

꿀벌독 알레르기 환자에서의 꿀벌독에 대한 특이 IgE와 IgG₄ 검출

연세대학교 의과대학 내과학교실

박중원 · 남동호 · 홍천수

서 론

Hymenoptera 목에 속하는 곤충은 일반적으로 꿀벌(apoidea ; honeybee, bumblebee), 말벌(vespoidea ; wasps, hornets, yellow jacket), 그리고 개미로 알려진 formicidea 속으로 크게 구분할 수 있으며¹⁾ 국내에서도 46과 약 1,000여종이 보고된 바 있다²⁾. 미국에서는 전체 인구의 약 20%에서 hymenoptera 독에 대한 피부 반응검사에 양성 반응이 관찰되고³⁾ 전체 인구의 약 0.6~4%에서 벌에 쏘인 후 전신적인 알레르기 반응을 경험하며⁴⁻⁶⁾ 아나필락시스로 인하여 사망하는 경우도 드물지 않게 보고되고 있다⁷⁾. 국내에서도 꿀벌독 아나필락시스와 개미독 아나필락시스가 보고된 바 있으며⁸⁻¹⁰⁾, 농촌지역 아동의 약 2.4%에서 벌에 쏘인 후 알레르기 증세를 경험한 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 더구나 국내에서는 현재 신경통 치료에 민간 요법으로 벌에 쏘이게하는 일이 무분별하게 성행하고 있어 벌독에 의한 아나필락시스가 더욱 우려되는 바이다. 벌독 알레르기 환자의 치료는 주로 회피요법과 대증요법이 이용되며 아나필락시스 환자는 epinephrine 피하주사등의 응급치료가 요망되고 있으나 치료가 지연됨에 따라 사망하는 경우가 있다. 벌독에 의한 아나필락시스 발현을 예방하기 위해 1970년대에 벌 전충체 추출물로 면역요법을 시행한 바 있었으나

그 효과에 대해서는 논란이 많았다^{12,13)}. 그러나 최근 10여년 전부터 벌독 아나필락시스 환자를 대상으로 벌 전충체 추출물 대신에 벌독 추출물로 면역요법을 실시하여 아나필락시스 예방에 좋은 성적이 보고되고 있다^{12,14-17)}. 그러나 이러한 벌독 알레르기 환자의 진단과 벌독면역 치료에는 벌독의 추출이 선행되어야 하며 벌독 추출물에 의한 피부 반응검사와 혈청내의 벌독 특이 IgE의 측정이 진단 및 면역 치료의 경과 관찰에 유용한 지표로 이용되고 있다¹⁸⁻²²⁾. 저자들은 최근에 꿀벌(Apis mellifera Linneus)에서 꿀벌독을 분리하였고 ELISA 방법을 이용한 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄ 측정 시스템을 개발한 바 있다. 이에 본 연구에서는 분리한 꿀벌독과 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄ 측정 시스템이 임상적으로 유용한지 알아보기 위하여, 벌독 알레르기 환자를 대상으로 피부 단자시험을 시행하였으며 이들 환자 및 직계 가족과 Bencard사 제품의 꿀벌(Apis mellifera) 및 말벌(Vespula vulgaris) 전충체 추출물로 피부 단자시험을 시행한 호흡기 알레르기 환자 95례를 대상으로 혈청내 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄를 측정하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

연세 의료원 세브란스 병원 알레르기 특수 크리닉에 내원한 꿀벌독 아나필락시스 환자 1례와 꿀벌에 쏘여도 알레르기 증상이 발현되지 않는 환자의 가족 2명(남편 및 아들), 꿀벌독 두드러기 환자 그리고 말벌독 아나필락시스 환자 각 1례 등 총 5례를 대상으로 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄를 측정하였다. 또한 전충체 추출물로 시행한 피부 단자시험의 유용성을 알아보기 위하여 1990년 1월부터 1991년 9월까지 내원한 호흡기 알레르기 환자를 대상으로 영국 Bencard사 제품인 꿀벌(*Apis mellifera*) 전충체 추출물과 말벌(*Vespa vulgaris*) 전충체 추출물로 피부 단자시험을 시행한 95명의 혈청에서 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄를 측정하였다.

2. 재료 및 방법

1) 꿀벌독 추출액

연세 의료원 세브란스 병원 알레르기 특수 크리닉에 내원한 꿀벌독 아나필락시스 환자로부터 꿀벌을 기증받았다. 꿀벌의 독침과 독낭만을 육안으로 분리한 후 이를 분쇄하였고 여기에 phosphate buffered saline(PBS) 용액 1ml를 첨가한 후 24시간 방치하였다. 이를 원심분리하고 그 상층액을 삼투막(MW 12,000 이하 투과)에 넣어 PBS 용액으로 36시간 투석하여 꿀벌독 추출액을 만들었다. 꿀벌독 추출액의 단백질 함량은 Lowry²³⁾의 방법으로 측정된 바 0.14mg/ml였다.

2) SDS-PAGE 전기 영동

SDS-PAGE는 Laemmli²⁴⁾의 방법을 이용하였으며 분리 gel으로는 10% linear gradient gel을 사용하였다. 전기영동은 slab당 15mA의 일정한 전류가 흐르게 하여 4°C에서 행하였다. 전기영동이 끝난후 gel은 Coomassie brilliant blue R-250(0.1%)을 50% methanol, 12.5% trichloroacetic acid에 녹인 염색액에 18시간 방치하여 염색하였으며 30% methanol, 10% acetic acid 용액에서 탈색하였다. 표준 단백질 시료로는 Sigma사 제품인 myosin(205kD), β -galactosidase(116kD), phosphorylase b(97kD), BSA(66kD), 그리고 ovalbumin(45kD)가 각각 5 μ g씩 포함된 용액 20 μ l를 사용하였다. 각 표준 단백질의

이동거리를 측정하여 relative mobility를 계산하여 표준곡선을 구하고 이 표준곡선에 의하여 시료 단백질의 분자량을 측정하였다.

3) ELISA법

꿀벌독 특이 항체는 ELSA 방법에 의해 측정하였다. 먼저 96 well microplate(Costar Co. Cambridge, MA, USA)의 각 well에 꿀벌독 추출액 2 μ l와 0.1M carbonate buffer(pH 9.6) 100 μ l를 넣고 4°C 냉장고에 18시간 보관한 후 단백질의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 각 well 당 1% bovine serum albumin-phumin-phosphate buffered saline-Tween(PBS-T) 300 μ l씩 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 세척하였다. 검사하고자 하는 환자의 혈청을 각 well에 50 μ l를 넣고 실온에 1시간 보관한 후 PBS-T로 3회 세척하였다. 그후 1 : 1,000 v/v으로 희석한 biotin labelled monoclonal antihuman IgG₄(Sigma)와 polyclonal antihuman IgE(Vector)을 100 μ l씩 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS-T로 3회 세척하였다. 1 : 1,000 v/v으로 희석한 avidin-peroxidase 100 μ l로 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS-T로 세척하였으며 ABTS 용액[2, 2-azino-di-(3 ethylbenzthiazoline sulfonic acid)(Sigma A1888) 55mg을 70mM citrate phosphate buffer(pH 4.2) 100ml에 녹이고 사용시 이 용액 1ml당 30% H₂O₂ 1 μ l씩 혼합하여 사용함] 100 μ l로 5분간 발색시킨 후 2mM sodium azide 100 μ l로 반응을 정지시켰으며 microplate reader 600(Dynateclab. Alexandria, Virginia, USA)으로 410nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 환자 혈청의 측정값은 혈청 대신에 PBS만을 넣어 측정한 background activity를 삭감하고 2 well의 수치를 평균하여 정하였다. 벌에 쏘인 일이 없는 정상 대조군의 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄의 O.D.값은 각각 0.015 $\pm$ 0.006과 0.005 $\pm$ 0.009였으며 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄의 양성 판정 기준은 평균값에 표준편차 2배를 더한 값 0.030 이상으로 정하였다.

