

닭고기 중 알레르기 유발성분의 동정

조은득 · 김동섭¹ · 정기화
덕성여자대학교 약학대학, ¹국립독성연구소

Identification of the Chicken Meat Allergens

Eun Deuk CHO, Dong Sup KIM¹ and Ki Hwa JUNG

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714

¹Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Reserch, Korea Food and Durg Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul, 122-704, Korea

(Received February 1, 2001; accepted March 23, 2001)

Abstract – The chicken meat has been reported as one of the food causing allergic reactions predominantly to Korean. At present, several *in vitro* tests for immunoglobulinG (IgG)-mediated as well as IgE-mediated food allergy are available. 13 clinically chicken meat-allergic patients were investigated together with 4 control subjects for identification of chicken meat-specific reactivity by ELISA. Also, protein profile and IgE, IgGtotal and IgG4-reacting allergens were detected by means of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting. Chicken meat extracts were prepared as raw, heated, heat and simulated gastric fluid (SGF) treated samples to characterize the stability of allergen to physicochemical treatment. SDS-PAGE revealed 9~200 kDa bands. And in immunoblotting 7 sera were identified most major bands between 10 and 78 kDa. In case of IgE, six proteins (17, 26, 35, 40, 78 kDa) were predominant in heat-treated extract, and the one (35 kDa) was present in SGF-treated preparations. In case of IgG_{total} and IgG4, most of them showed a pattern simmilar to IgE. There were significant differences ($P < 0.05$) in IgE, IgG_{total}, IgG4 Abs to chicken meat between the allergic and control subjects in ELISA. In addition, the concentration of IgG4 Abs in the challenge-positive subjects was significantly higher than that of control subjects. It is considered that the specific IgE response to chicken meat was rarely prevalent to Koreans. However, the specific IgG4 response play an important role in the development of allergic symptoms.

Key words □ Chicken meat, food allergy, SDS-PAGE, immunoblot, ELISA

식품 알레르기는 식품에 의해 소화관을 통해 발생하는 면역 과민반응으로 전 세계적으로 인구의 약 2%, 어린이의 경우에는 0.3~7.5% 정도가 식품 알레르기를 가지고 있으며, 나이가 들어감에 따라 그 빈도는 점차 감소하는데 (Sampson 등, 1997), 경제가 발전된 지역에서 환경오염 및 스트레스로 인한 면역상태의 불안정 및 식생활의 변화 등으로 면역계의 과민성이 나타나, 이러한 알레르기 환자가 급증하고 있다고 보고되고 있다 (Frew 등, 1997).

식품 알레르기는 어떤 식품에 노출된 후 특정성분에 의해 생성된 IgE항체에 의해 아토피성 피부염, 두드러기와 흥반, 천식, 설사 및 구토 등의 증상이 나타나며, 심한 경우는 아나필락시스 쇼크 및 사망에 이르는 등 심각한 증상이 야기되는 것을 주 기전으로 하며 (Sicherer 등, 1999), 최근에는 식품 알레르기 환자에서 특이 IgG항체가 빈번히 관찰되

고, 비만세포 표면에 IgG4항체의 Fc에 대한 수용체가 존재함이 발견된 이후, IgE항체만으로 설명이 되지 않는 알레르기 질환을 IgG4항체로 설명해 보고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다 (Nakagawa 등, 1992; Lee 등, 1993).

일반적으로 대부분 알려진 알레르겐은 10~70 kDa를 가진 수용성 당단백질로, 이들 알레르겐은 비교적 열에 안정하고, 위액과 장액의 소화반응에도 안정하므로 섭취 후 장에서 그 면역반응을 일으킴을 알 수 있다 (Opara 등, 1998). 대표적인 식품은 콩류, 우유, 밀, 어류, 갑각류, 견과류, 육류 및 달걀 등으로, 식품 알레르기의 약 90% 이상이 이들 식품에 의해 발생한다고 알려져 있으나 (Sampson 등, 1985/1997), 식품 알레르기 반응이 그 소비경향이 일반적인 음식에 대해 나타나고, 인종간, 개인간에도 큰 차이를 나타내므로, 각 나라마다 실정에 맞는 연구가 필요하기 때문에 한국인을 대상으로 한 연구가 요구된다 (Bock 등, 1990).

국내 대학병원에서 379명의 알레르기 천식증상을 나타내는

*To whom correspondence should be addressed.

환자를 대상으로 한 연구 결과 알레르기 원인 식품은 계란(22.7%), 돼지고기(14.8%), 복숭아(14.0%), 고등어(12.7%), 닭고기(11.1%) 및 우유(10.0%)등이고, 다른 연구 결과에서는 우유(65.3%), 달걀(61.9%), 닭고기(65.9%) 및 돼지고기(64.8%)등이 주 원인이 보고되었다(김규연 등, 1995). 이에 본 연구에서는 유발률이 높게 보고된 닭고기를 대상식품으로 선정하여 단백질을 추출하고 닭고기에 알레르기를 일으키는 환자의 혈청을 이용하여 IgE 항체에 대해 immunoblotting 및 ELISA 방법을 통하여 알레르기 유발 가능 성분을 동정하고, 가열 처리와 소화효소 처리 후에도 남아있는 원인 항원에 대해 물리화학적 특성을 확인하는 한편, IgGtotal와 IgGsubclass에 대한 반응성을 알아보고, 그 알레르기 유발 가능성을 확인하고자 하였다.

