

의학 박사학위 논문

메밀알레르기의 생쥐모델 개발과  
비강내 면역요법 후 특이 IgE 생성의  
변화

아주대학교 대학원

의학과

이기선

메밀알레르기의 생쥐모델 개발과  
비강내 면역요법 후 특이 IgE 생성의  
변화

지도교수 이 수 영

이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함.


2005년 2월


아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과


이 기 선


이기선의 의학 박사학위 논문을 인준함.

심사위원장    박 해 심    

심사위원    김 규 언    

심사위원    남 동 호    

심사위원    이 수 영    

심사위원    장 영 주    

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 22일

## I. 서 론

메밀은 아시아와 유럽에서 흔히 식용으로 사용하고 있는 곡물로서, 고단백 식품 중의 하나이다. 메밀에 대한 감각은 대개 경구를 통해서 일어나지만, 빵 공장이나 가정에서 메밀가루의 흡입을 통해서도 일어날 수 있다(Wieslander, 1996; Smith, 1909; Horesh, 1972; Davidson 등, 1992; Nakamura, 1972; Gohte 등, 1983; Valdivieso 등, 1989; Matsumura 등, 1964). 1909년에 Smith는 소량의 메밀을 섭취한 후에 심한 천식, 알레르기 비염, 두드러기와 혈관부종을 보였던 젊은 환자가 메밀의 흡입 후에도 동일한 알레르기 증상을 유발하였다고 기술하였다(Smith, 1909). 지난 30년 동안 메밀알레르기에 관한 논문들은 몇몇 보고 되고는 있지만, 역학적인 연구가 부족하여 다른 나라에서의 메밀알레르기 증상의 유병률이나 발생빈도는 알기 어려운 실정이다.

우리나라에서 메밀은 학동기와 어른에서 중요한 식품 알레르기 항원으로, 알레르기 피부단자시험 상 양성률은 약 5%였다(Lee와 Kim, 1988). 또한 메밀알레르기 환자에서 진단 및 불필요하고 위험한 메밀 유발 시험을 피하는데 도움을 줄 수 있는 메밀 특이 IgE값의 cut-off value를 1.26kU/L로 정하기도 하였다(Sohn 등, 2003). 우리나라에서는 메밀에 대한 과민반응에 대한 몇몇 보고가 있었는데, 2명의 증례에서는 메밀국수(소바)를 섭취한 후 발생하였고(Kwon과 Lee, 1985), 3명의 증례에서는 메밀껍질배개에서 메밀가루의 흡입에 의한 과민반응이었고(Lee 등, 2001), 한 증례에서는 국수를 만드는 공장에서 메밀가루의 흡입으로 인한 직업성 천식이었다(Park과 Nahm, 1996). 메밀 단백질 중 알레르겐 성분에 대한 연구로 우리나라의 메밀알레르기 환자에서는 24, 19, 16, 9 kDa 단백질이 주요항원으로 보고하였으나(Park 등, 2000), 일본에서는 11S globulin의 24 kDa  $\beta$  chain이 주요항원으로 알려져 있다(Kondo 등, 1993).

메밀은 우리나라와 일본에서 주로 섭취하는 곡물 중 하나이고, 메밀의 소비는 영양학적인 장점 때문에 증가하는 추세이다. 더욱이 메밀알레르기는 땅콩알

레르기와 마찬가지로 임상증상이 매우 심하며 치명적일 수도 있으나(Smith, 1909; Davidson 등, 1992; Schiffner 등, 2001), 현재로서는 역학, 기전 및 치료에 대한 연구가 미흡하다. 또한 메밀알레르기와 같은 식품 알레르기의 경우에는 회피요법 이외에는 유용한 치료도 없는 실정이므로, 사람에서의 메밀알레르기와 면역학적 특징이 유사한 메밀알레르기 동물모델의 개발은 메밀, 밀, 쌀 알레르기와 같은 곡물 알레르기의 면역반응을 이해하고, 치료법 개발을 위한 가치 있는 도구가 될 것이다. 현재까지 전 세계적으로 땅콩, 난백 및 우유 단백에 대한 동물모델은 연구된 바 있으나, 메밀알레르기에 관한 연구는 전무하다.

사람의 식품 알레르기와 유사한 생쥐모델의 확립에는 많은 어려움이 있는데, 이중 가장 의미 있는 방해요소는 경구 투여된 항원에 대한 타고난 면역관용이 있다는 것이다. 쥐에서의 면역관용은 쥐의 품종(Ito 등, 1997; Kiyono 등, 1982), 식이단백에 처음 노출된 시기(Hanson, 1981; Strobel과 Ferguson, 1984; Strobel, 1996), 노출되는 항원의 양과 종류에 영향을 받는다고 알려져 있다(Mowat, 1987; Lamont 등, 1989).

본 연구는 Li 등이 연구한 땅콩에 의한 아나필락시 생쥐모델을(Li 등, 2000) 응용하여 메밀에 대한 즉각적인 과민반응이 위장관을 통한 감각 및 유발 시험으로 유도될 수 있음을 증명하고자 하였다. 이 모델에서 메밀알레르기의 확립을 확인하기 위한 방법으로, 감각기간 중 얻을 혈청을 이용하여 혈청 내 특이 IgE, IgG 항체반응을 보고, 위장관내 유발시험을 통하여 증상유발을 확인하고자 하였으며, 비장세포의 증식반응 및 비장세포 배양액으로부터 다양한 종류의 항원 특이적 사이토카인을 측정하였다.

또한 본 연구에서는 식품 알레르기의 면역요법을 개발해 보고자 하는 목적을 가지고 연구를 병행하였다. 최근 들어 식품 알레르기의 치료를 위한 면역치료법 개발에 대한 연구가 종종 보고 되고 있으나, 기존의 흡입항원의 경우와 동일한 방법으로는 시행할 수 없다는 결론에 이르렀는데, 이는 피하주사에 의한 면역요법은 아나필락시 등의 심각한 전신적인 부작용이 나타나기 때문이다(Sampson, 1997; Nelson 등, 1997). 그러므로 현재까지는 식품 알레르기의 치료

를 위한 알레르기 면역요법은 실용화되어 있지 못하며, 동물 모델을 이용한 다양한 연구들이 진행 중에 있으며(Nowak-Wegrzyn, 2003), 식품 항원의 IgE epitope의 변화를 주어 보다 안전한 면역요법용 시약을 개발하려는 노력도 있다(Bannon 등, 2001). 이에 본 연구에서는 극소량의 메밀 조항원을 이용하여 비점막을 통하여 면역요법을 시도해 봄으로서 메밀 특이 IgE의 생성감소와 Th2 사이토카인 조절 기능이 있는지를 알아봄으로서 추후 사람의 메밀알레르기 치료를 위한 면역요법으로 사용이 가능한지를 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

실험은 크게 두 단계로 나누어서 진행하였다.

1단계(실험 A)는 다양한 용량의 메밀을 위장관을 통하여 감각시킴으로써 메밀알레르기의 생쥐모델을 개발하는 것이고, 2단계(실험 B)에서는 확립된 최적의 메밀알레르기 생쥐모델에서 메밀항원을 이용한 비강내의 면역요법을 시행하여 메밀 특이 IgE의 생성 조절유무를 관찰하였다.

