

Dermatophagoides pteronyssinus

항원 분획별 알레르기 면역반응

연세대학교 의과대학 내과학교실, 생화학-분자생물학교실*, 기생충학교실**

박중원·박상욱*·고시환·김철우·이한일**·오상환*·홍천수

서 론

집먼지진드기는 우리나라 뿐만 아니라 전 세계적으로 가장 중요한 원인 알레르겐으로 알려져 있으며, 그중 *Dermatophagoides pteronyssinus* 와 *Dermatophagoides farinae*가 가장 중요한 우점종으로 알려져 있고 우리나라의 각 지역마다 이들 분포에 약간의 차이가 있다¹⁻³⁾.

집먼지진드기 내에는 50여가지의 항원 성분이 발견되며 알레르겐으로 작용하는 것은 약 30여가지가 알려져 있으며^{4,5)} 이중 환자 혈청의 50% 이상에서 발견되는 알레르겐을 주알레르겐으로 부르는데 집먼지진드기의 경우에는 현재까지 group 1(분자량-25kD), group 2(15kD), group 3(29kD), group 4(60kD), group 5(14kD), group 6(25kD), 그리고 group 7(22-28kD) 알레르겐 등 7개의 주알레르겐이 밝혀져 있으며, 이들의 분자량은 대부분 30kD 이하로 보고되고 있다⁶⁻⁸⁾. 그러나 일부에서는 Mag 1(39kD), Mag 3(177kD),

Mag 29(68kD), 그리고 Mag 44(37kD) 과 같이 30kD 이상 되는 분자량 분획도 집먼지진드기에 감작된 환자에서 알레르겐으로 작용하는 것으로 보고되고 있다⁹⁻¹¹⁾.

최근 들어 알레르기 면역반응의 연구가 세포의 클론 단위로 내려감에 따라, 집먼지진드기 항원의 분자생물학적 면역반응 연구를 위해서는 전충체 항원만으로는 불충분하고, 주알레르겐의 순수 분리가 필수적이며, 외국에서는 순수분리 또는 유전자 재조합법으로 생산한 주알레르겐을 이용한 알레르기 면역반응에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다¹³⁻¹⁵⁾.

이에 연구자 등은 집먼지진드기 내 주알레르겐을 포함하는 단백질 분획(분자량 30kD 이하)과, 이상 되는 분획을 gel filtration chromatography 법으로 분리하였으며, 이들 추출된 분획에 따른 알레르기 피부반응과 특이 IgE 및 IgG 면역반응을 조사하고 이들 분리된 집먼지진드기 항원 분획을 임상 및 연구목적으로 이용할 수 있는지 살펴보았다.

*본 연구과제는 한국과학재단의 목적기초(KOSEF) 과제번호 :93-04-0015) 연구과제의 일환으로 수행되었음.

통신저자 : 연세의대 내과 홍천수

연구 재료 및 방법

1. 대상환자

연세의료원 신촌 세브란스 병원 알레르기 특수진료소에 내원한 환자 33예(집먼지진드기 아토피성 25예, 비아토피성 8예)와 의대 학생 18예(집먼지진드기 아토피성 16예, 비아토피성 2예)를 대상으로 *D. pteronyssinus* 항원 분획별 알레르기 면역반응을 비교하였다. 내원 환자의 평균 연령은 39.6 ± 14.5 세였으며 남녀비는 17:16였다. 의대 학생 18예는 모두 남성이었으며 평균 연령은 25.5 ± 1.3 세였다. 아토피군의 평균 연령은 33.2 ± 13.3 세였으며 비아토피군은 40.4 ± 12.9 세로 두 군간에 유의한 차

이는 관찰되지 않았다.

2. 집먼지진드기 항원 분자량 분획별 분리

Ethylether로 탈지방화시킨 집먼지진드기(*D. pteronyssinus*) 총체 1 gm을 1:50 W/V으로 PBS와 혼합한 뒤 냉장실에서 72시간 진탕한 후 냉장 초고속 원심분리기를 이용하여 상층액을 분리하였다. 이를 분자량 10,000 이하 투과성 투석막으로 증류수에 72시간 투석한 후 농축하여 Sephacryl S-100 column에 넣어 0.3 ml/min의 유출속도로 *D. pteronyssinus* 항원을 분획별로 분리하였다. 유출액은 5 ml씩 받아 spectrophotometer 상 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다(Fig. 1).

3. *D. pteronyssinus* 집먼지진드기 분획별

알레르기 피내시험용 항원 제조

분획 I, II, III 용액을 Lowry 방법¹⁶⁾으로 단백질을 정량한 후 *D. pteronyssinus* 각 분획은 15 μ g/ml, 그리고 *D. pteronyssinus* 전총체 항원은 20 μ g/ml되게 0.04% 인혈청 알부민-0.4% 페놀 생리식염수로 희석하였다. 그후 이를 ultrafilter로 투과한 후 알레르기 피내 시험에 이용하였다.

4. 알레르기 피내반응시험

모든 대상 환자는 검사하기 7일전부터 항히스타민제의 복용을 중지하여 약물에 의한 영향을 배제하였다. 피내반응시험은 검사 항원, 양성 대조시약(histamine 0.1mg/ml), 그리고 음성 대조시약(0.5% human albumin-0.4% phenol saline)을 주사하여 4~6mm 되는 수포를 만들어 시행하였으며 15분 후에 결과를 판독하였다. 피내반응시험 결과는 히스타민 대조시약 (0.1mg/ml)에 의한 팽진과 검사 항원에 의한 팽진의 면적을 측정 비교(A/H ratio)하여 결정하였다. 팽진 면적은 IBM PC의 Brain

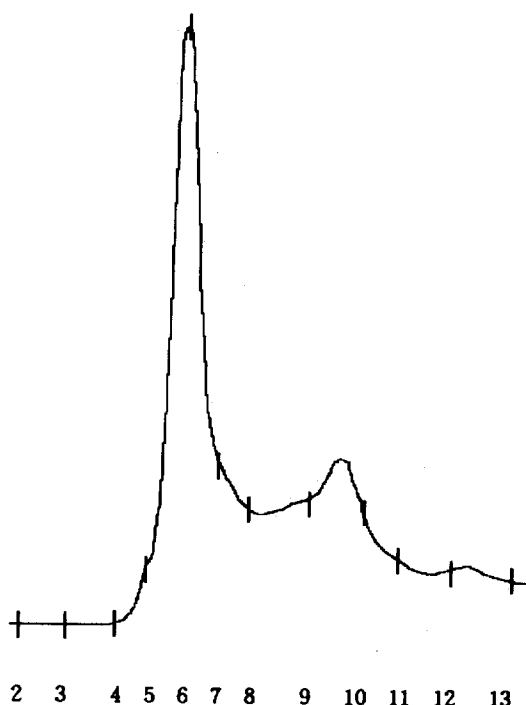


Fig. 1. Gel filtration chromatography with Sephacryl S-100. We collected fraction 5 and 6 as high molecular fraction(fraction I), fraction 9 and 10 as intermediate fraction(fraction II), and fraction 13 and 14 as low molecular fraction(fraction III).