4) ELISA 억제 시험

꿀벌독 아나필락시스 환자 혈청에서 측정된 꿀벌독 특이 IgE의 특이성을 알아보기 위해 *D. farinae* 2 μ l(10 μ g)와 꿀벌독 추출물 2 μ l을 각기 꿀벌독 아

나필락시스 환자의 혈청 50 μ l와 혼합한 후 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 18시간 반응시켰다. 대조군으로 환자 혈청 50 μ l를 0.1M carbonate buffer(pH 9.6) 2 μ l와 혼합하여 동일한 환경에서 반응시켰다. 그후 대조 혈청과 각 항원으로 처리한 환자 혈청에서의 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄는 앞서 기술한 ELISA법으로 측정하였다.

꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄가 검출된 호흡기 알레르기 환자의 경우에도 각 환자의 혈청 50 μ l와 꿀벌독 2 μ l를 혼합하여 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 냉장 보관한 후 동일한 방법으로 특이 IgE와 IgG₄를 측정하였다.

5) 통계처리

통계처리는 X²-test, Independent T-test 그리고 One-way 분석으로 하였다.

결 과

1. 꿀벌독 추출물의 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 양상

꿀벌독 추출물 5 μ l로 10% SDS-PAGE 전기영동을 시행한 바 분자량 95, 85, 60, 45, 25, 20, 15, 그리고 9kD에서 8개의 분획이 관찰되었다.

2. 벌독 알레르기 환자와 정상 대조군에서 꿀벌독 추출물로 시행한 피부 단자시험

정상 대조군 4례, 벌독 아나필락시스 환자 1례 그리고 꿀벌에 쏘인 후 두드러기 반응을 경험한 1례를 대상으로 꿀벌독 추출물로 알레르기 피부 단자시험을 시행한 바 정상 대조군 4례는 모두 음성 반응이 관찰되었다. 반면에 꿀벌독 아나필락시스 환자(Pt 1)에서는 팽진 5 $\times$ 3mm/홍반 40 $\times$ 20mm 그리고 꿀벌에 쏘인후 두드러기 증세를 경험한 환자(Pt 2)의 경우에는 팽진 4 $\times$ 3.5mm/홍반 11 $\times$ 12mm으로 모두 양성 반응이 관찰되었다.

3. 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄ 억제 시험

꿀벌독 아나필락시스로 내원한 환자의 혈청 50 μ l를 꿀벌독 추출물 2 μ l와 Dermatophagoides farinae 전충체 항원 10 μ g으로 각기 따로 혼합하여 억제된

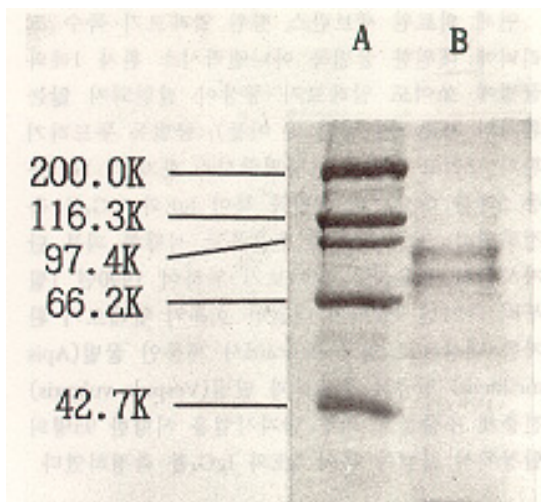


Fig. 1. Honeybee venom extract seperated by 10 % SDS-PAGE. A lane is molecular weight standard and the honeybee venom extract show 8 protein bands with molecular weight of 95, 85, 60, 45, 25, 20, 15, and 9kD respectively on B lane.

환자 혈청과 carbonate buffer(pH 9.6) 50 μ l로 전 처치한 대조 환자 혈청 간에 꿀벌독 특이 IgE 측정값을 비교하였다. 꿀벌독 아나필락시스 환자의 대조 혈청에서 측정된 꿀벌독 특이 IgE의 O.D.값은 0.273이었으며, 꿀벌독 추출물 2 μ l로 억제된 혈청에서는 O.D.값이 0.010로 96% 감소되었으나 D.farinae 10 μ g으로 억제시에는 O.D.값이 0.246으로 대조 혈과 큰 차이가 없었다(Fig. 2).

꿀벌독 특이 IgE가 양성인 8례의 호흡기 알레르기 환자를 대상으로 꿀벌독 추출물 2 μ l로 반응시킨 결과 8례 전 레에서 꿀벌독 특이 IgE가 현저하게 억제되었다. 꿀벌독 특이 IgG₄가 양성인 6례의 호 흡기 알레르기 환자를 대상으로 동일하게 꿀벌독 추출물로 억제시켰을 때는 1례를 제외한 5례에서 꿀벌독 특이 IgG₄가 억제되었다(Fig. 3).

4. 벌독 알레르기 환자 및 가족에서 측정한 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄

꿀벌독 아나필락시스 환자(Pt 1)의 혈청에서 측정한 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄ O.D.값은 각각 0.198,

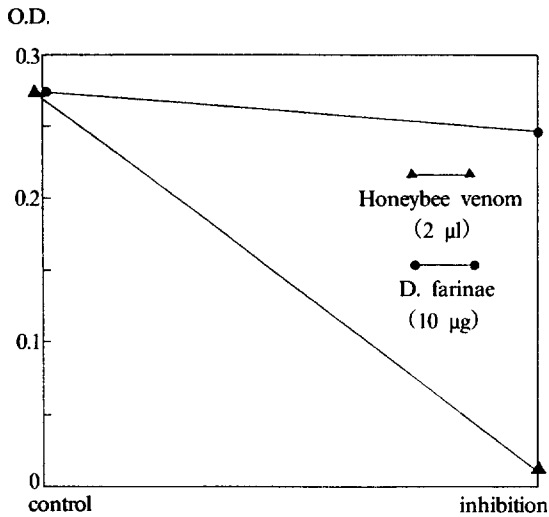


Fig. 2. Inhibition of specific IgE to honeybee venom with 2µl of honeybee venom (▲—▲) and 10µg of *D. farinae* whole body extract (●—●) in the honeybee sting anaphylaxis patient.

