



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

**Toluene diisocyanate (TDI)에 의한 직업성천식에서 TDI -
인혈청 알부민 접합체에 대한 특이 IgG 와 IgE
항체의 임상적 의의 및 IgE 항체 결합의 다양성**

아주대학교대학원

의 학 과

김 희 연

**Toluene diisocyanate (TDI)에 의한 직업성천식에서 TDI -
인혈청 알부민 접합체에 대한 특이 IgG 와 IgE
항체의 임상적 의의 및 IgE 항체 결합의 다양성**

지도교수 박 해 심

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2000년 2월

아주대학교대학원

의 학 과

김 희 연

김희연의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

아주대학교 대학원

2000년 2월 일

감사의 글

짧은 2 년간의 대학원 생활을 마치며 부족하다마 많은 것을 배울수 있었습니다. 이 길을 무사히 마칠 수 있도록 허락하신 주님께 감사 드립니다. 아무것도 모르던 저를 여기까지 손잡고 이끌어 주신 박해심교수님, 항상 선의에 찬 질책과 격려를 아끼지 않던 남동호교수님, 기꺼이 시간을 내어주신 이미리나교수님께 이 기회를 맞이하여 감사의 마음을 전합니다.

쉬고 싶을 때마다 저에게 새로운 길을 보여주시고, 용기를 주신 이상무 선생님, 최재웅 선생님, 무엇보다 항상 옆에서 저를 지켜준 부모님과 지칠때마다 포기하지 않도록 항상 격려해준 남편, 그리고 나의 가장 사랑하는 두딸 혜지, 현수에게 고마움을 전합니다.

깊어가는 가을에

김 회연

국문요약

TDI 는 우리나라뿐 아니라 전세계적으로 직업성천식을 유발하는 흔한 물질로 알려져 있다. 그러나 TDI 에 의한 직업성천식의 병인기전에 관하여는 아직 정확하게 밝혀진 바 없다. 이에 저자들은 isocyanate 에 의한 직업성 천식환자 혈청내에서 TDI-인혈청 알부민에 대한 특이 IgG 항체의 임상적 의의를 알아보고 이것의 IgE 항체와의 연관성을 알아보고자 병력 및 천식유발시험으로 확진된 isocyanate 에 의한 직업성천식 환자 (I 군), isocyanate 에 노출되었으며 호흡기 증상을 호소하는 근로자들에서 TDI 천식유발시험을 시행하였을 때 음성 반응을 나타낸 환자 (II 군)와 대조군으로 TDI 에 노출된 병력이 없으면서 특이 천식유발시험상 확진된 알레르기성 천식환자 (III 군)과 건강 대조군 (IV 군)으로 분류하여 TDI 에 의한 천식유발시험후 혈청에서 특이 IgG 및 IgE 항체를 면역효소법으로 측정하였다. 또한 다른 연구실에서 제조한 3 종류의 접합체로 (A, CM98, CM99) 20 명의 I 군 환자와 건강 대조군에서 동시에 면역효소법으로 IgE 항체를 측정하여 IgE 결합능의 차이를 관찰하였다.

1. I 군과 II 군 사이에 연령, 성별, 아토피유무, TDI 에 노출된 기간, 진단당시 PC₂₀, 혈청 총 IgE 치는 두군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (각각 $p>0.05$).
2. TDI-인혈청알부민에 대한 특이 IgG 항체는 I 군의 50 예중 23 예 (46%)에서 양성 반응으로 나타났으나, II 군에서는 13 예중 1 예 (7.7%)에서 양성이었다. 대조군인 III 군과 IV 군에서는 항체가 모두 음성이었다. TDI 에 노출된 환자에

서 TDI 에 의한 직업성천식을 진단하는데 있어 특이 IgG 항체의 민감도는 46%, 특이도는 92.3%, 양성 예측율은 95.8%, 음성 예측율은 30.8%이었다.

3. TDI-인혈청알부민에 대한 특이 IgE 항체는 I 군의 50 예중 7 예 (14%)에서 양성으로 나타났으나, II 군에서는 13 예중에서 1 예 (7.7%)만이 양성이었다. TDI 에 의한 직업성천식을 진단하는데 있어서 특이 IgE 항체의 민감도는 14%, 특이도는 92.3%, 양성 예측율은 87.5%, 음성 예측율은 21.8%이었다.
4. I 군에서 특이 IgG 항체 유병율과 IgE 항체 유병률사이에는 통계학적으로 유의한 상관관계는 없었고 ($p>0.05$), 천식반응의 종류에 따른 특이 IgG 항체의 유병률은 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ($p>0.05$).
5. 세종류의 TDI-HSA 을 이용한 특이 IgE 항체 측정 결과, 이들간의 양성물에 유의한 연관성이 관찰되었다 ($p<0.05$).
6. TDI 접합체중 A 접합체에 양성 반응을 보이는 환자의 혈청내 특이 IgE 항체 반응을 CM98, CM99 접합체로 억제하는 면역효소억제시험을 시행한 결과 A 접합체에 대한 억제 반응은 용량의존적 억제 반응 양상을 보였으나 CM98, CM99 접합체, 환삼덩굴 화분에 의해서는 21% 이하의 억제 반응이 관찰되었다. 반면 CM 99 접합체에 양성 반응을 보이는 환자의 혈청으로 면역효소억제 시험을 시행시 CM 99 접합체에 대한 억제 반응은 용량의존적 억제 반응 양상을 보였고, CM 98 접합체에도 50%이상의 억제를 보였으나 A 접합체, 환삼덩굴 화분에 대해서는 억제 반응이 관찰 되지 않았다.

이상의 결과로 TDI 에 의한 천식환자의 일부에서 특이 IgE 항체가 존재하

고, TDI 에 노출된 환자에서 혈청학적으로 특이 항체를 측정하여 TDI 천식 유발시험결과를 예측하기 위해서는 특이 IgG 항체 유무가 IgE 항체보다 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 접합체에 따라 특이 IgE 항체의 결합능이 차이가 있어, 이러한 사실이 특이 IgE 항체의 유병률 결과를 다양하게 나타낼 수 있겠다.

