

## 백신 접종후 발생할 수 있는 전신적과민증 예측을 위한 아급성 실험동물 모형 개발과 관련 면역독성학적 지표치 평가

허 용\* · 김광호<sup>1</sup>

대구가톨릭대학교 자연대학 산업보건학과, <sup>1</sup>대구가톨릭대학교 자연대학 생물학과

### Development of Subacute Animal Model to Predict Occurrence of Systemic Anaphylaxis Following Vaccination and Evaluation of Various Immunotoxicological Parameters

Yong Heo\* and KwangHo Kim<sup>1</sup>

Catholic University of Daegu, College of Natural Sciences, Dept. Occupational Health

<sup>1</sup>Catholic University of Daegu, College of Natural Sciences, Dept. Biology

(Received April 10, 2002)

(Accepted May 30, 2002)

**ABSTRACT :** This study was undertaken to develop a subacute murine model for predicting occurrence of systemic anaphylaxis and to evaluate efficacy of various immunological parameters as the monitoring indices for the occurrence of anaphylaxis. The murine anaphylaxis model was developed through intraperitoneally sensitizing 100 µg ovalbumin (OVA) in the presence of 1 mg alum and 300 ng cholera toxin twice a week interval followed by challenging 500 µg OVA intravenously. Typical anaphylaxis symptoms were demonstrated at the both BALB/c mice, a strain prone to type-2 response, and C57BL/6 mice, a strain prone to type-1 response. Level of plasma histamine was approximately 50-fold or 30-fold higher in the mice sensitized with OVA than the mice sensitized with alum plus cholera toxin or the saline-treated mice after OVA challenge, respectively. Sensitization and challenge with OVA significantly enhanced plasma leukotriene B<sub>4</sub> levels but not IgE levels in comparison with the control mice, which indicated the role of leukotriene B<sub>4</sub> for progression of anaphylaxis. Furthermore, among mice suffered from anaphylaxis, levels of OVA-specific IgG1 were significantly higher in the BALB/c mice than in the C57BL/6 mice, which implied the genetic susceptibility for the induction of systemic anaphylaxis. Conclusively, simultaneous evaluation of histamine, leukotriene B<sub>4</sub>, and allergen-specific IgG isotype may serve as more efficient monitoring tool for vaccine-related anaphylaxis.

**Key Words :** Anaphylaxis, Histamine, LeukotrieneB<sub>4</sub>, Cytokine, Immunoglobulin, Mice

## I. 서 론

치명적 감염성 질환들에 대한 예방 차원에서 주로 영유아 시기에 시행되고 있는 백신접종은 지난 20세기에 가장 성공적으로 수행되었던 질병 예방대책이었다는 점에는 의심의 여지가 없다. 아울러 대부분의 국가에서 백신접종을 반강제적 의무사항으로 규정할 정도로 안전성 역시 확보

되어 있는 것으로 간주된다. 그러나 대상 질환들의 발생이 백신접종으로 제어되면서 역으로 발생빈도가 지극히 낮은 접종후 나타나는 부작용에 대해서는 관심사가 증대되고 있다. 백신 접종과 관련하여 발생하는 부작용에는 발적, 통증, 국소 부종, 일과성 발열등과 같은 경미하면서 발생빈도가 비교적 높은 부작용과 뇌증, 과민증(아나필락시스, anaphylaxis), 발열성 경련등과 같은 발생빈도가 지극히 낮지만 치명적인 부작용이 보고되고 있다(Fine, 1995; Chen 등, 1998). 특히 후자의 경우, 그 발생빈도가 매우 낮은 점(홍역-유행성 이하선염-풍진 백신의 경우 백만회 접종시 1~20건 정도 보고되는 아나필락시스나 디프테리아-백일해

\*To whom correspondence should be addressed

List of abbreviations : DTaP vaccine, Diphtheria-tetanus- acellular pertussis vaccine; OVA, chicken egg ovalbumin; LT<sub>B4</sub>, Leukotriene B<sub>4</sub>

과상풍 백신의 경우 백만회 접종시 0~10.5 건 정도 보고 되는 뇌증등)은 시판전 임상시험이나 시판후 부작용 보고 체계등을 통한 직접적인 인체 연구에 의한 원인규명을 지극히 어렵게 하고 있다(Ward, 2000). 이러한 부작용중 백신 접종후 수시간내 발생하는 아나필락시스는 홍역-유행성 이하선염-풍진 백신, 디프테리아-백일해-파상풍 백신, B형간염백신등의 접종과 원인적 관련성이 높은 부작용으로 인지되고 있는데(Evans, 1996; Zimmerman 등, 1996; Ward, 2000), 불활화한 백일해균을 사용하는 DTwP 백신에 비해 접종후 이상반응이 현저히 감소된 디프테리아-파상풍-정제 백일해 백신(Diphtheria-tetanus- acellular pertussis; DTaP vaccine) 접종 후에도 그 발생이 우리나라를 포함한 여러 국가에서 보고되고 있다(MMWR, 1997).

아나필락시스는 청색증, 저혈압증, 徐脈, 頻脈, 咽喉部 또는 氣管 부종을 동반하면서 기도폐쇄등을 가져와 심한 경우는 사망에 이르게 되는 치명적 이상반응으로 면역학적으로 정의할 때 type I 과민반응인 immediate hypersensitivity의 결과로써 나타나는 알레르기성 과민반응이다(Abbas 등, 2000). 즉, 알레르기 항원 특이 IgE가 B 임과 구로부터 생성된 다음 비만세포나 호염구등의 면역세포 표면에 있는 IgE receptor(FcεRI 또는 RII)에 결합하게 되면 이들 면역세포들의 활성화를 유도하게 되고 그 결과 히스타민이나 leukotriene 같은 과민반응 유도체가 분비되어 아나필락시스 증상을 유도한다(Mudde 등, 1995). IgE외에도 알레르기 항원 특이 IgG1 역시 FcγRIII receptor에 결합함으로써 mouse에서 전신적 아나필락시스 발생에 관여함이 근래 발표되었다(Miyajima 등, 1997). 아나필락시스 발생 기전에 대한 면역학적 연구는 최근에 우유, 땅콩등과 같은 음식물 알레르기 항원을 mouse에 감작시켜 성공적으로 아나필락시스를 유도하는 실험동물 모형이 개발됨으로써 본 과민반응 치료 및 예방대책 수립에 전기를 맞고 있다(Li와 Serebrisky 등, 1999; Li 등, 2000). 그러나 백신 투여후 발생할 수 있는 아나필락시스에 대해서는 아직까지 체계적인 연구가 진행되고 있지 못하다.