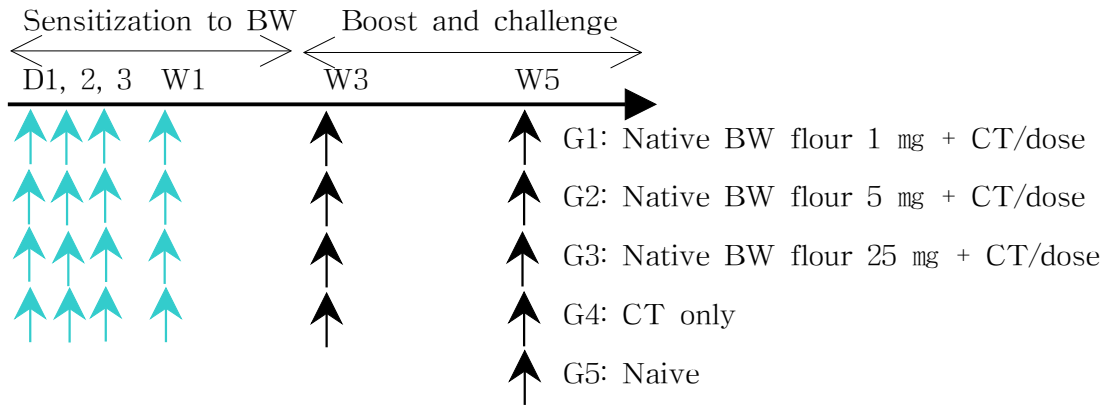
### A. 메밀알레르기의 생쥐모델 개발

#### 1. 동물, 메밀 조항원 및 시약

연령 4~5주의 웅성 C3H/HeJ 생쥐를 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)로부터 구입하였다. 메밀이 없는 대두 단백을 단백질원으로 하는 기본적인 chow(사육식이)를 먹이로 주었으며, specific pathogen-free(SPF) 환경에서 3일간 안정시킨 후 NIH에서 제시한 바 있는 실험동물 관리 및 사용에 대한 표준 지침(Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, NRC, 1996)에 의거하여 동물 실험을 진행하였다. 생 메밀(fresh *Fagopyrum esculentum*)가루를 감각과 유발항원으로 사용하였다. 본 연구에 사용된 메밀 추출물의 조항원의 제작과정은 다음과 같다. 메밀을 가루로 만들어 에테르로 탈지 방화한 후 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)에 1:10 w/v 으로 4℃에서 24시간 저으면서 보관한 후 10,000 rpm (4℃)에서 1시간 동안 원심 분리하였다. 여기서 상층액을 얻어 3차 증류수를 이용하여 24시간 동안 투석하였다(pore의 cut-off value가 분자량 3.5 kDa). 이후 -70℃에서 동결 건조시켜 최종 조항원을 얻었다(Lee 등, 2001).

경구 면역보강제로는 cholera toxin(이하 CT)을 사용하였으며, 이것은 List Biological Laboratories, Inc(Campbell, CA)로부터 구입하였고, 비장세포의 배양 시 사용된 Concanavalin A(이하 Con A)는 Sigma(St. Louis, MO)로부터 구입하

였고, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> 측정을 위한 항체 및 시약들과 IL-4, IL-5, IL-10, INF- $\gamma$  측정을 위한 ELISA kit는 PharMingen(San Diego, CA)으로부터 구입하였다.



**Fig. 1. Protocol for the experiment A.** Female C3H/HeJ mice(4~5weeks old, 6~8 per group) were sensitized and challenged via intragastric route with various doses of fresh buckwheat flour mixed in cholera toxin(10  $\mu$ g) as adjuvant. *BW*, Buckwheat. *CT*, Cholera toxin.

## 2. 위장관을 통한 메밀 항원의 감작 및 유발

생 메밀가루 액을 위장관을 통하여 감작을 시켰는데, Fig. 1에서 보인바와 같이 실험 제 0일, 1일, 2일 및 7일에 시행하였다. Li 등(Li 등, 2000)의 땅콩알레르기 생쥐모델에서 사용한대로 스테인리스 스틸 영양 관을 사용하여, 위장관을 통하여 감작시켰으며 매번 투여 전 2시간동안 사육식이(chow)를 제거한 후 지정된 zonde를 이용하였다. 적절한 감작 양을 알기 위해 각 군당 6~8마리씩의 생쥐를 5군으로 나누어 실험하였다. 생쥐 한 마리당 한번에 1 mg의 메밀가루(제 1군, G1, 저용량, 1 mg of buckwheat/mouse), 5 mg의 메밀가루(제 2군, G2, 중간용량, 5 mg of buckwheat/mouse), 25 mg의 메밀가루(제 3군, G3, 고용량, 25 mg of



buckwheat/mouse)를 CT 10  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 과 함께 투여하였다. 또한 항원은 없이 CT 만을 투여한 대조군(제 4군, G4)과 아무 조작도 하지 않은 naive군(제 5군, G5)도 사용하였다. 초기 감각 후 3주째와 5주째에 메밀가루 10  $\text{mg}/\text{mouse}$ 를 30분 간격으로 2번 나누어 위장관을 통한 추가 및 유발시험을 시행하였다. 이 실험은 같은 실험 프로토콜에 따라 2회 더 반복하였다.

### 3. 과민반응의 평가

아나필락시 증상은 땅콩알레르기 동물모델에서 사용한대로(Li 등, 2000), 실험 5주째에 두 번째 메밀로 유발시험 후 30분에 생쥐에서 보이는 증상을 점수화하였다. 증상점수는 0~5로 하였고, 각각의 점수에 해당되는 증상은 다음과 같았다: 0-무증상 혹은 pure naive와 동일한 정도의 일시적인 입 주변을 핥킴; 1-코등 뿐 아니라 귀 뒤 머리, 등, 어깨, 복부 등을 지속적으로 핥거나 문지름; 2-눈두덩, 입술 주변의 부종, 각막 혼탁, 설사, 모근의 수축, 활동의 감소, 호흡수의 증가; 3-천명, 호흡곤란(labored respiration), 입 주위, 꼬리, 사지 및 항문의 청색증; 4-몸체를 건드려도 도망가지 못할 정도로 행동이 저하되거나, 떨림/경련의 동반; 5-사망.

### 4. 메밀 특이 IgE, IgG<sub>1</sub> 및 IgG<sub>2a</sub> 항체의 측정

메밀의 초기 감각 후 매주 쥐의 꼬리 정맥으로부터 200  $\mu\text{L}$ ~500  $\mu\text{L}$ 의 혈장을 채취하여 냉동 보관하였다가 실험에 이용하였다. 메밀에 대한 특이 IgE 치는 ELISA법을 이용하여 측정하였고 방법은 다음과 같다. Immulon II 96-well plates(Dynatech Laboratories, Inc, Chantilly, VA)에 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 메밀 조항원을 coating buffer(pH 9.6, Sigma, St. Louis, MO)에 녹여 부착시킨 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 반응시켰다. 다음날 plate를 1% BSA-PBS로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후 세척을 하였다. 3회 세척 후 개별 혈청을 1:10으로 희석하여 well 당 50  $\mu\text{L}$ 씩 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤을 반응시켰다. 다음날 3회 세척 후 100  $\mu\text{L}$ 의 biotin이 부착된 2차 항체(biotinylated rat anti-mouse IgE, 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 넣고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간

반응시켰다. 이후 이를 3회 세척 후 1:2000으로 희석한 avidin peroxidase(Sigma, St. Louis, MO)를 100 uL씩 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후 6회 세척하였다. 그 후 ABTS(KPL, Gaithersburg, MD)를 첨가하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 읽는다. IgE 값은 총 IgE를 이용한 ELISA법으로 단클론 항체의 표준농도 곡선(Sigma, St. Louis, MO)을 이용하여 절대치를 산출하였다.

