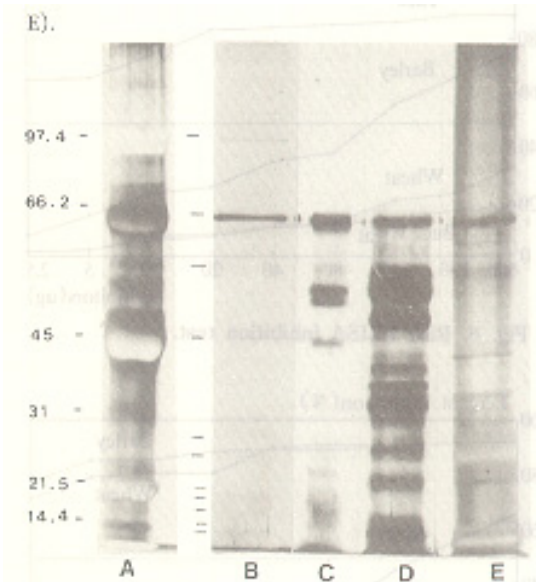


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of cereal extracts. Molecular weight were determined from a standard mixture of proteins of known MW : A, low Mw markers : phosphorylase-b (97.4 kd), bovine serum albumin(66.2 kd), ovalbumin(45 kd), carbonic anhydrase(31 kd),soybean trypsin inhibitor(21.5 kd), and lysozyme(14.4 kd);

2. ELISA 시험

각각의 항원과 항체의 최적반응을 보이는 적정 농도를 구하기 위하여 여러 농도의 항원과 토끼의 혈청 IgG를 이용하여 ELISA를 시행한 결과는 Fig. 2-Fig. 5와 같다. 쌀의 경우는 3.1ug/well의 항원과 2 : 100으로 희석한 토끼 혈청을 이용하여 시행한 경우가 흡광도 1.5~2.0사이의 가장 적절한 항원-항체 반응을 보였고, 보리의 경우는 항원 0.6×10^{-2} ug/well, 혈청 1 : 4,000~1 : 8,000인 경우에, 밀의 경우는 항원 1.75×10^{-2} ug/well, 혈청 1 : 8000v/v인 경우가, 메밀의 경우는 항원 $0.4 \sim 10^{-2}$ ug/well과 혈청 1 : 16,000v/v인 경우가 각각 최적의 반응을

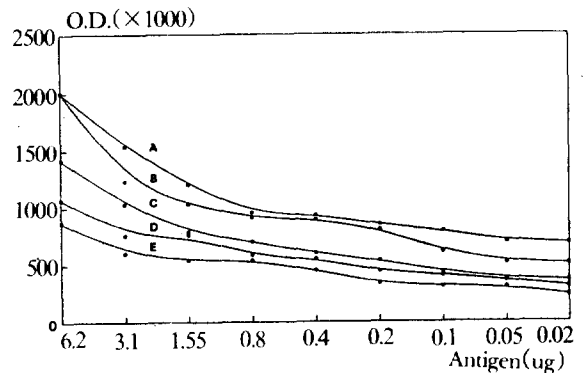


Fig. 2. Serial profile of ELISA to rice with rabbit IgG. Serum dilution : A, 1 : 100, B, 1 : 200, C, 1 : 400, D, 1 : 800, E, 1 : 1600.

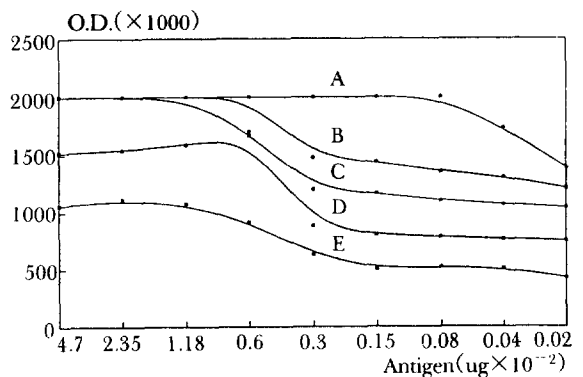


Fig. 3. Serial profile of ELISA to barley with rabbit IgG. Serum dilution : A, 1 : 1000, B : 1 : 2000, c, 1 : 4000, D, 1 : 8000, E 1 : 16000.