이에 본 논문에서는 DTaP 백신 자체 및 백신 구성성분의 아나필락시스 발생에 대한 기여도를 평가하는 본 연구에 앞서 아나필락시스 발생을 효과적으로 평가할 수 있는 실험동물 모형을 개발하였고 백신관련 안전성 검사에 유효하게 사용될 수 있는 면역학적 지표치를 설정하였기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Mouse strain 선정

아나필락시스 발생이 알레르기 항원 특이 IgE 또는 IgG1

의 단시간내 과다한 생성에 기인한 것임을 감안하여, 즉 체내에서 상기 항체 생성을 유도하는 IL-4를 생성하는 type-2 helper T cell의 활성화가 용이하게 유도되는 BALB/c mice를 실험군 strain으로 선정하였다(Chatelain 등, 1992; Pearlman 등, 1993). 아울러 대조군 mice로 type-2 helper T cell의 활성화에 길항작용을 하게 되는 type-1 helper T cell의 활성화가 용이하게 유도되는 C57BL/6 strain을 이용하였다(Krishnan 등, 1996). 각 mouse는 최초 아나필락시스 유발 항원 투여시 4주령의 어린 mouse를 실험에 사용하였는데 이는 인체에 있어서 백신접종과 관련한 아나필락시스 발생시기가 주로 중학생 이하의 청소년기임을 감안한 것이다. Mice는 일본 SLC 회사로부터 구입하여 무균적으로 관리하면서(사육실 온도: 25°C, 습도: 55%, 멸균 증류수 공급) 실험하였다.

### 2. 알레르기 항원 감작(sensitization) 및 아나필락시스 유도(challenge)

호흡기알레르기 유도에 성공적으로 이용되고 있는 chicken egg ovalbumin(OVA)을 본 연구의 아나필락시스 유발 항원으로 하고(Wills-Karp 등, 1998) 인체 주사용 생리식염수에 용해시켜 사용하였다. 100 µg OVA(Sigma, St. Louis, MO)에 adjuvant로 23 µl의 Imject Alum (1 mg alum hydroxide 함유, Pierce, Rockford, IL)와 300 ng의 cholera toxin(Sigma)을 혼합하여 최종적으로 100 µl를 mouse의 복강내로 1주 간격으로 2회 주사하였다. 아울러 Imject Alum과 cholera toxin만을 주사하는 sham sensitization 및 100 µl 생리식염수만을 주사하는 negative control 주사 역시 실시하였다. 각 군당 12 마리씩의 mice를 사용하고 기본적으로 3회 반복 실험하였다.

최종 감작후 3주 뒤 OVA 아나필락시스 유발 항원(500 µg/50 µl saline)만을 정맥(tail vein)내로 주사하는데(유도 실험), 이 때 일부분의 mice에는 아나필락시스의 병리적 소견중 하나인 혈관손상에 의한 누출을 확인하기 위하여 OVA와 0.5 % Evans blue dye(Sigma)의 혼합액을 정맥내 주사하였다. 주사후 일정 시간 아나필락시스 관련 증상 발현 여부를 관찰하였는데 아나필락시스 발생군의 경우 주사후 5분에서 30분 정도에 증상이 나타났으며 sham sensitization 혹은 negative control mice의 경우에는 1시간까지 관찰후 희생부검하였다.

### 3. 전신적 과민증 증상 발현 여부 판정

앞에서 기술한 것처럼 혈관손상(vascular leakage)에 의한 Evans blue dye의 말초조직(발바닥, 코 또는 귀 주위) 내 누출을 측정하였으며, 아울러 기존에 보고된 실험동물

에서의 systemic anaphylaxis scoring system을 이용하여 (Li와 Huang 등, 1999) 과민반응의 발생정도를 평가하였다. 즉, 유도실험 후 1시간까지 증상이 없음을 0점으로 하였으며, 주사후 눈, 코, 머리 주위를 부비는 증상을 1점, 눈 또는 입 주위 부종이 생기거나 혹은 이와 더불어 현저히 저하된 움직임을 보이면 2점, 노력성 호흡을 하거나 입, 귀 또는 꼬리 주위에 청색증이 발생하면 3점, 발작이나 경련등이 동반되면서 움직임이 없으면 4점, 3주사후 30분 이내에 사망하면 5점을 부여하였다.

치사한 mice의 경우 치사 직후에 안외정맥총(periorbital plexus) 혹은 심장(cardiac puncture)에서 채혈을 시행하였으며 치사하지는 않았지만 아나필락시스 증상 유발 mice는 주사후 30분 후에 채혈을 시행하였고, 무증상군은 주사후 1시간 후에 채혈이 수행되었다. 채취된 말초혈액에서 분리된 혈장은 사용전까지  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다. 아울러 채혈직후 무균적으로 비장을 채취하였다.

#### 4. 혈장내 히스타민 및 leukotriene 농도 정량

활성화된 비만세포나 호염구등에서 분비되는 leukotriene  $B_4$  및 히스타민의 혈장내 농도를 ELISA 기법에 의해 정량하였다. 히스타민 정량을 위해서는 IBL histamine ELISA kit (IBL Immuno-biological laboratories, Hamburg, Germany)를 사용하였는데, 방법을 요약하면 다음과 같다.