실험방법

시약 및 재료

Pepsin은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, U.S.A.)것을 사용하였으며, Tris-HCl, acrylamide, bis-acrylamide, ammonium persulfate, TEMED, glycine, coomassie brilliant blue R250, silver staining kit, protein marker는 Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA, U.S.A.)것을 사용하였다. Alkaline phosphatase anti-human IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, horseradish peroxidase anti-human IgG는 PharMingen(San Diego, CA, U.S.A.)것을 사용하였으며, BCA Protein assay reagent는 Pierce(Rockford, IL, U.S.A.)것을, 이 외에 시약들은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 또한 닭고기는 시중 슈퍼마켓에서 신선한 것을 구입하여 사용하였다.

Table 1. Clinical characteristics of chicken meat-sensitive patients

Patient no	Sex	Age od diagnosis (years)	Symptoms	Other allergenic food
1	F	4	AD, I, U	Yeast
2	M	25	AD, I, U	Wheat flour
3	F	30	AD, I, U	Cod, Orange, Egg, Beef
4	M	9	AD, U	Meats
5	F	5	AD, I, U	-
6	M	34	AD, D, I, U	-
7	M	11	AD, C, I, U	-
8	M	16	AD, I, U	-
9	F	7	AD, I, U	-
10	M	6	AD, I	-
11	F	19	I, U	Pork, Cow's milk
12	F	16	AD, I, U	Pork, Cow's milk, Egg
13	M	15	AD, I, U	-

AD: atopic dermatitis; U: urticaria; I: itching; C: constipation; D: Diarrhea

대상환자의 혈청

알레르기 임상진단법인 skin prick test 및 food open challenge test를 실시하여(Alberse 등, 1998) 닭고기에 알레르기 양성반응이 관찰된 환자(13명)의 혈청을 사용하였으며, 대조군으로는 닭고기 및 다른 식품이나 알레르겐에 대해 병원력이 없는 정상인의 혈청(4명)을 사용하였다. 각 혈청은 사용할 때까지 -70°C에 보관하였으며 닭고기 알레르기 환자에 대한 임상적 특징은 Table 1에 요약하였다.

닭고기 단백질 추출 및 시험물질처리

시험물질은 열 및 소화에 대하여 안정한 allergen을 동정하고 그 특성을 확인하기 위하여 조제하였으며, 원액, 열처리(10분), 가열후 Simulated gastric fluid(인공위액; SGF-15분, 60분)를 각각 처리하여 실시하였다

Crude extract제조는 James등(1997)이 사용한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 닭고기는 지방을 제거하고 순 살코기만을 취하여 PBS(Phosphate buffer saline, 20 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 5.4 mM KCl, 0.5 M NaCl, pH (7.0)를 10%(w/v)비율로 넣고 homogenizer(Nihonseiki Kaisha, Japan)로 유액 상태가 되도록 균질화시킨 후 Ultrasonicator(Fisher, U.S.A.)를 사용하여 5분간 초음파 분쇄하였다. 4°C, 1000×g에서 10분간 원심분리하여 상정액을 취한 후, 다시 초원심분리기(Kontron Co., Switzerland)를 사용하여 4°C, 140,000×g에서 15분간 원심분리하여 상정액을 취하였으며, 또한 crude extract(원액)를 10분간 가열한 후 원심분리하여 상정액을 취하여 가열처리 시료로 사용하였다.

인공위액처리의 경우에는 시험물질 원액을 가열 한 후 원심분리하여 상정액을 취하고, Anne등(2000)이 사용한 방법에 따라 U.S.P.규격을 참고하여 조제한 인공위액(0.32% w/v pepsin, 0.03 M NaCl, pH 1.2)을 각각 1 ml씩 37°C항온조에서 교반하면서 15분, 60분간 반응시킨 후 원심분리하여 상정액을 취하고, 200 mM Na₂CO₃용액을 600 µl 가하여 반응액을 중화하였다. 각 시료는 cellulose ester dialysis membrane(Spectrum inc. CA, USA)을 사용하여 단백질을 농축하고 시험에 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

단백질 정량

처리한 단백질 농도는 bovine serum albumin용액을 표준용액으로, BCA protein assay용 kit을 이용하여 정량하였다.

ELISA를 이용한 혈청 특이 항체가 측정

준비된 각 시료를 50mM carbonate buffer(pH 9.6)을 이용하여 5 µg/ml 단백질 농도로 희석하여 96well ELISA plate(Costar Co., Cambridge, MA, U.S.A)에 100 µl/well 씩 가하여 37°C에서 2시간 동안 흡착시킨 후 plate에

0.05% PBST(washing 및 dilution buffer)로 각 혈청을 희석(IgE 1:2, IgG 1:100, IgG1~G4 1:20, in 0.05% PBST)하여 100 µl/well씩 가하고 실온에서 하룻밤 반응시켰다. 그 후 PBST로 희석한 alkaline phosphatase anti-human IgE, alkaline phosphatase anti-human IgG4, HPR-conjugated anti-human IgG(IgE1:500, IgG 1:1000, IgG1~G4 1:1000)를 100 µl/well씩 가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 PNT (p-Nitrophenyl Phosphate tablet)를 substrate solution에 녹여 이를 100 µl/well씩 가하고 실온에서 약 20분동안 방치한 후, ELISA reader(Molecular Devices Co., Menlo Park, CA, U.S.A.)를 이용하여 405 및 490 nm에서 흡광도를 측정 비교하였다. 매 단계마다 각 well은 0.05% PBST로 세척하였고, 모든 혈청은 duplicate로 하여 그 평균값을 구하였으며, 알레르기 반응이 없는 정상인의 혈청과 PBS를 넣은 well의 평균값을 결과 분석에 이용하였다.