0.043으로 벌독에 노출된 과거력이 없는 정상 대조군에 비해 유의하게 높았다. 꿀벌독 아나필락시스 환자의 남편은 양봉을 부업으로 하며 아들과 함께 꿀벌독에 대한 알레르기 증상의 병력이 없었으나 남편의 혈청에서는 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄에 대한 O.D.값이 각각 0.061, 0.032로 모두 양성반응인 것으로 판정하였고 아들은 0.022, 0.016으로 전부 음성이었다. 또한 꿀벌에 쏘인후 두드러기 반응을 경험한 환자(Pt 2)의 혈청에서는 꿀벌독 추출물로

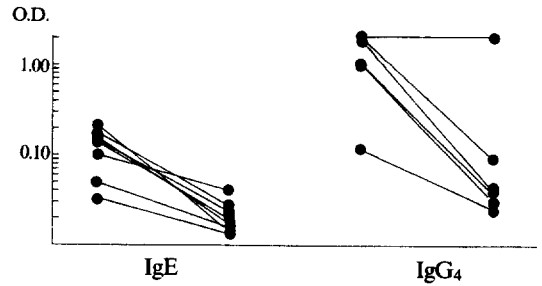


Fig. 3. Inhibition of specific IgE and IgG₄ to honeybee venom with 2µl of honeybee venom extract in the sera of respiratory allergy patients.

시행한 피부 단자시험에는 양성 반응을 보였으나 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄의 O.D.값이 0.019, 0.002로 모두 음성이었다. 말벌독 아나필락시스 환자(Pt 3)의 혈청에서는 꿀벌독 특이 IgE O.D.값은 0.097로 양성으로 판정되었으나 IgG₄는 0.028로 음성으로 나타났다(Table 2).

5. 호흡기 알레르기 환자에서 꿀벌 및 말벌 전충체 추출물 피부 반응도에 따른 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄

호흡기 알레르기 환자 95례중 꿀벌독 특이 IgE는 14예(15%), IgG₄는 7예(7%)에서 검출되었으며 이를 Bencard사의 꿀벌 및 말벌 전충체 추출물 피부 반응도에 따른 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄의 양성율을 살펴보았다.

꿀벌 전충체 추출물로 시행한 피부 단자시험에서

Table 1. Results of skin prick test in the Hymenoptera sting allergy and the control group

Patient	Symptoms	Histamine(mm/mm)	Skin reactivity(mm/mm)		
			Honeybee WBE	Wasp WBE	Honeybee V
Pt 1	honeybee S anaphylaxis	4×4/30×28	-/-	-/-	5×3/40×20
Pt 2	honeybee S urticaria	3×3/26×15	-/-	-/-	4×3.5/11×12
Cont 1	no history	5×3/20×18	ND	ND	-/-
Cont 2	no history	7×6/25×30	ND	ND	-/-
Cont 3	no history	5×5/25×26	ND	ND	-/10×10
Cont 4	no history	4×4/33×25	ND	ND	3×3/-

WBE : whole body extract, V : venom extract, Pt : patient, Cont : control

S : sting, ND : not done

Table 2. Summary of clinical data and the O.D. value of specific IgE and IgG₄ to honeybee venom in the Hymenoptera sting allergy

Patient	Age/Sex	Occupation	Symptoms	Honeybee V	
				IgE	IgG ₄
Pt 1	47/F	housewife	honeybee S anaphylaxis	0.198	0.043
Husband of Pt 1	50/M	bee keeper	no history	0.061	0.032
Son of Pt 1	20/M	student	no history	0.022	0.016
Pt 2	37/F	housewife	honeybee S urticaria	0.019	0.002
Pt 3	21/M	student	hornet S anaphylaxis	0.097	0.028

V : venom extract, Pt : patient, S : sting, M : male, F : female
cut-off value of honeybee venom-IgE ELISA : <0.030 at 410nm
cut-off value of honeybee venom-IgG₄ ELISA : <0.030 at 410nm

3+ 이상인 군에서는 꿀벌독 특이 IgE 양성률은 25%, 2+인 군은 21%, 1+인 군은 17% 그리고 음성인 군은 10%로 피부 반응도가 높은 군에서 꿀벌독 특이 IgE 양성 빈도가 더 높게 나타났으나 피부 반응도와 꿀벌독 특이 IgE 양성률 및 측정값 간에는 통계적으로 의미있는 상관관계를 관찰할 수 없었다. 또한 꿀벌 전충체 추출물 피부 단자시험에 2+인 군에서 꿀벌독 특이 IgG₄의 양성율이 17%로 제일 높았으며, 3+ 이상인 군은 0%, 그리고 음성군에서는 4%로 꿀벌 전충체 추출물 피부 단자 시험의 피부 반응도와 꿀벌독 특이 IgG₄ 양성률 및 측정값 간에 유의한 상관 관계를 발견할 수 없었다(Table 3).

말벌 전충체 추출물에 대한 피부 반응도가 1+인 군에서 꿀벌독 특이 IgE 양성률은 22% 2+인 군은 17%, 3+ 이상인 군은 14%로 말벌 전충체 추출물 피부 반응도와 꿀벌독 특이 IgE 양성률 및 측정값 간에 유의한 상관관계를 관찰할 수 없었다. 말벌

전충체 추출물 피부 반응도와 꿀벌독 특이 IgG₄ 양성률 및 측정값 간에서도 역시 유의한 상관관계를 발견할 수 없었다(Table 4).

6. 호흡기 알레르기 환자와 벌독 알레르기 환자에서 측정된 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄의 상관성

호흡기 알레르기 환자 95예와 벌독 알레르기 환자 및 그 가족 5예의 혈청에서 측정된 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄값 간의 상관 계수를 측정된 바 0.2891로 통계적으로 유의한 상관관계($p < 0.01$)를 발견하였으나(Fig. 4) 꿀벌독 특이 IgE가 검출된 17례에서 특이 IgE와 IgG₄ 측정값을 비교 검토한 경우에는 유의한 상관성을 찾을 수 없었으며 벌독 특이 IgE가 검출되지 않는 83례에서도 벌독 특이 IgG₄가 높은 경우도 4례(5%)있었다.

Table 3. Detection of specific IgE and IgG₄ to honeybee venom according to the skin reactivity with honeybee whole body extract in respiratory allergy

Honeybee specific IgE & IgG ₄	Skin reactivity with honeybee WBE				Total(n=95)
	Negative (n=52)	+	++	+++ ≤	
IgE	5(10%)	1(17%)	6(21%)	2(25%)	14(15%)
IgG ₄	2(4%)	0(0%)	5(17%)	0(0%)	7(7%)

WBE : whole body extract

X² test : P>0.05

Table 4. Detection of specific IgE and IgG₄ to honeybee venom according to the skin reactivity with wasp whole body extract in respiratory allergy

Honeybee specific IgE & IgG ₄	Skin reactivity with wasp WBE				Total(n=95)
	Negative (n=44)	+	++	+++ ≤	
IgE	5(11%)	2(22%)	6(17%)	1(14%)	14(15%)
IgG ₄	5(9%)	0(0%)	3(9%)	0(0%)	7(7%)

WBE : whole body extract

X² test : P>0.05

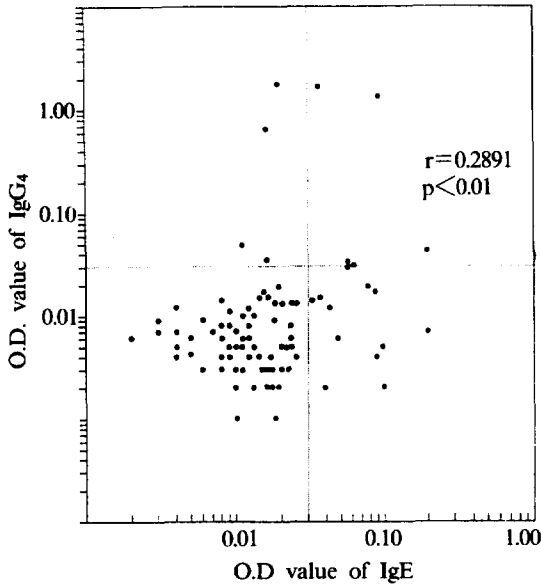


Fig. 4. Correlation between O.D. of IgE and IgG₄-ELISA to honeybee venom in the respiratory and Hymenoptera sting allergy. Broken lines indicate cut-off value of the IgE and IgG₄(P value<0.01).