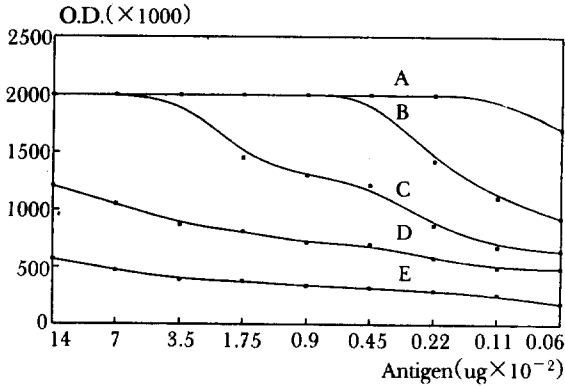


Fig. 4. Serial profile of ELISA to wheat flour with rabbit IgG. Serum dilution : A, 1 : 2000, B, 1 : 4000, C, 1 : 8000 D, 1 : 16000, E, 1 : 32000.

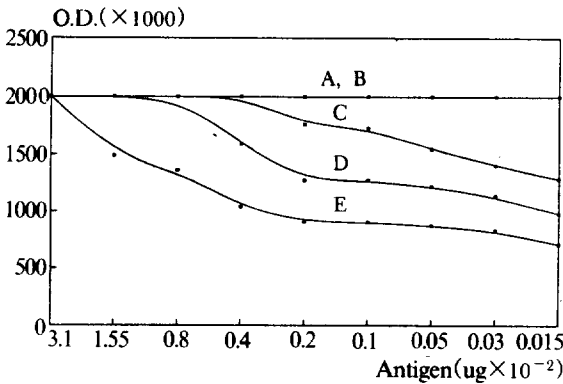


Fig. 5. Serial profile of ELISA to bucksheat flour to rabbit IgG. Serum dilution : A, 1 : 2000, B, 1 : 4000, C, 1 : 8000, D, 1 : 16000, E, 1 : 32000.

보였다. 상기에서 얻어진 각각의 항원과 항체의 농도로 ELISA 억제시험을 시행하였다.

3. ELISA 억제시험

쌀, 보리, 밀, 메밀의 ELISA 억제시험에서 해당 항원 600ug 씩을 억제제로 사용한 경우는 각각 85.9%, 90.9%, 63.2%, 72.5%가 억제되었다. 항원별로 다른 곡식을 억제제로 사용한 경우의 ELISA inhibition 정도는 쌀의 경우 보리에 의하여 75.7%, 밀에 의하여 33.3%, 메밀에 의하여 18.4%까지 억제되

었다. 따라서 쌀 항원은 보리항원과 상당한 교차 반응(cross reaction)이 있음을 알 수 있었고, 밀항원과는 다소의 교차반응이 발견되었으며, 메밀과는 교차반응이 미약함을 알 수 있었다(Fig. 6). 보리의 경우는 밀과 쌀에 의하여 각각 66.2%, 90.3%, 메밀에 의하여 22.5%까지 억제되어 보리항원과 밀항원 사이에는 매우 높은 교차반응을 나타내었고, 쌀 항원과의도 상당한 정도의 교차반응을 보였다(Fig. 7). 밀의 경우도 보리항원에 의하여 59.1%까지 억제되어 밀에 의하여 최대 억제된 정도인 63.2%와 거의 유사한 정도의 억제가 이루어져 두 항원 사이에는 매우 높은 교차반응이 발견되었다. 또한 쌀과 메밀항원에 의하여도 최고 35.6%, 27.3%까지 억제되었다(Fig. 8). 메밀의 경우는 쌀에 의하여만 37.3%의 억제가 일어나 다소의 교차반응이 의심되었다(Fig. 9).

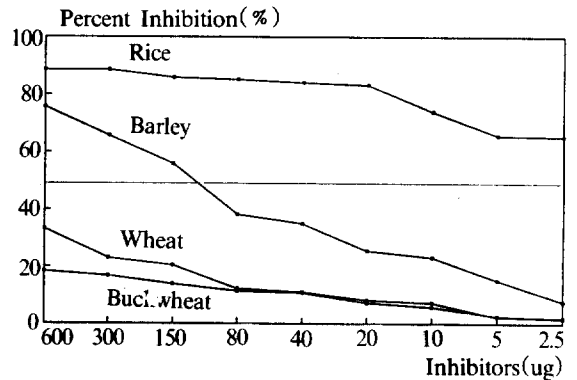


Fig. 6. Rice ELISA inhibition test.