SDS-PAGE

닭고기에 존재하는 단백질을 분리, 확인하기 위하여 mini protean III 전기영동 system(Bio-rad Lab. Hercules, CA, U.S.A.)등을 사용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 시험물질을 2X SDS sample buffer에 1:1로 희석하여 100°C에서 약 5분간 끓인 후, 6%stacking gel과 12%resolving gel로 구성된 mini gel의 각 lane에 10 µg/20 µl씩 loading하고 150V로 전기영동을 실시한 후 coomassie brilliant blue R-250 및 silver stain kit로 염색하여 분리된 단백질을 관찰하였다. 분자량의 확인을 위해 protein low marker를 함께 사용하였다.

Immunoblot

Immunoblot은 4% stacking gel과 5~20% resolving gel로 구성된 large gel system을 이용하였다. 시험물질은 2 mg/ml이 되도록 하여 2X SDS sample buffer에 1:1로 희석하여 100°C에서 약 5분간 끓인 후 사용하였다. SDS-PAGE로 분리된 단백질은 Towbin등(1979년)이 사용한 방법에 따라 transblot apparatus를 이용하여 methanol-activated polyvinylidene difluoride(PVDF)membrane(0.45 µm)로 50V에서 35 min, 그리고 80V에서 15 min동안 transfer하였다. 이 행된 membrane을 0.5%goat serum으로 1시간 동안 실온에서 반응하여 비특이적인 단백질의 흡착을 차단한 후 닭고기에 알레르기를 나타낸 환자의 혈청을 희석(IgE 1:2, IgG 1:100, IgG4 1:20, in 0.05% PBST)하여 700 µl/lane씩 가하여 37°C에서 4시간 반응시켰다. 각 strip은 0.05%PBST로 3회 세척하고 PBST로 희석한 alkaline phosphatase anti-human IgE, alkaline phosphatase anti-human IgG4, HPR-conjugated anti-human IgG(IgE1:500, IgG 1:1000, IgG4 1:1000)를 각각 700 µl/well씩 가하여 실온에서 2시간 반응시킨 후 PBST로 3회 세척하였다. IgE와 IgG4의

경우 다시 증류수로 2회 세척 후 기질로서 BCIP/NBT(5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate/nitro blue tetrazolium) tablet을 증류수 10 ml에 녹여 반응시키고, 발색정도를 관찰하여 증류수로 3회 세척한 후 건조시켰다. IgG인 경우에는 AEC(3-Amino-9-ethylcarbazole)substratesolution을 가하고 발색정도를 관찰하여 PBS로 3회 세척한 후 건조시켰다.

결 과

ELISA를 이용한 혈청 특이 항체가 측정

Food open challenge test에서 닭고기에 양성반응환자(13명)와 정상인의 혈청 특이 Ig항체를 ELISA법으로 IgE, G_{total}, IgG subclass에 대해 각각 상대적인 농도를 측정하여 알레르기 유발가능성에 대해 확인하였으며, T-Test로 유의성 검정을 하였다.

각 항체에 대한 혈청 특이 항체가는 Fig. 1과 같이 알레르기군에서 OD값(mean EM)이 0.38±0.19(IgE), 0.52±0.31(IgG), 0.2±0.08(IgG1), 0.4±0.22(IgG2), 0.2±0.08(IgG3) 및 0.78±0.91(IgG4)이고, 대조군에서 0.15±0.03(IgE), 0.15±0.03(IgG), 0.13±0.03(IgG1), 0.27±0.12(IgG2), 0.15±0.03(IgG3) 및 0.18±0.07(IgG4)로 나타났다. IgE의 경우 두 군 사이에 수치상 약 2배 정도, IgG_{total}의 경우는 약 3배 정도의 차이를 보였고(P<0.05), IgG4의 경우 5배 정도의 큰 차이(P<0.05)를 나타내었지만, IgG1, IgG2, IgG3의 경우는 두 군 사이에 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이에 IgE, IgG_{total}, IgG4에 대해 각 시험물질에 따라 반응성을 비교한 결과 큰 차이는 아니었지만, Fig. 2에서와 같이 crude extract에 비해 가열 처리한 군과 SGE처리 후에 반응성이 감소하는 양상을 나타내었다.

SDS-PAGE에 의한 닭고기 단백질의 확인

SDS-PAGE로 분리된 단백질을 Coomassie staining

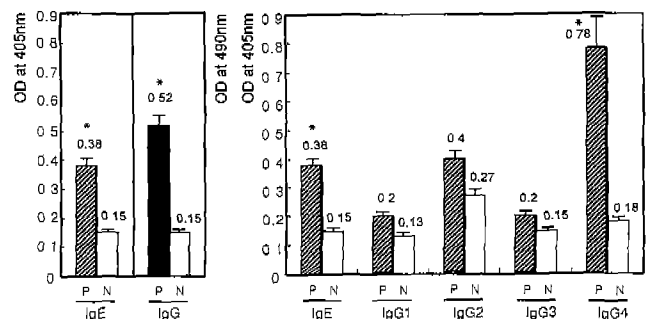


Fig. 1. Chicken-specific IgE, IgG_{total} and IgG subclass Abs (by ELISA) measured in sera from chicken meat allergics. Each lane indicated mean value of positive and negative level. Results expressed in optical density (OD) at 405 and 490. Bars indicate mean value and SEM. *p<0.05.