메틸 특이 IgG<sub>1</sub> 및 IgG<sub>2a</sub> 항체 값을 측정하기 위해 위에서 기술한 같은 방법으로 조항원을 coating buffer에 녹여 부착시켰고, 정지시킨 후에 세척하였다. 개별 혈청은 1:500으로 희석하여 plate에 넣고 4°C에서 하룻밤을 놔뒀다. plate를 세척한 후 IgG<sub>1</sub>와 IgG<sub>2a</sub> 값을 알아내기 위해 biotin이 부착된 2차 항체 (biotinylated rat anti-mouse IgG<sub>1</sub> 또는 IgG<sub>2a</sub> monoclonal antibodies, 1 µg/mL)를 100 uL 넣어 실온에서 1시간 더 반응시켰다. 이후 8회 세척하였고 ABTS를 첨가하여 실온의 암실에서 15-30분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 읽었다.

#### 5. 항원 및 Con A 자극에 의한 비장세포의 증식 반응

실험 제 5주에 메틸항원으로 다시 유발 시험을 한 후에 각 군마다 2마리의 생쥐를 희생하여 비장을 얻었다. 멸균된 2장의 슬라이드를 이용하여 조직을 갈아 단일세포 부유 액을 얻었고, 이를 완전세포배양액(10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 1% glutamine이 포함된 RPMI 1640)에 부유시켜 2회 세척한 후 세포수를 세었다. 96 well flat bottom 배양 판에  $1 \times 10^6$ /mL 농도의 비장 세포를 0.2 mL/well 씩 분주(triplicates)하였으며, 일부의 well에는 메틸항원(50 µg/mL와 250 µg/mL)을 첨가하거나 없는 상태에서 배양하였다. 양성 대조군으로 Con A(2 µg/mL)로 자극하였다. 72시간 배양 후 18시간 동안 1 µCi/well의 <sup>3</sup>H-thymidine pulse를 준 후 세포를 건어 섬광 계수관(scintillation counter)에 방사능을 측정하였다. 결과는 배양액만을 처리한 증식 정도를 기준으로 자극지수(stimulation index, 이하 SI)를 구하였다.

## 6. 항원 및 Con A 자극에 의한 비장세포 부유 액에서의 사이토카인 생성능 비교

실험 제 5주에 생쥐를 희생하여 비장을 얻어 멸균된 2장의 슬라이드를 이용하여 조직을 갈아 단일세포 부유 액을 얻었다. 이를 완전세포배양액(10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 1% glutamine이 포함된 RPMI 1640)에 부유시켜 2회 세척한 후 세포수를 세고, 24 well flat bottom 배양 판에  $4 \times 10^6$ /mL 농도의 비장세포를 분주하였다. 일부의 well은 메틸항원(250  $\mu$ g/mL), 혹은 Con A(2  $\mu$ g/mL)를 첨가하였고, 일부의 well은 배양액만을 첨가하여 72시간 배양하였다. 그 후 각 well로부터 상층 액을 얻어 1200 rpm으로 10분간 원심분리한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다가 실험에 사용하였다. PharMingen (San Diego, CA)의 OptEIA<sup>TM</sup> set을 사용하여 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5과 IL-10을 ELISA법으로 측정하였다. 각각의 사이토카인 생성 정도를 표준 농도곡선에 의거하여 정량 분석하였다.

## 7. 통계 분석

통계의 처리가 필요한 경우에는 SigmaStat software(SPSS Inc. Chicago, IL)를 이용하여 Student's *t*-test와 one-way ANOVA분석을 시행하였으며, *p* 값이 0.05미만일 때 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

## B. 메밀알레르기 생쥐모델에서 비강내 면역요법에 의한 혈청 특이 IgE 생성 변화

실험 A에서 얻어진 결과를 분석한 결과, 메밀 1mg의 용량으로 위장관내 감작을 시킨 경우 적절한 IgE 반응과 사이토카인 생성을 보였으므로, 이 용량을 이용하여 실험 B에서 동물을 감작시켰다. 메밀알레르기의 생쥐모델을 확립하는 자세한 방법은 실험 A와 동일하였다.

### 1. 동물, 메밀 조항원 및 시약

실험 A와 동일하였다.

### 2. 실험군 및 메밀 항원을 이용하여 비강내 면역치료를 시행

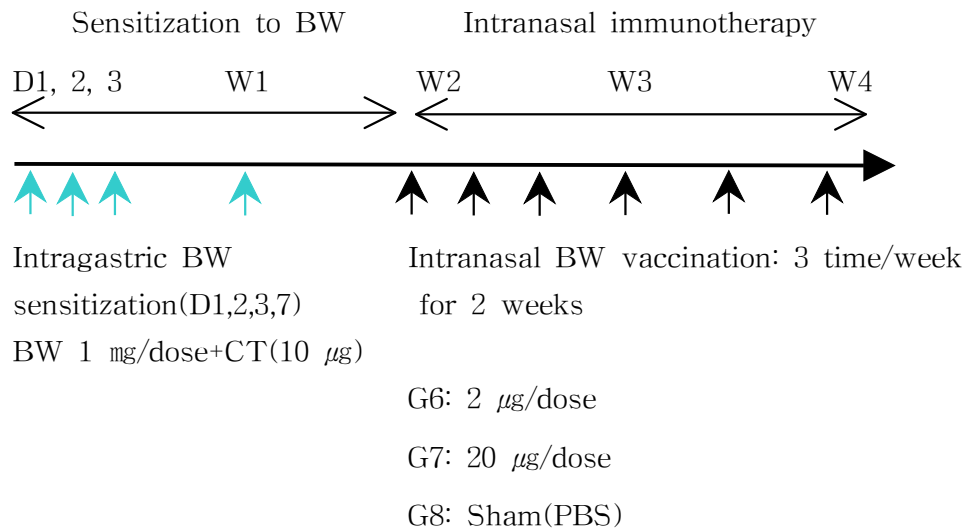
실험군은 총 3개의 군으로 나누었으며, 각 군의 정의는 다음과 같다.

제 6군(G6) : 메밀 감작 후 14일부터 메밀 항원을 2  $\mu\text{g}/\text{dose}/\text{mouse}$ 를 면역요법을 시행한 군

제 7군(G7) : 메밀 감작 후 14일부터 메밀 항원을 20  $\mu\text{g}/\text{dose}/\text{mouse}$ 를 면역요법을 시행한 군

제 8군(G8) : 메밀 감작 후 14일부터 PBS를 이용하여 면역요법을 시행한 군

Fig. 2에 보인바와 같이 각 군 모두에서 생후 4주의 3H/HeJ 생쥐를 연구자들이 제조한 메밀의 조항원으로 실험 제 1, 2, 3, 7일(1주)에 위장관을 통하여 감작을 시행하였다. 위장관을 통하여 감작한 메밀 항원의 양은 실험 A(메밀 알레르기 생쥐모델 개발)에서 특이 IgE 생성과 사이토카인 생성능이 가장 적절하다고 평가된 저용량(1 mg of buckwheat/mouse + CT) 감작을 시행하였다. 면역요법은 생쥐를 가볍게 마취시킨 뒤, 비강내로 항원을 점적하였는데, 주 3회씩 2주간 시행하였다. 실험 기간동안 매주 모든 생쥐의 꼬리 정맥에서 혈액을 200~300  $\mu\text{L}$ 씩 채혈하여  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다. 실험 제 4주말, 즉 5주 때에 생쥐를 희생하여 비장을 적출하였다.