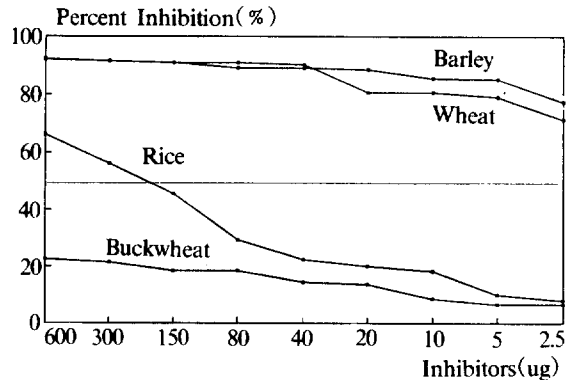


Fig. 7. Barley ELISA inhibition test.

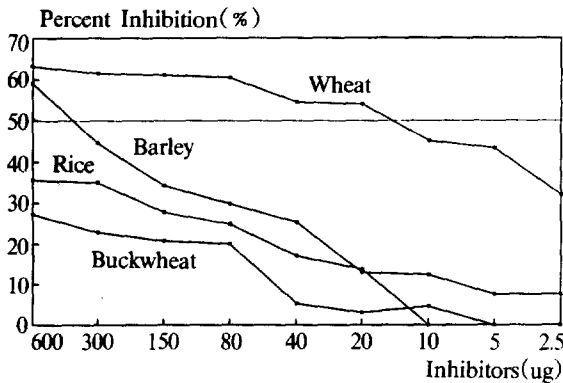


Fig. 8. Wheat flour ELISA inhibition test.

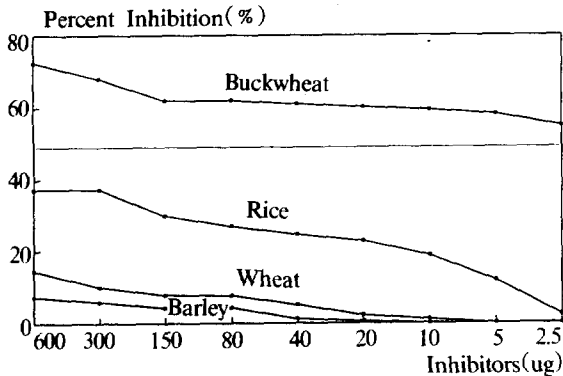


Fig. 9. Buckwheat flour ELISA inhibition test.

고 찰

식품 알레르기는 1형에서 4형 과민반응까지 모두 관련될 수 있는데, 1형 과민반응이 가장 잘 알려져 있다. 그런데 1형 과민반응은 식품을 섭취한 후 수분내에 증상이 유발되는 속발형반응과 식품 섭취 후 수 시간이 지나야 증상이 유발되는 지발형반응으로 나누어진다¹⁰⁾. 아토피성 피부염은 주로 영유아 시기에 발병하며 40~50세까지 지속될 수 있는 만성 질환으로서 심한 소양감 뿐 아니라 보기 흉한 외모 때문에 정서적으로 민감한 소아나 사춘기에는 극심한 정신적인 문제를 일으킬 수 있다.

그러나 아토피성 피부염의 발병기전은 아직 확실히 밝혀져 있지 않아서 근본적인 원인 치료는 거의 실시하고 있지 못하고, 스테로이드연고나 항히스타민제와 같은 증상 완화제를 투여하는 것이 대부분인데, 그 효과가 일시적이어서 곧 재발되기 때문에 환자나 담당의사 모두에게 큰 고통을 준다¹¹⁾.

아토피성 피부염과 식품항원과의 관계는 Sampson 등^{6,12-14)}에 의해서 정립되었는데, 아토피성 피부염 환자의 약 60%는 식품경구유발시험시 증상이 악화되고⁶⁾, 이때 혈중 히스타민치가 상승하며¹²⁾, 피부 조직검사에서는 호산구 및 major basic protein이 침착되는 것으로 보아 식품 항원이 아토피성 피부염에 중요한 원인이 되며^{12,14)}, 1형 과민반응의 지발형 반응이 관련된다고 보고하였다¹²⁾. 원인이 되는 식품으로는 계란, 땅콩, 우유, 생선 및 밀가루 등이 거론된다^{6,12)}.