우선  $20\ \mu\text{l}$ 의 실험혈장 및 표준 혈장, positive control 혈장에  $20\ \mu\text{l}$ 의 indicator buffer를 넣고 혼합한 다음,  $4\ \mu\text{l}$ 의 acylation reagent를 넣고 다시 혼합을 한 뒤 실온에서 30분간 정치시킨다. 이후  $150\ \mu\text{l}$ 의 diluted assay buffer를 넣고 혼합한 뒤, 이 혼합액  $50\ \mu\text{l}$ 를 goat anti-rabbit anti-serum against histamine 항체가 부착된 96 well plate에 넣는다. 곧바로 peroxidase-conjugated histamine  $50\ \mu\text{l}$ 을 부가하고 최종적으로 rabbit antiserum against histamine을 50v 첨가한다음 orbital shaker에서 3시간 혼합한다. 이후 plate를 세척하고 TMB(tetramethylbenzidine) 발색단을 첨가한 후 20분이 지난 다음  $450\ \text{nm}$ (reference wave length  $610\ \text{nm}$ )에서 ELISA reader(Bio-Tek EL800, Winoski, VT)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Leukotriene  $B_4$  (LTB $_4$ )는 R&D systems 사(Minneapolis, MN) kit를 사용하여 제작사에서 공급하는 표준화된 방법에 따라 정량하였다.

#### 5. 혈장내 아나필락시스 유발 항원 특이 항체 정량

혈장내 OVA-specific IgG1, IgG2a 수준을 본 연구자가 개발한 ELISA 방법에(Heo 등, 2001) 의거 정량하였다. 방

법을 요약하면 다음과 같다.

OVA를  $0.1\ \text{M}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 9.0) coating buffer에  $20\ \mu\text{g}/\text{m}^2$ 로 녹이고 이 용액을  $100\ \mu\text{l}$ 씩 96 well ELISA plate (Immulon 2 plate, Dynex, Chantilly, VA)에 첨가한 다음 냉장상태에서 24시간 정치시켰다. 이후 1% BSA(bovine serum albumin, Sigma)-PBS로 non-specific binding을 차단한 다음 희석된 실험혈장 및 표준 혈장(reference serum)을 첨가한 다음 냉장상태에서 24시간 정치시켰다. 다음날, biotinylated rat anti-mouse IgG1, IgG2a(각각  $1\ \mu\text{g}/\text{m}^2$  1% BSA-PBS, PharMingen, San Diego, CA)를 첨가하여 2시간 실온에서 정치시켜 detection antibody가 부착하게 한 다음 avidin-peroxidase를 넣고 다시 1시간 실온에서 정치시켰다. 이후 ABTS(2,2'-azino-bis{3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid}, Sigma)로 발색을 유도한 다음  $405\ \text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. OVA-specific IgG 정량을 위한 표준혈청은 OVA  $100\ \mu\text{g}$ 과 alum  $2\ \text{mg}$  혼합액을 1주에 2번씩 3주간 복강내 주사하여 얻었는데, 이 혈청을 1/2500, 1/100으로 희석한 경우 각각  $100\ \text{unit}/\text{m}^2$ 의 OVA-specific IgG1 및 OVA-specific IgG2a를 함유하는 것으로 정하였다.

#### 6. 혈장내 total IgE 정량

혈장내 존재하는 IgE 수준을 대조군 mice와 비교분석하기 위해 본 연구자가 개발한(Heo 등, 1996) sandwich ELISA 방법에 의해 total IgE를 정량하였다. 간단하게 방법을 기술하면 다음과 같다.

Rat anti-mouse IgE capture antibody(PharMingen)를 Immulon 2 plate(Dynex)에  $2\ \mu\text{g}/\text{m}^2$ (각 well당  $100\ \mu\text{l}$ ) 첨가한 다음 냉장상태에서 24시간 정치시키고 이후 1% BSA-PBS로 non-specific binding을 차단한 다음 희석된 실험혈장 및 표준 IgE(purified mouse IgE mAb isotype standard, PharMingen)를 첨가한 다음 냉장상태에서 24시간 정치시켰다. 다음날, biotinylated rat anti-mouse IgE( $1\ \mu\text{g}/\text{m}^2$  1% BSA-PBS, PharMingen)를 첨가하여 2시간 실온에서 정치시켜 detection antibody가 부착하게 한 다음 avidin-peroxidase를 넣고 다시 1시간 실온에서 정치시켰다. 이후 ABTS(Sigma)로 발색을 유도한 다음  $405\ \text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다.

#### 7. 통계 및 분석

群간 차이의 통계적 유의성을 검증하기 위해 Kruskal-Wallis one-way ANOVA 방법을 사용하였다. 결과에 제시된 각 그림에서 \*는  $p < 0.05$  수준에서 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

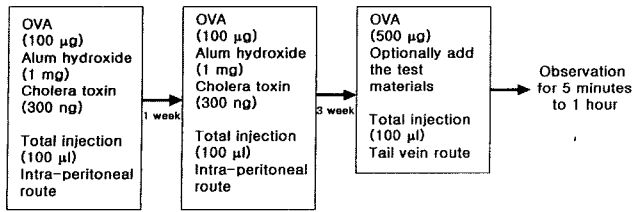


Fig. 1. Optimization of murine anaphylaxis induction with chicken egg ovalbumin sensitization and challenge through intraperitoneal and intravenous route, respectively.

### III. 결 과

#### 1. 단기간에 아나필락시스 발생을 관찰할 수 있는 mouse 모형 개발

실험동물에 있어서 아나필락시스 발생 모형은 mice에 아나필락시스 유발 항원을 경구, 근육 또는 복강내로 감작시키고 同 항원을 경구, 복강, 비강 혹은 위내투여로 투입하여 아나필락시스를 유도하는 방법이 보고되어 있다 (McCaskill 등, 1984; Wiedmeier 등, 1987; Li와 Serebrisky 등, 1999; Li와 Huang 등, 1999; Li 등 2000). 본 연구에서는 기존의 연구에서 채택되지 않은 복강내 투여를 통한 감작방법과 정맥 주사를 통한 유도실험 방법을 조합하여 4주만에 아나필락시스를 유도할 수 있는 방법을 개발하였다(Fig. 1). 본 유도 모형을 적용했을 때 발생기전의 면역학적 배경을 이루는 type-2 response가 우세한 BALB/c mice와 이에 길항작용을 나타내는 type-1 response가 우세한 C57BL/6 mice 모두에서 전형적인 아나필락시스를 유도할 수 있었다.