소프트웨어 및 scanner를 이용하여 측정하였다.

5. SDS-PAGE 및 immunoblotting법

대상 항원(D. pt 전충체 항원, 분획 I, II, III 항원)을 Laemmli 법¹⁷⁾에 준해서 4% stock-ing gel-12% polyacrylamide analytical gel SDS-PAGE를 시행하였다. 먼저 항원을 sample buffer와 혼합하여 1분간 끓인 후 130V에서 2시간 전기영동 하였다. 이를 TE22 Mighty small Transpor(Hoefer Co., USA)를 이용하여 350mA에서 1시간동안 nitrocellulose membrane(pore size-0.45 μ m, Hoefer Co., USA)에 전이시킨 후 1% fullname로 상온에서 1시간동안 비특이적 단백질을 차단한 후 이를 4mm 간격으로 절단하였다. 알레르기 피부 반응검사에 강한 반응이 관찰된 10예와 음성반응이 관찰된 4예의 혈청을(IgG immunoblot 1:100 희석, IgE immunoblot 1:5로 희석) 상온에서 18시간 반응시켰다. Biotin이 결합된 polyclonal antihuman IgE(Vector Co, USA)와 monoclonal IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4(Sigma Co, USA)를 1:500으로 각각 희석하여 90분간 반응시킨 후 streptavidin peroxidase(Sigma Co, USA)를 1:1000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 발색은 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma Co)로 하였다.

6. 항원 분획별 특이 IgE 및 특이 IgG 아형 측정

항원 분획별 특이 IgE, 그리고 특이 IgG 아형은 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 먼저 각 *D. pteronyssinus* 분획을 carbonate buffer(pH 9.6)에 0.8 μ g/ml(특이 IgE 측정시-2.0 μ g/ml) 되게 한 후, 96 well polystyrene microplate (Costa, USA)에 well당 50 μ l씩

넣은 후 4℃에서 18시간 반응시켰다. PBS T로 2회 세척한 후 1% BSA-PBST 용액으로 상온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 단백질 결합을 차단시켰다. 환자의 혈청을(특이 IgE 측정시-혈청 원액, 특이 IgG 및 IgG 아형 측정시-1:100 희석) well당 50 μ l씩 넣은 후 상온에서 1시간 반응시키고 PBS T로 3회 세척하였다. Biotin이 결합된 polyclonal antihuman IgE(Vector, USA), monoclonal antihuman IgG1, G2, G3, G4(Sigma, USA)를 각각 1:500으로 희석하였고 이를 well당 50 μ l씩 넣어 상온에서 1시간 반응시킨 후 PBS T로 3회 세척하였다. 1:500으로 희석된 streptavidin-peroxidase를 50 μ l씩 넣은 후 30분간 반응시키고 PBS T로 5회 세척하였다. 그후 Full name[ABTS 25 mg(Sigma, USA)를 50 mM citrate buffer 50 ml에 녹인 후 30% H₂O₂ 50 μ l씩 첨가] 용액으로 5분간 발색시킨 후 2 mM Na₂S₂O₃ 용액으로 반응을 중단시켰고 이를 410 nm에서 ELISA 판독기(Dynatec, USA)로 흡광도를 측정하였다.

7. 통계분석

모든 통계는 SAS 6.02 프로그램을 이용하여 시행하였다. 분획 I, II, III 별 피내반응시험의 피부반응도, 특이 IgE 및 IgG 아형의 값은 repeated ANOVA를 이용하여 분석하였다. 분획 I, II, III 각각의 피부반응도와 *D. pteronyssinus* 전충체 항원의 피부반응도간의 연관성은 Pearson 상관계수와 다중회귀 분석을 시행하였다. 특이 IgE ELISA 흡광도치와 피내반응 피부반응도와와의 연관성은 Pearson 상관계수를 이용하여 판정하였고 아토피 군과 비아토피 군간의 분획 I, II, III에 대한 특이 IgE 및 IgG 아형값은 Mann-Whitney U test를 시행하였다. P value가 0.05이하인 경우에 통계학적 유의성을 두었다. 집먼지진드기 특이 IgE 및 IgG 항체

에 대한 흡광도는 기하평균 및 95% 신뢰구간으로 표시하였고 그 외 모든 통계값은 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였다.

결 과

1. Gel filtration chromatography 법에 의해
서 추출한 *D. pteronyssinus* 항원 분획

Gel filtration chromatography 분출 곡선상 5-6번째 분획(분획 I), 9-10번째 분획(분획 II), 그리고 13-14번째 분획(분획 III)을 각각 모아 이들에 대한 면역반응의 차이를 비교하였다(Fig. 1). 분획 I, II, III 을 각각 Laemmli 법으로 12% SDS-PAGE를 시행하여 각 분획별 단백질의 분자량을 관찰하였다(Fig. 2). 분획 III에서는 분자량 30kD 이하의 단백질 띠가 약 5개, 30kD 이상에서는 1개의 단백질띠가 관찰되었다. 분획 I은 분자량 30kD 이상에서

11개의 단백질띠가 30kD 이하에서는 3개의 띠가, 그리고 분획 II에서는 30kD 이상에서 8개, 30kD 이하에서는 4개의 띠가 관찰되었다.

2. *D. pteronyssinus* 분획별 알레르기 피내반응 성적 비교

검사대상 총 49예중 9예는 *D. pteronyssinus* 피내반응검사에 음성 반응이 관찰되었고 40예는 양성 반응이 관찰되었다. 이중 6예의 경우는 분획 I에서, 3예에서는 분획 II에서 가장 강한 피내반응이 관찰되었으며, 그 외 31예는 분획 III에서 가장 강한 피내반응이 관찰되었다. 피부반응 양성군에서의 전총체 항원에 대한 평

Table 1. Multiple regression analysis of A/H ratio of fraction I, II and III for the determination of A/H ratio to *D. pteronyssinus* whole extract

	Parameters	p value
Fraction I	1.74	<0.0001
Fraction II	-0.37	0.2987
Fraction III	0.80	<0.0001
Constant	-0.22	0.2732