이에 반해서 쌀은 알레르기 질환의 흔한 원인 식품이라기 보다는 알레르기 질환을 거의 일으키지 않는 저 알레르기성 식품으로 알려져 있으며, 쌀 알레르기에 관한 보고도 1형 과민반응의 속발형반응⁵⁾과 3형 과민반응으로 추정되는 증례³⁾가 보고되었을 뿐이다. 따라서 쌀은 식품 알레르기의 예방 및 치료의 일환인 기본식품(basic food)으로 널리 이용되고 있다^{10,11)}.

그러나 최근 쌀을 주식으로하는 일본에서 아토피성 피부염 환자들을 대상으로 RAST를 실시하여 보면 영아시기에는 우유와 계란, 소아시기에는 집먼지 진드기, 성인에서는 쌀과 밀가루 항원에 양성율이 높은 것으로보다, 성인까지 지속되는 아토피성 피부염에는 쌀 항원이 매우 중요한 역할을 할 수 있다는 보고⁷⁾가 있으며, 小松平⁸⁾은 1,060명의 아토피성 피부염 환자들 대상으로 실시한 RAST에서 25명(소아 6명, 성인 19명)이 쌀 항원에 양성을 보였고, 이 환자들에게 약 5개월 간 쌀 대신 대체식으로 밀을 투여한 결과 36%에서 임상 증상이 현격하게 호전되었고, 40%는 다소간 호전되었으며, 임상 증상이 현격하게 호전되었던 환자들에서는 쌀 뿐 아니라 밀의 RAST치도 유의하게 낮아졌다고 보고하였다.

곡물류 단백질은 알부민, 글로불린, prolamin과 glutelin등으로 구성되며, 각각 물, 염기, 알콜 및 산과 알칼리에 녹는 특징이 있다. 쌀 단백질은 대부분이 glutelin으로 약 80%를 차지하며 글로불린과 prolamin이 각각 8%, 알부민이 5%로 구성된다¹⁵⁾.

쌀 단백질이 항원성을 갖는다는 사실은 Shibasaki 등¹⁶⁾에 의해서 최근 밝혀졌다. 이들은 쌀 단백질 중 glutelin과 글로불린을 분리하고, 글로불린을 다시 Sephadex G-200 column chromatography로 세 분획으로 분리 했는데, 이들 모두가 쌀 특이 항체와 결합하며, 60°C에서 1시간, 100°C에서 2분간 가열을 하면 그 항원성이 40~70% 감소된다고 보고하였다. Kikuchi 등¹⁷⁾은 쌀 단백질을 SDS-PAGE로 분리하여 분자량이 13-98 kd사이에 약 22개의 단백띠를 관찰할 수 있었으며, immunoblotting과 autoradiography를 실시하여 분자량이 13, 16, 및 37kd인 항원띠가 강하게 관찰되어 이들이 중요 항원이라고 하였으며, Ikezawa 등¹⁸⁾은 분자량이 16, 25, 및 33 kd인 항원이 중요항원이며, 이중 분자량 16과 25 kd은 글로불린, 33kd은 glutelin 분획에서 기인된 항원이며, 특수한 효소로 쌀을 전처리 하면 단백질 성분이 45% 감소하며, 분자량이 16과 25kd의 항원은 제거되나 분자량이 33kd은 남는다고 하였다. Watanabe 등¹⁹⁾은 위와 같이 전처리된 저알레르기성 쌀을 7명의 쌀 알레르기 환자에게 투여하여도 6명에서는 증상이 유발되지 않았다고 보고하였다.

본 연구에서는 쌀 항원을 실제로 우리가 섭취하는 상태로 얻기 위하여 쌀을 가열하여 밥을 지어서 phosphate buffered saline에 담구어 보관한 후 원심 분리하여 상층액을 얻었으므로 대부분 추출물이 글로불린이며 일부 glutelin이 섞여 있으리라고 생각된다. 35ug이 포함된 쌀 조항원을 SDS-PAGE로 분리한 결과 11개의 단백띠를 관찰할 수 있었는데 66.2kd를 제외하고는 매우 약하게 관찰되었다. 이것은 아마도 밥을 만드는 과정에서 고열을 받았기 때문에 분자량 60Kd 이하의 단백질들이 파괴되어 밥을 만드는 과정에서 고열을 받았기 때문에 분자량 60kd 이하의 단백질들이 파괴되어 작은 분자량의 단백질로 변하였기 때문으로 여겨지며, 이는 쌀 항원을 가열하면 항원성이 현격하게 감소된다는

