

한국에 서식하고 있는 독일바퀴, 새우, 게 항원의 교차반응에 관한 면역학적 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실

이기영, 정병주, 이수영, 김규연, 김동수

서 론

항체가 항원과 결합할 때 항원의 특이성에 따라 항체가 항원을 인지하는데 경우에 따라서는 한 항체가 항원성의 유사성 때문에 여러 가지의 항원을 같이 인지할 수 있다. 이러한 현상은 실제로 알레르기 피부검사를 실시하여 보면 몇 종류의 항원들은 동일인에서 모두 양성으로 나오는 경우를 흔히 관찰할 수 있는데 이는 특수한 항원들 사이에 공통 항원을 갖고있기 때문에 나타나는 교차반응(cross reaction)¹⁾ 혹은 그 기전은 잘 알려져 있지 않으나 면역반응을 조절하는 유전자와 관련되는 것으로 설명하고 있다²⁾.

바퀴벌레는 Berton과 Brown³⁾이 바퀴벌레 알레르기질을 최초로 보고한 이래 도시에서 통념한 기관지 천식과 알레르기성 비염을 일으키는 중요한 흡입항원으로 알려져 있으며 거주 환경의 변화로 바퀴벌레에 의한 알레르기 질환이 증가되는 추세이다^{4,5)}. 우리나라에서도 최근 고층 빌딩이 증가되고 난방시설이 좋아짐에 따라 바퀴의 서식 밀도가 높아져 이에 의한 알레르기 질환이 급격히 증가하는 추세이며, 저자들⁶⁾의 보고에서도 소아 아토피성 천식 환자의 11.4%가 바퀴항원에 알레르기 피부시험상 양성 소견을 나타내었고 강 등⁷⁾의 보고에서도 30%의 양성율을 보였으며

또한 저자들은 바퀴의 알레르기 항원성에 관한 면역학적인 연구도 이미 보고한 바 있다⁸⁾.

새우나 게도 우리가 흔히 섭취하는 식품이며 이들은 또한 식품 알레르기에 중요한 기인 항원으로 알려져 있는데⁹⁾, 외국에서도 알레르기 피부시험상 땅콩, 달걀, 콩류, 밀가루 및 생선류 다음으로 높은 양성율을 보이며 국내에서도 저자들^{7,10)}의 연구에 의하면 알레르기 피부시험에서 5%의 양성율을 보여 식품항원 중 시금치와 밀가루에 이어 높은 양성율을 나타냄과 동시에 경구 유발시험에서는 달걀, 게, 우유, 새우의 순으로 유발율이 높았다.

상기와 같이 이들 세 항원은 우리나라의 경우도 중요한 알레르겐으로 작용할 수 있는데 알레르기 피부검사상 새우와 게는 대부분 동일인에서 모두 양성반응을 보이며 바퀴벌레와도 동시에 양성으로 나오는 경우가 흔하다⁶⁾. 이는 동물 분류상 새우와 게는 같은 갑각류에 있고, 새우, 게 및 바퀴벌레는 동일한 절지동물문에 속해 있기 때문에¹¹⁾ 이들 항원간에 교차반응이 존재할 가능성을 생각하게 해준다. 또한 이러한 항원의 교차반응이 실제로 존재할 경우에는 알레르기 피부시험의 결과 판정과 알레르기 질환의 치료의 일환인 항원으로 부티의 회피 및 면역요법 등에 큰 혼선을 일으키게 되므로 이를 규명하는 것은 매우 중요하다^{1,12)}.

그러나 바퀴벌레^{8,13)}, 새우 및 게 항원에 대한 국내의 보고는 거의없는 실정이고 외국에서도 바퀴벌

* 본연구는 1991년도 연세 대학교 의과대학 교수 연구비의 보조로 이루어진 것임

레^{14~21)}와 새우 항원의 분리^{22~25)} 및 새우와 게 항원의 교차반응에 대한 연구^{12,26)}는 최근에야 진행되고 있으며, 게 항원의 분리나 새우, 게 및 바퀴벌레 항원들 간의 교차반응에 대한 보고는 아직 없다. 이에 저자들은 우리나라에 서식하고 있는 바퀴벌레, 새우 및 게 항원을 분리하여 그 특성을 규명하고 이 항원들 간에 교차반응 여부를 알아보기 위하여 본 연구를 실시하였다.

대상 및 방법

1. 항원 추출

가) 바퀴벌레 항원의 추출

저자들이 배양한 독일바퀴를 잡아 -70℃에 냉동시킨 후 분쇄하였다. 이를 에테르에 처리하여 지방을 제거하고 Coca용액(NaCl 5gm, NaHCO₃ 2.75gm, phenol 5mg/1LD. W.)에 넣고 Waring blender로 잘 섞어서 4℃에서 7일간 보관하였다. 이것을 18,000xg로 원심분리하여 상층액을 0.45 μm 여과기로 여과한 후 증류수에 여과공의 크기가 mw 6,000~8,000 dalton짜리 투석막으로 3일간 투석 하였다. 이것을 다시 냉동 건조하여 바퀴벌레의 조항원(crude extract)으로 사용하였다.

나) 새우와 게 항원의 추출

조리하지 않은 흰새우의 육질과 15분 동안 쪄낸 흰새우 및 게의 육질을 각각 약 100gm씩 취하여, Waring blender를 이용하여 균등액을 만든 후 4℃에서 1일간 보관한 후 18,000XG로 원심분리한 후에 상층액을 취하였다. 이 상층액을 바퀴벌레와 동일한 방법으로 여과 및 투석을 시행하여 냉동 건조시켜 새우와 게의 조항원을 얻었다.