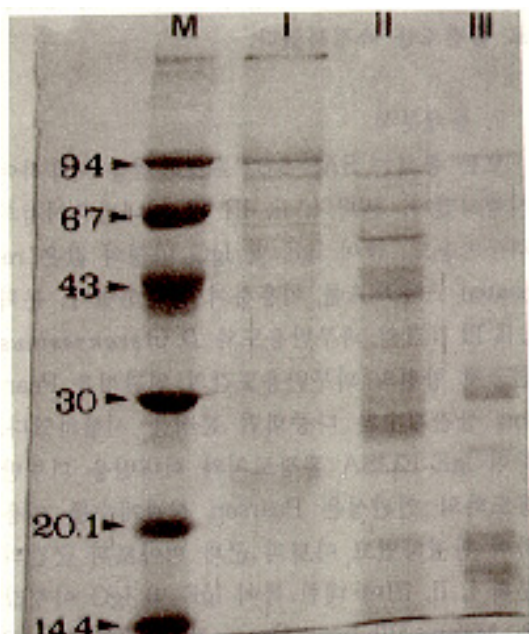


Fig. 2. 12%-SDS PAGE findings of fraction I, II and III

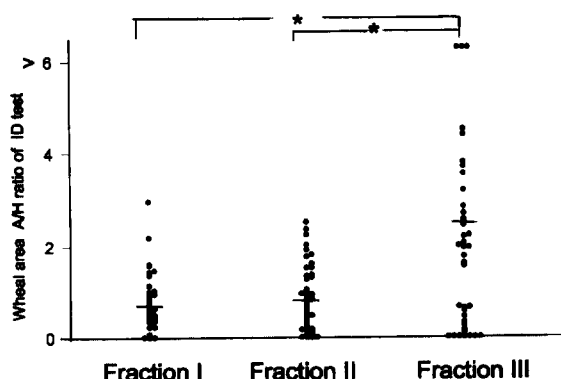


Fig. 3. Comparison of wheal area A/H ratio to fraction I, II and III of *D. pteronyssinus* on intradermal(ID) skin test.

* : $p < 0.01$

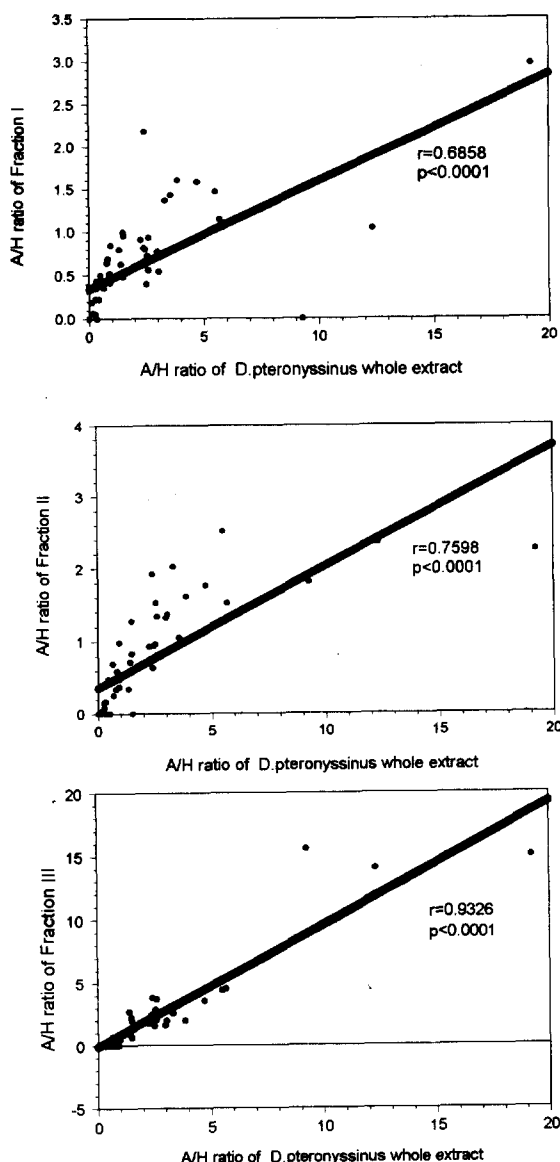


Fig. 4. Correlation between A/H ratio to *D. pteronyssinus* whole extract and that of fraction I, II and III on intradermal skin test

균 A/H 비는 2.67 ± 0.58 였다. 분획별 피내 반응 성적을 비교한 바 분획 I의 A/H ratio는 0.76 ± 0.10 , 분획 II는 0.88 ± 0.12 , 그리고 분획 III는 2.44 ± 0.61 로 분획 I, II에 비교시 분획 III

에서 A/H 비가 유의하게 높았다($p < 0.01$). *D. pteronyssinus* 전총체 항원과 분획 I, II, III으로 시행한 피내시험 성적(A/H ratio) 간의 연관성을 조사한 바 분획 I, II, III 모두 *D. pteronyssinus* 전총체 항원과 유의한 연관성이 관찰되었다(Fig. 4). 그러나 이들을 대상으로 다중회귀분석을 시행한 바 분획 I, III의 피부반응도는 *D. pteronyssinus* 전총체 항원의 피부반응도를 유의하게 예측 가능하였으나 분획 II 피부반응도는 통계적 의미가 없었다(Table 1).

3. 분획 I, II, III 별 IgE immunoblot 성적 비교

알레르기 피부반응검사에 강한 반응이 관찰된 10예와 음성반응이 관찰된 4예의 혈청을 대상으로 분획 I, II, III 별로 각각 immunoblot을 실시하였다. 양성 반응군 10예중 1예를 제외한 9예에서 분자량이 15kD 되는 단백질에 강한 IgE 띠가 분획 III에서 관찰되었으며 분획 I, II에서는 본 15kD 단백질에 결합하는 IgE 띠가 관찰되지 않았다. 그 외 분획 III에서 분자량 25kD 되는 단백질에 결합하는 IgE 띠가 4번 환자에서 관찰되었다. 분획 I에서는 분자량 31kD 되는 단백질에 결합하는 IgE 띠가 아토피환자 10예 중 4예에서 검출되었다(Fig. 5).