고 찰

벌독 알레르기 반응의 기전으로는 벌독내 펩타이드 성분의 약리학적 작용 과 세포 매개에 의한 제 4형 면역반응도 관여한다고 보고되고 있으나²⁵⁻²⁷⁾ IgE에 의한 제 1형 면역반응이 주로 관여하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 외국에서는 전체 인구의 0.6~4%에서 벌 자상 후 전신 알레르기 반응이 유발되는 것으로 보고되어 있다³⁻⁶⁾. 국내에서도 벌

자상후 심한 전신 알레르기 반응을 보고한 바 있으며^{8,10)}, 종종 유사 환자를 경험하고 있으나 아직 진단에 벌 전충체 항원을 이용하고 있는 등 벌독 알레르기 질환에 대한 인식이 부족한 실정이다. 이에 저자들은 꿀벌에서 먼저 독낭을 분리하여 꿀벌독 추출물을 만들었으며 이것을 이용하여 벌독 알레르기 환자와 그 가족에서 피부 단자 시험을 시행하였고 이들의 혈청과 호흡기 알레르기 환자의 혈청에서 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄를 ELISA 방법으로 측정하여 그 임상적 의의를 살펴보고자 하였다.

꿀벌독은 크게 고분자량의 효소 성분과 저분자량인 펩타이드 성분으로 구분할 수 있다. 효소 성분은 분자량이 15,800 dalton인 phospholipase A₂, 45,000 dalton인 hyaluronidase 그리고 49,000 dalton인 acid phosphatase 3가지로 구성되어 있으며 phospholipase A₂가 주 알레르겐으로 알려져 있다. 펩타이드 성분으로는 꿀벌독의 약 50%를 차지하는 mellitin(2,840 dalton)과 그외에 apamin(2,038 dalton), mast cell-degranulating peptide(2,590 dalton)가 있다^{1,29)}. 이들 펩타이드는 알레르겐으로 작용하여 비만 세포와 호염기구에서 histamine 및 다른 화학 매개체를 유리시키기도 하지만 주 기능은 약리학적 독소로 작용하여 체내에서 용혈, 모세혈관 투과도 증가 및 염증 반응을 유발하며, 벌자상후 발생하는 증상의 상당 부분이 펩타이드의 약리작용에 의해서 발현된다. 저자들은 꿀벌독 추출물 제조시 분자량이 12,000 dalton 이하인 물질이 투과되는 삼투막으로 꿀벌독을 충분히 여과시켰으므로 펩타이드 성분은 모두 제거되었으리라고 본다. 따라서 본 꿀벌독 추출물에 의한 피부 단자시험

에서의 양성 반응은 펩타이드에 의한 약리 작용이 아니라 꿀벌독의 효소성분인 phospholipase A₂와 hyaluronidase등에 의한 알레르기 반응으로 발현되었을 것으로 생각된다. 꿀벌독 추출물의 SDS-PAGE 전기영동에서 보면 hyaluronidase와 phospholipase A₂의 분자량에 합당한 45kD과 15 kD에서 단백질 분획을 관찰할 수 있었으며 그 이외에도 6개의 단백질 분획이 더 관찰되어 저자들이 이용한 꿀벌독 추출물에는 순수한 꿀벌독 성분 이외에 타 물질이 포함되어 있음을 알 수 있었다. 이는 꿀벌독 추출물 제조시 꿀벌독 뿐만 아니라 독낭, 독침과 일부의 벌 몸체등이 꿀벌독 추출물속에 포함되어있기 때문이라 생각된다.

저자들은 꿀벌독 추출물로 정상 대조군 4례, 꿀벌독 알레르기 환자 2례를 대상으로 피부 단자시험을 시행하였는데 정상 대조군 4례 모두에서 음성 반응이 관찰되었고 꿀벌독 알레르기 환자 2례를 꿀벌 전충체 추출물로 피부 단자시험을 시행하였을 때는 모두 음성 반응이었으나 꿀벌독 추출물로 시행한 피부 단자시험에는 2례 모두 양성 반응이 관찰되어 비록 증례 수는 적지만 꿀벌독 추출물이 꿀벌독 알레르기 환자의 진단에 유용함을 알 수 있었다.

또한 저자들은 꿀벌독 아나필락시스 환자의 혈청에서 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄를 검출하여 꿀벌독 알레르기 환자의 진단에 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄ 측정이 유용함을 알 수 있었다. 그러나 꿀벌에 쏘인 후 두드러기를 경험한 환자는 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄가 모두 음성임에도 불구하고 꿀벌독으로 시행한 피부 단자시험에 양성 반응이 관찰되어 꿀벌독 피부 알레르기 단자시험이 더 예민함을 알 수 있었다. Kagey-Sobotka등³⁰⁾에 의하면 벌독 추출물로 시행한 피부 시험에 양성 반응이 관찰된 환자의 20%에서 RAST 검사상 벌독 특이 IgE가 검출되지 않았다 하며 위양성율도 또한 16%로 보고되고 있다. Blaauw 및 Smithuis³¹⁾는 벌독 특이 IgE와 IgG 측정이 벌독 알레르기 질환이 진단을 향상시키지 않는다 하였고 벌독 아나필락시스 환자중에는 벌독 특이 IgE가 정상 범위 내에 분포하는 경우도 흔한 것으로 보고한 바 있다¹³⁾. Stuckey등⁵⁴⁾의 보고에

의하면 벌독 알레르기 병력을 지닌 환자의 47%만이 RAST 검사상 꿀벌독 특이 IgE가 검출된 것으로 보고하였다. Müller등^{32,33)}은 면역 치료 종료 1년 후에 시행한 벌독 유발검사서 아나필락시스 유발군과 비유발군 간에서 혈청내 꿀벌독 특이 IgE와 IgG값을 비교한 바 두 군간에 있어서 벌독 특이 면역 글로불린 측정값에 유의한 차이가 없었고 꿀벌독 특이 IgE와 IgG 측정으로는 꿀벌독 알레르기 증상의 발현 여부 및 증상 재발시의 중증도를 예측할 수 없다고 보고하였다. 알레르기 증상 유발은 혈청내 IgE 양 또는 세포에 결합된 IgE양보다는 비만 세포와 호염기구 본래의 화학 매개체 유리능이 더 중추적 역할을 담당한다³⁴⁾. 따라서 혈청내 벌독 특이 IgE가 검출되지 않는다 해도 벌독 알레르기를 배제할 수는 없음으로 꿀벌독 알레르기 질환의 진단시 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄ 측정뿐만 아니라 종특이 독으로 시행한 피부 단자시험 결과를 참작하여 결정하여야 할 것으로 생각되었다.