Shibasaki 등¹⁶⁾의 보고와 일치되는 소견으로 생각된다. 쌀 항원과는 대조적으로 보리와 밀은 동일한 방법으로 조항원을 제조하였는데도 SDS-PAGE상 분자량이 66.2kd 이외에도 매우 강하게 관찰되는 단백띠들이 있었으며, 메밀은 매우 다양한 종류의 단백질로 분리 되었다. 본 연구의 경우 비록 쌀 항원이 SDS-PAGE상 약하게 관찰되었지만 메밀을 이용하여 IgE와 결합하는 항원을 규명하여 본 이 등²⁰⁾의 연구에서와 같이 SDS-PAGE로는 미약하거나 거의 관찰되지 않았던 단백질도 혈청 특이 IgE와 강하게 결합하는 주된 항원이 될 수 있으므로 쌀 알레르기 환자의 혈청과 결합하는 항원은 본 실험만으로는 밝혀낼 수 없었다. 또한 쌀에 의해서 Quincke's edema가 유발되었던 증례³⁾에서는 다른 종류의 쌀이 일본에서 생산되는 쌀과는 항원성이 다를 수 있기 때문에 이에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

식품 알레르기는 일반적으로 1~2년 이상의 장기간 동안 원인이 되는 식품을 금식하고 대체식을 투여하여야 하기 때문에 Ikezawa 등¹⁸⁾은 쌀을 전처리하여 항원성이 감소된 저항원성 쌀은 장기적인 대체식으로 일반 환자들이 이용하기에는 경제적인 어려움이 따른다고 하였다. 따라서 본 연구의 목적에서도 언급한 바와 같이 쌀과 교차반응이 없는 적절한 대체식의 발견이 필요하며, 역으로, 보리나 밀, 메밀 알레르기 환자에게 쌀이 안전한 기본식품인지를 규명할 필요가 있다.

쌀, 보리 및 밀은 동식물 분류 상 모두 Gramineae family에 속해있고 메밀은 Polygonaceae family에 속해있기 때문에^{9,10)}, 쌀이 보리와 밀과 더 교차반응이 있으리라는 것은 쉽게 생각할 수 있으나, 동식물 분류상 과(family)보다도 더 가까운 종(species)사이에도 모두 교차반응이 존재하는 것은 아니며 연관성이 적은 항원들 사이에서도 교차반응이 있을 수 있다는 것도 염두에 두어야 한다^{9,21)}. 따라서 실험적으로 교차반응을 있을 수 있다는 것도 염두에 두어야 한다⁹⁾²¹⁾. 따라서 실험적으로 교차반응을 증명해야 하는데, 쌀, 보리, 밀 및 메밀 사이에 교차반응이 존재하는지를 밝힌 연구는 극히 드물다. Kiruchi 등¹⁷⁾은 쌀과 밀 모두에 RAST가 양

성인 10명을 관찰하였는데, 밀의 주된 항원인 분자량 16과 19Kd 항원이 쌀과 교차반응을 일으킬 수 있지만, 개인에 따라서 각기 다를 수 있다고 하였고, Urisu등²²⁾은 RAST 억제시험으로 쌀과 밀, 메밀은 교차반응이 있다고 하였으며, Yamada등²³⁾은 메밀 RAST는 양성이나 임상증상이 없는 환자들이 쌀과 교차반응이 더 잘 일어난다고 보고하였다.