**Fig. 2. Protocol for the experiment B.** Female C3H/HeJ mice(4~5 weeks old, 4 per group) were sensitized with buckwheat mixed cholera toxin. From the sensitization day 14 on, different mice were administered intranasal buckwheat antigens or PBS, three times per week for 2 weeks. *BW*, Buckwheat. *CT*, Cholera toxin.

### 3. 혈청에서 메밀 특이 IgE 및 IgG<sub>2a</sub> 항체의 측정

실험 제 0일, 1주, 2주 및 3주에 꼬리 정맥으로부터, 혹은 동물 희생 시에 200~500 $\mu$ l의 혈액을 채취하여 보관하였다가 실험에 이용하였다. 메밀 특이 IgE 및 IgG<sub>2a</sub> 항체는 ELISA법을 이용하여 측정하였고, 그 방법은 메밀알레르기의 생쥐모형을 개발하는 실험 A에서 기술한 것과 동일한 방법으로 시행하였다.

### 4. 항원 및 Con A 자극에 의한 비장세포의 증식 반응

실험 제 4주말에 생쥐를 희생하여 비장을 얻어 멸균된 2장의 슬라이드를 이용하여 조직을 갈아 단일세포 부유 액을 얻었고, 메밀알레르기의 생쥐모형을 개발하는 실험 A에서 기술한 것과 동일한 방법으로 시행하였다.

## 5. 항원 및 Con A 자극에 의한 비장세포의 사이토카인 생성능의 비교

실험 제 4주말에 생쥐를 희생하여 비장을 얻어 멸균된 2장의 슬라이드를 이용하여 조직을 갈아 단일세포 부유액을 얻어 메틸 항원(250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Con A(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 자극하거나, 배양액만을 첨가하여 72시간 배양하였다. 그 후 각 well로부터 상층 액을 얻어  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다가 실험에 사용하였다. PharMingen(San Diego, CA)의 OptEIA<sup>TM</sup> set을 사용하여 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10 및 TGF- $\beta$ 를 ELISA법으로 측정하였다. 모든 사이토카인은 상층 액의 원액을 사용하였으며, 한 항목에 대하여 각각 2회씩 측정하였다. 각각의 사이토카인 생성 정도를 표준 농도 곡선에 의거하여 정량 분석하였다.

## 6. 통계 분석

통계의 처리가 필요한 경우에는 SigmaStat software(SPSS Inc. Chicago, IL)를 이용하여 Student's  $t$ -test와 one-way ANOVA분석을 시행하였으며,  $p$  값이 0.05미만일 때 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

### III. 결 과

#### A. 메밀알레르기의 생쥐모델 개발

##### 1. 위장관을 통한 메밀 유발후의 전신 아나필락시 반응

전신의 아나필락시 증상은 첫 유발 후 5~15분 내에 보였고, 아나필락시 반응의 중증도는 두 번째 메밀 유발 후에 점수로 평가되었다. 초기 반응은 주로 전신을 심하게 비비거나 눈두덩, 입술주변이 붓고 청색증과 같은 피부반응 후에 호흡곤란, 몸체를 건드려도 도망가지 못할 정도의 행동저하가 있었다. 저용량의 메밀농도(1 mg/mouse + CT)와 중간용량의 메밀농도(5 mg/mouse + CT)로 감작된 생쥐에서의 전신 아나필락시 반응 증상 점수는 각각 평균 3점으로 고용량의 메밀농도(25 mg/mouse + CT)로 감작된 생쥐의 증상점수인 평균 1.2점보다 더 심한 반응을 보였다. 본 연구에서는 사망이나 거의 사망에 이를 아나필락시 반응은 없었다. 위감작되거나(sham-sensitized), naive 생쥐에서는 어떠한 아나필락시 증상도 보이지 않았다(Fig. 3). 이 결과는 초기 감작하는 용량이 과민반응의 정도에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다. 본 연구자들은 메밀감작에 필요한 적절한 용량은 1 mg/mouse 또는 5 mg/mouse(저용량 또는 중간용량)이었으며, 이 용량은 다음에 진행될 연구에 사용할 수 있을 것으로 결론지었다.

##### 2. 메밀 특이 IgE, IgG 항체 반응

메밀 특이 IgE 농도는 제 1군에서는 실험 1, 2, 3, 4주에 각각 평균 10 ng/mL, 160 ng/mL, 210 ng/mL, 25 ng/mL로 유의하게 증가하였고, 실험 제 2군에서는 실험 1, 2, 3, 4주에 각각 평균 10 ng/mL, 50 ng/mL, 120 ng/mL, 150 ng/mL로 증가됨을 보였다. 실험 제 3군에서는 실험 1, 2, 3, 4주에 각각 평균 5 ng/mL, 45 ng/mL, 30 ng/mL, 30 ng/mL를 보여 메밀특이 IgE 반응의 증가추세가 2주후부터 감소하였다(Fig. 4). CT만을 투여하였던 대조군인 제 4군과 naive 군인 실험 제 5군에서는 메밀 특이 IgE 값이 측정되지 않았다. 또한 메밀 특이

IgE 값은 5주째 아나필락시 증상 점수와 일치하였다.

메밀 특이 IgG<sub>1</sub> 값은 실험 제 1군에서는 실험 1, 2, 3, 4주에 각각 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 보여 의미 있는 증가 추세를 보였다. 실험 제 2군에서는 실험 1, 2, 3, 4주에 각각 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 보였다. 실험 제 3군에서는 실험 1주와 2주에 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 실험 3, 4주에는 각각 평균 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 보였다. 실험 제 4군과 실험 제 5군에서는 측정되지 않았다. 즉, 실험 제3주와 4주 때의 메밀 특이 IgG<sub>1</sub> 값은 실험 제 1군/제 2군에서와 실험 제 3군에서는 유의한 차이가 있었다(Fig. 5).

메밀 특이 IgG<sub>2a</sub> 값은 실험 제 1군에서는 실험 1, 2, 3, 4주에 각각 평균 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 135  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 보여 증가 추세를 보였다. 실험 제 2군에서는 실험 1, 2, 3, 4주에 각각 평균 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 보여 제 1군과 마찬가지로 증가 추세를 보였다. 실험 제 3군에서는 실험 1, 2, 3, 4주에 각각 평균 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 보였다. 즉, 실험 제 3군에서의 메밀 특이 IgG<sub>2a</sub> 값도 메밀 특이 IgG<sub>1</sub> 반응과 유사하게 실험 제 2주부터 4주까지 실험 제 1군과 제 2군에서의 값보다 유의하게 낮았다(Fig. 5).