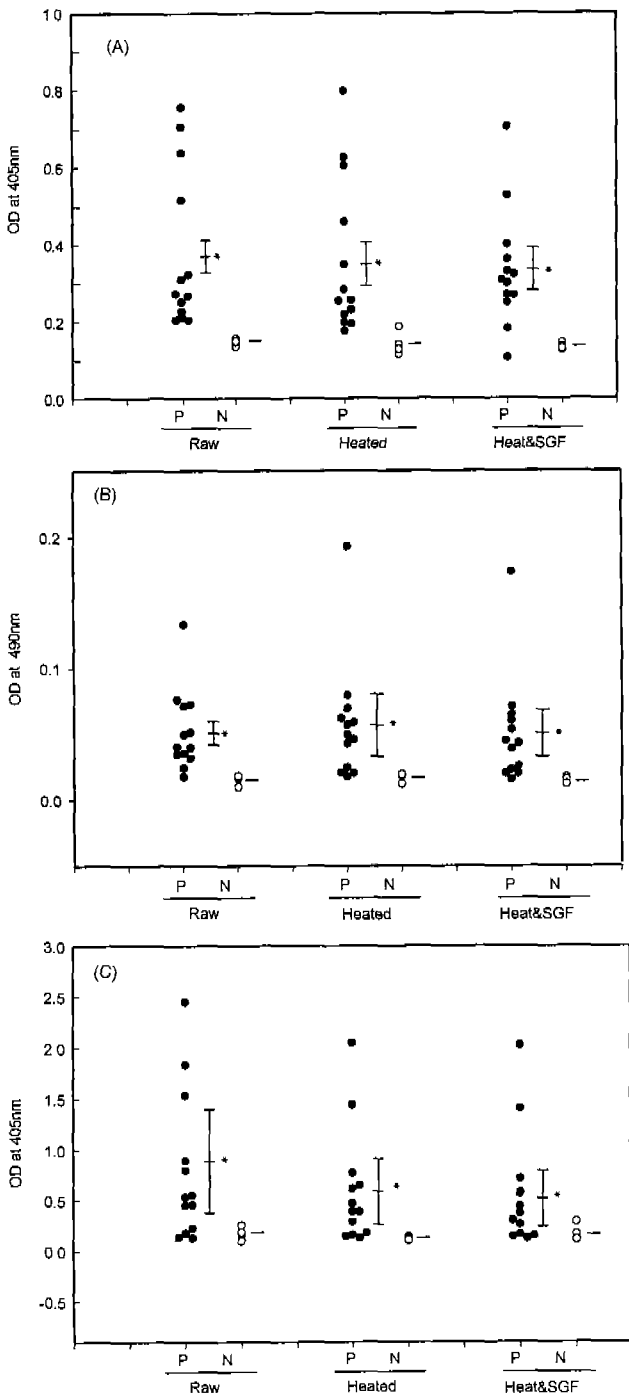


Fig. 2. Chicken-specific (A)IgE (B)IgGtotal and (C)IgG4 Abs (by ELISA) measured in sera from allergics and nonallergics. ELISA were performed on same plate to allow interindividual comparison. Each horizontal bars indicated mean value. *P*: positive, *N*: negative, *Raw*: raw meat, *Heated*: heated meat, *SGF-15*: SGF-treated(15min) meat. Bars indicate mean value and SEM. **p*<0.05.

solution으로 염색하여 관찰했을 때 10~200 kDa정도의 다양한 단백질 성분을 볼 수 있었다(Fig. 2(A)). Crude extract의

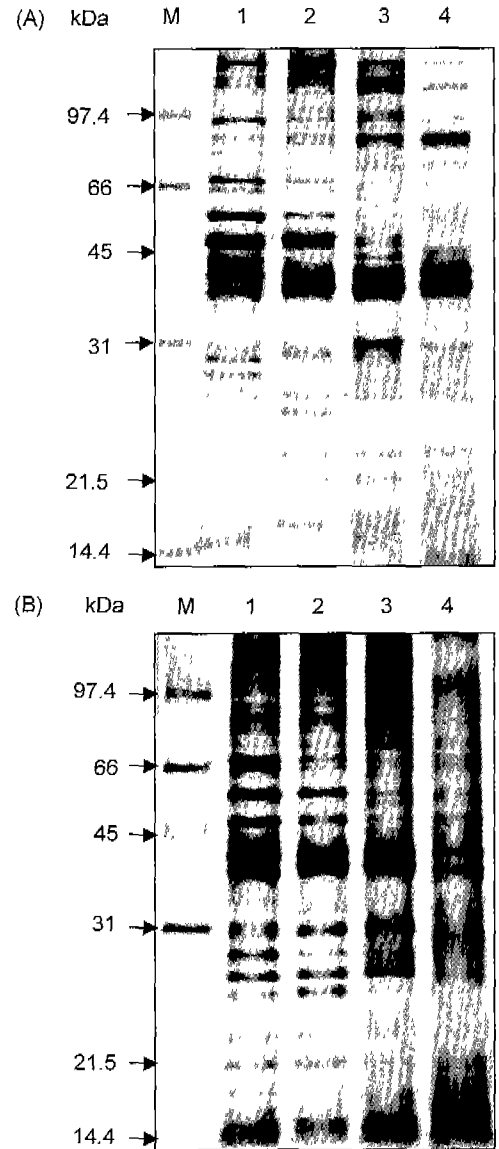


Fig. 3. (A)Coomassie brilliant blue and (B)Silver stained SDS-PAGE of crude extract (lane 1), heated extract (lane 2), heat and SGF-treated for 15minutes (lane 3), heat and SGF-treated for 60minutes (lane 4). *M*, marker. *SGF*, simulated gastric fluid.