Fig. 2는 상기와 같은 방법으로 아나필락시스가 유도된 C57BL/6 mouse의 대표적 예인데 Evans-blue 염색시약을 OVA와 함께 정맥내로 주사시 5분 경과시 사망한 mouse로 구강 및 비강, 귀, 발바닥등 전신에서 급성 아나필락시스의 면역학적 특징인 혈관손상으로 인한 염색시약의 말초혈관을 통한 노출을 볼 수 있었다(Fig. 2上). 반면 sham sensitization(OVA 없이 cholera toxin과 alum만으로 감작)한 후에 OVA와 Evans-blue로 유도실험한 경우에는 이러한 혈관손상이 발생하지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 2下). 아나필락시스 증상이 관찰된 mice 중 치사에 이른 mice는 모두 주사후 10분 이내 사망하였으며 이외의 mice는 관찰 종료시점인 주사후 1시간까지 모두 생존하였다(data not shown).

위의 재료 및 방법 3. 전신적 과민증 증상 발현 여부 판정에서 기술한 바에 의거하여 각 실험군에서 anaphylactic score를 결정하여 분석한 결과, cholera toxin과 alum 혹은 생리식염수만으로 감작한 후 OVA로 유도 실험을 한 경우

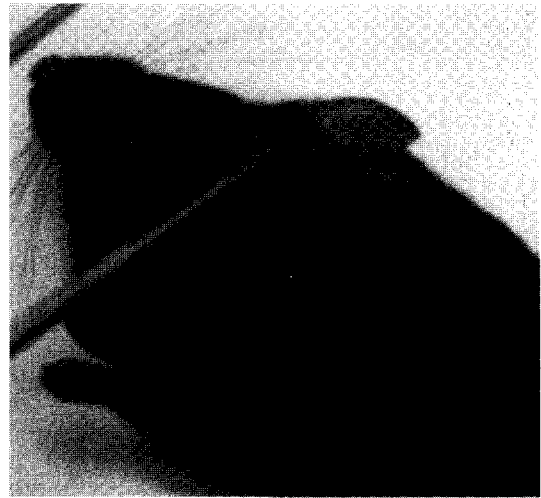


Fig. 2. Induction of anaphylactic reaction resulting in vascular leakage at the C57BL/6 mice challenged with mixture of chicken egg ovalbumin and Evans blue dye following sensitization with OVA (top), but not the mice sham-sensitized (bottom).

에는 BALB/c 및 C57BL/6 mice 모두에서 아나필락시스 발현 증상을 관찰할 수 없었다. 반면, OVA와 adjuvant로 감작한 후 OVA로 유도실험을 한 경우에는 BALB/c mice는  $3.12 \pm 0.27$ , C57BL/6 mice는  $4.36 \pm 0.25$ 로 중등도의 아나필락시스 증상을 보였다.

#### 2. 히스타민 및 leukotriene의 아나필락시스 발생 예측 지표치로서의 가능성에 대한 검토

히스타민은 비만세포나 호염구에서 분비되면 기관지 또는 내장 평활근의 수축을 유도하고, 혈관내피세포의 수축을 통해 내피세포간 간격을 넓게함으로써 혈액내 물질의 혈관 밖으로의 삼출을 유도하여 아나필락시스의 직접적인 증상들을 유발시키는 물질로서 아나필락시스와 관련하여

주요하게 측정된다. 반면, 아라키돈산(arachidonic acid) 대사의 주요 산물인 leukotriene B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)는 주로 탐식세포, 호산구 및 호중구의 활성을 매개하는 물질로서 동일계열의 LTC<sub>4</sub>에 비해 아나필락시스 쇼크 발생에 대한 역할이 잘 알려져 있지 않다(Yokomizo 등, 1997). 최근에 비만세포에서 분비되는 platelet-activating factor에 의한 아나필락시스 발생에 LTB<sub>4</sub>가 관여될 가능성이 mice 연구에서 보고되었지만(Haribabu 등, 2000) 아직까지 LTB<sub>4</sub> 분비와 아나필락시스 발생의 상관관계에 대해서는 본격적으로 연구되고 있지 않다. 특히 백신접종에 따른 아나필락시스 발생에 LTB<sub>4</sub>가 어떠한 역할을 수행할지는 연구된 바 없다.

본 연구에서는 우선 각 실험조건별로 히스타민의 농도를 정량하였다. OVA 항원이 adjuvant와 혼합되어 감각된 mice에 OVA를 정맥내로 투여한 경우 히스타민 농도가 (BALB/c mice; 309±59 ng/ml, C57BL/6 mice; 249±37 ng/ml) adjuvant 만을 감각단계에서투여한 뒤 OVA로 유도 실험한 경우(BALB/c mice; 6±2, C57BL/6 mice; 3±1 ng/ml)나 생리식염수를 감각단계에서 투여한 뒤 OVA로 유도실험한 경우(BALB/c mice; 12±9, C57BL/6 mice; 13±8 ng/ml) 보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았으며(Fig. 3), BALB/c mice와 C57BL/6 mice간 유의한 차이는 없었다. 이는 OVA와 adjuvant로 감각한 후 OVA로 유도실험을 한 경우에 BALB/c mice 및 C57BL/6 mice 모두에서 anaphylaxis score가 평균 3 이상으로 중등도였던 반면, 대조군에서는 증상이 관찰되지 않았던 결과와 일치하는 것이다. 아울러 아나필락시스 증상 발현을 동반할 정도의 히스타민 증가는 항원에 일차적으로 감각된 후 동일 항원에 반복 노출됨이 중요한 요인임을 제시하는 결과라 생각된다.

다음으로 본 연구에서 개발한 OVA 감각을 통한 아나필락시스 유도 모형에서 LTB<sub>4</sub>의 혈장내 생성 수준을 분석하였다(Fig. 4). Mice에서 stem cell factor를 복강내 투여

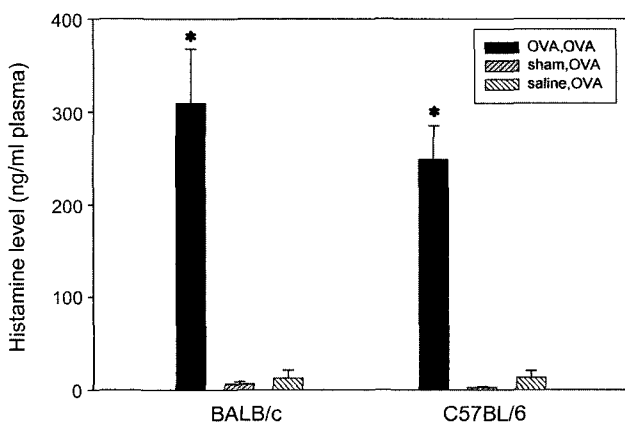


Fig. 3. Levels of plasma histamine for the mice sensitized with OVA mixed with cholera toxin and alum, cholera toxin and alum, or sline followed by intravenous challenge of OVA.