### 3. 사육 식이 단백질추출물에 대한 IgE 반응

쥐에게 매일 먹었던 사육 식이 단백질 추출물에 대한 IgE 반응을 알아내기 위해 ELISA법을 이용하여 쥐의 사육 식이 조단백 추출물에 대한 IgE 항체를 측정하였다. 비록 소량의 사육 식이 특이 IgE 반응이 2주후에 위감작된 군에서 측정되었지만 무시할 정도의 값이었다(Fig. 4).

### 4. 메밀 추출물에 대한 비장세포의 증식 반응

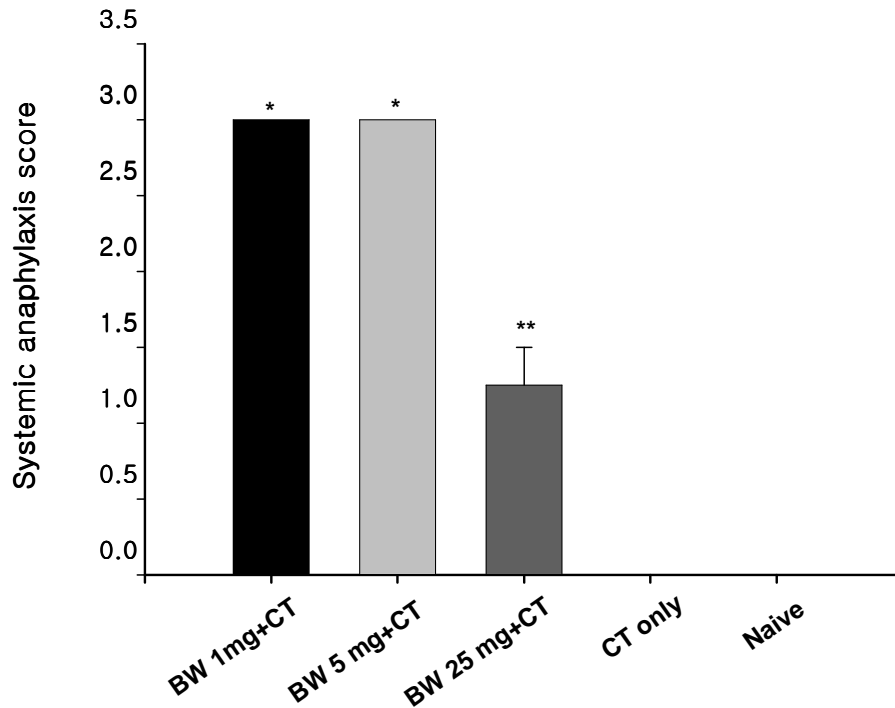
Fig. 6에서 보인바와 같이 CT로 감작한 대조군을 포함한 모든 실험 군에서 비장세포의 증식은 Con A 자극에 대해 유의하게 증가하였다. 위 감작된 군에서의 비장세포의 증식은 메밀 추출물에 대해 의미 있는 증식 반응을 볼 수는 없



었으나 메밀로 감작된 실험 군에서는 메밀 추출물에 대해 유의한 증식을 보였다. 메밀 특이 IgE와 IgG 반응과는 달리 비장세포의 항원의 자극에 의한 증식반응은 고용량의 메밀로 감작된 실험 군에서는 저용량의 메밀로 감작된 실험 군처럼 강했다.

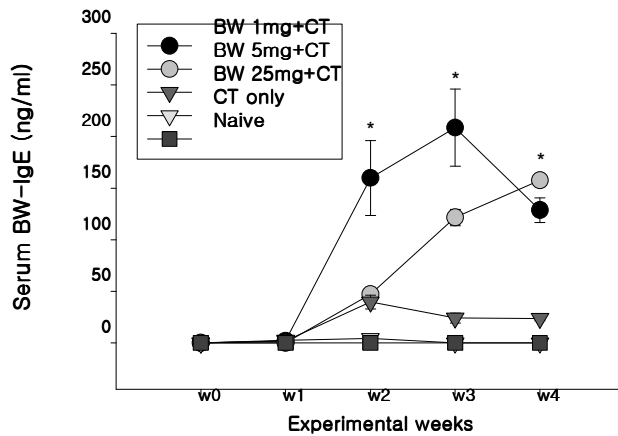
#### 5. 항원 자극에 의한 비장세포의 사이토카인 반응

Fig. 7에 보인바대로 메밀 특이 IL-4 반응은 저용량군, 중간용량 군, 고용량 군 모두에서 의미 있게 증가하였으나, 메밀 특이 IL-5 반응은 저용량 군에서만 현저하게 증가하였다. 더 나아가 Con A는 IL-4와 IL-5 반응에 약간의 자극 효과가 있는 것처럼 보였다. Th2형 사이토카인 반응과 유사하게, 메밀 특이 IFN- $\gamma$  반응도 메밀로 감작된 쥐에서 우세하였으며, 저용량 군에서 가장 높았다. IFN- $\gamma$ 의 생성은 메밀 자극이 있었던 경우보다는 Con A 자극이 있을 때 가장 높았다(Fig. 8). 메밀 특이 IL-10 생성도 메밀 감작된 쥐에서 증가하였으나 이 모델에서는 항원 자극보다는 Con A 자극에 의해 IL-10의 생성이 현저히 많이 유도됨을 보였다(Fig. 9).

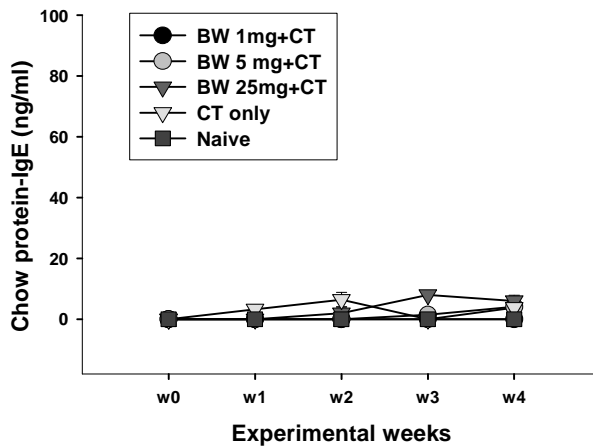


**Fig.3.** Symptom score of buckwheat–induced systemic anaphylaxis. Mice (n=6~8 in each group) were sensitized intragastric route with crude extract of fresh buckwheat flour, 1 mg, 5 mg or 25 mg per mouse per dose, respectively mixed with cholera toxin(10  $\mu$ g). Then mice were challenged with crude buckwheat extract(10 mg/mouse) in 2 doses at 30 min. intervals at week 3. \*  $p < 0.05$  vs. \*\*. Data was the combined results of two separate experiments done under the same protocol. *BW*, Buckwheat. *CT*, Cholera toxin.