4. *D. pteronyssinus* 분획별 특이 IgE 값 비교 및 *D. pteronyssinus* 전총체 항원으로 시행한 피내반응 성적과의 연관성 조사

아토피 군에서 분획별 특이 IgE 값을 비교할 때 분획 III-특이 IgE의 흡광도치의 기하평균 값은 $66.7(40.1 \sim 111.7, 95\% \text{ CFI})$ 으로 분획 II 특이 IgE의 $13.3(6.8 \sim 26.0, p < 0.001)$ 보다 유의하게 높았으나, 분획 I-특이 IgE와는 유의한 차이가 관찰되지 않았다[$42.1(32.6 \sim 54.3), p = 0.106$]. 분획 I-특이 IgE는 분획 II-

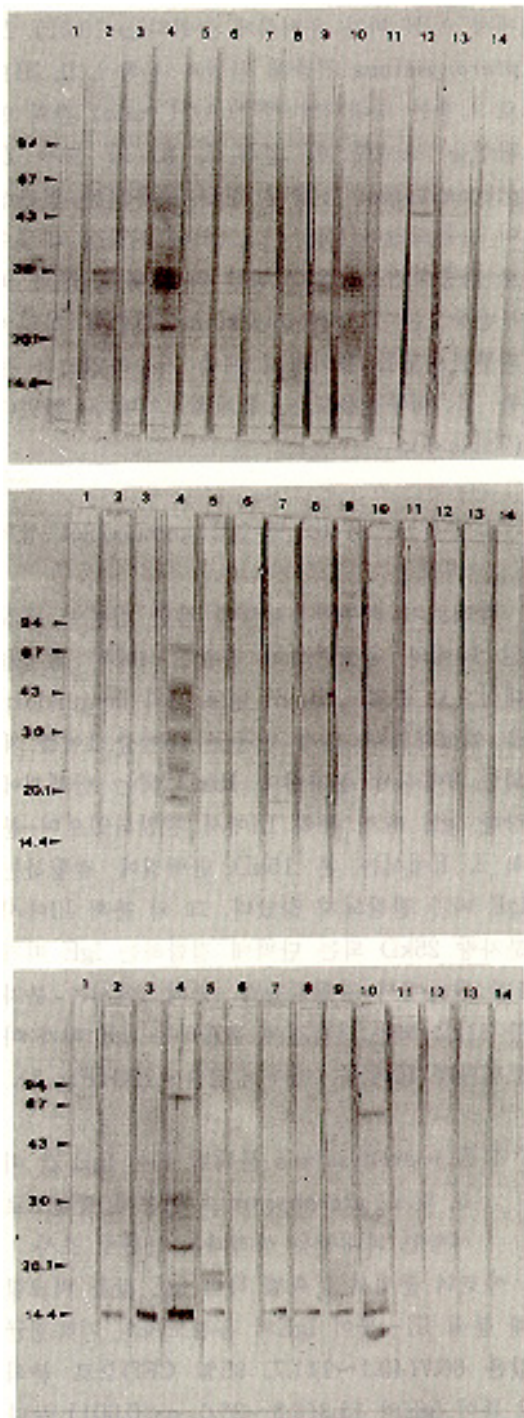


Fig. 5. IgE Immunoblotting patterns of the sera of atopics(1~10 lane) and non-atopics(11~14 lane) to fraction I(A), II(B), and III(C) of *D. pteronyssinus*

특이 IgE에 비해 유의하게 높았다($p < 0.001$) (Fig. 6).

분획 I, II, III 특이 IgE와 집먼지진드기 전충체항원으로 시행한 피내반응검사의 피부반응도와와의 상관관계를 각각 비교한 바 분획 III 특이 IgE와 피부 반응도(A/H ratio) 간에는 유의한 상관관계($r = 0.3862$, $P < 0.01$)가 관찰되었으나 분획 I 특이 IgE($r = 0.2605$, $p = 0.071$), 분획 II 특이 IgE($r = 0.1103$, $p = 0.45$)와 피내검사 피부반응도와의 유의한 연관성을 찾을 수 없었다(Fig. 7).

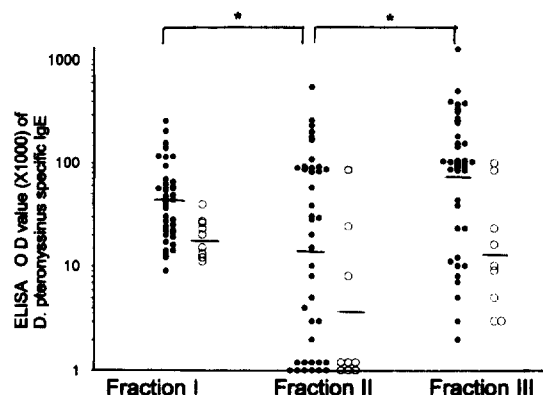


Fig. 6. ELISA specific IgE according to the fractions of *D. pteronyssinus* antigen in atopic subjects.

* $p < 0.001$, ●;atopics, ○;nonatopics

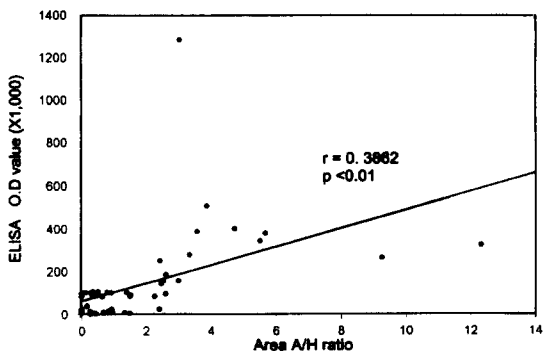


Fig. 7. Correlation of specific IgE to fraction III in ELISA and A/H ratio to *D. pteronyssinus*

5. *D. pteronyssinus* 분획별 특이 IgG 아형의 면역효소법 상의 흡광도 비교

아토피 군과 비아토피 군간에 각각의 분획에 따라 특이 IgG 아형에 차이가 있는지 조사한 바 두 군간에 분획 I—특이 IgG1에서만 유의하게 차이가 있었고 그 외에는 두 군간에 차이가 관찰되지 않았다.

아토피 군에서의 분획 I—특이 IgG1의 기하평균 흡광도치는 116.4(85.7~158.0 95% CFI)로 분획 II의 72.2[(55.8~91.5), $p<0.05$], 분획 III의 6.2[(4.1~9.4), $p<0.001$]에 비해 유의하게 높았고 분획 II—특이 IgG1 역시 분획 III—특이 IgG1에 비해 높은 값이 관찰되었다($p<0.001$). 아토피 군에서의 분획 I—특이 IgG2의 기하평균 흡광도치는 338.8

(270.4~424.6)으로 분획 II[43.7(33.3~57.2), $p<0.0001$] 그리고 분획 III 특이 IgG2[31.6(26.4~37.9), $p<0.0001$]의 흡광도치보다 유의하게 높았으며 분획 II—특이 IgG2 값도 분획 III—특이 IgG2 보다 유의하게 높았다($p<0.05$). 분획 I—특이 IgG3의 기하평균 흡광도치는 27.5(19.2~39.5)로 분획 II—특이 IgG3 [2.8(1.8~4.1), $p<0.0001$] 그리고 분획 III—특이 IgG3[2.3(1.6~3.5), $p<0.0001$] 보다 유의하게 높았으며 분획 II, III 특이—IgG3 간에는 유의한 차이가 없었다. 또한 분획 I—특이 IgG4의 기하평균값은 14.8(11.3~19.4)로 분획 II—특이 IgG4[7.1(5.4~8.5), $p<0.0001$] 그리고 분획 III—특이 IgG4[6.0(4.8~7.6), $p<0.0001$] 보다 마찬가지로 유의하게 높았으며