핵심되는 말: TDI 에 의한 직업성 천식, 특이 IgG 항체, 특이 IgE 항체,
면역효소법, 다양성

차례

논문 인준서	i	
감사의 글	ii	
국문요약	iii	
차례	vi	
그림차례	viii	
표차례	x	
I. 서론		
I. 서론		1
II. 대상 및 방법		
A. 연구대상	3	
B. TDI 천식유발시험	3	
C. TDI-인혈청 알부민 결합체 (이하 TDI-HSA 라 약함) 제조	4	
D. 면역효소법을 이용한 TDI-HSA 에 대한 특이 IgG 항체 측정	5	
E. 면역효소법을 이용한 TDI-HSA 에 대한 특이 IgE 항체 측정	6	
F. 면역효소억제시험	7	
G. 통계	7	
III. 결과		
A. 대상 환자의 임상적 특성	8	
B. TDI-HSA 에 대한 특이 IgG 항체	9	
C. TDI-HSA 에 대한 특이 IgE 항체	10	

D. TDI-HSA 에 특이 IgG 와 IgE 항체사이의 연관성-----	11
E. 천식반응 종류에 따른 특이 IgG 항체의 유병률-----	11
F. 세종류의 TDI-HSA 을 이용한 특이 IgE 항체 측정 결과 비교-----	12
G. 면역효소억제시험-----	13
IV. 고찰 -----	15
V. 결론 -----	18
참고문헌-----	19
영문요약 -----	22

그림 차례

Figure 1. Comparison of specific IgG bindings to toluene diisocyanate (TDI) -human serum albumin conjugate in four different groups. Group I: TDI-induced asthma with positive challenges, Group II: Exposed asthmatic workers with negative challenges, Group III: Unexposed allergic asthma, Group IV: Unexposed healthy controls.-----8

Figure 2. Comparison of specific IgE bindings to toluene diisocyanate (TDI) - human serum albumin conjugate in four different groups. Group I: TDI-induced asthma with positive challenges, Group II: Exposed asthmatic workers with negative challenges, Group III: Unexposed allergic asthma, Group IV: Unexposed healthy controls.-----9

Figure 3. Comparison of specific IgG levels to toluene diisocyanate (TDI)- human serum albumin conjugate according to the type of asthmatic response during the TDI-bronchoprovocation test. No significant differences were noted among them ($p>0.05$). -----10

Figure 4. Percent inhibition of specific IgE bindings to Ajou toluene diisocyanate

(TDI)-human serum albumin conjugate by ELISA with serial additions of Hop japanese pollen, three sources of TDI-HSA conjugate, Ajou and two CM conjugates (98, 99) in serum showing an isolated positive response to Ajou conjugate.-----12

Figure 5. Percent inhibition of specific IgE bindings to CM99 toluene diisocyanate

(TDI)-human serum albumin conjugate by ELISA with serial additions of Hop japanese pollen, three sources of TDI-HSA conjugate, Ajou and two CM conjugates (98, 99) in serum showing an isolated positive response to CM99 conjugate.-----13

표 차례

Table 1. Comparison of dermographic data between group I and group II subjects

----- 7

Table 2. Comparison of specific IgE bindings among three different toluene diisocyanate (TDI)- human serum albumin conjugates in 20 sera of TDI-induced asthma.----- 11

Toluene diisocyanate (TDI)에 의한 직업성천식에서 TDI-인혈청 알부민 접합체에 대한 특이 IgG와 IgE 항체의 임상적 의의 및 IgE 항체결합의 다양성

아주대학교 대학원 의학과

김 회 연

< 지도 박 해 심 교수 >

I. 서론

Isocyanate는 폴리우레탄 형성에 사용되는 화학물질로 가구, 약기의 도장제, 접착제, 광택제로 널리 이용되고 있으며¹, 전세계적으로 직업성천식을 유발하는 가장 흔한 원인으로 보고되고 있다². 국내에서는 isocyanate 화합물중 toluene diisocyanate (TDI)가 직업성천식과 관련성이 높으며, spray painter에서 조사된 국내 유병률은 13%까지 보고되고 있다³.

TDI에 의한 직업성천식의 병인기전은 아직 완전하게 밝혀져 있지 않지만, 약리학적 기전⁴, 호중구의 역할에 대한 일부 보고⁵ 등 다양한 비면역학적 기전 외에 isocyanate를 취급하는 근로자의 일부에서만 직업성천식이 유발되고, 비자극적인 농도에서도 증세를 유발 시키며, 일정기간 잠복기를 거친다는 점등으로 면역학적 기전에 대한 활발한 연구

가 진행중이다⁶. Isocyanate 에 의한 천식으로 확진된 환자들의 혈청 특이 IgE 항체 양성은 0-40%까지⁶⁻⁹ 다양하게 보고 되어, IgE 매개반응의 병인적 역할에 대하여는 많은 논란이 있다. Catier 등¹⁰은 IgG 매개반응에 대해서, hexamethylene diisocyanate (이하 HDI 라 약함)와 methylene diisocyanate (이하 MDI 라 약함)에 감작된 환자들에서 HDI 와 MDI-인혈청 알부민 접합체 (이하 MDI-HSA 라 약함)에 대한 특이 IgG 항체와 천식유발시험 결과와의 밀접한 관련성을 보고하였고, 그후 Lushniak 등¹¹이 MDI 에 노출된 근로자를 대상으로 한 연구에서 MDI-HSA 에 대한 특이 IgG 항체가 병인기전에 작용하기보다 노출에 따른 표지자임을 보고하였으나, TDI-HSA 결합체에 대한 특이 IgG 항체에 관한 연구는 알려진 바 없으며 TDI-HSA 에 따른 IgE 결합하는 항원부위의 차이를 보고한 논문은 없다.

이에 저자들은 TDI 에 의한 직업성천식 환자 혈청내에서 TDI-HSA 에 대한 특이 IgG 항체의 임상적 의의와 IgE 항체와의 연관성을 알아보고자 하였고, IgE 항체의 양성률에 대한 보고의 차이가 많은 이유로 접합체의 제조방법이나 IgE 와 결합하는 항원성의 차이에 기인한 것으로 생각되어, 다양한 TDI-HSA 을 이용하여 IgE 항체를 측정하고 면역효소검정법을 통하여 항원성을 비교하였다.

II. 대상 및 방법

A. 연구대상

병력 및 천식유발시험으로 확진된 TDI에 의한 직업성천식 환자 50 예를 I군으로 분류하였고, TDI에 노출후 호흡기 증상을 호소하는 근로자들에서 TDI 천식유발시험을 시행하였을 때 음성 반응을 나타낸 환자 13 예를 II군으로 분류하였다. 대조군으로 천식유발시험상 확진된 알레르기성 천식 환자 20 예를 III군으로, TDI 노출력이 없는 건강대조군 20 예를 IV군으로 분류하였다.

아토피 유무를 조사하기 위해 우리나라에서 가장 흔한 50여가지 흡입성 알레르겐 (*Dermatophagoides farinae*, cat fur, oak, rye grass, mugwort, *Aspergillus* spp., 포함 : Bencard, U.K.)에 대해 알레르기 피부단자시험을 시행하였다. 대조군으로 1% histamine (Bencard, U.K.)에 대한 피부단자시험을 동시에 시행하여 각각의 팽진 (wheal) 및 발적 (erythema)의 크기를 측정, 이를 histamine에 대한 팽진비 (allergen histamine wheal ratio : A/H 비)로 표시하였다. A/H 비가 1 이상인 경우를 3+로 판독하며, 피부단자시험상 한가지 이상의 흡입성 알레르겐에 3+이상의 양성 반응을 보였을 때 아토피로 정의하였다. 총 IgE는 방사선면역검사 (DPC, USA)로 측정하였다.