꿀벌독 알레르기 증상은 두드러기, 부종등과 같은 국소 반응이 대부분을 차지하며 전신 반응의 약 70%는 생명에 지장이 없는 경미한 전신성 두드러기 및 혈관성 부종이다. 이러한 경우에는 면역 치료의 대상이 되지 않고 대부분의 경우 벌에 노출되지 않게 주의하면 시간이 경과됨에 따라 점차 증세가 호전되며³⁵⁾, Zora등³⁶⁾에 의하면 최근 1년 내에 벌 자상 병력이 있는 사람의 41%에서 벌독 피부 반응검사에 양성 반응이 관찰된데 비하여 3년 이상 경과된 대상군에서는 단지 6%에서 양성 반응을 관찰하였다. 그러나 벌에 쏘인후 의식이 소실되거나 아나필락시스 속을 경험한 본 꿀벌독 아나필락시스 환자의 경우와 같이 생명이 위독한 전신성 알레르기 병력이 있으면서 피부 단자시험 또는 RAST 검사로 벌독 특이 IgE가 증명되는 경우, 비록 이들 환자의 20%~60%만이 재차 벌에 쏘였을 때 알레르기 증세가 유발되나^{12,31,35,37,38)} 예방적인 목적으로 벌독에 의한 면역요법을 실시하는 것이 좋으며^{25,39)}, 그 예방효과는 95~98%로 알려져 있다^{12,15,17)}.

본 꿀벌독 아나필락시스 환자의 경우에는 피부 단자시험에 양성 반응을 보였고 꿀벌독 특이 IgE

역시 양성으로 꿀벌독 면역치료의 대상으로 판단되며 꿀벌독 특이 IgE 측정이 꿀벌독 면역치료 대상 선정에 도움이 될 것으로 사료된다. 벌독 면역치료는 3년 이상 시행하여야 효과가 있으며 가장 효과적이며 객관적인 효과 판정기준은 벌에 직접 쏘이게한 후 증상의 유발여부를 관찰하는 것이다^{33, 40)}. 그러나 장기간 면역치료를 벌독 피부 반응도가 양성에서 음전되는 경우가 있으며 일반적으로 벌독 특이 IgE는 약간 감소하는데 비해 특이 IgG₁과 IgG₄는 점차 증가하는 것으로 알려져 있어^{41, 42)} 꿀벌독 면역치료의 효과 판정, 치료 중단 여부 결정 그리고 꿀벌독에 대한 방어 효과 판정에 벌독에 대한 피부반응도 측정과 특이 IgE 및 IgG₄ 검출이 절대적인 기준은 되지 않지만 유용한 방법으로 보고되고 있으며^{41, 43-45)}, Golden등²²⁾은 벌독 면역치료 기간이 4년 미만인 경우에는 특이 IgG 혈청 농도가 3μg/l 이상인 환자에서 예방 효과가 더 높았다 하며 4년 이상 벌독 면역 치료시에는 특이 IgG 혈청 농도로 예방 효과를 예측할 수 없는 것으로 보고하였다.

본 환자의 남편은 부업으로 양봉을 하며 꿀벌에 쏘여도 알레르기 반응이 유발되지 않는다. 꿀벌독 추출물로 시행한 피부 단자시험에 남편은 음성 반응이 관찰되었으나 혈청에서는 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄가 모두 소량 검출되었다.

양봉업자와 장기간 벌독 면역치료를 받은 환자를 대상으로 시행한 연구에 의하면 꿀벌독 특이 IgG₄가 검출되고 특이 IgE와 IgG₄간에 역 상관관계가 관찰되며 이 IgG₄가 특이 IgE의 알레르기 반응을 차단하는 것으로 보고하고 있다^{1, 13, 21, 46)}. Aalberse등²⁰⁾은 면역 치료시 IgG₄가 증가하는데 이는 만성적으로 항원에 노출되어 특이 IgG₄가 생성되며 이 IgG₄가 차단 항체로서의 역할을 하여 면역 치료의 효과를 획득한다는 가설을 제시한 바 있다. 꿀벌독이나 필락시스 환자의 남편은 꿀벌독 특이 IgE가 양성임에도 불구하고 알레르기 반응이 유발되지 않은 것은 IgG₄가 증가되어 있어 이 IgG₄가 꿀벌독 특이 IgE에 의한 알레르기 반응을 억제한 것으로 생각된다. 그러나 벌독 특이 IgG₄가 단순히 항원의 만성적인 노출에 의해 생성된 항체인지 혹은 차단 항체로서 알레르기 반응을 억제하는지에 대해서는

아직 확실히 규명되어 있지 않으며 추후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 호흡기 알레르기 환자 95례와 벌독 알레르기 환자 3례 및 그 가족 2례 등 총 100례에서 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄를 측정 비교한 바 꿀벌독 특이 IgE가 검출된 17례 중 IgG₄가 검출된 예는 6례, IgG₄가 검출되지 않은 예가 11례이었으며, 꿀벌독 특이 IgE가 검출되지 않은 83례 중에도 IgG₄만 높게 측정된 예도 4례가 있어 이 사람들에서의 벌독 알레르기 반응에 대한 특이 IgG₄의 방어효과 여부에 대하여 추후 검토가 요망되는 바이다.

임상적으로 벌독 알레르기의 원인이 되는 벌을 규명하기는 쉽지 않다. 꿀벌에 쏘인 경우에는 쏘인 자리에 독침을 관찰할 수 있으나 말벌은 그렇지 않다. 말벌에 쏘인 후 아나필락시스를 경험한 환자(환자 2)는 벌에 쏘인 자리에 독침을 발견할 수 없었으며 나무가지에 달려있는 벌집을 일부러 건드리다가 벌에 쏘여 비록 말벌을 직접 확인할 수 없었지만 문진상 말벌독에 의해 아나필락시스가 유발되었으리라 생각하였다. 말벌독 아나필락시스 환자의 혈청에서 꿀벌독 특이 IgE가 검출되었다. 이는 말벌독 아나필락시스 환자가 말벌독 항원에 반응할 뿐 아니라 꿀벌독 항원에도 교차반응을 일으키는 것으로 사료되고 있는 꿀벌독과 말벌독의 항원 성분에 있는 교차 항원 때문으로 생각된다. Schubert등⁴⁷⁾에 의하면 Hymenoptera 알레르기 증세를 호소한 소아 환자의 다수에서 꿀벌독과 말벌독 피부 단자시험에 모두 양성 반응을 보였다 하며 Light 및 Reisman⁴⁸⁾은 벌독 알레르기 환자 99례를 대상으로 꿀벌독, 말벌의 일종인 hornet과 yellow jacket 벌독 특이 IgE를 각각 측정한 바 약 반수에서 2종 이상의 벌독 특이 IgE가 검출되는 것으로 보고하였다. Reisman등⁴⁹⁾과 Reisman 및 Lazell⁵⁰⁾에 의하면 꿀벌독 및 yellow jacket 독 특이 IgE가 모두 높은 환자들을 대상으로 각각의 벌독으로 억제반응을 시행한 바 서로 교차 억제반응이 관찰되지 않는 군, 꿀벌독에 의해서만 억제 반응이 나타나는 군, yellow jacket 독에 의해서만 억제되는 군, 양 독에 의해서 모두 억제되는 군 등 4가지 형태로 구분할 수 있다고 보고하였다. 따라서 본

말벌독 아나필락시스 환자는 꿀벌독과 말벌독에 서로 교차반응이 있을 가능성과 꿀벌독 및 말벌독에 각각 따로 감작되었을 가능성도 있다.