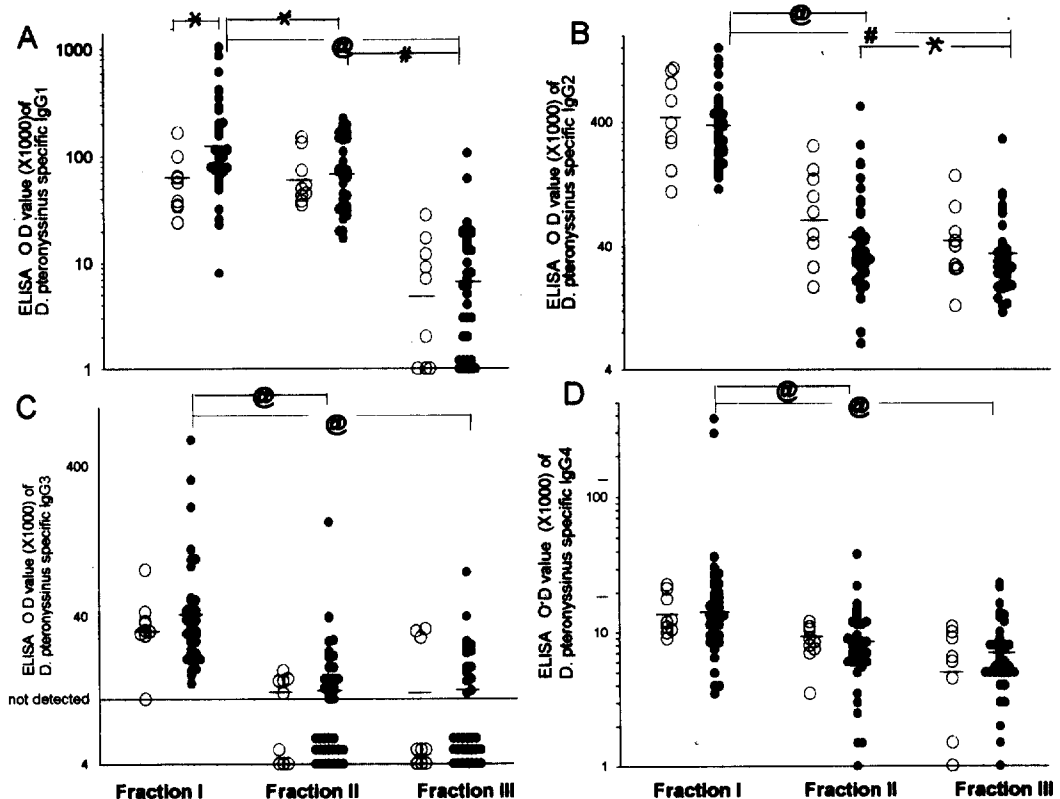


Fig. 8. Specific IgG subclass to *D. pteronyssinus* fraction I, II, III.

A: IgG1, B: IgG2, C: IgG3, D: IgG4, ●: atopics, ○: nonatopics, @: $p<0.001$, #: $p<0.01$, *: $p<0.05$.

분획 II와 III 특이 IgG4 간에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 8).

6. 아토피 환자와 비아토피 환자에서의 집먼지진드기 특이 IgG와 IgG 아형의 immunoblot 소견

IgG immunoblot 검사상 아토피 및 비아토피 환자 모두에서 분자량 30kD 이상 되는 단백 분획에 IgG 결합 띠가 주로 관찰되었다. 그러나 피부단자시험상 집먼지진드기에 강양성반응을 보인 4예 모두에서 분자량 15kD 분획에 IgG와 결합하는 띠가 관찰되었으며, 비아토피 환자 4예중 2예에서 미약한 띠만이 관찰되었다. 동일한 환자의 혈청을 이용하여 IgG 아형에 대한 *D. pteronyssinus* immunoblot을 시행한 바, 아토피 환자에서 발견되는 분자량 15kD 단백 분획에 대한 특이 IgG는 주로 IgG1 아형이었으며, IgG2, IgG3, IgG4 immunoblot에서는 결합 띠가 관찰되지 않았다(Fig. 9, 10).

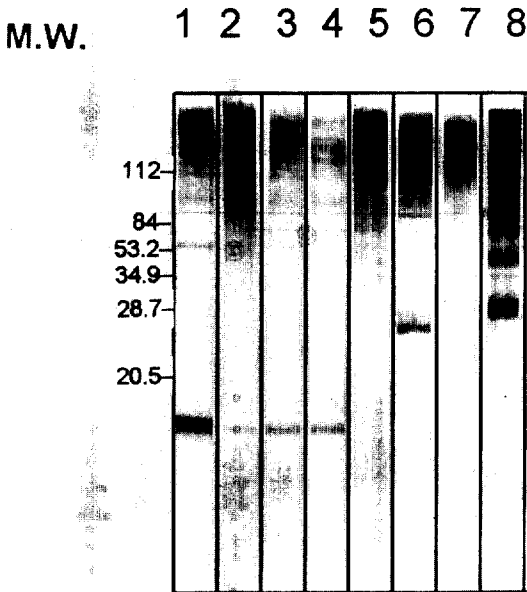


Fig. 9. IgG immunoblot pattern with the sera of atopic(1~4 lane) and nonatopic(5~8 lane) sera to *D. pteronyssinus*.

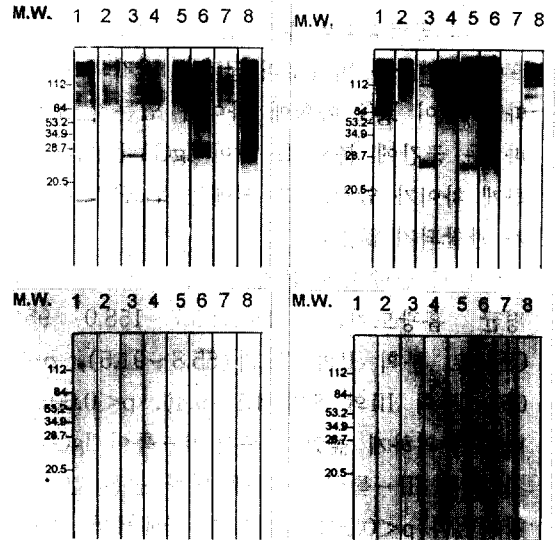


Fig. 10. IgG subclasses immunoblotting patterns with the sera of atopics(1~4 lane) and nonatopics(5~8 lane) to *D. pteronyssinus*. A: IgG1, B: IgG2, C: IgG3, D: IgG4.