2. 항 체

바퀴벌레, 전새우 및 전게의 조항원 2.0mg/ml를 동량의 Complete Freund's adjuvant로 증폭하여 각각 두마리의 New zealand white rabbit에 피하주사하였다. 바퀴벌레는 매주 1회씩 4주, 월 1회씩 6개월간 주사하였고 새우와 게는 매주 1회씩 6주간 주사하였다. 마지막 주사 1주 후에 토끼를 희생시켜 각 항원에 대한 혈정을 얻었다. 이 혈정을 ammonium sul-

fate를 이용하여 침전시켜 분획을 다시 phosphate buffered saline(PBS)에 용해시켜 투석한 후 다음 실험에 이용하였다.

3. Double diffusion gel precipitation(DDGP)

1% agarose gel을 이용하여 DDGP를 시행하였다. 중앙에는 토끼에서 추출한 세 종류의 항체를 각각 놓고 주위에 바퀴벌레, 새우 및 게의 조항원 10mg/ml의 농도로 20 μl씩 넣은 후 4℃에서 16시간 반응시킨 뒤 육안적으로 침전 반응을 확인하고 PBS로 5일간 세척하였다. 이를 0.01% Coomassie Brilliant Blue (Sigma Co., St. Louis, Mo.)로 염색하여 immuno-precipitation line를 관찰하였다.

4. 면역 효소법(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용한 항원 항체 반응 억제 시험

5 μg/ml농도의 바퀴벌레, 전 새우, 전 게의 조항원을 96 well EIA plate(Costar)에 100 μl/well씩 넣은 후 37℃에서 16시간 보관하였다. 그후 1% bovine serum albumin(BSA), PBS, Tween 20으로 1시간 처리하여 불필요한 단백질 결합을 차단시킨 다음 세척하였다. 적정 항원의 농도를 구하기 위하여 여러 농도의 항원과 토끼 혈정을 이용하여 예비시험(box titration)을 시행한 결과 바퀴항원과 전 새우 항원의 경우는 항원 농도 5 μg/ml와 1:6,000희석 항체와 가장 잘 반응하였고, 전 게 항원의 경우는 항원 농도 5 μg/ml와 1:3,000희석 항체와 가장 잘 반응 하였다. 따라서 바퀴, 전 새우, 게의 항원에 대한 토끼 항체를 각각 1:6,000, 1:6,000 및 1:3,000배로 희석한 항체와 농도를 달리한 억제제 (0.1, 1, 10, 100, 1,000, 2,000 μg/ml)를 실온에서 1시간 반응 시켰다. 이를 각각 100 μl/ml씩 넣고 또다시 1시간 반응시킨후 phosphatase가 부착된 anti-rabbit IgG 항체 (Sigma Co., St. Louis Mo.)를 1:2,000희석하여 반응시킨 다음 substrate(p-nitrophenyl phosphate disodium, Sigma, St. Louis, Mo.)를 첨가하여 ELISA reader를 이용하여 410 nm에서 발색정도를 관찰하였고 다음 공식에 의하여 억제정도를 구하였다.

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

5. Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

4%의 stacking gel과 12%의 separating gel을 사용하여 시행하였다. 각각의 조항원 40 μ g/well씩을 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue가 함유된 0.06M/L Tris HCl, pH 6.8에 녹여 100°C에 4분간 처리하여 30mA로 3시간 동안 전기영동을 시행하였다. 이후 0.01% Coomassie Brilliant Blue(Sigma, Co. St. Louis, Mo.)로 염색하여 저분자량의 표준단백 (Bio Rad. Lab., Richmond, CA.)에 의거하여 각 띠의 분자량을 계산하였다.

6. Immunoblotting

40 μ g씩의 바퀴, 게 항원을 전기영동에 의하여 분리한 후 nitrocellulose membrane(Milipore, 0.45 μ m, Bedford, Massachusetts, USA)에 2시간 동안 70V로 이행시키고 토끼에서 얻은 IgG항체를 이용하여 다음의 과정을 거쳐 면역검출을 시행하였다. 단백질이 전이된 각각의 nitrocellulose membrane을 10mM Tris, 0.9% NaCl, 3% BSA에 2시간 동안 담구어 불필요한 단백질을 차단시킨 후 10mM Tris, NaCl로 30분간 세척하였다. 이를 항 바퀴, 항 새우, 항 게 항체를 각각 0.1% PBS Tween 20에 1:4,000 배로 희석한 용액에 16시간 담구었다가 다시 세척하였다. 이를 다시 phosphatase가 부착된 anti-rabbit IgG를 conjugate buffer(MgCl₂, ZnCl₂를 포함한 20mM Tris, 0.3% BSA, 0.9% NaCl)에 1:2,000 배로 희석한 용액에 2시간 담구 후 세척하였다. 여기에 naphthol as-mx phosphate(Sigma Co., St. Louis, Mo.)와 Fast Blue BB salt(4-benzoylamino-2, 5-diethoxybenzene-diazonium chloride hemi salt, Sigma Co., St. Louis, Mo)를 섞은 용액을 첨가하여 발색시켜서 육안으로 항원 항체 결합 띠를 관찰하였다.

결 과

1. DDGP

항 바퀴항체는 바퀴항원과 네개 이상의 precipitation line을 관찰할 수 있었고 (Fig. 1), 항 새우 항체는 새우 항원과 두개의 precipitation line을 관찰할



Fig 1. Double diffusion gel precipitation with rabbit anti-cockroach IgG (a-cr). This shows more than four precipitation lines with cockroach extract(cr) and none with shrimp(sb) or crab(cb) extract.

수 있었다. 이중 하나는 게 항원과 부분적인 교차 항원성(partial identity)을 나타내었다(Fig. 2). 항 게 항체는 게항원과 2개의 precipitation line을 관찰할 수 있었고 이중 하나는 새우 항원과 완전 교차 항원성 complete identity)을 나타내었다(Fig. 3).