저자는 Bencard사의 꿀벌과 말벌 전충체 추출물로 피부 단자시험을 시행한 호흡기 알레르기 환자 95예를 대상으로 전충체 추출물에 대한 피부 반응도에 따른 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄의 양성 빈도를 조사하였으나 통계적 의미를 발견할 수 없었다. Schwartz⁵¹⁾와 Schwartz⁵²⁾이 보고한 바에 의하면 벌 전충체 추출물로 검사한 피부 단자시험은 의미가 없으며 벌 전충체 추출물과 벌독 추출물로 정상인을 대상으로 각각 피부 단자 시험을 시행한 바 벌독 항원이 1.0μg/ml 포함된 추출물로 피부 단자시험을 실시한 경우에는 위양성율이 관찰되지 않았으나 전충체 추출물로 피부 단자시험을 시행한 군에서 위양성율이 높았다. Hunt⁵³⁾도 1.0μg/ml의 벌독 추출물을 이용하여 벌독 알레르기 환자 30예를 대상으로 피부 반응도를 검사한 바 100%에서 양성 반응을 관찰하였고 벌독 알레르기 질환 진단에 벌독 추출물에 의한 피부 시험이 유용함을 보고한 바 있다. 본 연구에서 꿀벌 및 말벌 전충체 추출물에 대한 피부 반응도와 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄의 양성 빈도간에 유의한 연관성을 찾을 수 없었으며 이는 꿀벌 전충체 추출물로 시행한 피부 단자시험의 위양성률이 높았기 때문으로 생각된다. 앞으로 꿀벌독 추출물로 시행한 피부 반응도에 따른 혈청내 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄의 양성빈도 및 측정값의 비교 연구가 필요할 것으로 생각되며 꿀벌 전충체 항원에 의한 피부 단자시험의 임상적 효용성에 대해서 재 검토하여야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 꿀벌 전충체 추출물에 피부 반응도가 음성인 호흡기 알레르기 환자 52례중 5례 (10%)에서 꿀벌독 특이 IgE가 검출되는 등 모두 14례(15%)에서 꿀벌독 특이 IgE가 검출되었다. 이 결과는 벌독 알레르기 반응을 경험하지 않은 예를 대상으로 특이 IgE 양성률을 측정하여 보고한 Stuckey⁵⁴⁾의 13.9%, Jarish⁵⁵⁾의 10.4%와 매우 유사한 결과이다. 또한 Jarish⁵⁵⁾은 꿀벌독 추출물 1회 접종시 비알레르기 대상군의 14%에서, 2회 접종시에는 31%에서 꿀벌독 특이 IgE가 검출되는

것으로 보고하였으며 꿀벌독 감작정도는 시간이 경과함에 따라 점차적으로 저하되는 것으로 보고되고 있다^{5,36,54)}. 혈청내에서 꿀벌독 특이 IgE가 검출되는 사람은 모두 꿀벌에 쏘인후 알레르기 증세를 발현하는 것은 아니다. Charpin⁶⁾에 의하면 벌에 쏘여도 알레르기 반응이 관찰되지 않는 82례중 14.6%에서 RAST 검사상 벌독 특이 IgE가 검출되어 벌독 알레르기 질환 진단에 있어서 꿀벌독 특이 IgE 측정이 도움이 되지만 유병률 측정에 적합하지 않음을 보고하였다. 현재까지 이러한 무증상 꿀벌독 특이 IgE 양성군의 임상적 의미에 대해서 명확하게 규명되지 않았으며 앞으로 이에 대한 연구가 필요하리라 생각되었다. 그러나 국내 알레르기 환자중 상당수가 꿀벌독 알레르기 질환에 이환되어 있으리라 생각되며 꿀벌독 알레르기예보다 더 관심을 가져야 할 것이다.

이상을 종합하여 보면 벌독 알레르기 질환의 진단, 치료 방침 결정 그리고 경과 관찰에 벌독에 의한 피부 단자시험과 특이 IgE와 IgG₄의 측정이 도움이 될 것으로 생각되었으며 앞으로 무증상 꿀벌독 특이 IgE 양성 환자군에 대한 연구가 필요하리라 생각되었다.

결 론

꿀벌에서 독침이 붙은 독낭만을 따로 분리한 후 이를 꿀벌독 추출물로 제조하였으며 이것으로 꿀벌독 알레르기 환자 및 가족을 대상으로 피부 단자시험을 실시하였다. 또한 본원 내과에 내원한 꿀벌독 알레르기 환자 2례와 그 가족 2례, 말벌독 알레르기 환자 1례 그리고 호흡기 알레르기 환자중 Bencard사 제품인 꿀벌(*Apis mellifera*)과 말벌(*Vespa vulgaris*) 전충체 추출물로 알레르기 피부 단자시험을 시행한 95례의 혈청을 가지고 ELISA 방법으로 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 독낭과 독침으로 만든 꿀벌독 추출물을 Lowry 방법으로 측정한 단백질 함량은 0.14mg/ml였으며, SDS-PAGE 전기 영동으로 꿀벌독 추출물을 분석한 바 분자량이 95, 85, 60, 45, 25, 20, 15, 9kD인 8개의

단백질 분획을 관찰할 수 있었다.

2. 꿀벌독 추출물로 정상 대조군 4례, 꿀벌독에 의한 아나필락시스 그리고 두드러기 환자를 대상으로 피부 단자시험을 시행한 바 꿀벌독 아나필락시스 환자와 꿀벌독 두드러기 환자에서는 꿀벌 전충체 추출물에 대하여 모두 음성 반응이 관찰된 반면, 꿀벌독 추출물에는 2례 모두 양성 반응이 관찰되었다. 또한 정상 대조군 4례는 꿀벌독 추출물에 모두 음성 반응을 나타내었다.

3. 꿀벌독 아나필락시스 환자의 혈청에서는 꿀벌독 특이 IgE(O.D. : 0.198)와 IgG₄(O.D. : 0.043)가 모두 검출되었다. 꿀벌독 특이 IgE 측정값은 *D. farinae* 전충체 항원으로 억제시에는 IgE O.D.값은 감소하지 않으나 꿀벌독으로 전처치에는 96% 감소하여 꿀벌독 추출물의 항체 특이성이 증명되었다. 말벌독 아나필락시스 환자의 혈청에서 꿀벌독 특이 IgE가 검출되었으나(O.D. : 0.097) IgG₄는 검출되지 않았다. 이에 비해 꿀벌에 쏘인 후 두드러기를 경험한 환자에서는 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄를 모두 검출할 수 없었다.