B. TDI 천식유발시험

TDI 천식유발시험은 복용했던 약물을 24시간 이상 중단한 후에 시행하였다. DeVilbiss 646 nebulizer로 생리식염수를 상시 호흡량으로 10회 흡입하고 폐기능 검사를

시행하여 FEV₁을 측정하여 이를 기저치로 하였다. TDI 천식유발시험은 작은 밀폐된 방에서 TDI (80:20=2, 4-form:2, 6-form, Aldrich, Milwaukee, USA)를 5분에서 15분까지, 천식 증상이 나타날 때까지 흡입하도록 하였으며, 이때 유독가스 측정기인 TLD-1 (MDA Scientific, USA)로 측정한 TDI의 농도는 20 ppb 이하였다. 흡입후 첫 1시간동안은 10분마다 3회, 30분마다 1회 폐기능검사를 시행하며, 후기 반응을 관찰하기 위해 7시간까지 매시간 폐기능검사를 시행하여 FEV₁이 기저치보다 20%이상 감소하는 경우를 양성 반응으로 판정하였다.

TDI 천식유발시험 결과는 Perrin 등¹²이 보고한 방법으로 분류하였다. 10분에서 20분 이내에 양성 반응으로 관찰된 경우를 조기 반응으로, 3시간에서 4시간이후에 양성 반응으로 관찰된 경우를 후기 반응으로, 조기 및 후기 반응이 모두 나타난 경우를 이중 반응으로 분류하여, 이들 세가지 형을 전형적인 반응으로 정의하였으며, prolonged immediate, square waved, progressive response 를 비전형적 반응 (atypical reaction)으로 정의하였다.

C. TDI-HSA 제조

TDI-HSA 은 손 등¹³이 보고했던 방법을 변형하여 만들었다. 간략하게 기술하면 2.4g의 TDI (toluene 2,4-diisocyanate)를 90ml의 인산염 완충액에 녹인 후 1% 인혈청 알부민에 넣고 반응시킨 후 5분, 10분, 20분, 30분, 40분 후 분주하였다. Ammonium carbonate (2M)을 동량 넣어 반응을 종결시킨 후 4°C에서 3,000g로 20분간 원심분리한 후 cellulose membrane (molecular weight cut off 12KDa, Sigma Chemical Co. St Louise, MO)으로 3일간 4 liter의 0.1M ammonium carbonate buffer에 투석시켰다. 동량의 20% trichloroacetic acid로 침전시킨 후 1M sodium carbonate로 다시 용해하여 1일간 증류수로 투석하였다.

결합체내의 TDI 양은 Gutmann assay¹⁴를 수정하여 측정하였다. 50 μ l의 검체에 50 μ l 농축된 염산, 50 μ l 증류수, 0.2ml 0.029M sodium nitrate를 5분간 반응시킨 후 0.6ml의 7.4M ammonium hydroxide에 녹인 0.031M sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate을 반응시켰다. 5분 후 500nm의 spectrophotometry에서 흡광도를 읽은 후 *p*-toluidine을 기준으로 하여 측정하였다. 결합체내의 단백질농도는 우혈청 알부민을 기준으로 하여 Lowry 법¹⁵으로 측정하였고 이를 A 접합체로 명명하였다.

실험에 사용된 다른 두개의 접합체는 Canegie Mellon 대학 (Pittsburgh, USA)에서 만든 여러 개의 결합체중 가장 예민도가 높은 두개의 접합체 (이하 CM98, CM99)를 제공받아 실험에 사용하였다.

D. 면역효소법을 이용한 TDI-HSA에 대한 특이 IgG 항체 측정

1mg/ml의 TDI-HSA 항원을 carbonate buffer (PH 9.6)로 희석하여 96-well microtiter plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에 1 well 당 100 μ l씩 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 작용시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 인산염 완충식염수 (PBS)로 3회 세척후 3% 우혈청알부민이 포함된 PBS-T (3% BSA-PBST)를 well 당 350 μ l씩 넣어 3시간 작용시켜 비특이적 반응을 막았다. 환자와 대조군의 혈청을 3% BSA-PBST로 1:500 v/v으로 희석하여 well 당 50 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBS-T로 3회 세척후 peroxidase가 결합된 염소 항 IgG 항체 (Sigma Chemical Co., St. Louise, MO)를 3% BSA-PBST에 1:5000 v/v으로 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 반응시켰다. 다시 5회 PBS-T로 세척후 o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 발색용액 (Sigma Chemical Co, St Louise, MO)을 well 당 100 μ l씩 넣어 반응시켰고 10분후 100 μ l의 2.5N H₂SO₄로 반응을 중지시킨후

microplate reader (Molecular Device Co.)을 이용하여 490nm 에서 흡광도를 측정하였다. 동시에 시행한 건강대조군 20 예의 혈청을 대조군으로 하여, 이들의 평균흡광도에 2 배의 표준편차치를 더하여 양성 반응의 cut-off치를 산출하고, 그 이상일 경우 양성반응으로 정의하였다.

D. 면역효소법을 이용한 TDI-HSA 에 대한 특이 IgE 항체 측정

Microtiter plate (Coastar, Cambridge, MA)에 TDI-HSA 항원을 carbonate buffer (PH 9.6)로 희석하여 well 당 1 μ g 씩 넣은 후 4°C 에서 18 시간 반응시켰다. 5% BSA-PBST 를 well 당 350 μ l 씩 넣어 3 시간 작용시켜 비특이적 반응을 막았다. 환자와 대조군의 혈청을 5% BSA-PBST 로 1:10 v/v 으로 희석하여 well 당 50 μ l 씩 넣어 37°C 에서 24 시간 반응시켰다. 다시 PBS-T 로 3 회 세척후 biotin 이 부착된 염소 항 IgE 항체 (Vector Laboratories, Inc., Burlingam, CA)를 5% BSA-PBST 로 1:500v/v 으로 희석후 37°C 에서 3 시간 반응시켰다. 3 회 PBST 로 세척후 peroxidase 가 결합된 streptoavidin (Sigma Chemical Co, St, Louis, MO) 를 5% BSA-PBST 로 1:2000 v/v 으로 희석하여 37° C 에서 1 시간 반응시켰다. 다시 5 회 PBS-T 로 세척후 TMB 발색용액 (Sigma Chemical Co, St, Louis, MO)을 각 well 당 75 μ l 씩 넣어 15 분간 발색시킨 후 2.5N H₂SO₄ 용액을 동량 넣어 반응을 중단시켰다. Microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 450nm 에서 흡광도를 측정하였다. 동시에 시행한 건강대조군 20 예의 혈청을 대조군으로 하여, 이들의 평균흡광도에 2 배의 표준편차치를 더하여 양성 반응의 cut-off치를 산출하고, 그 이상일 경우 양성 반응으로 정의하였다.