경우 35~70 kDa사이에 많은 양의 단백질이 분포되어 있었다(lane 1). 가열 처리한 후에는 그 양이 줄어들거나 늘어날 뿐, 사라지는 단백질 성분을 관찰 할 수 없었다(lane 2). 가열처리 후 SGF로 15분간 처리한 경우, 분해되어 사라지는 단백질과 새로 생긴 단백질을 관찰할 수 있었는데, 특히 70, 85 kDa부분의 밴드는 SGF처리 후에 더 강하게 나타나는 양상을 보였다(lane 3). 또한 가열처리 후 SGF로 60분간 가열 처리한 결과 소화효소에 의해 대부분의 단백질 성분은 분해되어 peptide가 되기 때문에 많은 단백질이 사라졌다(lane 4).

Silver staining(Fig. 2(B))은 Coomassie staining법과 연 관성 있는 결과를 볼 수 있었으며, 전체적으로는 brown과 yellow계열을 나타내었다. 또한 crude extract에서 나타난 단백질들이 각 처리에 따라 점차적으로 분해되어, SGF처리 후 단백질이 분해되어 넓게 퍼져있는 양상을 볼 수 있었다.

Immunoblotting에 의한 닭고기 중의 알레르기 유발성분 관찰

Immunoblot은 혈청 특이 IgE항체에 대한 닭고기 중의 알레르기 유발성분을 동정하고자 알레르기군으로 7명의 환자와 대조군으로 알레르기 병력이 없는 2명의 혈청을 pooling하여 사용하였다(Fig. 3).

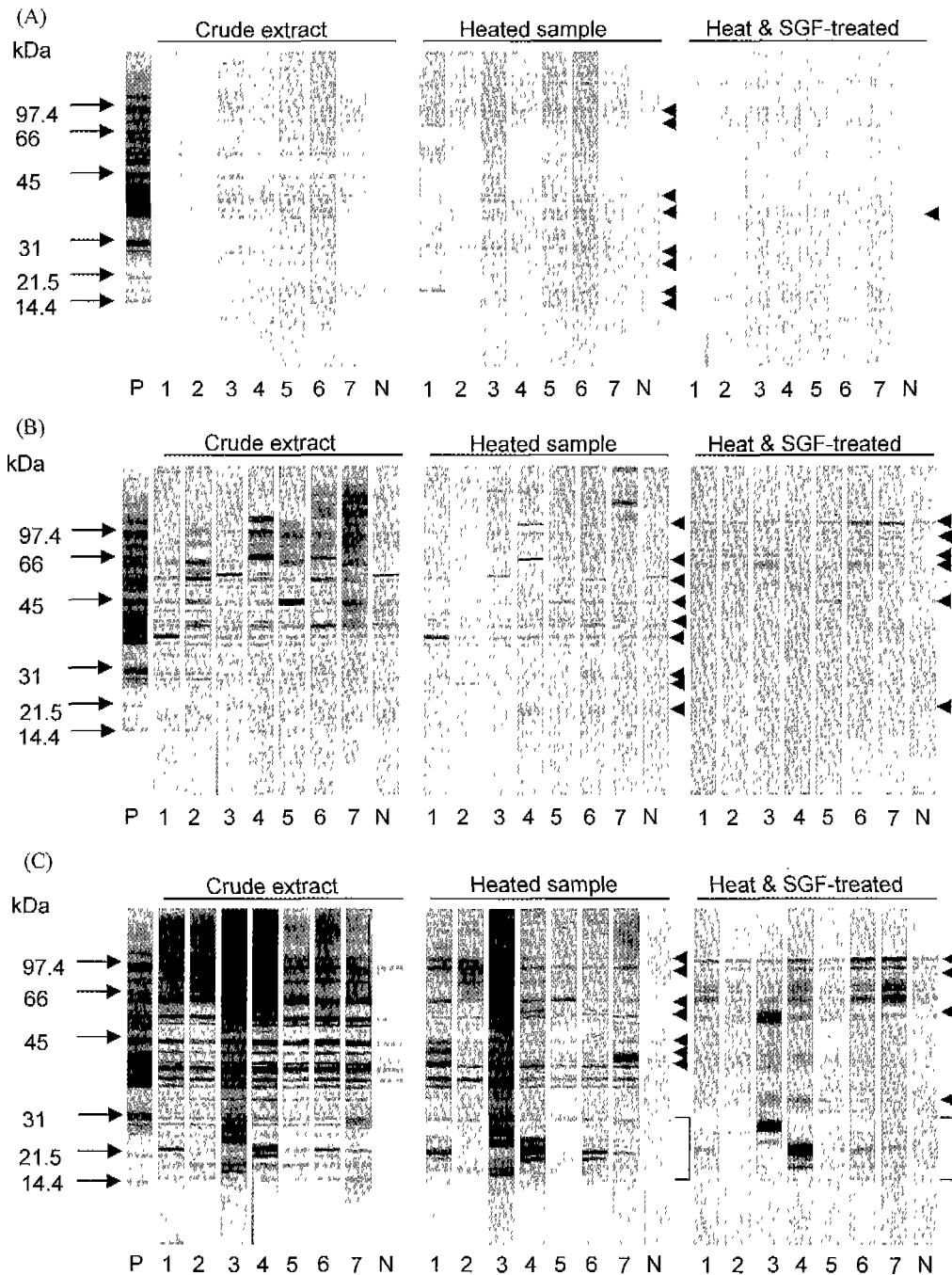


Fig. 4. (A)IgE (B)IgG_{total} and (C)IgG4 immunoblots of chicken meat extract, heated sample and heat and SGF-treated (15 min) sample with sera from individuals (1-7) with allergy to chicken meat. *P*, migrated chicken meat proteins. *N*, normal pooled serum. ◀; interested proteins.