4. 호흡기 알레르기 환자 95예 중 꿀벌독 특이 IgE는 14례(15%)에서, IgG₄는 7례(7%)에서 검출되었으나 꿀벌 및 말벌 전충체 추출물로 검사한 피부 반응도에 따른 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄의 양성 빈도를 비교 조사한 바 통계적 유의성을 발견할 수 없었다.

5. 호흡기 및 벌독 알레르기 환자 총 100례를 대상으로 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄간의 연관성을 조사한 바 통계적 유의성을 찾을 수 있었으나($r=0.2891$, $p<0.01$) 꿀벌독 특이 IgE가 양성인 17례에서는 유의한 상관관계를 발견할 수 없었다.

이상의 결과로 보아 꿀벌독 알레르기 환자는 꿀벌독으로 피부 단자시험을 시행해야 하고 꿀벌독 특이 IgE와 IgG₄를 측정하는 것이 진단 뿐만아니라 면역 치료 대상 선정 및 경과 관찰에 도움이 되리라 생각되며 추후 꿀벌독 추출물로 검사한 피부 반응도와 꿀벌독 특이 IgE 및 IgG₄ 간의 연관성에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

핵심되는 말 : 꿀벌독, 벌독 알레르기, IgE, IgG₄

- Abstract -

Detection of Honeybee Venom Specific IgE and IgG₄ in Honeybee Venom Allergy

Jung-Won Park, M.D., Dong-Ho Nahm, M.D.,
and Chein-Soo Hong, M.D., Ph.D.

Department of Internal Medicine, College of
Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Hymenoptera sting allergy, it's incidence being reported to be as high as 4% of general population, remains as an important clinical as well as research agenda. In this study, honeybee venom was extracted from crushed venom sac. Skin prick test using this venom was performed to the patients who were known to be allergic to Hymenoptera sting. In addition, the authors attempted to detect specific IgE and IgG₄ to honeybee venom utilizing ELISA methods in several category of the subjects ; 3 patients who has definite history of allergy following the Hymenoptera sting, two immediate family members of the patients with the history of honeybee sting anaphylaxis, and 95 cases of respiratory allergy who already had undergone skin prick test using Bencard's® bee and wasp whole body extracts.

1) The protein content of honeybee venom extract, as quantitatively measured by Lowry method, was 0.14mg/ml. SDS-PAGE demonstrated the presence of 8 bands with the molecular weight of 95, 85, 60, 45, 25, 20, 15 and 9 kD respectively.

2) None of the 4 subjects in normal control group showed positive response to skin prick test with the honeybee venom. In contrast,

strong positive response were noted in two patients with a history of anaphylaxis or urticaria following honeybee sting.

3) In the patients with a history of honeybee sting anaphylaxis, we were able to document the presence of high level of specific IgE and IgG₄ to honeybee venom by ELISA method (O.D. : 0.198, 0.043 respectively). This high level of specific IgE was inhibited specifically by honeybee venom, not by *D. farinae* whole body extract. In one patient of honeybee sting urticaria, specific IgE and IgG₄ were not detected, even though she showed a positive response to the skin prick test with honeybee venom extract.

4) Among the 95 cases of respiratory allergy who had undergone the skin prick test using whole body extracts of honeybee and wasp, honeybee venom specific IgE were detected in 14 patients and IgG₄ in 7 patients. However, the presence of honeybee venom specific immunoglobulines were not correlated with their skin reactivities to the whole body extracts of honeybee and wasp.

5) The O.D. value of specific IgE and IgG₄ showed modest correlation in the respiratory and Hymenoptera sting allergy patients ($n=100$, $r=0.2891$, $p<0.01$). However, in 17 patients who had specific IgE to honeybee venom in their sera, we were not able to find any significant correlation between the level of IgE and IgG₄.

In conclusion, the skin prick test with honeybee venom appears to have high sensitivity in patients with honeybee sting allergy. Additionally, the specific IgE and IgG₄ to honeybee venom were demonstrated in honeybee sting anaphylaxis. Therefore, this study strongly suggests that the skin prick test with honeybee venom and the measurement of venom speci-

fic IgE and IgG₄ would subserve a valuable tool in terms of diagnosis as well as clinical management of honeybee sting allergy.

KEY WORDS : Honeybee venom · Hymenoptera sting allergy · IgE · IgG₄.

REFERENCES

- 1) Valentine MD : Insect venom allergy : diagnosis and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 73 : 299-305, 1984
- 2) 신유향 : 막시 곤충류의 생태학. 대한 알레르기학회 제 8회 심포지움 “곤충 알레르기 초록 pp9-10, 1977
- 3) Golden DBK, Valentine MD, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM : Prevalence of Hymenoptera venom allergy. Abstracted. *J Allergy Clin Immunol* 9 : 124, 1982a
- 4) Settipane GA, Newstead GJ, Boyd DK : Frequency of Hymenoptera allergy in an atopic and normal population. *J Allergy Clin Immunol* 50 : 146-150, 1972
- 5) Golden DBK, Marsh DG, Kagey-Sobotka A, Freidhoff L, Szkio M, Valentine MD, Lichtenstein LM : Epidemiology of insect venom sensitivity. *JAMA* 262-240-244, 1989b
- 6) Charpin D, Birnbaum J, Lanteaume A, Vervloet D : Prevalence of allergy to Hymenoptera stings in different samples of the general population. *J Allergy Clin Immunol* 90 : 331-334, 1992
- 7) Barnard JH : Studies of 400 Hymenoptera sting deaths in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 52 : 259-264, 1973