E. 면역효소억제시험

면역효소법에서 강양성을 보인 환자의 혈청을 이용하여 면역효소 억제시험을 시행하였다. 항원으로는 A 접합체, CM 98, CM99를 사용하였으며 각각 0-100 μ g/ml 용액을 만들어서 농도에 따른 억제 정도를 측정하였다. 환자 혈청 50 μ l와 동량의 억제용액을 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 반응시킨후, 앞서 기술한 것과 동일한 방법으로 특이 IgE 항체 측정을 위한 면역효소법을 시행하였다. 억제정도는 아래와 같은 방법으로 산출하였다.

$$1 - (\text{억제 항원이 추가된 혈청의 흡광도} / \text{PBS가 추가된 혈청의 흡광도}) \times 100 (\%)$$

G. 통계

통계처리는 SPSS version 7.0 (Chicago, USA)을 이용하여 분석하였다. 각 군간의 특이 IgG 항체와 IgE 항체의 양성률 비교는 cross-tab을 이용하여 산출하였다. p 값이 0.05 이하일때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

III. 결과

A. 대상 환자의 임상적 특성

천식유발시험상 양성인 I군은 50 예로 평균연령이 39.1 ± 1.4 세였고 남자가 35 예, 여자가 15 예였다. 50 예중 27 예가 아토피였고 TDI에 평균 노출 기간은 72.1 ± 9.7 개월이었다. 진단당시 메타콜린 PC₂₀치는 7.98 ± 1.8 mg/ml 이었고 혈청 총 IgE는 389.6 ± 78.2 IU/ml 이었다. 천식유발시험결과 23 예에서는 조기 반응, 5 예에서는 후기반응, 9 예에서는 이중반응을 보였고, 13 예에서 비전형적인 반응을 나타내었다. I군과 II군 사이에 연령, 성별, 아토피유무, TDI에 노출된 기간, 진단당시 PC₂₀, 혈청 총 IgE 치는 표 1과 같으며 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (각각 $p > 0.05$).

Table 1. Comparison of demographic data between group I and group II subjects.

	Group I (n=50)	Group II (n=13)	P value
Sex (M/F)	35/15	11/2	NS
Age (year)	39.1 ± 1.4	36.1 ± 3.6	NS
Atopy (presence/absence)	27/23	6/8	NS
Exposure duration to TDI (months)	72.1 ± 9.7	56.0 ± 17.3	NS
Initial methacholine PC ₂₀ (mg/ml)	7.98 ± 1.8	12.2 ± 4.0	NS
Serum total IgE level (IU/ml)	389.6 ± 78.2	411.3 ± 120.9	NS

All values were presented as mean \pm S.E.

NS : no statistical significance

TDI : toluene diisocyanate

B. TDI-HSA 에 대한 특이 IgG 항체

TDI-HSA 에 대한 특이 IgG 항체는 I 군의 50 예중 23 예 (46%)에서 양성으로 나타났으나, II 군에서는 13 예중에서 1 예 (7.7%)에서 양성이었다. 대조군인 III 군과 IV 군에서는 항체가 모두 음성이었다. 특이 IgG 의 유병율은 I 군이 II 군 ($P= 0.02$)과 III 군 ($p< 0.001$)에 비해 유의하게 높았고, II 군과 III 군사이에는 유의한 차이가 없었다 ($p >0.05$, Fig 1). TDI 에 노출된 환자에서 TDI 에 의한 직업성천식을 진단하는데 있어 특이 IgG 항체의 민감도는 46%, 특이도는 92.3%, 양성 예측율은 95.8%, 음성 예측율은 30.8%이었다.

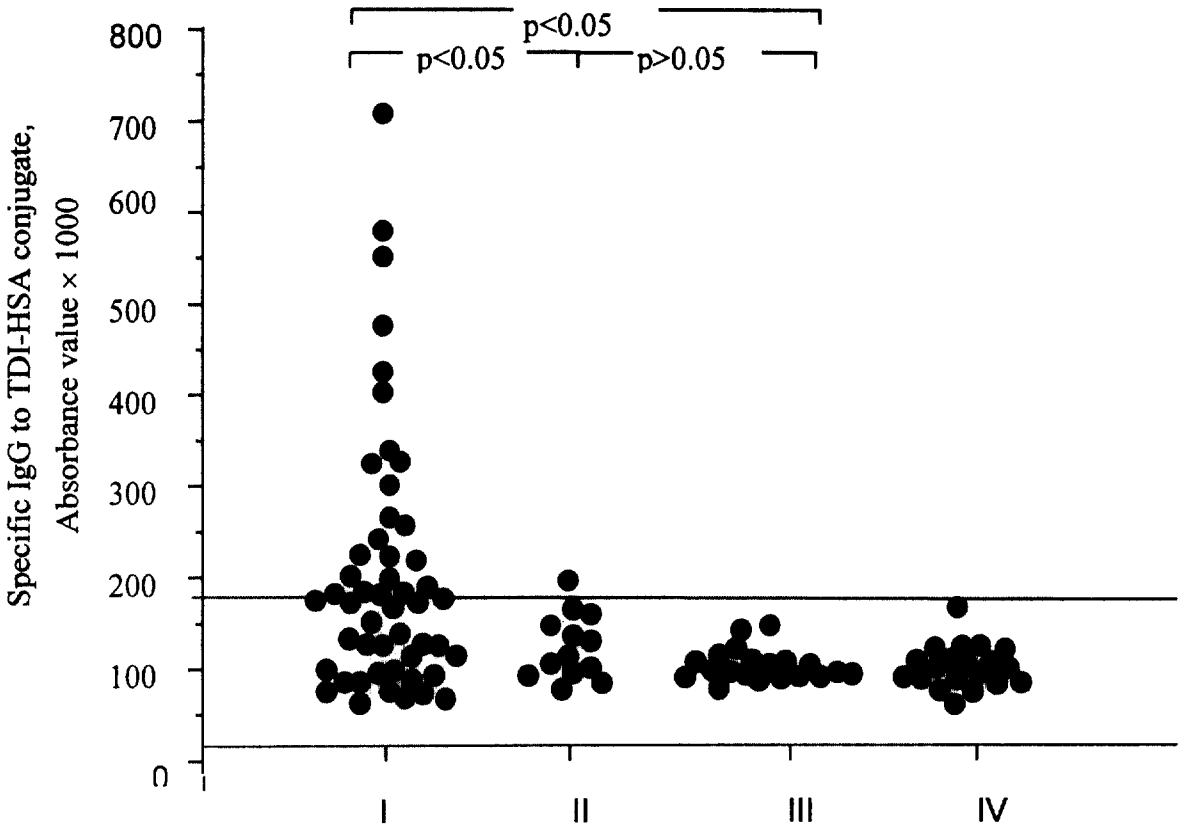


Fig 1. Comparison of specific IgG bindings to TDI-HSA conjugate in four different groups. Group I : TDI-induced asthma with positive challenges, Group II : Exposed asthmatic workers with negative challenges, Group III : Unexposed allergic asthma, Group IV : unexposed healthy controls.