고 찰

연구자 등은 집먼지진드기 항원을 분자량 30kD을 기준으로 그 이상 또는 이하되는 분획을 gel filtration chromatography법으로 추출한 후 각 집먼지진드기 항원 분획에 대한 면역반응을 조사하였다.

본 연구에서 집먼지진드기 항원 분획 I, II, III으로 피내 반응시험을 시행한 바, 분자량이 30kD 이하되는 분획 III에 대한 피부반응도가 분획 I, II에 비해 현저하게 낮았으며, immunoblot 검사에서도 아토피 환자 10명중 9예에서 분자량 15kD 되는 알레르겐에 결합하는 특이 IgE를 검출할 수 있었으며, 분자량 30kD 이상되는 집먼지진드기 항원분획(분획 I, II)으로 시행한 immunoblot에서는 15kD 단백질과 결합

하는 IgE가 검출되지 않아 본 연구팀이 제조한 집먼지진드기 항원분획은 집먼지진드기 주 알레르겐, 특히 group II 알레르겐의 연구에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 여겨진다.

D. pteronyssinus 전충체 항원과 분획별로 시행한 피내반응시험 성적간에 다중회귀분석을 시행한 바, 분획 III 외에 분획 I도 전충체 항원의 피내 반응성적과 유의한 상관관계가 관찰되었으며, 분획 I의 immunoblot 검사에서 분자량 31kD에 결합하는 IgE 띠가 10예 중 4예에서 관찰되어, 분획 I도 유의할만한 알레르겐 항원성이 포함되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 분획 I, II, III-특이 IgE ELISA상 흡광도치를 비교한 바, 분획 III-특이 IgE 값이 분획 I, II 값보다 높아 알레르기 항원성은 분획 III가 분획 I에 비해 더 높을 것으로 판단되었다. 그러나 비록 분획 III에서 제일 강한 알레르기 면역 반응이 관찰되었으나 약 50%의 아토피 환자에서 30kD 이상의 알레르겐에 대해서 IgE 면역반응이 관찰되었으며, 40예의 아토피 환자 중 9예(23%)에서는 분획 I, II에 가장 강한 피내 반응이 관찰되어, 분자량 30kD 이상의 고분자 알레르겐도 알레르기 면역반응에 관여함을 알 수 있었다. 최근 들어 여러 연구자들이 분자량 30kD 이상의 집먼지진드기 항원도 집먼지진드기 알레르기 환자에서 주요 알레르겐으로 작용하는 것으로 보고하고 있으며⁹⁻¹²⁾, 이들에 대한 알레르기 및 세포면역반응도 일부에서는 시도되고 있으나^{18,19)} 아직까지 고분자 알레르겐에 대한 연구는 미흡하여 이에 대한 연구가 시급한 실정이다.

D. pteronyssinus 분획 특이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 아형값 모두 분획 I값이 분획 II 및 III에 비해 높았고 특히 분획 III IgG 아형이 3가지 분획중 제일 낮았다. 이러한 결과는 집먼지진드기 알레르기환자에서 IgG 면역반응은 주로 30kD 이상되는 고분자 단백질에 대해서

유발되고, IgE 면역 반응은 30kD 이하의 저분자 단백 및 일부 고분자 단백질에 의해서 유발됨을 추정할 수 있다. 연구자 등은 앞서 아토피군, 비아토피군 모두에서 전충체 항원에 대한 특이 IgG ELISA 흡광도치가 높으나 정제된 Der fI, Der fII에 대한 특이 IgG 치는 낮아 대부분은 IgG 항체 반응이 주 알레르겐이 아닌 다른 항원에 의해서 나타날 것을 시사한 바 있으며²⁰⁾, 이는 다른 연구자와의 보고와 일치한다. Nakada 등은 sephadex gel column을 이용하여 고분자량(150kD 이상)과 저분자량(9-21kD)의 집먼지진드기 분획을 추출하여 ELISA 방법으로 특이 IgE 및 IgG 값을 비교 조사한 바, 특이 IgE 항체는 주로 저분자 알레르겐의 분획에서 높은 항체값이 관찰되었고 IgG1, IgG4 항체는 고분자 단백질에 높은 항체값을 보고하였다²¹⁾.

현재 임상에서는 알레르기 피부반응검사, 혈청내 특이 IgE 측정, 그리고 면역 치료시 집먼지진드기 전충체항원을 이용하고 있다. 이에 알레르기 면역반응을 유발하는 주알레르겐 등이 포함된 집먼지진드기 분획만을 이용한다면 집먼지진드기 알레르기 환자의 진단과 치료과정에서의 임상적 안전성 뿐만 아니라 진단과 치료의 효율성이 향상될 것으로 생각되었으며 이들 분획을 이용한 임상연구가 뒤따라야 할 것으로 생각되었다.

또한 아토피 환자와 비아토피 환자간에 집먼지진드기-특이 IgG 면역 반응에 차이가 있는지 조사한 바, 두 군간에 *D. pteronyssinus* 분획-특이 IgG 아형의 ELISA상 흡광도치에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 집먼지진드기 전충체 항원을 이용한 IgG immunoblot 검사에서는 아토피 및 비아토피군 모두에서 분자량 30kD 이상 되는 단백 분획에 주로 결합하는 IgG 띠가 관찰되었다. 그러나 아토피 환자 4예 전예에서 모두 15kD 단백질에 결합하

는 IgG 띠가 관찰되었으나 비아토피 환자에서는 검출되지 않거나 매우 약하게 결합하는 양상이 관찰되어, 비록 ELISA 검사에서는 두 군간에 *D. pteronyssinus* 전충체 항원에 대한 IgG 흡광도치 간 유의한 차이가 관찰되지 않았으나, 아토피군에서는 비아토피군에 비해 group II 알레르겐에 대한 특이 IgG가 존재하거나, 혹은 비아토피군에 비해 현저하게 그 농도가 높을 것으로 생각되었다. Oshika 등²²⁾도 immunoblot 검사에서 분자량이 15kD 되는 Der fII 주 알레르겐에 대한 IgG 결합 반응이 아토피 환자의 73%, 그리고 비아토피 환자의 20% 정도에서 관찰되는 것으로 보고하였으며, 이는 본 연구 결과와 일치하는 것으로 생각되었다. 알레르기 환자에서 특이 IgG 면역반응의 역할에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다. 면역치료후의 치료효과가 특이 IgG1, IgG4의 증가와 연관이 있다는 보고가 있으나²³⁾ 이들이 과연 항원체의 노출량이 증가함에 따라 증가한 것인지, 아니면 실제로 차단 항체로서 작용하는지에 대해서는 아직 논란이 많은 실정이다. 그러나 알레르기 면역반응에서 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 알려진 IL-4는 B 림프구에서 IgE 이외 IgG1 생성을 촉진하는 것으로 보고되어 있고^{24, 25)}, 본 연구 결과에서도 아토피 환자에서 분자량이 15kD 되는 단백질에 결합하는 IgG가 대부분 IgG1으로 이는 IL-4의 영향으로 생각되었다. 지금까지의 연구 결과로 볼 때 집먼지진드기 항원 분획에 따라 알레르기 면역반응에 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다.