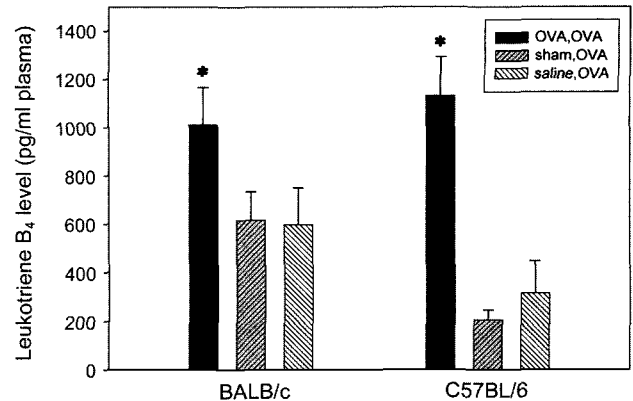


Fig. 4. Levels of plasma leukotriene B<sub>4</sub> were significantly enhanced in the mice sensitized with OVA in comparison with those of the mice sensitized with the adjuvant or saline followed by OVA challenge.

했을 때 LTB<sub>4</sub>의 합성을 유도하고 이를 통해 호산구의 활성을 매개함으로써 IgE-mediated hypersensitivity 발생을 촉진할 수 있다는 보고와(Klein 등, 2000; Klein 등, 2001) 개에서 꽃가루에 의한 비염 발생시 LTB<sub>4</sub>의 혈중 농도가 증가한다는 보고를(Cardell 등, 2000) 바탕으로, 본 연구에서는 히스타민 증감실험과 더불어 개발 백신의 아나필락시스 발생에 대한 면역학적 예측지표로서의 가능성을 모색하고자 하였다. 히스타민의 경우와 비슷하게 OVA 항원에 감각된 mice에 OVA를 정맥내 주사한 경우가 항원에 감각을 시키지 않은 상태에서 OVA로 유도실험한 경우보다 유의하게 높은( $p < 0.05$ ) LTB<sub>4</sub> 농도를 보였다. 특히 type-2 response가 용이하게 유도되는 BALB/6 mice의 경우 OVA에 감각된 군(1010±155 pg/ml)과 대조군(sham; 616±117, saline; 596±153 pg/ml)간의 차이가 C57BL/6 mice에 비해 크지 않았다. 이는 유전적 성향에 따라 LTB<sub>4</sub>의 기저수준(background level)에 차이가 있음을 제시하는 것으로 LTB<sub>4</sub> 수준이 상대적으로 높다고 해서 곧바로 아나필락시스 발생 가능성이 높을 것이라는 가정은 무리임을 시사한다고 본다.

### 3. 혈장내 total IgE 수준의 아나필락시스 발생과의 상관성 평가

본 연구에서 설정한 아나필락시스 유도 모형에서 anaphylaxis score, 히스타민, LTB<sub>4</sub>에 이어 감각 조건별로 혈장내 total IgE의 증감을 분석하였다. BALB/c mice의 경우 OVA에 감각된 mice(1034±195 ng/ml)와 감각되지 않은 mice간(sham; 1395±214, saline; 978±288 ng/ml) 혈장내 IgE의 수준에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 5). 또한, OVA에 감각된 C57BL/6 mice의 IgE 농도는 728±139 ng/ml로 adjuvant로만 감각된 mice의 434±227 ng/ml

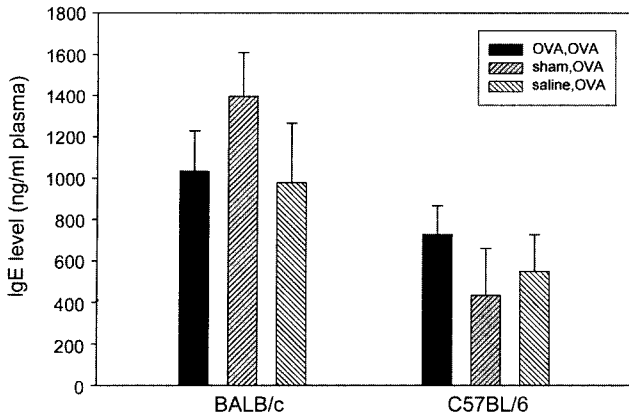


Fig. 5. Levels of IgE were not significantly modulated by the OVA sensitization at the BALB/c mice.

과 감작단계에서 생리식염수만 투여한 mice의 IgE 수준 ( $549 \pm 178$  ng/ml)에 비해서 높았지만 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 히스타민 및 LTB4와 달리 감작 조건별로 IgE의 수준이 유의한 차이를 보이지 않았던 것은, 아나필락시스 유발 항원에 감작된 개체가 재차 동일 항원에 노출될 때 히스타민 및 LTB4는 수분내외에 그 생성이 증가하는 화학물질임에 반해 IgE는 이 항원을 기억하는 B 림파구(memory B cell)의 활성화 증식을 통해 혈중에서 유의하게 증가된 IgE의 농도를 나타내기까지 수일이 소요되기 때문일 것이라고 추측해 볼 수 있다. 또한 유도실험이 항원 감작후 3주가 경과된 시점에서 행해졌다는 점을 고려하면 IgE가 항원 감작후 일시적으로 상승했다가 유도실험이 시행된 시기에는 다시 원래 수준으로 복귀되었을 가능성 역시 존재한다. 이 가능성은 수은에 노출된 mice의 경우 노출 후 2주 정도에 IgE 수준이 최고에 달한 뒤 4주 경에는 원상태로 돌아간다는 연구결과(Pelletier 등, 1994)와 연계시켜 볼 수 있다. 본 연구결과는 백신 자체 혹은 백신 구성성분에 의한 아나필락시스를 평가하는 모형으로서 감작후 일정 기간이 지난 뒤에 유도실험을 하는 경우 혈장내 IgE 수준의 변동에 근거하여 아나필락시스 발생을 예측하는 것은 판별력이 그다지 높지 않을 수 있음을 제기하고 있다.