혈청 특이 IgE 항체에 대한 immunoblot 결과 crude extract에서 14(4/7), 17(5/7), 28(5/7), 35(7/7), 43(6/7), 61(3/7) 및 78(4/7) kDa의 단백을 볼 수 있었다. 가열처리한 후에 남아있는 단백질은 알레르기 환자군에서 14(1/7), 17(6/7), 26(3/7), 28(1/7), 35(6/7), 40(5/7), 78(3/7) 및 90(6/7) kDa의 단백질이 남아있었고, 17 kDa의 단백질은 반응성이 증가하였으며, 26 kDa의 단백질은 새로 나타난 반면, 28, 33, 43, 61 kDa의 단백질은 사라졌다. 알레르기 환자군에서는 35(4/7) kDa의 단백질이 소화반응 후에도 남아있었다.

혈청 특이 IgG_{total} 항체에 대한 immunoblot 결과 가열처리한 후에 남아있는 단백질은 알레르기 환자군에서는 21(1/7), 28(1/7), 30(4/7), 39(1/7), 41(7/7), 45(2/7), 50(1/7), 66(1/7) 및 110(1/7) kDa에서 관찰되었다. 많은 단백질들이 사라졌으며, 21 kDa에서는 약간 강해졌고, 41 kDa의 경우 거의 변화가 없었다. SGF에 의한 소화반응 후에는 21(5/7), 45(1/7), 50(6/7) 및 60-110(6/7) kDa에서 밴드를 볼 수 있었다.

혈청 특이 IgG4 항체에 대한 immunoblot 결과 가열처리한 후에도 16(1/7), 17(3/7), 21(3/7), 23(4/7), 26(4/7), 40(6/7), 43(3/7), 45(5/7), 61(4/7), 64(6/7), 85(6/7) 및 110(7/7) kDa의 밴드가 나타났다. 가열 처리 후 25, 35 kDa의 밴드는 분해되어 사라졌으며, 61 kDa에서 반응성이 나타났다. SGF에 의한 소화반응 후에는 21(5/7), 45(1/7), 50(6/7) 및 60-110(6/7) kDa에서 단백질이 관찰되었다. 소화 반응 후에 많은 단백질은 분해되어 사라진 것으로 보였다.

고 찰

식품 알레르기에 관한 연구는 각 나라마다 고유의 식이 및 문화가 다르기 때문에 그 소비경향이 일반적인 식품에 대해 이루어지고 있어, 노르웨이의 경우는 대구, 일본의 경우는 쌀과 콩, 미국의 경우는 땅콩에 대한 연구가 주로 진행되고 있으나(Samuel 등, 1996), 우리 나라의 경우에는 아직은 이러한 식품 알레르기 및 알레르겐에 관한 연구가 미흡한 상황이다. 닭고기에 대한 식품 알레르기는, 외국에서는 드물게 보고되어 있어, 사례연구(Liccardi 등, 1997)나 달걀에 대한 교차 반응성(Bausela 등, 1997)을 알아보기 위한 정도이나, 국내에서는 알레르기환자에게 비교적 알레르기 유발율이 높은 식품으로 보고되고 있어, 닭고기를 대량식품으로 하여 본 실험을 통해 닭고기 단백질의 물리화학적 특성을 확인하고 알레르기 유발성을 알아보려고 하였다.

알레르겐에 대한 즉시형 반응은 IgE항체에 의해 특징적으로 나타나지만, 근래에는 식품 알레르기 환자에서 특이 IgG항체가 빈번히 관찰되고 있기 때문에 본 실험에서는 각 항체에 대한 반응성을 관찰하여, 혈청 특이 IgE 항체와 더불어 혈청 특이 IgG_{total}와 IgGsubclass중 특히 IgG4에 대한

연관성을 확인하고자 하였다. 이에 각 항체에 대한 혈중 농도를 측정된 결과 IgE와 IgG1, IgG2 및 IgG3의 경우는 낮은 값을 나타내었고, IgG_{total}와 IgG4에서는 대조군과 3배 이상의 차이로 유의한 값을 보였다. 혈청 특이 IgE 항체는 알레르기군과 대조군을 비교했을 때 평균 2배 정도의 차이를 보였지만, 대체로 낮은 수치를 나타내어 닭고기 알레르기가 IgE매개 반응보다는 다른 기전이 있는 것으로 생각되어졌다. 또한 닭고기 알레르기가 서양인에게는 알레르기 환자 중 1.4% 정도의 비율로 매우 드문 것으로 보고(Bock 등, 1990)되고 있는 반면, 우리나라에서 비교적 알레르기 유발 가능성이 높은 식품으로 나타남으로써, 인종간의 차이가 있음을 고려하고, 현재 알레르기 클리닉에서 사용하고 있는 진단시약이 외국에서 만들어진 것을 감안할 때, 우리나라에서 특이적인 알레르기 유발성에 차이가 있음을 짐작할 수 있었다. 혈청 특이 IgG4항체의 경우 전체적인 반응성이 IgE와 다른 항체에 비해 현저히 높게 나타났으며, 특히 IgG4항체가 주로 식품항원에 작용한다는 것(Igea 등, 1993)을 감안할 때 닭고기에서 나타나는 특이적인 결과로 생각되었다. 또한 물리화학적 처리에 따른 평균치의 변화에서 crude extract와 가열처리 한 것, 그리고 SGF처리에 따라 감소하는 경향(Urisu 등, 1999)을 볼 수 없는 것은 알레르겐 epitope의 알레르기 유발성이 열과 소화반응 후에도 감소되지 않고 남아있을 가능성을 생각할 수 있다.