본 연구에서는 연구 기간 동안 저자들이 제조한 항원 및 Torii사의 항원으로 실시한 알레르기 피부시험에서 쌀, 보리 및 밀에 양성반응을 보인 경우가 없었으므로 IgE를 이용한 교차반응을 연구할 수 없었다. 따라서 토끼에 면역 주사를 하여 얻은 혈청 IgG를 이용하여 ELISA 억제시험을 시행하여 각 항원들 사이에 교차반응을 알아 보았는데, 쌀과 보리와 밀은 서로 교차반응을 나타내는 항원을 포함하고 있으며 특히 보리와 밀은 서로 강한 교차반응을 보임을 알 수 있었다. 메밀은 쌀을 억제제로 사용한 경우에 중등도의 양으로도 20% 이상의 억제소견을 보여 쌀 항원에는 메밀과 교차반응을 일으키는 단백질이 포함되어 있을 가능성을 시사하였는데, 본 연구에는 포함되지 않았으나 저자들이 진행중인 또다른 연구에 의하면 이와 부합되는 결과를 알 수 있었다. 즉, 메밀 알레르기 환자를 대상으로 생쌀 항원으로 ELISA 시험을 실시하여 보았는데 14명 중 2명은 쌀에 대한 IgE가 양성이었으며(KWH, OD=0.431, PCW, OD=0.642), 이들 혈청으로 ELISA 억제시험을 시행한 결과 쌀 항원 2.5ug에 의해서 50%, 50ug에 의해서 64%가 억제 되어 IgE와 결합하는 항원 사이에도 교차반응이 일어날 수 있음을 시사하는 소견을 보였다(미발표 자료).

이러한 연구 결과로 미루어 볼 때 우리나라에서 흔히 섭취하는 네종류의 곡물들 사이에는 정도의 차이는 있으나 교차항원이 존재함을 알 수 있었고, 이들 항원이 환자에서 IgG 혹은 IgE를 생성하게 하는지 여부는 추후 연구하여야 하겠다. 또한 향후 곡물 항원으로 알레르기 피부시험과 RAST 등을 지속적으로 실시하여 이들에 의한 알레르기 환자를 발견하여 IgE와 결합하는 항원과 이들 곡물 간의

교차반응에 관한 연구 및 곡물 알레르기가 있는 경우, 개개의 환자에게 알맞은 기본식품을 찾기위한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

우리나라에도 존재할 가능성이 있는 쌀 알레르기 환자의 진단 및 치료시 안전한 기본식품의 발견과 교차반응이 없는 대체식품의 개발을 위하여 쌀, 보리, 밀 및 메밀로 밥을 지어, 이로부터 추출한 항원을 이용하여 전기영동과 면역효소법(ELISA) 및 ELISA 억제시험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 전기영동에 의하여 쌀의 경우는 11개(97.4, 66.2, 58, 45, 29, 25, 21.5, 20.5, 18, 17, 14kd)의 단백띠를 관찰할 수 있었는데, 이중 분자량 66.2 kd의 단백띠가 강하게 나타났고 그이외의 단백띠는 매우 약하였다. 보리의 경우도 11개 이상의 단백띠가 관찰되었는데 이중 66.2, 53, 50.5, 45kd의 단백띠가 강하게 나타났고 그이외의 단백띠도 쌀에 비하여 비교적 강하였다. 밀의 경우는 15개 이상의 단백띠를 관찰할 수 있었는데 대부분의 단백띠들이 강하게 관찰되었고 쌀이나 보리, 메밀에서는 소량 혹은 관찰되지 않은 58, 48.5, 41.5, 40, 37, 34, 22.5, 16.6kd의 단백띠도 강하게 관찰되었다. 메밀의 경우는 적어도 20개 이상의 단백띠를 관찰할 수 있었는데 이중 62, 36, 25, 16.5, 13kd의 단백띠가 비교적 강하게 나타났고 기타의 곡류에 비하여 매우 많은 종류의 단백질이 분리되었다.

2) 각각의 항원과 항체의 최적반응을 보이는 적정 농도를 구하기 위하여 여러 농도의 항원과 토끼의 혈청 IgG를 이용하여 ELISA를 시행한 결과 쌀의 경우는 3.1ug/well의 항원과 1 : 100v/v으로 희석한 토끼 혈청을 이용하여 시행한 경우가 흡광도 1.5~2.0사이의 가장 적절한 항원-항체 반응을 보였고, 보리의 경우는 항원 0.6×10^{-2} ug/well, 혈청 1 : 40 00~1 : 8,000v/v인 경우에, 밀의 경우는 항원 1.75×10^{-2} ug/well, 혈청 1 : 8,000v/v인 경우가, 메밀의 경우는 항원 0.4×10^{-2} ug/well과 혈청 1 : 16,000v/v인 경우가 각각 최적의 반응을 보였다. 상기에서

얻어진 각각의 항원과 항체의 농도로 ELISA 억제 시험을 시행하였다.