4. 아나필락시스가 유도된 mice의 항원 특이 IgG1 및 IgG2a의 *in vivo* 생성 수준

알레르기 항원 특이 IgE 외에도 알레르기 항원 특이 IgG1 역시 FcγRIII receptor에 결합함으로써 mouse에서 전신적 아나필락시스를 유도함이 근래 발표되었을 뿐만 아니라(Miyajima 등, 1997), IgE 유전자가 결핍된 mice에서도 호흡기 과민반응에 의한 아나필락시스 쇼크가 유발됨이 발표된 바 있다(Oettgen 등, 1994). 이러한 결과는

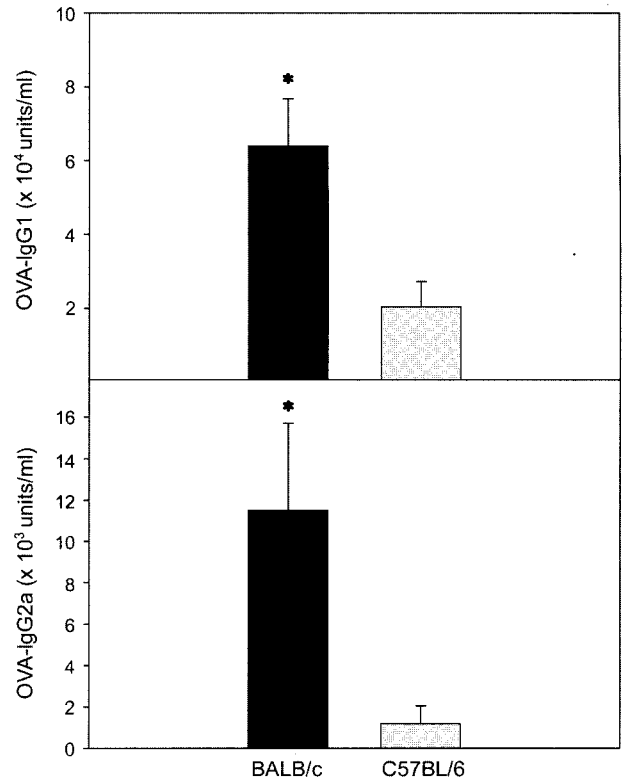


Fig. 6. Levels of OVA-specific IgG1 and IgG2a were significantly higher in the BALB/c mice than the C57BL/6 mice sensitized with OVA.

IgE 이외의 항체가 아나필락시스와 같은 과민반응을 매개할 수 있음을 제시하는 결과로서 본 연구에서는 OVA에 감작된 후 유도실험 단계에서 동일 항원에 다시 노출된 mice의 OVA-specific IgG1 및 IgG2a의 수준을 측정하여 비교분석하였다(Fig. 6). OVA-specific IgG1과 OVA-specific IgG2a의 수준을 평가할 때 BALB/c 및 C57BL/6 mice 모두에서 OVA-specific IgG1의 수준이 OVA-specific IgG2a에 비해 약 10배 정도 높았다. 이는 본 연구에서 개발한 실험동물 모형이 아나필락시스의 면역학적 배경 기전인 type-2 response를 촉진하고 있음을 제시하는 또 하나의 결과로 생각된다. 아울러 OVA-specific IgG1의 BALB/c mice 혈장내 수준이 C57BL/6 mice 보다 유의하게 높음 역시 주목이 되는데, 이는 BALB/c mice가 C57BL/6 mice에 비해 type-2 response로의 편향성이 강하다는 기존의 보고들(Chatelain 등, 1992; Pearlman 등, 1993; Krishnan 등, 1996)과 맥락을 같이 하는 것이다.

IV. 고 찰

본 논문에서는 복강내 아나필락시스 유발 항원인 chicken egg ovalbumin을 1주일 간격으로 2회 투여하여 감작

시키고 다시 3주 후에 동일 항원을 꼬리정맥 주사를 통해 노출시킴으로써 4주만에 아나필락시스의 전형적인 증상을 관찰할 수 있는 모형을 개발하여 발표하였다. 이 모형 개발은 현재 우리나라의 경우 제조 백신의 아나필락시스 관련 시험법으로 유일하게 등재되어있는 마우스 히스타민 증감시험을(생물학적제제기준 및 시험방법, 1999) 보완 할 수 있는 방법이라는 점에서 그 의의가 있을 것이다. 또한 본 모형은 여러 가지 백신의 개발 단계에서 아나필락시스 관련 안전성을 실험할 수 있는 효과적인 기술로도 여겨진다. 특히 본 모형은 IgE-mediated type-1 hypersensitivity 유발 항원 즉, 알레르기 항원에 감작되어 있을 가능성을 염두에 두고 이들 백신접종 대상 어린이들에 있어서 백신 자체 및 각 구성성분이 아나필락시스 증상 발현에 어느 정도 기여할 수 있는지를 평가할 수 있는 모형이다.