C. TDI-HSA 에 대한 특이 IgE 항체

TDI-HSA 에 대한 특이 IgE 항체는 I군의 50 예중 7 예 (14%)에서 양성으로 나타났으나, II군에서는 13 예중에서 1 예 (7.7%)에서만 양성이었다. 특이 IgE 항체의 유병율은 I군과 II군 및 III군사이에 유의한 차이가 없었다 (각각 $p>0.05$, Fig 2). TDI에 의한 천식을 진단하는데 있어서 특이 IgE 항체의 민감도는 14%, 특이도는 92.3%, 양성 예측율은 87.5%, 음성 예측율은 21.8%이었다.

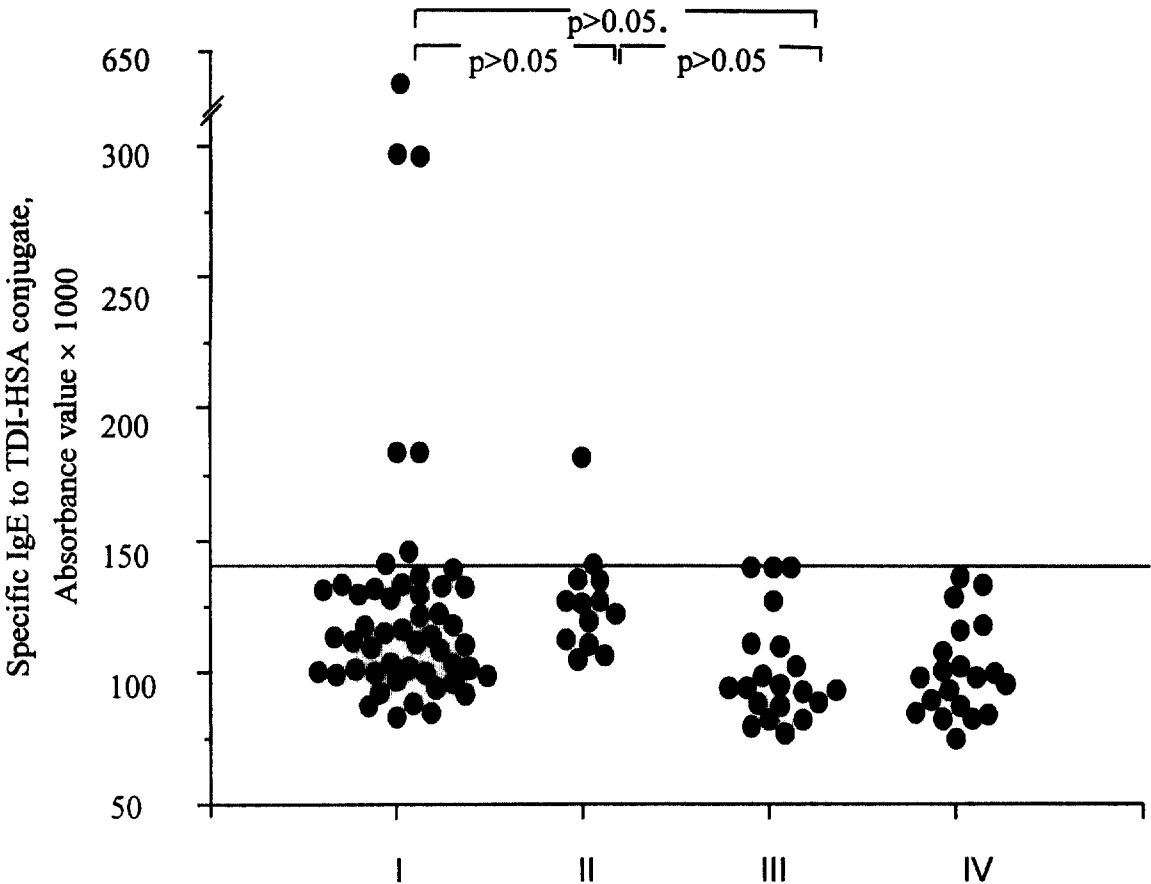


Fig 2. Comparison of specific IgE bindings to TDI-HSA conjugate in four different groups. Group I : TDI-induced asthma with positive challenges, Group II : Exposed asthmatic workers with negative challenges, Group III : Unexposed allergic asthma, Group IV : unexposed healthy controls.

D. TDI-HSA 에 특이 IgG 항체와 IgE 항체사이의 연관성

I 군에서 특이 IgG 항체 유병률과 IgE 항체 유병률사이에는 통계적으로 유의한 상관성은 없었다 ($p>0.05$).

E. 천식반응 종류에 따른 특이 IgG 항체의 유병률

I 군에서 천식유발시험중 관찰되는 천식반응의 종류에 따른 특이 IgG 항체의 유병률은 통계적으로 유의한차이가 없었다 ($p>0.05$, Fig 3).

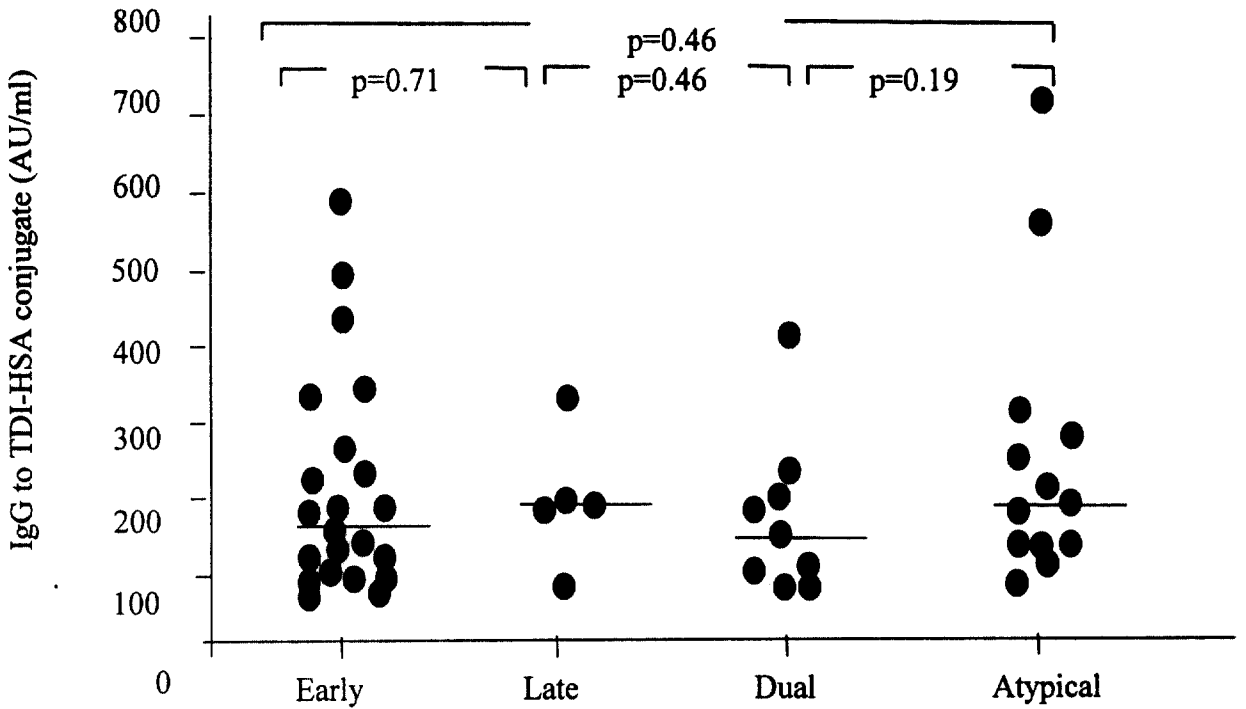


Fig 3. Comparison of specific IgG levels to TDI-HSA conjugate according to type of asthmatic response on TDI-bronchial challenge test.