3) 쌀, 보리, 밀, 메밀의 ELISA 억제시험에서 해당 항원 600ug 씩을 억제제로 사용한 경우는 각각 85.9%, 90.9%, 63.2%, 72.5%가 억제되었다. 항원별로 다른 곡식을 억제제로 사용한 경우의 ELISA inhibition 정도는 쌀의 경우 보리에 의하여 75.7%, 밀에 의하여 33.3%, 메밀에 의하여 18.4%까지 억제되었다. 따라서 쌀 항원은 보리항원과 상당한 교차 반응(cross reaction)이 있음을 알 수 있었고, 밀항원과는 다소의 교차반응이 발견되었으며, 메밀과는 교차반응이 미약함을 알 수 있었다. 보리의 경우는 밀과 쌀에 의하여 각각 66.2%, 90.3%, 메밀에 의하여 22.5%까지 억제되어 보리항원과 밀항원 사이에는 매우 높은 교차반응을 나타내었고, 쌀 항원과도 상당한 정도의 교차반응을 보였다. 밀의 경우도 보리항원에 의하여 59.1%까지 억제되어 밀에 의하여 최대로 억제된 정도인 63.2%와 거의 유사한 정도의 억제가 이루어져 두 항원 사이에는 매우 높은 교차반응이 발견되었다. 또한 쌀과 메밀항원에 의하여도 최고 35.6%, 27.3%까지 억제되었다. 메밀의 경우는 쌀에 의하여만 37.3%의 억제가 일어나 다소의 교차반응이 의심되었다.

결론적으로 쌀, 보리 및 밀 항원사이에는 상당한 정도의 교차반응이 있었으며, 쌀과 메밀 항원사이에도 교차반응이 의심되었다. 그러나 연구에서는 토끼에게서 IgG를 이용하여 교차반응을 알아보았으므로, 향후 이들 곡물에 알레르기 반응을 보이는 환자를 대상으로 환자의 혈청 IgG나 IgE를 이용한 연구가 필요하겠다.

- Abstract -

Cross-reactivity among four cereals : rice, barley, wheat flour and buckwheat flour

Ki Young Lee, M.D., Soo Young Lee, M.D.,
Byeung Joo Jeoung Jeong, M.D., Kyu Earn Kim,
M.D.,
and Dong Soo Kim, M.D.

*Department of Pediatrics, College of Medicine,
Yonsei University,*

There has been no report of rice allergy in Korea, but it is possible that rice allergy may be present in Korea. In this study, for the purpose of identification of safe cereals as a basic food in children with food allergy, we partially purified steamed rice, barley, wheat flour and buckwheat flour performed 12% gel SDS-PAGE and evaluated the cross reactivity among these four cereals by ELISA inhibition test with polyclonal rabbit IgG to four cereals.

The rice antigen contains at least 11 proteins. Among them a component of molecular weight with 66.2Kd was most prominently demonstrated by SDS-PAGE. Barley, wheat flour and buckwheat flour contain at least 11, 15 and 20 proteins, respectively.

Using the ELISA inhibition test, rice ELISA was inhibited by other cereals, such as barley, wheat and buckwheat, up to 75.7%, 33.3% and 18.4%, respectively and significant inhibitions were noted barely and wheat flour(66.2% and 59.1%).

In conclusion, our result suggest that there was variable degree of cross reactivity among four common cereals in Korea and further

study will be needed to identify the allergic cross reactivity among cereals in atopic children, especially with hypersensitivity to at least one of four cereals, by use of IgG and IgE antibodies.