2 ELISA를 이용한 항원-항체반응 억제시험

각각의 항원을 주사하여 얻은 rabbit IgG를 이용한 ELISA inhibition test(EIT)결과 동일 항원에 의하



Fig 2. Double diffusion gel precipitation with rabbit anti-shrimp IgG(a-sh). This shows two precipitation lines with shrimp extract(sh) and one precipitation line with crab extract(cb). This result express the partial identity between one antigen of shrimp and crab extracts.

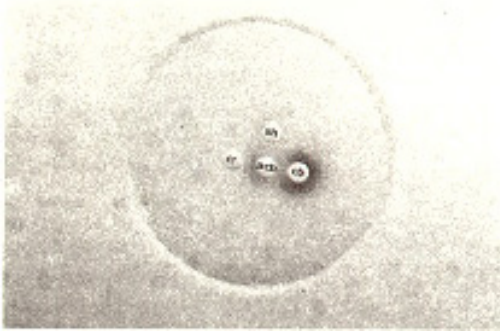


Fig 3. Double diffusion gel precipitation with rabbit anti-shrimp IgG(a-cb). This shows two precipitation lines with crab extract(cb) and one precipitation line with shrimp extract(sh). This result express the complete identity with one antigen of crab and shrimp extracts.

여서 각각 90%이상의 억제 효과를 보였으며 교차항원성을 보기위한 타 항원들에 의한 EIT를 보면 다음과 같다.

항 바퀴항체를 이용한 EIT결과 새우 항원을 억제 항원으로 사용한 경우 200 μ g(2mg/ml)의 고농도에 서만 23.6%억제되었을 뿐이고 게 항원에 의해서는 전혀 억제되지 않았다(Fig 4). 항 새우 항체의 경우는 게항원을 억제 항원으로 사용한 결과 0.01 μ g(0.1 μ g/ml)으로도 14.2%가 억제되었으며 농도를 높임에 따라 억제 정도도 증가하여 200 μ g(2mg/ml)의 고

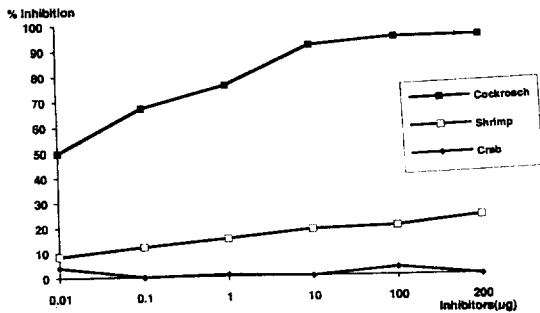


Fig 4. Inhibition of cockroach-ELISA with three antigens. The ability to inhibit the cockroach-ELISA were trsted with increasing concentration of cockroach, shrimp and crab extracts and results were expressed as% inhibition.

농도에서는 45.8%억제되었다. 바퀴 항원에 의하여 는 200 μ g(2mg/ml)의 고농도에서만 20%억제되었다 (Fig 5). 항게 항체를 이용한 경우에는 새우항원에 의하여 10 μ g(100 μ g/ml)농도에서도 44.2%가 억제 되었을 뿐 아니라 200 μ g(2mg/ml)농도에서는 90.0%까지 억제되었다. 바퀴항원에 의하여도 200 μ g (2mg/ml)의 고농도에서는 25.7%억제되었다(Fig 6).

3. SDS-PAGE

생 새우는 SDS-PAGE상 40개 이상의 단백질 띠를 관찰할 수 있었는데 이중 분자량이 97.4 kilodalton (이하 kd로 약함) 이상인 항원도 10개 이상 관찰되었 고 분자량 75-87, 69, 51.5, 50.5, 45.5, 42, 36-40,

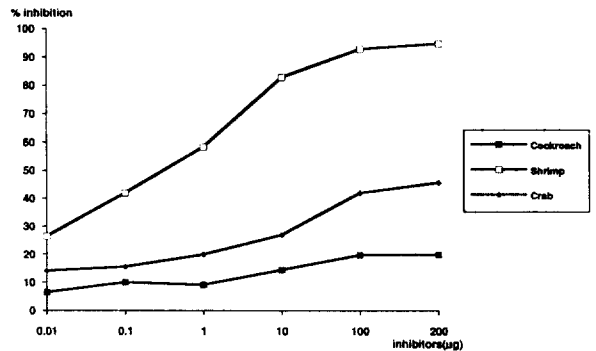


Fig 5. Inhibition of shrimp-ELISA with addition of cockroach, shrimp and crab. The results were expressed as% inhibition.

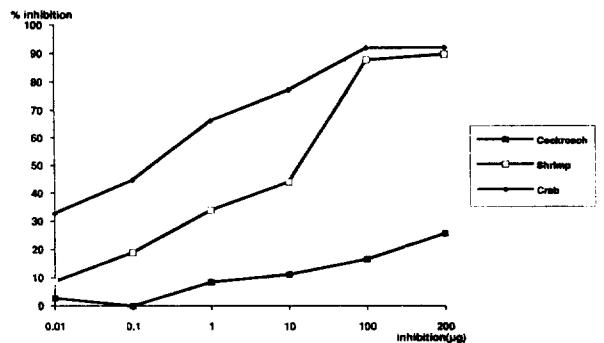


Fig 6. Inhibition of shrimp-ELISA with addition of cockroach, shrimp and crab. The results were expressed as% inhibition.

28.5, 21-25 및 15kd 항원들이 강하게 관찰되었다. 전 새우는 32개 이상의 단백질 띠를 관찰할 수 있었는데 그 중 분자량이 75-87, 45.5, 38, 32, 28.5, 22-55, 19.5 및 15kd인 단백질 띠가 강하게 관찰되었다. 전 개는 11개 이상의 단백질 띠를 관찰할 수 있었으므로 분자량이 25-28kd인 띠가 강하게 관찰되었고, 20.5, 19.5, 18.5, 17, 12-15kd 띠도 관찰되었다. 독일 바퀴는 30개 이상의 단백질 띠를 관찰할 수 있었는데 이중 97.4kd 이상의 띠도 10개 관찰되었으며, 거의 모든 항원들이 새우나 개에 비하여 약하게 관찰되었다. 그중 분자량 97.4, 84, 76 및 55Kd의 띠가 비교적 강하게 관찰되었다(Fig. 7).