F. 세종류의 TDI-HSA 을 이용한 특이 IgE 항체 측정 결과 비교

TDI 에 의한 직업성천식이 확진된 1군 환자 20 예와 대조군 10 예의 혈청으로 A 접합체, CM98, CM99 접합체를 이용 면역효소법으로 특이 IgE 항체를 동시에 측정하여 그 결과를 비교하였다. 대부분의 환자들에서는 이들간의 양성률에 유의한 연관성이 관찰되었지만 ($p < 0.05$), A 접합체와 CM98 접합체간에 비교해 보면 일치하는 경우도 있지만 한 가지 접합체에만 반응하는 경우도 있었고, A 접합체와 CM99 접합체간에도 서로 다른 결과가 관찰된 경우가 1례 있었으며 두개의 CM 접합체간에도 일치하지 않은 경우가 있었다 (Table 2). 서로 다른 접합체간의 혼광도를 비교해 보면, A 와 CM98 접합체 사이에는 $r = 0.95$ 였고, CM99 접합체는 $r = 0.98$, CM98 과 CM99 접합체간에는 $r = 0.92$ 로 유의한 상관성이 관찰되었다 ($p < 0.05$).

Table 2. Comparison of specific IgE bindings among three different TDI-HSA conjugates in 20 sera of TDI-induced asthma.

	CM98		CM99	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Ajou conjugate				
Positive	3	1	4	0
Negative	0	16	1	15
Positive predictive value	75%		100%	
Negative predictive value	100%		93.8%	

G. 면역효소억제시험

A 접합체에 양성 반응을 보이는 환자의 혈청으로 A, CM98, CM99 접합체에 대해서 면역효소억제시험을 시행하였다. A 접합체에 대한 억제반응은 용량의존적 억제반응 양상 (0-64.7%)를 보였으나 CM98, CM99 접합체, 그리고 비특이적 반응을 보기위한 환삼덩굴 화분과 반응시켰을 때 미미한 억제 반응만 관찰되었다 (Fig 4). 또한 CM99 접합체에 양성반응을 보이는 환자의 혈청으로 면역효소억제시험을 시행시 CM99 접합체에 대한 억제반응은 용량의존적 억제반응 양상을 보였고, CM98 접합체에도 50% 이상의 억제를 보였으나, A 접합체, 환삼덩굴 화분에 의해서는 미미한 억제반응이 관찰되었다 (Fig 5).

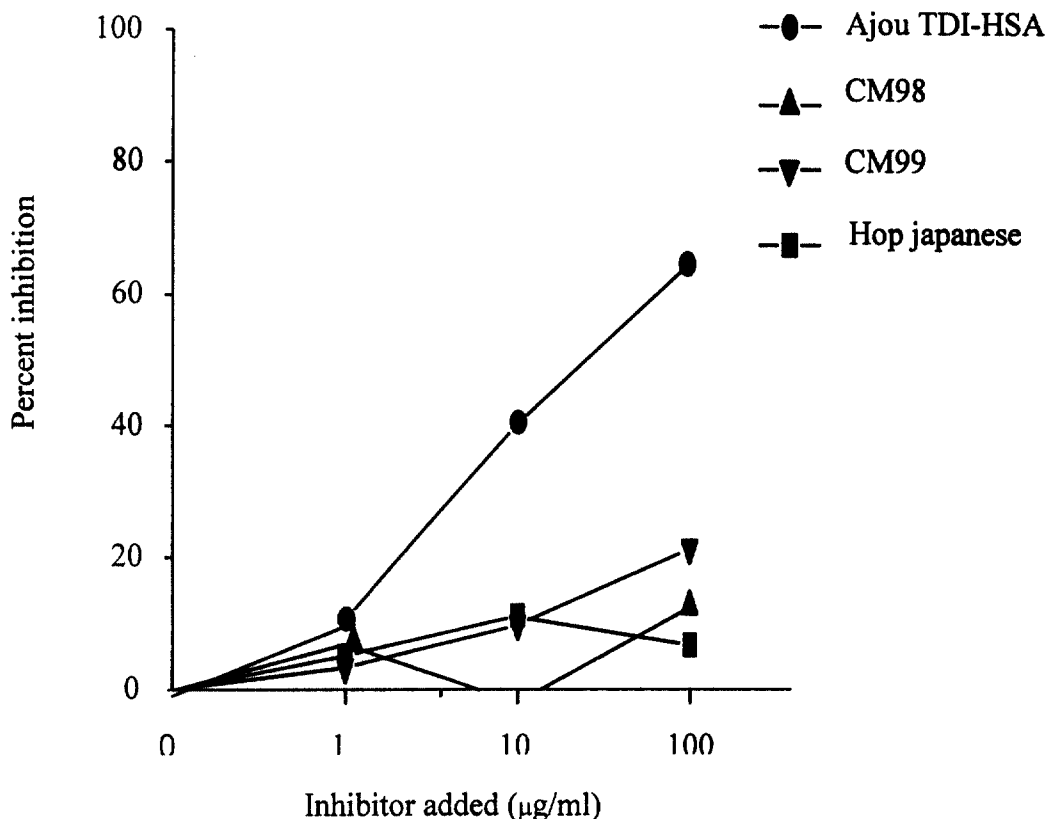


Fig 4. Percent inhibition of specific IgE bindings to Ajou toluene diisocyanate (TDI)-human serum albumin (HSA) conjugate by ELISA with serial additions of Hop japanese pollen, three sources of TDI-HSA conjugate, Ajou and two CM conjugates (98, 99).