특히 본 연구에서는 기존에 아나필락시스 발생과 관련하여 주요하게 평가되고 있는 혈중 히스타민 증가가 아나필락시스 발생의 배경기전인 type-2 response가 용이하게 유도되는 BALB/c mice 뿐만 아니라 type-2 response 항원에 길항작용을 하게 되는 type-1 helper T cell의 활성화가 용이하게 유도되는 C57BL/6 mice에서도 관찰되었다(Fig. 3). 이는 백신접종시기에 다양한 경로를 통하여 과민 반응 유발 항원에 지속적으로 노출되는 경우에는 type-1 혹은 type-2 response 편향성에 대한 유전적 차이에 별반 영향을 받지 않고 아나필락시스 발생에 대한 감수성이 증가될 수 있음을 시사한다. 한편, leukotriene B4는 stem cell factor에 의해 그 합성이 촉진되어 호산구 활성화에 기여한다든지(Lynch 등, 2001), 알레르기성 비염 발생시 증가된다든지, 아토피성 피부염 진행에 관여한다든지등에 대해서는 기존에 발표되었지만(Koro 등, 1999; Mitsunobu 등, 2000), 아나필락시스 유발 항원을 체내에 감작시킴으로써 유도되는 아나필락시스 쇼크 발생과의 상관성에 대해서는 발표된 바가 없었다. 본 연구 결과 LTB4 역시 히스타민과 유사하게 아나필락시스 유발 항원에 감작된 후 동일 항원에 재차 노출된 mice에서 유의하게 증가됨이 밝혀져, 아나필락시스 발생시 기존에 알려져 있는 호중구, 호염구, 비만세포의 역할 외에 호산구 및 LTB4의 아나필락시스 발생에 대한 역할을 구체적으로 규명해 볼 필요성을 제시하고 있다.

또한 본 연구에서는 혈장내 total IgE 수준의 변동에 근거하여 아나필락시스 발생을 판단하는 것은 히스타민 혹은 LTB4 수준 증가에 비해 정확도가 떨어질 수 있음을(Fig. 5) 추론케하는 결과를 제시하였다. 이 결과는 사람의 경우 천식을 중심으로 여러형태의 과민반응성 질환의 경우 Total IgE 수준이 증가됨이 보고되어 있지만(Burney 등, 1997; Sherrill 등, 1999) 전신적 과민증의 경우에는 의심

되는 아나필락시스 유발 항원에 대한 특이 IgE를 측정하여 아나필락시스 발현 정도 또는 다른 면역지표치등과의 상관성을 분석함으로써 IgE의 아나필락시스 모니터링 지표치로서의 비중을 평가해보는 것이 필요함을 제시하고 있다. 아울러 아나필락시스 유발 항원 특이 IgG1 및 IgG2a 분석은(Fig. 6) type-2 helper T cell의 기능항진이 선택적으로 촉진되는 개체에 있어서는 아나필락시스 유발 항원 특이 IgG의 합성 수준이 증가하고 이에 따라 FcγRIII receptor에 결합하는 빈도도 양적으로 증가하여 중국에는 아나필락시스 이환에 대한 감수성이 높아질 수 있음도 제시하고 있다.

한편, 백신 관련 아나필락시스 발생과 환경오염의 관련성에 대해서도 연구의 필요성을 제기할 수 있다. 즉, 납, 수은, 경유연소물질 등 환경유해인자는 helper T cell의 분화를 type-2 helper T cell로 편향화시키고(Kishikawa 등, 1997; Heo 등, 1998), 모체를 통하여 노출되었을 때도 출생후 IgE의 수준 증가를 유도함이 보고되어 면역체계 발달에도 영향을 미칠 수 있음이 보고되고 있다(Miller 등, 1998). 특히 경유연소물질이 사람 및 실험동물 모두에서 알레르기항원 특이 IgE 및 IgG1 생성을 증가시키고 특히 호염구와 비만세포들의 초기 활성화를 유도하여 이들 세포들로부터 interleukin-4 및 히스타민 생성을 항진시켜 결과적으로 전체면역반응을 알레르기 발생이 용이한 type-2 response로 편향시킴이 최근 보고되었다(Wang 등, 1999; Diaz-Sanchez 등, 2000; Heo 등, 2001). 이러한 연구 결과들은 어린이들에 대한 환경유해인자 노출 정도가 가중될 수록 백신 접종 후 아나필락시스 발생 가능성 역시 높아질 수 있다는 가정을 세우고 평가해 볼 필요가 있음을 적시하고 있다.

본 연구를 통해 얻은 결과를 종합해보면 백신 접종과 관련하여 발생할 수 있는 전신적 과민반응인 아나필락시스는 type-1 hypersensitivity를 유도할 수 있는 항원에 노출된 경우에 뚜렷하게 발현되었으며, 특히 본 논문에서 제시한 mice 아급성 모형은 면역학적 배경의 차이(type-1 response 혹은 type-2 response의 선택적 편향성)에 상관없이 아나필락시스 증상 발현, 히스타민 및 LTB4와 같은 지표치의 상승을 측정할 수 있는 효과적인 전신적 아나필락시스 유도 실험으로서 가치를 부여할 수 있다. 아울러 본 연구는 히스타민, LTB4, 항원 특이 IgG isotype을 동시에 분석함으로써 개발 백신의 안전성 평가의 효율성을 높일 수 있음도 제시하고 있다.

## 감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 용역연구개발사업의 연구

비지원에 의해 이루어졌습니다.