4. Immunoblotting

항 바퀴 항원을 이용하여 면역검출을 시행한 결과

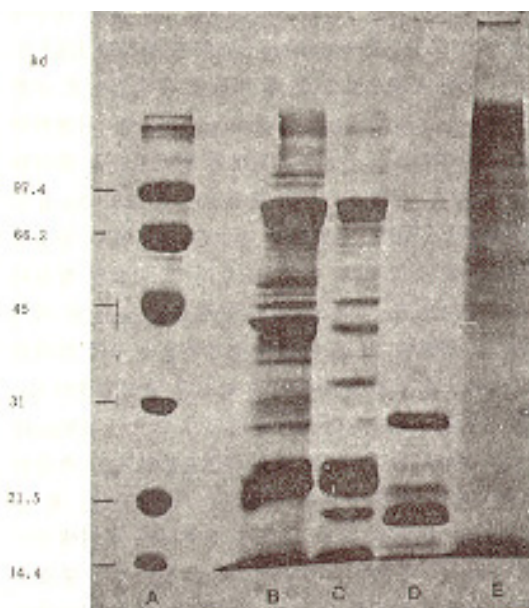


Fig 7. SDS-PAGE analysis of crude extracts: raw shrimp(B), steamed crab(D) and cockroach(E). Molecular weights were determined from a standard mixture of preteins as known molecular weight; a low molecular weight markers(A): phosphorylase b(97.4kd), bovine serum albumin(66.2kd), ovalbumin(45kd), carbonic anhydrase(31kd), soybean trypsin inhibitor(21.5kd) and lysozyme(14.4kd).

는 Fig. 8과 같다. 바퀴 항원에 대해서는 거의 모든 항원과 결합하는 양상을 보였고 새우 및 개 항원과는 약하기는 하지만 일부 결합하였다. 새우와 개 항원 모두 분자량 75~87, 69Kd인 항원이 비교적 강하게 결합하였고, 그외에도 새우 항원은 분자량 33~38, 25~27kd의 항원이, 개 항원의 경우는 분자량 30~32, 14~15kd의 항원이 항바퀴 항체와 비교적 강하게 결합하였다.

항 새우 항체를 이용하여 면역검출을 시행한 결과는 Fig. 9와 같다. 새우 항원에 대하여는 거의 모든 항원에 결합하는 양상을 보였고, 특히 분자량 78~87, 68~76, 65, 47, 39~42, 28~30, 15~24kd의 항원이 강하게 결합하였다. 또한 개 항원중 몇몇 항원과는 비교적 강한 결합 양상을 보였는데 이들은 분자량이 82, 71, 34, 31~32, 23~24 kd인 항원들이었다. 항 개 항체를 이용한 면역검출의 결과는 항새우 항체를 이용한 경우와 매우 유사한 결과를 나타내었다.

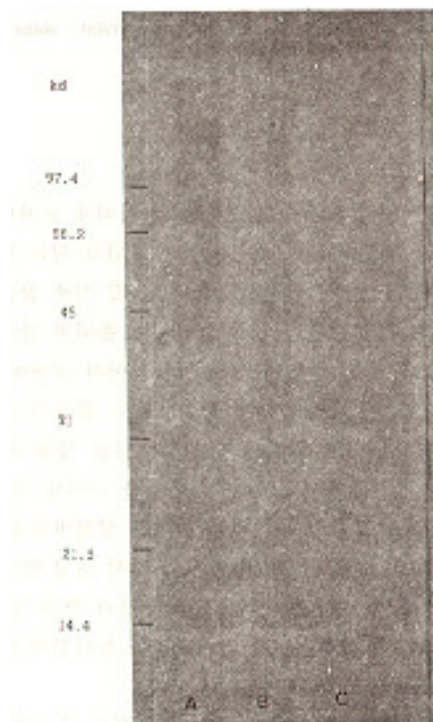


Fig 8. Enzyme immunoblotting with rabbit anti-cockroach IgG: Crude extract of cockroach(A), shrimp(B) and crab(C) antigens.

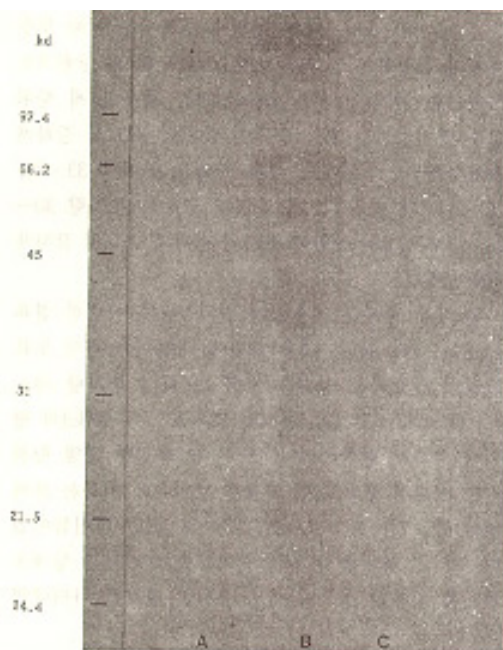


Fig 9. Enzyme immunoblotting with rabbit anti-shrimp IgG: Crude extract of cockroach(A), shrimp(B) and crab(C) antigens.