최근들어 알레르기 면역반응의 연구가 세포단위의 분자생물학적으로 접근함에 따라 순수 분리된 집먼지진드기 주 알레르겐을 이용한 연구가 많이 이루어지고 있으며 이에 외국에서는 집먼지진드기의 주 알레르겐을 유전자 재조합 기법에 의해서 다량 생산하여 연구에 이용하고

있다²⁶⁻³¹⁾. 본 연구자 등이 추출한 집먼지진드기 분획은 비록 분자량을 기준으로 정확하게 분리하지는 못하였지만 비교적 관련된 주 알레르겐을 포함하고 있어 집먼지진드기 알레르기 연구에 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었으며 국내 집먼지진드기 알레르기 면역 반응 연구의 활성화를 위해서는 주 알레르겐의 순수 분리에 관한 연구와 유전자 재조합 기법에 의한 주 알레르겐 생합성 기법의 개발이 시급하리라 생각되었다.

결론적으로 집먼지진드기 알레르기 환자에서 집먼지진드기 항원 분획에 따라 알레르기 피부 반응과 IgE 및 IgG 면역 반응에 차이가 있음을 알 수 있었다. 연구자 등이 추출한 집먼지진드기 항원 분획이 집먼지진드기 알레르기 면역기전의 연구이외에도 환자 진료에도 이용될 가능성을 제시하는 것으로 생각되었으며 추후 분리된 주알레르겐을 이용한 면역학적 및 임상 연구가 뒤따라야 하리라 생각되었다.

결 론

집먼지진드기 주 알레르겐을 포함하는 분자량 30kD 이하되는 단백질 분획과 이상되는 단백질 분획을 분리하여 집먼지진드기 아토피 환자를 대상으로 각각 분획별 알레르기 면역반응을 조사하였다. 먼저 *D. pteronyssinus* 항원을 분획 I(30kD 이상), II(30kD 이상), III(30kD 이하)로 분리한 후 이들 분획으로 아토피 환자(n=40)를 대상으로 피내반응검사를 시행한 바, 분획 III(A/H ratio- 2.44 ± 0.61 , $p < 0.001$)에서 분획 I(0.76 ± 0.10 , $p < 0.001$) 및 II(0.88 ± 0.12 , $p < 0.001$)에 비해 강한 피부반응이 관찰되었다. 아토피 환자의 혈청으로 분획별 immunoblot을 시행한 바 분획 III에서 15kD 단백질에 결합하는 IgE 띠가 90% 에서

관찰되었다. 아토피 환자의 분획 I, II, III에 대한 특이 IgE ELISA 흡광도치를 조사한 바 분획 III-특이 IgE의 기하평균값은 0.067로 분획 II 특이 IgE의 0.013 보다는 높았으나($p < 0.001$) 분획 I의 0.042과는 유의한 차이가 없었다. 분획별 특이 IgE 흡광도치와 D. pt 전충체 항원의 피부반응도와의 연관성을 조사한 바 분획 III와는 연관성($r=0.3862$, $p < 0.01$)이 관찰되었으나 분획 I($r=0.2605$, $p < 0.07$) 및 II와는 유의한 연관성이 없었다. 아토피 환자의 혈청에서 분획 I, II, III에 대한 각각 특이 IgG ELISA 흡광도치를 조사한 바 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 모두 분획 I 특이 IgG 아형값이 유의하게 높아 특이 IgE와는 다른 양상이 관찰되었다($p < 0.0001$). D. pt 전충체 항원을 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 immunoblot을 시행한 바 IgE와는 달리 분자량 30KD 이상의 고분자 단백질에 주로 IgG 결합 띠가 관찰되었다. 그러나 집먼지진드기 아토피 환자에서는 비아토피 환자와 달리 분자량 15kD 에 결합하는 IgE 띠의 빈도와 밀도가 현저히 높았다.

이상의 연구 결과로 보아 집먼지진드기에 감작된 환자는 비아토피환자에 비해서 집먼지진드기 항원의 분자량 분획에 따라 면역 반응에 차이가 있음을 알 수 있었다.

-Abstract-

Allergic immune responses to the fractionated antigen of *Dermatophagoides pteronyssinus*

Jung Won Park, MD, Sang Wook Park*, MD,
PhD, Si Whan Koe, Cheol Woo Kim, MD,
Han Il Ree* PhD, Sang Hwan Oh* PhD, and
Chein-Soo Hong, MD.

Internal Medicine, Biochemistry-Molecular
Biology, Parasitology,* College of Medicine,
Yonsei University, Seoul, Korea*

As molecular size of the most major allergens of house dust mite(HDM) are known to be less than 30 kD, allergic immune reactions may be different according to the molecular fractions of HDM allergens. In this study, we fractionated *D. pteronyssinus*(D. pt) antigen according to its molecular weights; fraction I(FI), II(FII, more than 30 kD), III(FIII, less than 30 kD), and evaluated the differences of allergic immune responses in 40 atopic patients.

FIII(A/H ratio- 2.44 ± 0.61) elicited stronger response on intradermal skin test than FI(0.76 ± 0.10 , $p < 0.001$) and FII(0.88 ± 0.12 , $p < 0.001$). The immunoblot analysis revealed that the nine out of 10 atopics had IgE binding bands with 15 kD protein of FIII which were not found in FI and FII. The geometric mean of absorbance value of specific IgE to FIII was 0.067, which was higher than that of FII (0.013, $p < 0.001$), with no difference from that of FI(0.042). The skin reactivity to whole

D. pt antigen correlated with FIII-specific IgE($r=0.3862$, $p<0.01$), not with FI-($r=0.2605$, $p=0.07$) and FII-specific IgE($r=0.1103$, $p=0.45$). FI-specific IgG levels in atopic sera($n=40$) were significantly higher than that of FII and FIII in all IgG subclasses ($p<0.001$). Both atopic($n=4$) and nonatopic($n=4$) groups showed multiple IgG, IgG1, and IgG2 binding bands at high molecular proteins in immunoblot analysis. The prevalence and density of the IgG and IgG1 binding bands to 15 kD were higher and more intense in atopics than those of nonatopics.