본 실험에서 닭고기 단백질의 특성을 확인하고자 SDS-PAGE를 실시한 결과 닭고기 중 crude extract에서 확인된 7~200 kDa의 단백질들은 대부분 열에는 안정하게 남아있었고, 산과 소화효소에는 불안정하여 분해된다는 것을 알 수 있었다(Kortek Kangas-savolainen 등, 1993). Silver stain결과는 열에 안정하고, 소화 반응 후에도 남아있는 단백질들이 당화된 glycoprotein임을 확인시켜 주었다(Liebers 등, 1996).

또한 알레르기 환자의 혈청을 이용해 닭고기 성분 중의 알레르기 유발 성분을 동정하고자 immunoblot을 실시한 결과, crude extract와 가열 처리한 경우, 그리고 가열 후 SGF처리 후에도 남아있는 단백질을 관찰할 수 있었다. 보통, 알레르겐의 처음 감작은 소화반응이 끝난 단백질에 의해서 일어나지만, 재 노출 시에는 동일한 또는 유사한 epitope에 의해 급성반응이 나타나게 되므로 소화반응 전의 단백질 성분들도 알레르겐으로 작용할 수 있는 가능성이 있는 것으로 생각되며, 특히 닭고기의 경우는 보통 익혀서 먹는 경우가 대부분이므로 가열 처리 후에도 존재하는 성분이 국내 알레르기 환자에서 식품 알레르기를 유발하는 알레르겐으로 추정된다. 가열 후 SGF를 처리하여 얻어진 단백질은 crude extract, 혹은 열처리한 경우와 비교했을 때 대부분의 단백질은 소화과정동안 분해되어 그 양이 현저히 감소

됨을 알 수 있었다.

IgG와 항체가 측정 시 유의하게 높은 값을 나타낸 IgG4에 대해 immunoblot을 실시한 결과 혈청 특이 IgE, IgG_{total}, IgG4항체가 유사한 알레르겐에 반응하는 양상을 볼 수 있었다(Szabo, I. 등, 2000). 혈청 특이 IgG_{total}의 경우 관찰된 성분은 모든 군에서 공통적으로 나타난 것이 아니라 개인마다 특징적으로 나타난 것으로 Specific IgG가 인체 내 자연 면역체계의 일부로 그 항원への 노출을 알려주는 표지라고 볼 수 있었다(Johansson 등, 1988). 혈청 특이 IgG4의 경우 관찰되는 성분이 특이 IgE와 비교했을 때 그 반응성이 역의 관계로 나타났다. 즉, IgE에 반응성이 큰 환자인 경우는 IgG4에 대해 낮은 반응성을 나타내었고, IgE에 대한 낮은 반응성은 IgG4에 높은 반응성을 보여주었는데, 본 실험에 사용된 혈청이 식이 유발 검사로 확인된 닭고기에 대한 알레르기 환자의 혈청임을 감안 할 때, 닭고기 알레르기가 IgE 매개 반응뿐 아니라 IgG4 매개 반응 또한 동반함을 기대할 수 있었다. 근래에는 알레르기 질환에서 IgG4의 역할에 대해 관심이 모아지고 있는데, IgG4를 포함해서 열에 안정한 IgG항체가 basophil과 결합하는 reaginic특성을 가지고 있어 즉시형 과민반응을 매개한다는 보고(Wakayama 등, 1998)와 IgG4가 immune complex를 만든 후 basophil을 자극하여 히스타민 등 매개체를 분비시킴으로써 제3형의 알레르기 반응을 일으켜 제1형과 유사한 반응을 하는 반면, 제1형 반응을 억제하는 항체(Blocking antibody)로도 또한 작용할 수 있다는 보고(Igea 등, 1993)가 있으며, Rafei등(1989)은 IgG4항체가 즉시형 반응과 지연형 반응을 일으킨다고 보고하고 있어 본 실험에서 닭고기에 대한 높은 반응성과 연관된 결과라 볼 수 있었다(Nakagawa, T. 등, 1992, Miyamoto, T. 등, 1991).