고 찰

알레르기 반응을 일으키는 기인 항원들 사이에 교차반응이 있다는 것은 비교적 최근에야 연구되고 있는 분야이다. 기관지 천식, 알레르기성 비염 및 식품 알레르기 등 알레르기 질환은 일정 항원에 노출되면 감작이 이루어진 후 동일 항원에 재차 노출되어야 증상이 나타난다. 그러나 항원들간에 공통항원이 있어서 교차반응을 일으킨다면 알레르기 피부시험상 몇몇 특정 항원들이 동일인에서 모두 양성반응을 나타낼 수 있으며, 항원에 접촉한 과거력이 없어도 양성반응을 나타낼 수 있고 항원 유발시험에서도 역시 양성 반응을 나타내게 된다. 따라서 이들 검사의 결과 판독 및 치료의 일환이 회피요법이나 면역요법을 실시함에 있어 혼란을 일으킬 수 있다¹²⁶⁾.

항원들 간의 교차반응은 동식물 분류상 비교적 가까운 과(family) 사이에서 존재하는 경우가 대부분이나 그보다 더 가까운 종(species)사이에서도 모두 교

차반응이 존재하는 것은 아니다¹⁾. 그러므로 개털과 고양이털과 같이 포유동물에 속하는 항원 사이에서 뿐 아니라 자작나무 화분(birch pollen)과 사과와 같이 관련이 적은 항원들 사이에서도 교차반응이 나타날 수 있다^{27,28)}.

새우나 게를 포함한 갑각류(crustacea)의 항원성에 관한 연구들을 살펴보면 새우 항원은 새우를 끓인 추출액이나 육질 모두에 동일한 항원이 있는 것으로 보고되고 있으며²⁵⁾, Hoffman 등²²⁾은 교차 면역 전기영동법(crossed immunoelectrophoresis, CIE)와 SDS-PAGE로 항원을 분석하여서 두개의 중요한 항원을 규명하였는데, Ag I은 열에 비교적 약해서 생새우에서만 발견되며 분자량은 21kd, 등전기점은 pH 4.5이며, Ag II는 열에 비교적 강해서 생새우나 삶은 새우 모두에서 발견되며 그 분자량은 38kd, 등전기점은 pH 4.75인 특성을 갖는데, 대부분 새우는 익혀서 먹으므로 열에 비교적 강한 Ag II가 더 중요한 항원이라고 보고하였다. 또한 Nagphal 등²³⁾은 삶은 새우에서 얻은 조항원을 ultrafiltration하여 분자량 10kd 이상의 항원 분획으로 나눈 후 이들을 각각 음이온 교환수지(anion-exchange chromatography)를 시행하여 열에 안정한(heat stable) 두개의 알레르겐을 분리할 수 있었다. 이중 Sa-I은 분자량이 8.2kd, Sa-II는 분자량이 34kd인 항원이며 이들은 54%에서 동일한 epitope을 갖고 있고 이중 Sa-II가 더 중요한 항원이 되며 아마도 Sa-I은 Sa-II의 분절(fragment)로 여겨진다고 하였다. 또한 이들의 추가적인 연구에 의하면 10kd이상의 항원 분획중에서 분리된 알레르겐인 Sa-III 항원은 proteinase에는 분해되지 않으나 RNaset2에는 분해되는 것으로 보아 RNA항원으로 추정된다²⁴⁾. 게는 우리가 흔히 섭취하는 식품이므로 게 알레르기가 드물지 않을 것으로 생각되나 국내에서는 저자들¹⁰⁾이 속발성 식품알레르기를 일으키는 중요한 원인 식품의 하나로 보고한 것 외에는 없고 외국에서도 게 가공업자들 사이에서 호흡기 질환이 보다 빈번하게 발생된다는 보고²⁹⁾와 게 가공업자의 약 15%가 게에 의한 직업성 천식이 있다는 보고^{30,31)}뿐 게 항원의 분리 및 그 면역학적 특성은 아직 명확히 규명되지 않은 상태이다.

이에 대한 저자들의 연구 결과에서는 생새우의 경

우 적어도 40개 이상, 전 새우의 경우는 적어도 32개 이상, 전 게의 경우 11개 이상의 항원 띠를 관찰할 수 있었다. 생새우와 전 새우의 항원을 비교하여 볼 때 전 새우의 경우 분자량 75-87kd 및 36~40kd인 항원의 양이 매우 줄었고 분자량 21~25kd의 항원의 양은 큰 감소가 없었다. 또한 생새우에서는 잘 관찰되지 않았던 분자량 19.5kd의 항원이 다량 관찰되었는데 이러한 결과는 새우를 찌는 과정에서 열에 약한 단백질이 변하여 생성된 것으로 생각된다. 이러한 저자들의 연구 결과는 얼핏 보기에는 Hoffman²²⁾이나 Nagphal²³⁾의 결과와 상이점이 있는 것으로 단정지워지기 쉬우나 이러한 다소의 차이는 연구방법의 따라 흔히 나타날 수 있다. 예를 들면 Hoffman²²⁾의 연구에서도 SDS-PAGE상 분리된 분자량 21kd의 Antigen I 과 분자량 38kd인 Antigen II도 gel filtration에 의하여는 각각 분자량 45kd와 분자량 200kd이상의 항원으로, 환원제(dithiothreitol)를 포함한 SDS-PAGE-reduced에 의하여는 각각 21kd와 37.5kd의 항원으로, 또한 아미노산 정량 분석에 의하여는 각각 분자량 21.4kd, 36.8kd의 항원으로 분리되었다. 또한 Nagphal²³⁾의 연구에는 Hoffman²²⁾과 동일한 조건으로 삶은 새우를 이용하여 연구한 결과 이지만 환원제를 이용한 경우나 이용하지 않은 경우나 모두 분자량 8.2kd와 34kd의 항원이 주된 알레르겐으로 작용함을 알 수 있었다. 이러한 관점에서 비교해 볼 때 저자들의 연구는 SDS-PAGE-reduced (2-mercaptoethanol) 첨가방법에 의한 결과이므로 실험 과정에서 100℃에 4분간 다시 끓이는 과정과 환원제를 포함한 buffer용액과 반응시키는 과정이 포함되고 환자의 혈청 IgE가 아닌 토끼의 IgG를 이용한 연구 결과이므로 상기의 연구 결과들과 다소간의 상이점을 나타내게 된다. 저자들이 이미 보고한 바퀴항원의 알레르기 항원성에 관한 연구⁸⁾에서도 나타난 바와 같이 SDS-PAGE에서는 발견되지 않았거나 소량이었던 항원들중에 다수의 항원들이 환자의 혈청 특이 IgE와 결합하는 주된 알레르겐으로 밝혀졌으므로 환자의 혈청 IgE를 이용하여 시행한다면 이들 새우와 게항원들중 어떤 단백질이 우리나라에서 주된 알레르겐으로 작용하며 알레르기 교차 항원성을 나타내는지를 규명할 수 있겠고, Hoffman²²⁾이나 Nagphal²³⁾의 결과