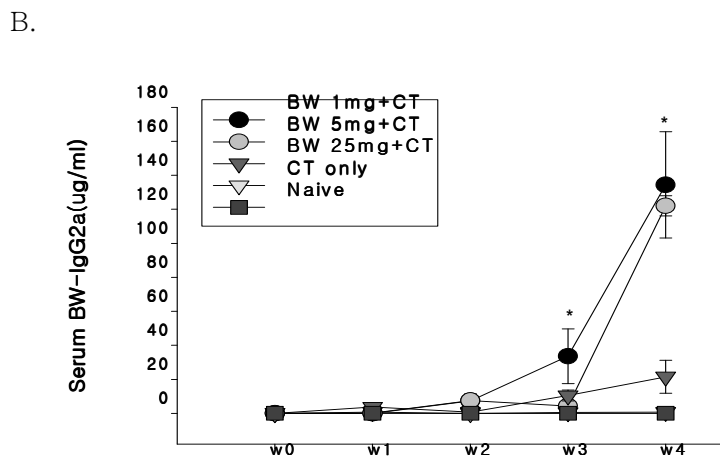
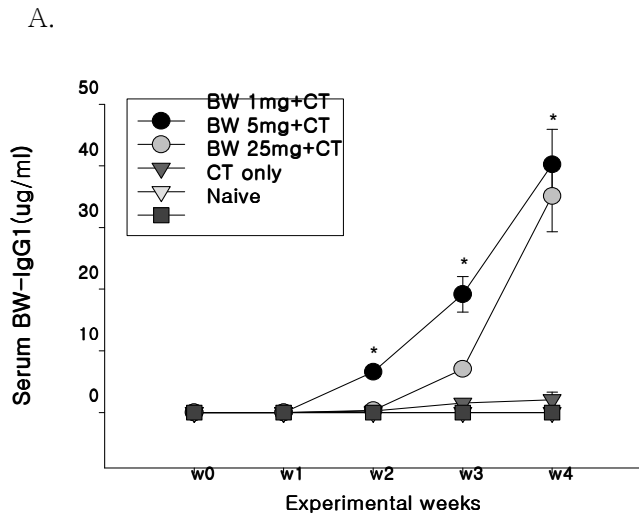
A.



B.



**Fig.4. Levels of buckwheat-specific IgE(A) and chow protein specific IgE(B) antibodies.** Individual sera from different groups of mice( $n=6\sim 8$  in each group), were obtained weekly following initial buckwheat-sensitization. IgE levels were determined by ELISA. Data was given as mean $\pm$ SE (standard error of mean) of 6 $\sim$ 8 individual sera. \*: Statistically different among experimental groups,  $p < 0.05$  by  $t$ -tests. *BW*, Buckwheat. *CT*, Cholera toxin.



**Fig.5. Levels of buckwheat-specific IgG<sub>1</sub>(A) and IgG<sub>2a</sub>(B) antibodies.** Individual sera from different groups of mice(n=6~8 in each group) were obtained weekly following initial buckwheat-sensitization. Antibody levels were determined by ELISA. Data was given as mean±SE of 6~8 individual sera. \*: Statistically different among experimental groups,  $p < 0.05$  by ANOVA. *BW*, Buckwheat. *CT*, Cholera toxin.

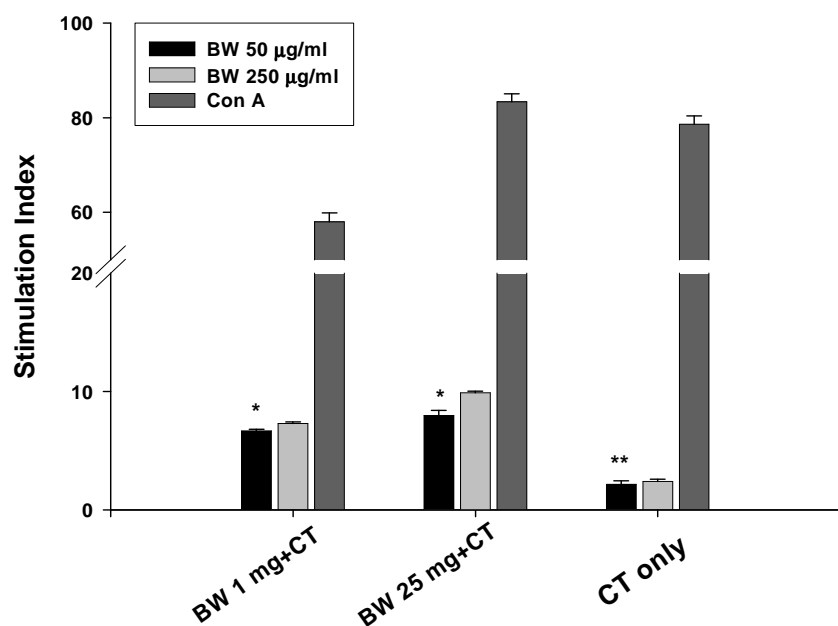
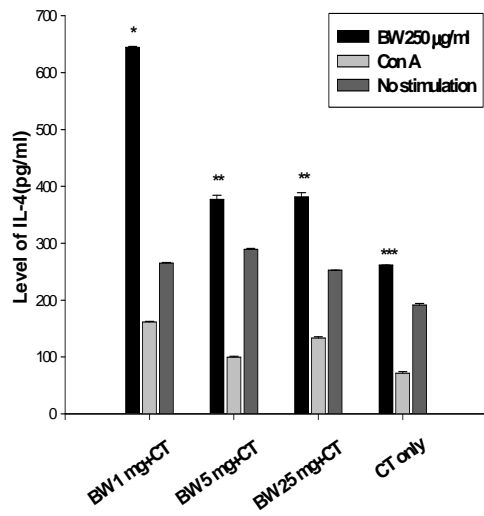
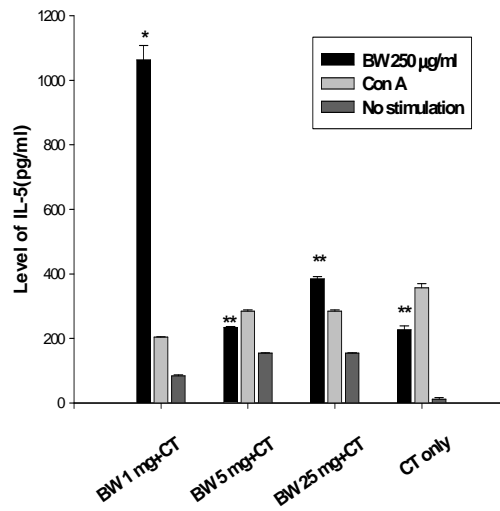


Fig.6. Proliferative responses of splenocytes by stimulation with buckwheat extract. Spleen cells from buckwheat allergic mice(n=2) and cholera toxin control mice(n=2) were stimulated with 50 and 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Three days later, the cultures were treated with 1  $\mu\text{Ci}$  per well of  $^3\text{H}$ -thymidine. And the cells were harvested 18 hours after  $^3\text{H}$ -thymidine treatment and the incorporated radioactivity was counted. The results were expressed as counts per minute (cpm). The proliferative potency was given as stimulation index(SI) over negative control. \*,  $p < 0.05$  vs. \*\* by  $t$ -test.