근래 들어 패스트 푸드점이나 냉동 가공육의 보급 등 닭고기의 소비 뿐 아니라 다른 식품에 대해서도 식생활의 문화가 빠르게 바뀌어가고 있고, 이러한 식생활의 변화가 알레르기 원인식품의 빈도에도 크게 영향을 미치게 됨으로 각 식품에 대한 특이적인 검색법과 지속적인 통계자료가 요구되고 있다. 이에 본 실험에서는 이상의 결과들을 통해 닭고기 단백질의 *in vivo* model에서의 processing에 따른 변화를 *in vitro*상에서 확인하였으며, 열과 산 및 소화효소에도 안정하여 알레르겐으로 추정되는 단백질을 관찰할 수 있었다. 또한 혈청 특이 IgE에 비해 월등히 높은 혈청 특이 IgG4에 대한 반응성이 확인됨으로써 닭고기에서의 특이적인 양상으로 생각되었다. 이에 IgE에 대한 1형 알레르기 기전으로는 설명될 수 없는 다른 기전에 대한 많은 연구에 관심이 모아지고 있고, IgG subclass 측정이 널리 사용되고 있는 점을 고려할 때, 더 나아가 IgG4의 항체가 측정이 닭고기 알레르기 환자의 진단 및 치료제의 개발에 유용하게 쓰일 수 있을 것이라 생각되었다.

참고문헌

- Alberse, R. C., Stapel, S. O. and van, Ree, R. (1998) Standardization of *in vivo* and *in vitro* diagnostic procedures in food allergy. *Allergy*. **53**, 62-64.
- Anne, P. L., Paivi, K., Kati, P., Tuomo, T., Hannu, K. (2000) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests : concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*. **67**, 53-64.
- Astwood, J. D., Leach, J. N. and Fuchs, R. L. (1996) Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotech*. **14**, 1269-1273.
- Bausela, B. A., Garcia-Ara, M. C., Esteban, M. M., Martinez, T. B., Diaz-Pena, J. M. and Ojeda-Casas, J. A. (1997) Peculiarities of egg allergy in children with bird protein sensitization. *Ann. allergy. Asthma. Immunology*. **78**, 213-216.
- Bock, S. A. and Atkins, F. M. (1990) Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. *J. Pediatr*. **117**, 561-567.
- Frew, A. J. (1997) Food allergy and intolerances. *Allergy*. **52**(6), 675.
- Igea, J. M., Cuevas, M., Marcos, C., Lazaro, J. A., Compaired, M. and Sanchez-Cano, M. (1993) IgG Subclass response to *Aspergillus Fumigatus*. *Arch Allergy immunology*. **101**, 277-282.
- James, J. M., Helm, R. M., Burks, A. W. and Lehrer, S. B. (1997) Comparison of pediatric and adult IgE antibody binding to fish proteins. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol*. **79**, 131-137.
- Johansson, S. G. and Yman, L. (1988) *In vitro* assay for immunoglobulin E. Methods, indications and interpretation. *Clinical Review of Allergy*. **6**, 93-139.
- Kortekangas-savolainen, O., Savolainen, J. and Einarsson, R. (1992) Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens. *Clin. Exp. Allergy*. **23**, 587-590.
- Lee, S. I. (1993) The role of IgG in allergic disease. 소아알레르기 및 호흡기, **3**(2), 3-10.
- Liccardi, G., Szepfalusi, Z., Noschese, P., Nentwich, I., D'Amato, M. and D'Amato, G. (1997) Allergy to chicken meat without sensitization to egg proteins : A case report. *J. Allergy. Clin. Immuno.* **100**, 577-577.
- Miyamoto, T., Koya, N. and Suzuki, S. (1991) Clinical significance of specific IgG4 antibody in serum. *Japaness journal of allergol*. **40**, 215-223.
- Nakagawa, T., Okano, Y. and Iwasaki, E. (1992) Clinical significance of specific IgG4 antibody determination in children against egg white. *Japaness journal of allergol*. **41**, 694-704.
- Opara, E. I., Oehlschlager, S. L. and Hanley, A. B. (1998) Immunoglobulin E mediated food allergy. Modelling and application of diagnostic and predictive tests for existing and novel foods. *Biomakers*. **3**(1), 1-19.
- Rafei, A. E., Peters, S. M., Harris, N. and Bellanti, J. A. (1989) Diagnostic value of IgG4 measurements in patients with food allergy. *Ann. Allergy*. **62**, 94-99.

- Sampson, H. A. and McCaskill, C. C. (1985) Food hypersensitivity and atopic dermatitis : evaluation of 113 patients. *J. Pediatr.* **107**, 669-675.
- Sampson, H. A. and Ho, D. G. (1997) Relationship between food-specific IgE concentration and the risk of positive food challenges in children and adolescent.. *Allergy Clin. Immunol.* **100**, 444-451.
- Samuel, B., Lehrer, w., Elliott, H. and Gerald, R. (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **36**(6), 553-564.
- Sicherer, S. H. (1999) Manifestations of food allergy : Evaluation and Management. *American Family Physician.* **59**(2), 415-424.
- Szabo, I. and Eigenmann, P. A. (2000) Allergenicity of major cow's milk and peanut proteins determined by IgE and IgG immunoblotting. *Allergy.* **55**(1), 42-49.
- Towbin, H. T., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350.
- Urisu, A., Yamada, K., Tokuda, R., Ando, H., Wada, E., Kondo, Y. and Morita, Y. (1999) Clinical significance of IgE-binding activity to enzymatic digests of ovomucoid in the diagnosis and the prediction of the outgrowing of egg white hypersensitivity. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **120**, 192-198.
- Wakayama, H. Y. Hasegawa, T. Kawabe, H. Saito, H. Kikutani and Himokata, K. (1998) IgG-mediated anaphylaxis via Fcγ receptor in CD40-deficient mice. *Clinical and experimental Immunology.* **114**, 154-160.
- 김규연, 정병주, 이기영 (1995) 소아 천식환자에서 식품알레르기의 빈도 및 원인 식품. *소아 알레르기 및 호흡기.* 제5권, 96-106.