와도 보다 정확한 비교를 할 수 있으리라 생각되며 이 부분에 대한 연구는 추후 계속 진행시킬 예정이다. 전 게의 경우도 항원의 양이 적고 많은 차이는 있으나 분자량 30kd이하의 항원들은 전 새우와 유사하였고, 그 이상의 항원들은 매우 약하여 분자량 75-87kd의 몇 항원을 제외하고는 확실한 띠를 관찰하기 어려웠다.

바퀴벌레의 항원은 대부분 체부에 존재하는데 주로 위장관의 상피세포와 내용물, 신장의 전신기관인 말피기관의 혈관과 난소 등에 분포한다.²⁰⁾ 우리나라에서 가장 흔히 관찰할 수 있는 독일바퀴의 항원에 관한 면역학적 특성은 보고자에 따라서 조금씩 다르다. Baldo¹⁴⁾은 분자량이 30에서 200kd중 여러개의 항원을, Schon¹⁵⁾은 25Kd과 6Kd, Helm¹⁶⁾은 36kd 항원이 알레르기 증상을 유발하는 중요한 항원이 된다고 하였다. 저자들은 본 연구에서 SDS-PAGE상 30개 이상의 항원을 관찰할 수 있었는데 이전의 연구 결과에 의하면 이중 분자량이 64kd과 39kd인 항원이 환자의 혈청 특이 IgE와 가장 강하게 결합하는 주요 항원으로 추정되었다. 새우 항원과 마찬가지로 바퀴항원의 경우도 각 연구자마다 주요하게 작용하는 알레르겐 성분에 있어서 다소간의 차이를 관찰할 수 있는데, 이것도 역시 실험 방법의 차이나 동물 혹은 환자 개체마다 항원을 생성시키는 항원의 종류나 강도가 차이가 있으므로 나타나는 결과이며, 이 등³²⁾이 메밀 알레르기 환아를 대상으로 시행한 연구에서도 환자 개개인마다 혈청 특이 IgE와 결합하는 단백질 항원들은 매우 다양하며 수나 강도에 있어서도 서로 많은 차이가 있음을 알 수 있었다.

임상적으로도 새우와 게는 알레르기 피부점사상 동시에 양성반응으로 나오는 경우가 많고 새우 알레르기가 있는 환자 중 반수 이상에서는 게 알레르기가 동반되는 것으로 보아³³⁾ 이들 간에 교차반응 항원이 존재할 가능성을 시사해 준다. 또한 갑각류간 사이의 식품항원간에 교차반응을 연구한 바에 의하면 RAST 억제검사에서도 새우는 게에 의해서 41.6% 억제되며, crossed immuno-electrophoresis상 새우에서 분리되는 18개의 이상의 항원 중 게에는 3번과 6번 등 2개의 교차반응 항원이 존재한다고 보고하였다.^{12,34)} 저자들의 소아 알레르기 클리닉에서도 알레르기 피부시험을

시행할 때 새우와 게 항원은 물론 바퀴항원까지 세 종류의 항원이 동일인에서 모두 양성을 보이는 경우가 많으나 그의 정확한 연구가 우리나라 뿐 아니라 외국에서도 정확히 알려지지 않았으므로 진단 및 치료의 장애요소가 되고있다. 다만 곤충의 하나인 깔따구와 갑각류와의 교차항원에 관한 연구초록 보고가 있는데 그들 사이에는 교차 항원성이 없는 것으로 보고되었다³⁵⁾.

저자들이 Rabbit IgG를 이용하여 시행한 DDGP, ELISA inhibition test(EIT) 및 immunoblotting 결과도 새우와 게 사이에는 상당한 정도의 교차 항원성을 밝힐 수 있었다. 즉 immunodiffusion결과에서 보았듯이 새우 항원의 일부는 항 게 항체와, 게 항원의 일부는 항 새우 항체와 부분적 혹은 완전 교차 항원성을 나타내었고 EIT결과에서는 새우 ELISA는 게 항원에 의하여 45.8%까지 억제되었고 게 ELISA는 새우 항원에 의하여 최고 90%까지 억제되었다. 이러한 결과는 비록 환자의 혈청 IgE를 이용한 것은 아니지만 Lehrer¹²⁾가 IgE를 이용하여 시행한 RAST inhibition test 결과와 매우 유사한 정도의 결과를 보이고 있는데 그의 보고에 의하면 새우 RAST는 10mg/ml 농도의 게 항원에 의하여 41.6% 억제 되었고 게 RAST는 동량의 새우 항원에 의하여 84.8%가 억제 되었다. 항 새우 항체를 이용한 immunoblotting결과에서도 몇몇의 게 항원과도 강한 결합을 나타내어 교차 항원성이 있음을 시사해 주었는데, 특히 분자량 82, 71, 34, 31~32, 23~24kd의 게 항원들이 토끼의 항 새우 IgG와 강하게 결합하는 소견을 보였다. 그러나 이들 모두가 알레르겐으로 작용하는지, 혹은 알레르기 교차 항원성을 나타내는 원인 단백질인지, 이들 이외의 소량 존재하는 기타의 단백질 성분이 알레르기 교차 항원성을 나타내는지 등에 관하여는 본 연구 만으로는 알 수 없다.