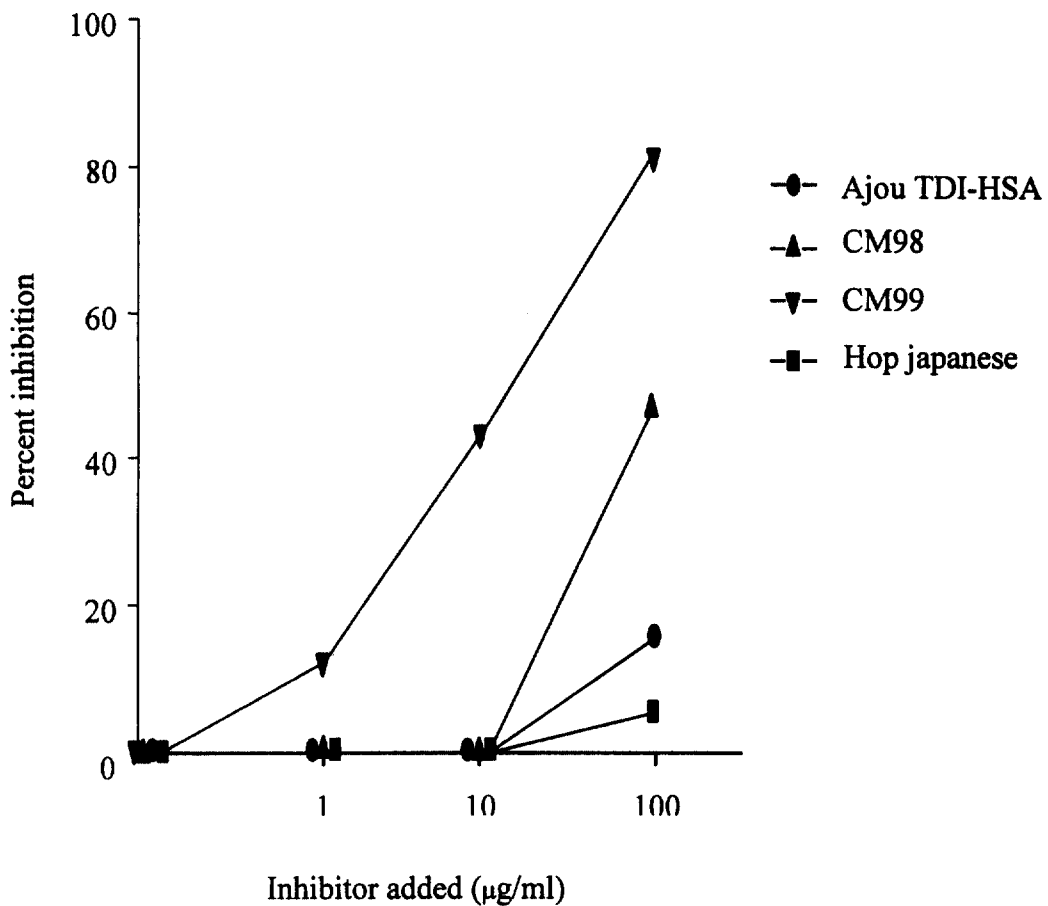


Fig 5. Percent inhibition of specific IgE bindings to CM 99 toluene diisocyanate (TDI)-human serum albumin (HSA) conjugate by ELISA with serial additions of Hop japanese pollen, three sources of TDI-HSA conjugate, Ajou and two CM conjugates (98, 99).

IV. 고찰

직업성천식에서 특이 IgG 항체의 역할에 대한 보고는 원인 항원에 따라 그 결과가 다양한데 Forester 등¹⁶은 tetrachlorophthalic anhydride (TCPA)에 대한 특이 IgG 항체가 천식 환자와 노출되었으나 증상이 없는 환자의 일부에서 관찰되었음을 보고하였고, 박 등¹⁷은 반응성 염료에 의한 천식에 대한 보고에서 특이 IgG 및 IgG4 항체 유병률은 천식 환자에서 유의하게 높아, 이들 항체가 노출된 환자에서 호흡기 증세를 유발하는데 기여할 가능성을 시사한 바 있다. Isocyanate (HDI, MDI)에 대한 IgG 항체에 관한 연구로는, Cartier 등¹⁰이 HDI와 MDI에 대한 특이 IgG 항체가 천식유발시험상 양성 반응을 보인 군에서 72%, 음성군에서 25%로 유의한 차이가 있어, 특이 IgE 항체에 비해 IgG 항체가 천식유발시험 결과와 밀접한 연관성이 있음을 보고하였다. 지금까지 TDI에 대한 IgG 항체의 임상적 의의에 대한 연구는 국내외적으로 보고된 바 없다. 본 연구에서 TDI에 의한 특이 IgG 항체는 병력과 천식유발시험으로 확진된 TDI에 의한 직업성천식 환자 50예중 23예 (46%)에서 양성 반응을 나타내었고, 천식유발시험에서 음성 반응을 나타낸 환자 13예중 1예 (7.7%)만이 양성을 나타내었으며, 알레르기성 천식 환자나 건강대조군에서는 양성 반응을 보인 예가 없어 TDI-HSA 결합체에 대한 특이 IgG 항체가 천식유발시험 결과와 밀접하게 연관성이 있어 천식유발시험 결과 예측에 특이 IgG 항체 유무가 도움이 되리라 여겨진다. 또한, 이러한 높은 양성률이 특이 IgG 항체가 TDI에 의한 천식의 병인기전에 기여할 가능성이 있어 추후 연구가 필요하리라 생각된다.

Isocyanate에 의한 천식 환자에서 IgE 매개 반응의 역할에 대해, 천식유발시험으로 확진된 환자들의 혈청 특이 IgE 항체 양성률이 0%에서 40%까지⁷⁻¹⁰ 다양하게 보고되며,

이의 역할에 대해 부정적으로 생각하는 학자도 있다. 본 연구에서 병력과 천식유발시험으로 확진된 환자 50 예중 7 예 (14%)에서 특이 IgE 항체가 양성을 나타내어 일부 환자에서 IgE 매개 반응이 관여하리라 여겨진다. 최근 Tee 등⁹도 RAST로 천식유발시험상 확진된 환자를 대상으로 특이 IgE 항체를 측정하여 RAST score 3 이상을 한계치로 하였을 때 예민도가 20%, 특이도가 100%로 isocyanate에 의한 천식을 진단할 수 있다고 보고하였다. 그러나 특이 IgE 항체 양성률의 범위가 다른 흡입성 알레르겐의 경우와 달리 보고자에 따라 차이가 많은 원인으로 다음과 같은 가능성을 생각할 수 있다. 첫째, 특이 IgE에 대한 항원 결정부위가 TDI 자체, TDI-HSA 연결부위, 혹은 TDI와 HSA의 작용에 의해 생성된 새로운 항원 결정부위일 수 있어, IgE 반응이 개인마다 다양할 수 있다. 둘째, 각 연구실마다 결합체를 만드는 제조방법이 동일하여도 실험실내 환경에 따라 접합체내에 TDI와 알부민간의 결합능의 차이가 있을수 있는데, 실제 본 연구에서도 연자들이 여러 번 제조 후 가장 예민도가 높은 것으로 선택한 A 접합체와 미국 Canegie Mellon 대학에서 제공한 가장 높은 예민도를 지닌 두개의 접합체를 이용하여 동일한 환자에서 동일한 방법으로 IgE 항체를 측정한 결과 각각의 접합체에만 결합하는 환자가 관찰되었으며, 또한 이들 혈청을 이용한 면역효소억제법상 교차반응이 아닌 그 접합체에만 특이적인 반응이 증명되었다. 이는 개인에 따라 항원결합부위가 차이가 있을 수 있음을 보여준다.