REFERENCES

- 1) Sampson HA, Metcalfe DD : Food allergy : Immediate reaction to foods. In Sampson HA, Metcalfe DD, Simon RA(eds) : Food allergy : adverse reaction to foods and food additives. 1st ed. p99-112, Blackwell Scientific publications, Boston, 1991
- 2) Vitoria JC, Camareo C, Sojo R, Ruiz A, Rodriguez-Soriano J : Enteropathy related to fish, rice and chicken. Arch Dis Child 57 : 44-48, 1982
- 3) Van den Hoogenband HM, Ketel WG : Allergy to rice. Contact dermatitis 9 : 527-528, 1983
- 4) Strunk RC, Pinna JL, John TJ, Hansen RS, Blazovich JL : Rice hypersensitivity associated with serum complement depression : Clin allergy 8 : 51-58, 1978
- 5) Pastorello EA, Stocchi L, Pravettoni V, Bigi A, Schilke ML, Incorvaia C, Zanussi C : Role of food elimination diet in adult with food allergy. J Allergy Clinical Immunol 73 : 475-483, 1989
- 6) Sampson HA, McCaskill CM : Food hypersensitivity in atopic dermatitis : evaluation of 113 patients. J Pediatr 107 : 669-675, 1985
- 7) 藤澤 重樹, 山本 子, 原 弘之, 荒記ひろみ, 森降文, 森岡 貞雄, 鎌田 英明, 權東 明, 徳田 安章 : アトピー性皮膚炎にねける 血清IgE値, ダニ, 卵白, 牛乳, 大豆, 米, 小麥 の 特異 IgE 抗體の 相關性—多項式回 モラルによる 検討—. 日皮會誌 99 : 1235-1241, 1989
- 8) 小 松平, 菅 千束, 宮川加祭太, 宮川精子淳子, 山朝美, 池澤善郎, 中鳥 弘 : アトピー性皮膚炎に 對するユメ除去食にする 臨床效果及びユメ小麥のRAST, 血清 IgE, 末梢血好酸具數の 變動について. アトピー39 : 402-409, 1990
- 9) Sachs MI, O'Connell EJ : Cross-reactivity of food-mechanisms and clinical significance. Ann allergy 61 : 36-40, 1988
- 10) Matcalfe DD : Food hypersensitivity, J Allergy Clin Immunol 73 : 749-762, 1984
- 11) 이기영 : 아토피 피부염의 식이요법. 알레르기 9 : 198-203, 1989
- 12) Bradbent JB, Sampson HA : Food hypersensitivity and atopic dermatitis. Pediatr Clin North America 35 : 1115-1130, 1988
- 13) Sampson HA, Johie PA : Increased plasma histamine concentration after food challenges in patients with atopic dermatitis. N Engl J Med 311 : 372-376, 1984
- 14) Sampson HA : The role of allergy in atopic dermatitis. Clin Rev Allergy 4 : 125-138, 1986
- 15) Yunginger JW : Food antigens. In Sampson HA, Metcalfe DD, Simon RA(eds) : Food allergy : adverse reaction to foods and food additives. 1st ed. p99-112, Blackwell Scientific publications, Boston, 1991
- 16) Shibasaki M, Suzuki S, Nemato H, Kuromume T : Allergenicity and lymphocyte stimulating property of rice protein. J Allergy Clinical Immunol 64 : 259-265, 1979
- 17) Kikuchi S, Yamada M, Ito K, Yamada K, Urisu A, Torii S : Analysis of rice and wheat protein by immunoblotting. Program and abstracts 14 international congress of allergology and clinical immunology p254, Hogrefe and Huber

Publisher, Toronto, 1991

- 18) Ikezawa Z, Miyakawa J, Komatsu H, Sugiyama A, Suga C : Analysis of rice allergen in atopic dermatitis and preparation of hypoallergenic rice. *J Invest dermatol* 92 : 449, 1989
- 19) Watanabe M, Miyakawa J, Ikezawa I, Suzuki Y, Hirao T, Yoshizawa T, Arai S : Production of hypoallergenic rice by enzymatic decomposition of constituent proteins. *J Food Science* 55 : 781-783, 1990
- 20) 이수영 · 정병주 · 김동수 · 김규언 · 이기영 : 메밀의 알레르기 항원성에 관한 면역학적 연구. *알레르기* 5 : 546-554, 1991
- 21) Ebner I, Birjner T, Valenta R, Rumpod H, Breitenhah H, Scheiner O, Kraft D : Common epitopes of birch pollen and applesstudies by western and northern blot. *J Allergy Clinical Immunol* 88 : 588-594, 1991
- 22) Urisu A, Kondo Y, Wada Z, Horiba F, Yamada K, Komada H, Komada H, Yamada M, Torii S, Nakamura R : Rice protein 16Kd is responsible for cross-allergenicity between not only cereal, grains in poacea family but also buckwheat and soybean. Program and abstracts 14 international congress of allergology and clinical immunology p255, Hogrefe and Huber Publisher, Toronto, 1991
- 23) Yamada K, Urisu A, Komada H, Inagaki Y, Yamada M, Torii S : Immediate hypersensitivity reactions by buckwheat ingestion and cross-allergenicity between buckwheat and rice. Program and abstracts 14 international congress of allergology and clinical immunology p254, Hogrefe and Huber Publisher, Toronto, 1991