In conclusion, we suggest that fractionated antigens of *D. pteronyssinus* had different antigenicities and that the allergic immune responses to HDMs in atopics and nonatopic are different according to molecular fractions of HDM.

key words : allergic response, *Dermatophagoides pteronyssinus*

참 고 문 헌

- 1) 조백기: 한국의 집먼지진드기에 관한 연구. 제 2편 분포. 가톨릭 대학 의학부 논문집. 33:423-30, 1980
- 2) 홍천수: 집먼지진드기에 대한 환자의 감각 상태와 환자 집먼지내 집먼지진드기의 생 태에 관한 연구. 알레르기 11:457-65, 1991
- 3) 이한일, 전성후, 이인용, 홍천수: 국내 집먼 지진드기의 지역 분포상. 기생충학 회지, 간행중, 1997
- 4) Romagnani S, Boccaccini P, Amador A, Ricci M: Studies on allergens of *Dermatophagoides pteronyssinus* by direct and indirect RAST. Int Arch Allergy Appl Immunol 50:525-35, 1976
- 5) Tovey ER, Baldo BA: Comparison by electroblotting of IgE-binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite culture. J Allergy Clin Immunol 79:93-102, 1987
- 6) Baldo BA, Ford SA, Tovey ER: Toward a definition of the complete spectrum and rank order of importance of the allergens from the house dust mite : *Dermatophagoides pteronyssinus*. Advances in the Bioscience 74:13-31, 1989
- 7) Heyman PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW, Platts-Mill TAE: Antigenic and structural analysis of group II allergens(Der fII and Der pII) from house dust mites(*Dermatophagoides* spp.). J Allergy Clin Immunol 83:1057-67, 1989
- 8) King TP, Hoffman D, Lowensterin H, Marsh DG. Platts-Mills TAE, Thomas W: Allergen nomenclature. Int Arch. Allergy Immunol 105:224-33, 1994
- 9) Aki T, Ono K, Paik S, Wada T, Jyo T, Shigeta S, Murooka Y, Oka S: Cloning and characterization of cDNA coding for a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. Int Arch Allergy Immunol 103:349-56, 1994
- 10) Aki T, Ono K, Hidaka Y, Shimonishi Y, Jyo T, Wada T, Shigeta S, Murooka Y, Oka S, Oka S: Structure of IgE epitopes on a new 39 kD allergen molecule from the house dust

- mite, *Dermatophagoides farinae*. Int Arch Allergy Immunol 103:357—64, 1994b
- 11) Aki T, Kodama T, Fujikawa A, Miura K, Shigeta S, Wada T, Jyo T, Murooka Y, Oka S, Ono K: Immunochemical characterization of recombinant natural trophomyosins as a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. J Allergy Clin Immunol 96:74—83, 1995
- 12) Fujikawa A, Ishimaru N, Seto A, Yamada H, Aki T, Shigeta S, Wada T, Jyo T, Murooka Y, Oka S, Ono K: Cloning and characterization of a new allergen, Mag 3, from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae* : Cross—Reactivity with high—molecular—weight allergen. Molec Immun 33:311—9, 1996
- 13) O' Brien RM, Thomas WR, Wootton AM: T cell responses to the purified major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. J Allergy Clin Immunol 89: 1021—31, 1992
- 14) O'Hehir RE, Verhoef A, Panagiotopoulou E, Keswani S, Hayball JD, Thomas WR, Lamb J: Analysis of human T cell responses to the group II allergen of *Dermatophagoides* species : Localization of major antigenic sites. J. Allergy Clin Immunol 92:105—13, 1993
- 15) O'Hehir RE, Hoyne GF, Thomas WR, Lamb JR: House dust mite allergy : from T—cell epitopes to immunotherapy. Eur J Clin Invest 23:763—772, 1993
- 16) Lowry J, Rosebrough HJ, Farr AL., Randall RL: Protein measurement with folin phenol reagent. J Bio Chem 193:265—75, 1951
- 17) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680—5, 1970
- 18) Nishioka K, Saito C, Nagano T, Okano M, Nakagawa F, Nishioka S, Masuda Y, Ono T: Allergens of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, in patients with mite allergic rhinitis : A clinical investigation by intracutaneous skin tests and nasal provocation tests. Acta Med Okayama 48(5):279—82, 1994
- 19) Okano M, Nagano T, Ono T, Masuda Y, Ohta N: Clonal analysis of human T—cell response to fractionated house dust mite antigens(*Dermatophagoides pteronyssinus*). Int Arch Allergy Immunol 101:82—8, 1993
- 20) Hong CS, Park JW, Nahm DH: Measurement of IgG subclass and IgE antibodies of whole body antigen and two major allergens (Der fl & Der fII) of *Dermatophagoides farinae* in normal and asthmatics. Yonsei Med J 35:453—63, 1994
- 21) Nakada S, Saito A, Yasueda H, Shida T, Nakagawa T, Haida M, Ito K, Miamoto: Measurement of IgE, IgG1 and IgG4 antibodies against mite sephadex fractions and purified allergens by means of enzyme—linked immunosorbent assay, Arerugi 38: 9—15, 1989
- 22) Oshika E, Kuroki Y, Sakiyama Y, Matsumoto S: Measurement of IgG subclass antibodies to the group II antigen of *Dermatophagoides pteronyssinus*(Der pII) in sera from children with bronchial asthma. Ann Allergy 69:427—32, 1992

- 23) Nakagawa T: The role of IgG subclass changes in the clinical response to immunotherapy in allergic diseases. Clin Exp Allergy 21:289—96, 1991
- 24) Coffman RL, Ohara J, bond MW, et al: B cell stimulatory factor—1 enhances IgE response of lipopolysaccharide—activated B cells. J Immunol 136:4538—41, 1986
- 25) Fearon: Antibody production by B lymphocytes. In Janeway CA, Travers P eds Immunology 2nd editions, pp 8:1—8:42, Published by Current Biology 1996
- 26) Chua. KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM, Turner KJ: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen. Der pI. J Exp Med 167:175—82, 1988
- 27) Chua KY, Doyle CR, Simpson RJ, Turner KJ, Stewart GA, Thomas WR: Isolation of cDNA coding for the major allergen Der pII by IgE plaque immunoassay. Int Arch Allergy Appl Immunol 91:118—23, 1990
- 28) Dilworth RJ, Chua KY, Thomas WR: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der fI. Clin Exp Allergy 21:25—32, 1991
- 29) Stewart GA, Ward LD, Simpson RJ, Thompson PJ. The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is a trypsin—like enzyme. Immunology 75:29—35, 1992
- 30) Yuuki T, Okumura Y, Ando T, Yamakawa H, Suko M, Haida M, Dohi M, Okudaira H: Int Arch Allergy Appl Immunol 94: 354—6, 1991
- 31) Thomas WR, Chua K—Y: The major mite allergen Der p2 — a secretion of the male mite reproductive tract. Clin Exp Allergy 25:667—9, 1995