또한 저자들의 연구에서는 EIT에 의하여 바퀴항원과 새우, 게 항원 사이에도 어느정도의 교차 항원성이 있음을 알 수 있었는데 바퀴와 게, 새우 사이에는 서로를 억제 항원 (각각 최고2mg/ml 농도, 200 μ g 용량)으로 사용한 결과 20% 내지 25.7%까지 억제되는 소견을 보여 비록 IgE를 이용한 결과는 아니지만 흥미 있는 결과라고 생각되며 사람의 혈청 특이 IgE

를 이용한 연구의 기본 연구로서 큰 의의가 있다고 생각되었다.

이러한 연구에 힘입어 실제로 임상적으로 교차 항원성이 의심되는 많은 경우에 있어서 확실한 원인 규명을 위한 검사방법의 마련에 다소나마 도움을 줄 수 있으리라 기대되는 바 크다. 그러나 또한 Cladosporium, Alternaria 및 Aspergillus항원 들에서와 같이 이들 항원 생산을 조절하는 유전자가 매우 가까이 있거나 항원의 epitope의 구조가 비슷하여서 교차반응이 없이도 알레르기 피부검사에서 모두 양성으로 나왔거나²⁾, 집먼지 진드기와 바퀴벌레 항원과 같이 알레르기 피부검사에서 양성율이 모두 높기 때문에 교차반응이나 유전자와 관련이 없이도 동시에 양성으로 나왔을 가능성³⁶⁾등에 대하여도 항상 관심을 가지고 주의하여야 하겠으며 이러한 분야에 대해서는 앞으로 보다 많은 연구와 경험이 필요하다고 생각된다.

결 론

바퀴벌레, 새우 및 게는 알레르기 질환을 일으키는 중요한 기인 항원이 되는데 알레르기 피부검사에서 동시에 양성으로 나오는 경우가 흔하다. 그러나 이들 항원의 면역학적 특성이나 교차반응 여부는 아직 확실히 밝혀져있지 않다. 이에 저자들은 SDS-PAGE를 이용하여 단백질 띠를 관찰하였고, double diffusion gel precipitation(DDGP)과 면역 효소법(ELISA)억제검사로 교차반응을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 새우와 게는 DDGP상 부분적 혹은 완전 동일성 (partial or complete identity)를 보이는 띠를 관찰할 수 있었고 ELISA 억제 검사에서도 각각 45.8%와 90.0%까지 억제되어 이들 항원 간에는 상당한 교차반응이 관찰되었다.

2. 바퀴벌레와 새우 및 게는 DDGP 상 교차반응을 보이지 않았으나 ELISA 억제 검사에서는 바퀴벌레 항원을 억제제로 사용하였을 경우 새우 및 게 항체와 각각 20%와 25.7%까지 억제되었다.

3. SDS-PAGE 상 바퀴벌레, 전새우 및 전 게는 각각 30개, 32개 및 11개 이상의 항원을 분리할 수 있었다. 이들 항원을 immunoblotting한 결과 항 바퀴 IgG와 반응하는 새우 및 게 항원이 다수 관찰되었고, 항 새우 IgG를 이용한 경우 게 항원과는 상당한 결합을 보였으나 바퀴항원과는 결합하는 띠를 관찰할 수 없었다.

결론적으로 토끼로부터 얻은 IgG항체를 이용하여 double diffusion gel precipitation, ELISA inhibition test 및 Immunoblotting을 시행한 결과 새우와 게 항원 사이에는 부분적 혹은 완전 교차 항원성을 관찰할 수 있었고 바퀴와 갑각류(새우, 게) 사이에도 교차 항원성이 존재함을 시사하는 결과를 얻을 수 있었다.

- Abstract -

An immunologic study of cross-reaction among german cockroach, shrimp and antigens in Korea

Ki Young Lee, M. D., Byung Joo Jeaung, M. D., Soo Young Lee, M. D., Kyu Earn Kim, M. D., and Dong Soo Kim, M. D.

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

To evaluate the antigenic cross reactivity, we underwent double diffusion gel precipitation, ELISA inhibition test and enzyme immunoblotting using rabbit antisera and Yonsei extracts of german cockroach, raw shrimp, steamed shrimp and steamed crab.

Double diffusion gel precipitation(DDGP) shows partial or complete identity between antigens of steamed shrimp and crab, but no cross-reaction between cockroach, shrimp or crab antigens. Using the ELISA inhibition test, there are a great cross reactivity between shrimp and crab antigens and some degree of cross reactivity was noted between cockroach and crustacea(shrimp, crab). The result of immunoblotting of shrimp and crab extracts against rabbit anti-cockroach IgG shows several cross reacting bands of shrimp and crab extracts, and immunoblotting of crab extract against anti-shrimp rabbit IgG shows more than six reacting bands.