본 연구에서 특이 IgE와 IgG 항체를 동일한 환자에서 면역효소법으로 측정하였을때 특이 IgG, IgE 항체 모두 특이도는 92.3%로 동일하였으나 예민도는 각각 46%, 14%로 특이 IgG가 IgE보다 예민도가 높았고 양성 예측율과 음성 예측율이 높았다. 따라서 TDI에 의한 천식환자의 병인기전에서 일부 환자의 경우 IgE 매개 반응이 관여할수 있으며 특이 IgE 항체보다 IgG 항체의 유무가 진단을 위한 천식유발시험 결과를 예측하는데 더

욱 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구의 결과로 TDI에 의한 직업성천식 환자에서 TDI-HSA 결합체에 대한 특이 IgG는 IgE보다 TDI 천식유발시험 결과와 밀접한 연관성이 관찰되었다. 특이 IgE 항체는 일부 환자에서 검출되어 병인기전에 관여할 수 있을것으로 여겨지며, 측정 결과는 일부 환자에서 사용한 접합체에 따라 결과가 달랐고, 이러한 사실은 개인에 따라 IgE와 결합하는 항원 결합부위가 다를 수 있음을 나타낸다. 특이 IgG 항체가 TDI에 의한 직업성천식의 병인기전에 기여할 가능성에 대해서는 추후 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. 박해심: 한국의 직업성 천식. 산업의학 34:80-92, 1995
2. Chan-Yeung M, Malo JL : Occupational asthma . New Eng J Med 333:107-112, 1995
3. Park HS, Park JN, Kim JW, Kim SK : Clinical and immunological evaluation of isocyanate-exposed workers. J Kor Med Sci 7:122-127, 1992
4. Davies RJ, Butcher BT, O'Neil CE, Salvaggio JE : The *in vitro* effect of toluene diisocyanate on lymphocyte cyclic adenosine monophosphate production by isoproterenol, prostaglandin and histamine: passible mode of action. J Allergy Clin Immunol 60:223-229, 1977
5. Fabbri LM, Boschetto P, Zocca E, Milani G, Picicotto F, Plepari M, Burlina A et al: Bronchoalveolar neutrophilia during late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. Am Rev respir Dis 136:36-42, 1987
6. Baur X, Dewier M, Fruhmann G: Detection of immunologically sensitized isocyanate workers by RAST and intracutaneous skin test. J Allergy Clin Immunol 73:610- 618, 1984
7. Karol MH, Loset HH, Alarie YC: TolyI-specific IgE antibodies in workers with hypersensitivity to toluene diisocyanate. Am Ind Hyg Assoc J 39:454-458, 1978
8. Tee RD, Cullian P, Welch J, Burge PS, Newman-Taylor AJ: Specific IgE to isocyanates:a useful diagnostic role in occupational asthma. J Allergy Clin

Immunol 101:709-715, 1998

9. Park HS, Nahm DH: Isocyanate-induced occupational asthma : challenge and immunologic studies. J Kor Med Sci 11:314-318, 1996
10. Cartier A, Grammer L, Malo JL, Lagier F, Ghezzi H, Harris K, Patterson R: Specific serum antibodies against isocyanate: association with occupational asthma. J Allergy Clin Immunol 84:507-514, 1989
11. Lushniak BD, Reh CM, Gallagher JS, Dernstein DI: Indirect assessment of exposure to diphenyl- methan diisocyanate (MDI) by evaluation of specific immune response to MDI-human serum albumin (HSA) in foam worker at risk for occupational asthma. J Allergy Clin Immunol 85:251, 1990 (abstract)
12. Perrin B, Cartier A, Ghezzi H, Grammer L, Harris K, Chan H, Chang-young M et al: Reassessment of the temporal patterns of bronchial obstruction after exposure to occupational sensitizing agents. J Allergy Clin immunol 87:630-639, 1991
13. Son MS, Lee M, Kim YT, Yoon JK, Park HS: Heterogeneity of IgE response to toluene diisocyanate (TDI)-HSA conjugates by ELISA in TDI-induced occupational asthma patients. J Kor Med Sci 13:147-152, 1998
14. Modesto RR, Pesce AJ : Use of tolyl diisocyanate for the preparation of a peroxidase-labelled antibody conjugate. Quantitation of the amount of

diisocyanate bound. *Biochem Biophys Acta* 295:283-295,1973

15. Lowry OH, Rosebrough N, Lewis FA, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent . *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
16. Forester MW, Wenables KM, Nunn AJ, Newman-Taylor AJ, Topping MD . Specific IgG and IgG4 antibody in workers exposed to tetrachlorophthalic anhydride. *Allergy* 9:294, 1998 (abstr.)
17. Park HS, Hong CS: The significance of specific IgG and IgG4 antibodies to a reactive dye in exposed workers. *Clin Exp Allergy* 21:357-362, 1991

Abstract

Clinical significance of specific IgG and IgE antibodies to toluene diisocyanate (TDI)- human serum albumin (HSA) conjugate in TDI-induced occupational asthma

Hee-Yeon Kim

Department of medicine

Graduate School, Ajou University

(directed by associate Professor Hae-Sim Park)

Background and objective : TDI is known to be the most prevalent cause of occupational asthma (OA) in Korea. However, the pathogenesis of TDI-induced occupational asthma still remains to be further clarified. We evaluated clinical significance of serum specific IgG and IgE antibodies to TDI-HSA conjugate in TDI-induced occupational asthma and the specificity of serum IgE bindings using three kinds of TDI-HSA conjugates.

Subjects and methods : Serum specific IgG and IgE to TDI-HSA conjugates

were measured by enzyme linked immunosorbent assay. Sera were collected from 50 TDI- induced OA patients (classified to group I), and were compared with that from 13 asthmatic subjects with negative TDI-bronchoprovocation test (group II), allergic asthmatics (group III) and unexposed healthy controls (group IV).

Twenty of group I subjects and 10 of group IV subjects were enrolled in order to compare the results of specific IgE bindings using IgE-ELISA with three different conjugates (one from Ajou University, two from Canegie Mellon university). Specificity of IgE binding to each conjugate was confirmed by ELISA inhibition assay.

Results : The prevalence of specific IgG was significantly higher in group I than in group II ($p=0.01$) or group III ($p< 0.01$). No significant difference was noted between group II and group III ($p>0.05$). However, the prevalence of specific IgE was not different between group I and group II ($p> 0.05$) or group II and group III ($p>0.05$). There was no significant difference in prevalence of specific IgG according to the asthmatic response during TDI bronchoprovocation test ($p>0.05$). No statistical significance was noted between specific IgG and IgE antibodies in group I subjects ($p>0.05$). Specific IgE bindings were different according to the conjugate used. ELISA inhibition test using each conjugate showed heterogeneity of IgE binding according to the conjugate used.

Conclusion: These findings demonstrate that the presence of specific IgG to TDI-HSA conjugate is closely related to TDI-bronchoprovocation test results and it may

contribute to the development of TDI-induced asthma. The IgE response to TDI-HSA conjugates was heterogenous depending upon the TDI-HSA conjugate used.

Key words: TDI-induced occupational asthma, Serum IgG, Serum IgE, Enzyme linked immunosorbent assay, Heterogeneity.