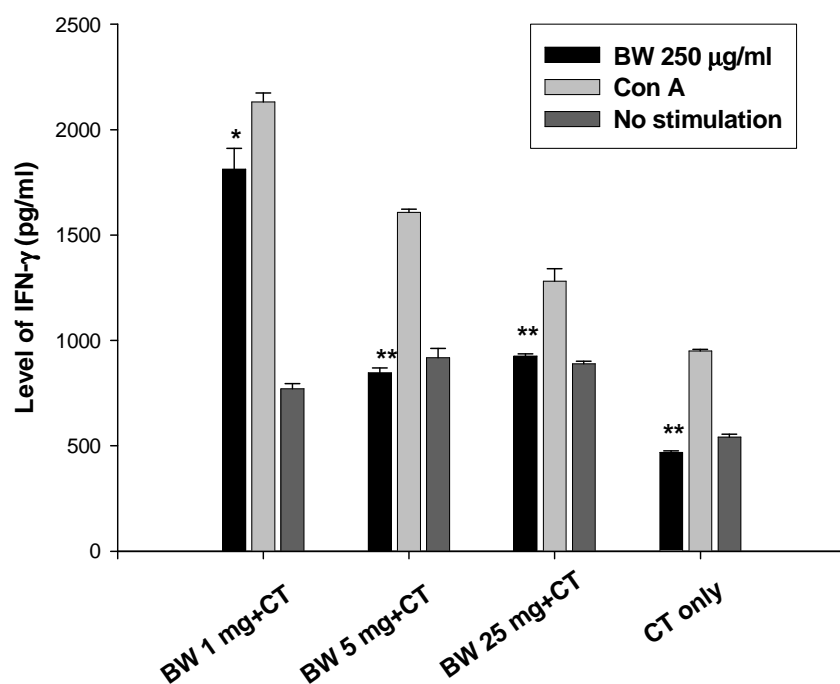
A.



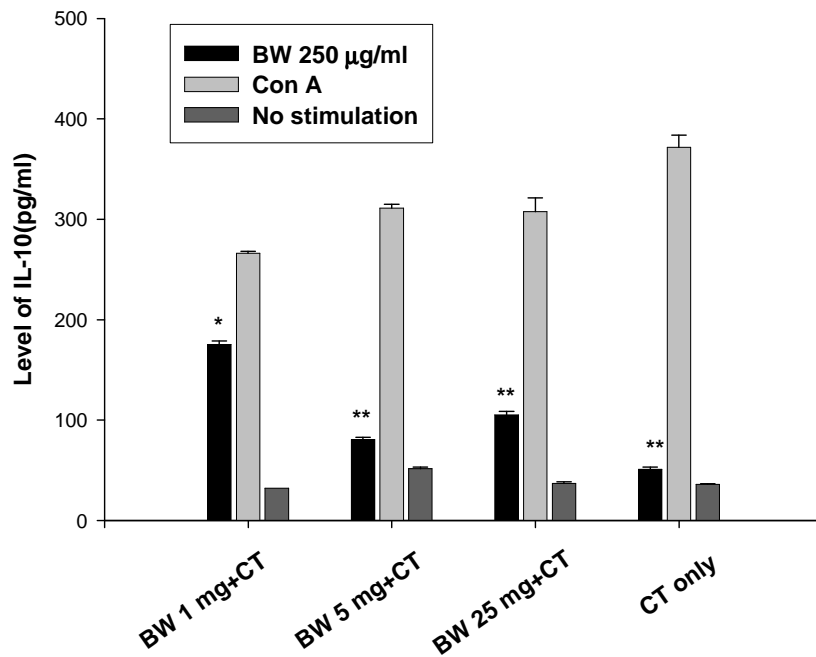
B.



**Fig.7. Levels of IL-4(A) and IL-5(B) within the culture supernatant of the splenocytes.** Spleen cells from buckw heat allergic mice(n=2) and cholera toxin control mice(n=2) were stimulated with 250 µg/mL of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Levels of cytokines were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data was given as mean±SE. \*,  $p < 0.05$  vs \*\*, \*\*,  $p < 0.05$  vs \*\*\*.



**Fig.8.** Levels of IFN- $\gamma$  within the culture supernatant of splenocytes. Spleen cells from buckwheat allergic mice (n=2) and cholera toxin control mice (n=2) were stimulated with 250  $\mu$ g/mL of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Levels of cytokines were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data was given as mean $\pm$ SE. \*,  $p < 0.05$  vs. \*\*.



**Fig.9. Levels of IL–10 within the culture supernatant of splenocytes.** Spleen cells from buckwheat allergic mice(n=2) and cholera toxin control mice (n=2) were stimulated with 250 µg/mL of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Levels of cytokines were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data was given as mean±SE. \*,  $p < 0.05$  vs. \*\*.



## B. 메밀알레르기 생쥐모델에서 비강내 면역요법에 의한 혈청 특이 IgE 생성 변화

### 1. 메밀 특이 IgE, IgG 항체 반응

혈청 메밀 특이 IgE 항체는 실험 A에서와 마찬가지로 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 메밀 감작 후 14일부터 메밀 항원을 2  $\mu\text{g}/\text{dose}/\text{mouse}$ 로 면역요법을 시행한 실험 제 6군에서의 실험 제 2주에 측정된 메밀 특이 IgE 값은 76 ng/mL, 실험 3주에는 271 ng/mL, 실험 4주에는 70 ng/mL를 보였다. 실험 제 7군에서는 실험 2주에는 45 ng/mL, 3주에는 168 ng/mL, 4주에는 30 ng/mL를 보였다. 실험 8군에서는 실험 2주에 45 ng/mL, 3주에 82 ng/mL, 4주에 161 ng/mL를 보였다. 즉, 비강내 면역요법을 시행한 1주후인 실험 제 3주에서 혈청 특이 IgE 항체 값은 실험 제 6군에서 271 ng/mL로 가장 높았고, 실험 제 7군(168 ng/mL), 실험 제 8군(82 ng/mL)의 순이었다(Fig. 10). 그러나 면역요법 시행 2주후인 실험 제 4주 때 혈청 메밀 특이 IgE 항체 값은 실험 제 8군에서 지속적으로 상승하여 가장 높았고(161 ng/mL), 실험 제 6군(70 ng/mL), 실험 제 7군(30 ng/mL)의 순이었다(Fig. 11). 특히 실험 제 6군과 실험 8군 사이의 통계학적  $p$  value는 0.015이었고, 실험 제 7군과 8군 사이의  $p$  value는 0.00001이었으며, 실험 제 6군과 제 7군 사이의  $p$  value는 0.00007로 통계학적인 유의한 차이가 있었다. 본 연구에서는 면역요법을 시행한 후에 IgG<sub>1</sub>의 생성이 너무 높아 농도 측정 및 비교가 불가능하여, IgG의 아형 중 IgG<sub>2a</sub>만을 측정하였다. 실험 제 4주 때의 IgG<sub>2a</sub>의 값은 실험 제 6군에서 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 실험 제 7군에서는 145  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, 실험 제 8군에서는 측정되지 않았다. 즉, 실험 제 6군과 7군 사이에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 11).