REFERENOES

- 1) Sachs MI, O'Connell EJ : Cross-reactivity of foods-mechanisms and clinical significance. *Ann allergy* 61 : 36, 1988
- 2) Potter PC, Juritz J, Littie F, McCaldin M, Dowdle EB : Clustering of fungal antigen-specific IgE antibody responses in allergic subjects. *Ann Allergy* 66 : 149, 1991
- 3) Bernton HS, Brown H : Insect allergy; preliminary studies of the cockroach. *J Allergy Clin Immunol* 35 : 506, 1964.
- 4) Kang B : Study on cockroach antigen as probable causative agent in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 58 : 357, 1976.
- 5) Kang B, Sulit N : A compatative study of prevalence of skin hypersensitivity to cockroach and house dust antigens. *Ann Allergy* 41 : 333, 1978
- 6) 이기영, 김규언 : 면역요법 백신을 처방할 때 불필요한 항원을 배제하는 방법에 관한 연구. *알레르기*, 8 : 150, 1988
- 7) 강석영, 최병휘, 문희범, 민경업, 김유영 : 한국 호흡기 알레르기 환자에 있어서의 피부시험 성적에 관한 연구. *알레르기* 4 : 49, 1984
- 8) 이기영, 김규언, 정병주, 이수영, 김동수 : 한국에 서식하고 있는 바퀴벌레 *Blattella germanica*의 알레르기 항원성에 관한 면역학적 연구. *알레르기* 11 : 33, 1991
- 9) Kettelhut BV, Metcale DD : Adverse reactions to Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginer JW (eds) : *Allergy principles and practice* (3rd ed.). Mosby Co. St. Louis, 1988, p. 1481
- 10) 이기영, 김규언 : 식품제거 또는 유발시험으로 확진된 소아의 식품 알레르기 : I. 속발형 식품알레르기. *알레르기* 7 : 149, 1987
- 11) 장남기 : 한국 동식물 도감. 문교부, 서울, 1986
- 12) Lehrer SB : The complex nature of food antigens : Study of crossreacting crustacea allergens. *Ann Allergy* 57 : 267, 1986
- 13) 백옥현, 강석영 : 바퀴벌레 알레르기 3례. *알레르기*, 3 : 185, 1983
- 14) Baldo BA, Panzani RC : Detection of IgE antibodies to a wide range of insect species in subject with suspected inhalent allergy. *Int Arch Allergy appl Immunol* 85 : 278, 1988.
- 15) Schon L, Lind P, Fernandez-Caldas E, Lockey RF, Lowenstein H : Identification and purification of an important crossreactive antigen from American (*Periplaneta americana*) and German (*Blattella germanica*) cockroach. *J Allergy Clin Immunol* 86 : 935, 1990
- 16) Helm RM, Bandele EO, Swanson MC, Campbell AR, Wynn SR : Identification of German cockroach-specific allergen by human IgE and rabbit IgG. *Int Arch Allergy appl Immunol* 87 : 230, 1988
- 17) Stankus RP, Lehrer SB : Indentification and charcterization of important cockoach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 86 : 781, 1990
- 18) Pollart SM, Mullins DE, Vailes CD, Hyden ML, Platts Mills TAE, Sutherland WE, Champman MD : Identification, quantitation and purification of cockroach allergens using momoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 87 : 511, 1991
- 19) Kang BC, Wilson M, Price KH, Kambara T : Cockroach-allergen study:

- Allergen patterns of three common cockroach species, probed by allergic sera collected in two cities. *J Allergy Clin Immunol* 87 : 1073, 1991
- 20) Zwick H, Popp W, Sertl K, Kauscher H, Wanke T : Allergenic structure in cockroach hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 87 : 623, 1991
 - 21) Lehrer SB, Horner WE, Menon P, Stankus RP : Comparison of cockroach allergenic activity in whole body and fecal extract. *J Allergy Clin Immunol* 87 : 574, 1991
 - 22) Hoffman DR, Day ED, Miller JS : The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy* 47 : 17, 1981
 - 23) Nagphal S, Rajappa L, Metcalfe DD, Subba Rao PV : Isoaltion and characterization of heat stable allergens from shrimp(*Penaeus indicus*). *J Allergy Clin Immunol* 82 : 26, 1989
 - 24) Nagphal S, Metcalfe DD, Subba Rao PV. Identification of shrimp derived allergen as tRNA. *J Allergy Clin immunol* 138 : 4169, 1987.
 - 25) Lehrer SB, Ibanez MD, McCants ML, Daul CB, Magan JE : Characterization of water souble shrimp allergens released during boiling. *J Allergy Clin Immunol* 85 : 1005, 1990
 - 26) Lehter SB, Waring NB, McCant MC : Immunological cross reaction of shrimp, crab, crawfish and lobster allerens. *J Allergy Clin Immunol* 73 : 114, 1984
 - 27) Towbin H, Stalhelin T, Gordon J : Electrophoretic transfer of proteinis from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; precedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 4350, 1979
 - 28) Ebner I, Birkner T, Valenta R, Rumpoid H, Breitenah M, Scheiner O, Kraft D : Common epitopes of birch pollen and applesstudies by western and northern blot. *J Allergy Clin immunol* 88 : 588, 1991
 - 29) Asthma-like illness among crabprocessing wirker : Alaska mobidity mortality weekly report. 31 : 95, 1982.
 - 30) Cartier A, Malo JC, Forrest F, Lafrance M, Pineau L, StAubin JJ, Dubois JY : Occupational asthma in snowcrab processing worker. *J Allergy Clin Immunol* 74 : 261, 1984
 - 31) Cartier A, Malo JC, Ghezso H, McCants M, Lehrer SB : IgE sensitization in snow-crab processing worker. *J Allergy Clin Immunol* 78 : 344, 1986
 - 32) 이수영, 정병주, 김동수, 김규언, 이기영 : 메밀의 알레르기 항원성에 관한 면역학적 연구. *알레르기*, 5 : 546, 1991
 - 33) Waring NP, Daul, CB, deShazo RD, McCant ML, Lehrer SB : Hypersensitivity reactions to ingested crustacea : clinical and diagnostic studies in shrimp sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol* 76 : 440, 1985
 - 34) Morgan JE, O'Neil CE, Daul CB : Speciespecific shrimp allergens : RAST and RAST inhibition studies. *J Allergy Clin Immunol*, 83 : 1112, 1989
 - 35) Eriksson N, Johnsson P, Ryohn B : Cross sensitization between chironomids and crustacea. *Eur Cong Allerg* 1986 (abstract).
 - 36) Tandon N, Maitra SB, Saha GK, Modak A, Hati AK : Role of cockroaches in allergy to house dust in Calcutta, India. *Ann Allergy* 64 : 155, 1990