- 8) 문희범 · 강석영 : 꿀벌(*Apis mellifera* Linne) 독 알레르기 1예. 알레르기 2 : 30-34, 1982
- 9) 강석영 · 장석일 · 민경업 · 문희범 · 김유영 : 개미독에 의한 전신성 알레르기 1례. 알레르기 5 : 183-189, 1985
- 10) 강석영 · 문희영 · 민경업 · 최병휘 · 김유영 : 중독했던 벌독 알레르기 1예. 알레르기 6 : 214-218, 1986
- 11) 문희범 · 강석영 : 농촌아동들의 벌독 알레르기에 관한 역학적, 임상적 조사. 서울대학술지 22 : 385-291, 1981
- 12) Hunt KJ, Valentine MD, Kagey-Sobotka A, Benton AW, Amodio FJ, Lichtenstein LM : A controlled trials of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med* 299 : 157-161, 1978
- 13) Lichtenstein LM : Insect allergy : the state of the art. *J Allergy Clin Immunol* 64 : 5-12, 1979
- 14) Busse WW, Reed CE, Lichtenstien LM, Reisman RE : Immunotherapy in bee-sting anaphylaxis : use of honeybee venom. *JAMA* 231 : 1154-1156, 1975
- 15) Golden DBK, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM : Dose dependence of Hymenoptera venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 67 : 370-374, 1981
- 16) Lichtenstein LM, Valentine MD, Kagey-Sobotka A : A case for venom treatment in anaphylactic sensitivity to Hymenoptera sting. *N Engl J Med* 290 : 1223-1227, 1974
- 17) Reisman RE, Livingston A : Venom immunotherapy : 10 years of experience with administration of single venoms and 50µg maintenance doses. *J Allergy Clin Immunol* 89 : 1189-1195, 1992
- 18) Reisman RE, Wypych JI, Arbesman CE : Stinging insect allergy detection and clinical significance of venom IgE antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 56 : 443-449, 1975
- 19) Grant JA, Goldblum RM, Rahr R, Thueson DO, Farnam J, Gillasp J : Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for immunoglobulin G antibodies against insect venom. *J Allergy Clin Immunol* 68 : 112-118, 1981
- 20) Aalberse RC, van der Gaag R, van Leeuwen J : Serologic aspects of IgG₄ antibodies I. prolonged immunization results in an IgG₄-restricted response. *J Immunol* 130 : 722-726, 1983
- 21) Cheung NV, Moore JB, Reid MJ, Yang G : Honey bee venom specific immunoglobulin G₄ in honey bee sting allergic patients and bee keepers. *Ann Allergy* 50 : 155-160, 1983
- 22) Golden DBK, Lawrence ID, Hamilton RH, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM : Clinical correlation of the venom-specific IgG antibody level during maintenance venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 90 : 386-393, 1992
- 23) Lowry J, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193 : 265-275, 1951
- 24) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970
- 25) Reisman RE : Insect allergy. In : Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yuninger Jw, eds. *Allergy principles and practice*. 3rd ed. St. Louis, Mosby Co, 1988, p1345-1364
- 26) Lesourd B, Paupe J, Thiollot M, Moulias R, Saint-Laudy J, Scheinmann P : Hymenoptera venom immunotherapy I. Induction of T-cell-mediated immunity by honeybee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 83 : 563-571, 1989a
- 27) Lesourd B, Paupe J, Melani M, Saint-Laudy J, Moulias R, Scheimann P : Hymenoptera venom immunotherapy II. T proliferative and T suppressive activities induced by *Vespa* immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 83 :

- 572-580, 1989b
- 27) Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Benton AW, Lichtenstein LM : Allergy to insect stings. I. Diagnosis of IgE-mediated Hymenoptera sensitivity by venom-induced histamine release. *J Allergy Clin Immunol* 53 : 170-184, 1974
- 29) Habermann : Bee and wasp venoms : the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science* 177 : 314-322, 1972
- 30) Kagey-Sobotka A, Adkinson NF, Valentine MD, Lichtenstein LM : Allergy to insect stings IV. Diagnosis by radioallergosorbent test (RAST). *J Immunol* 121 : 2477-2484, 1978
- 31) Blaauw PJ, Smithuis LOMJ : The evaluation of the common diagnostic methods of hypersensitivity for bee and yellow jacket venom by means of an in-hospital insect sting. *J Allergy Clin Immunol* 75 : 556-562, 1985
- 32) Müller U, Helbling A, Bischof M : Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honeybee venom. *Allergy* 44 : 412-418, 1989
- 33) Müller U, Berchtold E, Helbling A : Honeybee venom allergy : Results of a sting challenge 1 year after stopping successful venom immunotherapy in 86 patients. *J Allergy Clin Immunol* 87 : 702-709, 1991
- 34) Conroy MC, Adkinson NF, Lichtenstein LM : Measurement of IgE on human basophils : Relation to serum IgE and anti-IgE-induced histamine release. *J Immunol* 118 : 1317-1321, 1977
- 35) Savliwala MN, Reisman RE : Studies of the natural history of sting-insect allergy : Long-term follow-up patients without immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 80 : 741-745, 1987
- 36) Zora JA, Swanson MC, Yunginger JW : How common is unrecognized Hymenoptera venom allergy in the general population ? *J Allergy Clin Immunol Abstracted* 73 : 139, 1984
- 37) Reisman RE : Natural history of insect sting allergy : Relationship of severity of symptoms of initial sting anaphylaxis to re-sting reactions. *J Allergy Clin Immunol* 90 : 335-339, 1992
- 38) van der Linden PWG, Hack CE, Poortman J, Vivie-Kipp YC, Struyvenberg A, van der Zwan JK : Insect-sting challenge in 138 patients : Relation between clinical severity of anaphylaxis and mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 90 : 110-118, 1992
- 39) Barsky HE : Sting insect allergy Avoidance, identification, and treatment. *PGM* 82 : 157-162, 1987
- 40) Golden DBK, Addison BI, Gadde J, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM : Prospective observations on stopping prolonged venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 84 : 162-167, 1989a
- 41) Golden DBK, Meyers DA, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM : Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 69 : 489-493, 1982b
- 42) Djurup R, Malling HJ, Sørensen I, Weeke B : The IgE and IgG subclass antibody response in patients allergic to yellow jacket venom undergoing different regimens of venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 76 : 46-55, 1985
- 43) Bar-Sela S, Levo Y : Bee venom immunotherapy : Clinical and immunologic observations. *Ann Allergy* 47 : 460-463, 1981
- 44) Graft DF, Schuberth KC, Kagey-Sobotka A, Kwiterovich KA, Niv Y, Lichtenstein LM, Valentine MD : The development of negative skin tests in children treated with venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 73 : 61-68, 1984

- 45) Urbanek R, Forster J, Kuhn W, Ziupa J : Discontinuation of bee venom immunotherapy in children and adolescents. *J Pediatr* 107 : 367-371, 1985
- 46) Nakagawa T : IgG subclass changes in response to desensitisation. *Monogr Allergy* 19 : 253-261, 1986
- 47) Schuberth KC, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Szklo M, Kwiterovich KA, Valentine MD : Epidemiologic study of insect allergy in children. II. Effect of accidental stings in allergic children. *J Pediatr* 102 : 361-365, 1983
- 48) Light WC, Reisman RE : Sting insect allergy changing concepts. *PGM* 59 : 153-157, 1976
- 49) Reisman RE, Arbesman CE, Lazell MI : Studies of coexisting honeybee and vespid venom sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 73 : 246-252, 1984
- 50) Reisman RE, Lazell MI : Further studies of the patients with both honeybee and yellow jacket venom-specific IgE. Abstracted. *J Allergy Clin Immunol* 75 : 207, 1985
- 51) Schwartz HJ : Skin sensitivity in insect allergy. *JAMA* 194 : 113-115, 1965
- 52) Schwartz HJ, Lockey RF, Sheffer AL, Parrino J, Busse WW, Yunginger JW : A multicenter study on skin-test reactivity of human volunteers to venom as compared with whole body Hymenoptera antigens. *J Allergy Clin Immunol* 67 : 81-85, 1981
- 53) Hunt KJ, Valentine MD, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM : Diagnosis of allergy to sting insects by skin testing with Hymenoptera venoms. *Ann Intern Med* 85 : 56-59, 1976
- 54) Stuckey M, Cobain T, Sears M, Cheney J, Dawkins RL : Bee venom hypersensitivity in Busseton. *Lancet* 2 : 41, 1982
- 55) Jarish R, Zajc J, Buzath A : The risk of sensitization of non-allergic persons to bee venom. *Arch Dermatol Res* 273 : 173, 1982