### 참고문헌

- 생물학적제제기준 및 시험방법(1999): 식품의약품안전청, pp. 125-130.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. (2000): Cellular and Molecular Immunology (4th edition), W.B. Saunders Company, New York, pp. 283-297.
- Burney, P., Malmberg, E., Chinn, S., Jarvis, D., Luczynska, C. and Lai, E. (1997): The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, 314-322.
- Chen, R.T. and Hibbs, B. (1998): Vaccine safety: current and future challenges. *Pediatric Annals*, **27**, 445-455.
- Chatelain, R., Varkila, K. and Coffman, R.L. (1992): IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J. Immunol.*, **148**, 1182-1187.
- Diaz-Sanchez, D., Penichet-Garcia, M. and Saxon A. (2000): Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 1140-1146.
- Evans, G. (1996): National childhood vaccine injury act: revision of the vaccine injury table. *Pediatrics*, **98**, 1179-1181.
- Fine, P.E.M. (1995): Methodological issues in the evaluation and monitoring of vaccine safety. *Annals NY Acad. Sci.*, **754**, 300-308.
- Foster, P.S., Hogan, S.P., Ramsay, A.J., Matthaei, K.I. and Young, I.G. (1996): Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.*, **183**, 195-201.
- Haribabu, B., Verghese, M.W., Steeber, D.A., Sellars, D.D., Bock, C.B. and Snyderman, R. (2000): Targeted disruption of the leukotriene B4 receptor in mice reveals its role in inflammation and platelet-activating factor-induced anaphylaxis. *J. Exp. Med.*, **192**, 433-438.
- Heo, Y., Parsons, P.J. and Lawrence, D.A. (1996): Lead differentially modifies cytokine production *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **138**, 149-157.
- Heo, Y., Lee, W.T. and Lawrence, D.A. (1998): Differential effects of lead and cAMP on development and activities of Th1- and Th2-lymphocytes. *Toxicol. Sciences*, **43**, 172-185.
- Heo, Y., Saxon, A. and Hankinson, O. (2001): Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology*, **159**, 143-158.
- Kishikawa, H., Song, R. and Lawrence, D.A. (1997): Interleukin-12 promotes enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection of lead-exposed mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147**, 180-189.
- Klein, A., Talvani, A., Cara, D.C., Gomes, K.L., Lukacs, N.W. and Teixeira, M.M. (2000): Stem cell factor plays a major role in the recruitment of eosinophils in allergic pleurisy in mice via the production of leukotriene B4. *J. Immunol.*, **164**, 4271-4278.
- Klein, A., Talvani, A., Silva, P.M., Martins, M.A., Wells, T.N., Proudfoot, A., Luckacs, N.W. and Teixeira, M.M. (2001): Stem cell factor-induced leukotriene B4 production cooperates with eotaxin to mediate the recruitment of eosinophils during allergic pleurisy in mice. *J. Immunol.*, **167**, 524-531.
- Koro, O., Furutani, K., Hide, M., Yamada, S. and Yamamoto, S. (1999): Chemical mediators in atopic dermatitis: involvement of leukotriene B4 released by a type I allergic reaction in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 663-670.
- Krishnan, L., Guilbert, L.J., Russell, A.S., Wegmann, T.G., Mosmann, T.R. and Belosevic, M. (1996): Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN- $\gamma$  response and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.*, **156**, 644-652.
- Li, X., Huang, C.K., Schofield, B.H., Burks, A.W., Bannon, G.A., Kim, K.H., Huang, S.K. and Sampson, H.A. (1999): Strain-dependent induction of allergic sensitization caused by peanut allergen DNA immunization in mice. *J. Immunol.*, **162**, 3045-3052.
- Li, X.-M., Serebrisky, D., Lee, S.-Y., Huang, C.-K., Bardina, L., Schofield, B.H., Stanley, J.S., Burks, A.W., Bannon, G.A. and Sampson, H.A. (1999): A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 206-214.
- Li, X.-M., Schofield, B.H., Huang, C.-K., Kleiner, G.I. and Sampson, H.A. (2000): A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 150-158.
- Lynch, O.T., Gienbycz, M.A., Barnes, P.J. and Lindsay, M.A. (2001): Pharmacological comparison of LTB(4)-induced NADPH oxidase activation in adherent and non-adherent guinea-pig eosinophils. *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 797-806.
- McCaskill, A.C., Hosking, C.S. and Hill, D.J. (1984): Anaphylaxis following intranasal challenge of mice sensitized with ovalbumin. *Immunology*, **51**, 669-677.
- Miller, T.E., Golemboski, R.S., Ha, T., Bunn, F.S., Sanders, F.S. and Dietert, R.R. (1998): Developmental exposure to lead causes persistent immunotoxicity in Fischer 344 rats. *Toxicol. Sciences*, **42**, 129-135.



- Mitsunobu, F., Mifune, T., Hosaki, Y., Ashida, K., Tsugeno, H., Okamoto, M., Harada, S., Takata, S., Tanizaki, Y. and Harada, M. (2000). Enhanced peripheral leukocyte leukotriene production and bronchial hyperresponsiveness in asthmatics. *Eur. Respir. J.* **16**, 504-508.
- Miyajima, I., Dombrowicz, D., Martin, T.R., Ravetch, J.V., Kinet, J.P. and Galli, S.J. (1997): Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and FcγRIII. *J. Clin. Invest.*, **99**, 901-914.
- MMWR (1997): Pertussis vaccination: use of acellular pertussis vaccines among infants and young children recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **46 (RR-7)**, 1-25.
- Mudde, G.C., Bheekha, R. and Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M. (1995): IgE-mediated antigen presentation. *Allergy*, **50**, 193-199.
- Oettgen, H.C., Martin, T.R., Wynshaw-Boris, A., Deng, C., Drazen, J.M. and Leder, P. (1994): Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*, **370**, 367-370.
- Pearlman, E., Kazura, J.W., Hazlett, F.E. and Boon, W.H. (1993): Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses. *J. Immunol.*, **151**, 4857-4864.
- Pelletier, L., Castedo, M., Bellon, B. and Druet, P. (1994): Mercury and autoimmunity in Immunotoxicology and Immunopharmacology (Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E. and Amos, H. eds.). Raven Press, New York, pp. 539-552.
- Sherrill, D.L., Stein, R., Halonen, M., Holberg, C.J., Wright, A. and Martinez, F.D. (1999): Total serum IgE and its association with asthma symptoms and allergic sensitization among children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, 28-36.
- Snapper, C.M. and Paul, W.E. (1987): Interferon- and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, **236**, 944-947.
- Wang, M., Saxon, A. and Diaz-Sanchez, D. (1999): Early IL-4 production driving Th2 differentiation in a human *in vivo* models is mast cell derived. *Clinical Immunol.*, **90**, 47-54.
- Ward, E.J. (2000): Vaccine adverse events in the new millennium: is there reason for concern? *Bull. WHO*, **78**, 205-215.
- Wiedmeier, S.E., Chung, H.-T., Cho, B.H., Kim, U.-H. and Daynes, R.A. (1987): Murine responses to immunization with pertussis toxin and bovine serum albumin: I. Mortality observed after bovine albumin challenge is due to an anaphylatic reaction. *Pediatric Res.*, **22**, 262-267.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L. and Donaldson, D.D. (1998): Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, **282**, 2258-2261.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y. and Shimizu, T. (1997): A G-protein-coupled receptor for leukotriene B-4 that mediates chemotaxis. *Nature*, **387**, 620-624.
- Zimmerman, R.K., Kimmel, S.R. and Trauth, J.M. (1996): An update on vaccine safety. *American Family Physician*, **54**, 185-193.