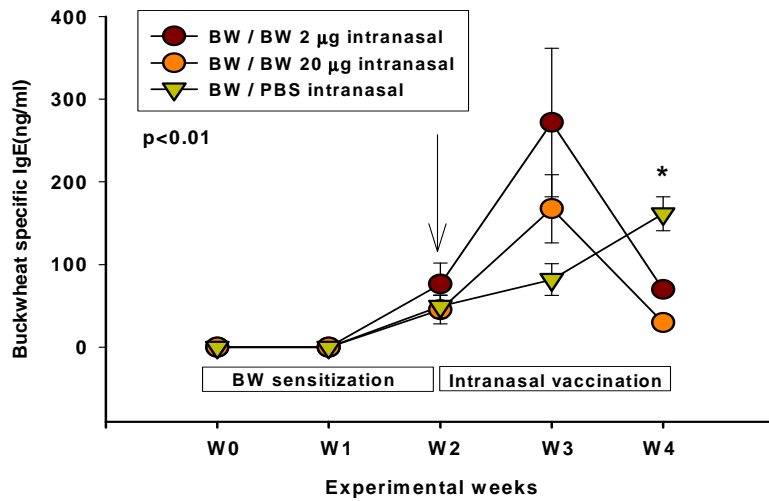
### 2. 메밀 항원에 대한 비장세포의 증식 반응

실험 제 6군, 제 7군, 제 8군의 비장세포를 실험 제 5주에 희생하여 얻은 후 메밀 추출물 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Con A 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  또는 배양액만으로 배양하였다. 이때 메밀

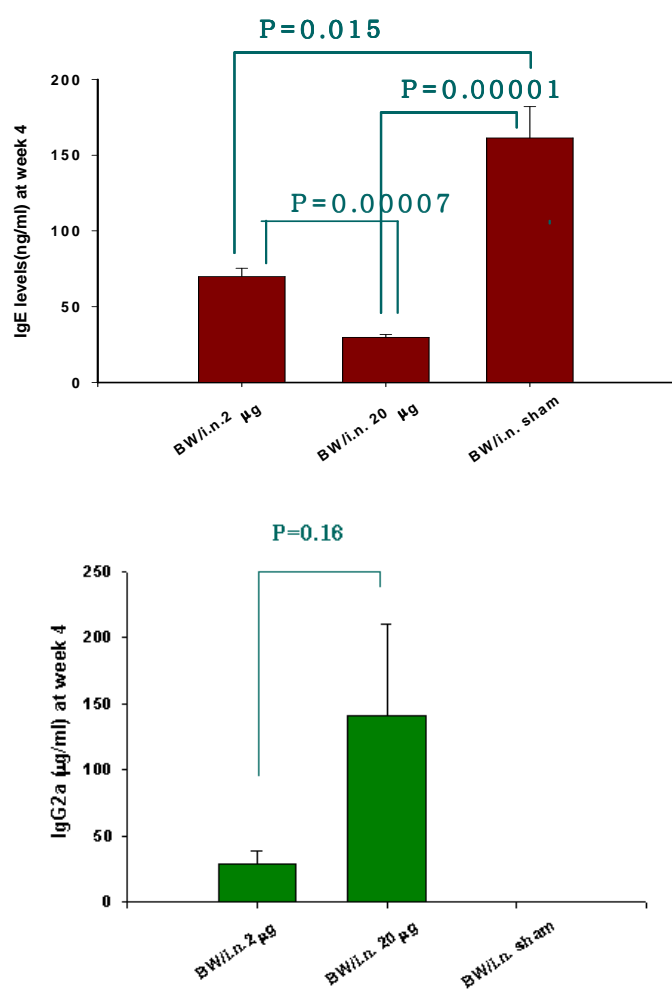
항원 자극에 따른 비장세포의 증식 반응에 따른 자극지수(SI)가 제 6군에서 1.8(mean±SD)SI, 제 7군에서 1.4(mean±SD)SI, 제 8군에서 2.2(mean±SD)SI를 보여 항원자극에 의한 비장세포 증식능력의 감소를 보였다. 이것은 실험 4주째의 IgE 생성의 둔화와 일치하는 소견이다.

### 3. 항원 자극에 의한 비장세포의 사이토카인 반응

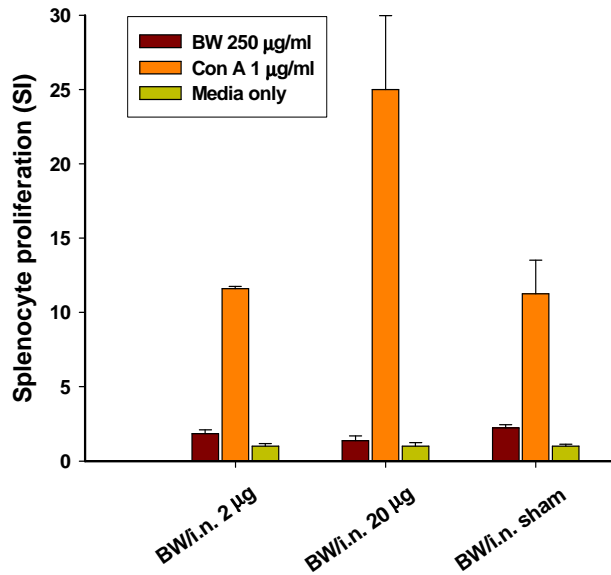
실험 제 5주에 생쥐를 희생하여 얻은 비장에서 항원 특이 T 세포 사이토카인 반응은 메틸추출물과 Con A 자극으로 이뤄졌는데, Fig. 13에서 보인바대로 메틸추출물로 자극 시 메틸 특이 IL-4 반응은 실험 제 6군과 제 8군에 비하여 실험 7군에서는 현저히 감소하였다. 그러나 비장세포의 IL-5의 반응은 IL-4 생성 반응과 일치하지 않았다. 한편 항원 자극에 의한 IFN- $\gamma$ 의 생성은 IL-4 반응과 유사한 양상을 나타내어 실험 제 6군과 제 8군에 비하여 실험 7군에서는 현저히 감소하였다. 한편 항원 자극에 의한 IL-10의 생성은 제 6군에서 현저히 증가함을 관찰할 수 있었으며, 제 7군에서는 약간 감소한 소견을 보였다. 그러나 TGF- $\beta$  생성은 메틸자극에 의해 실험 6군, 7군, 8군 모두에서 동일한 정도를 나타내었다(Fig. 15~17). 또한 실험 제 7군에서의 현저히 감소된 IL-4 생성 반응은 실험 4주째 측정된 특이 IgE 농도의 현저한 감소 소견과 일치하였다.



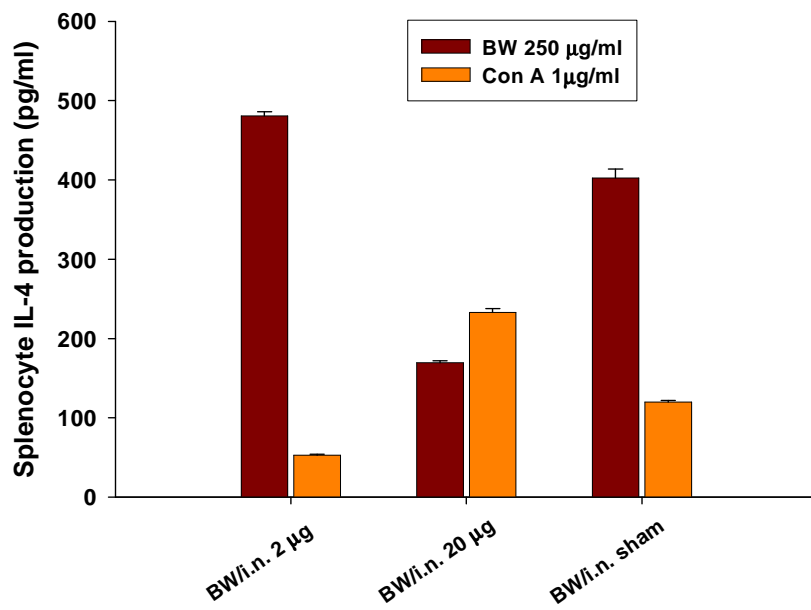
**Fig.10. Kinetics of buckwheat-specific IgE levels during the sensitization and intranasal immunization.** Individual sera from different groups of mice ( $n=6\sim 8$  in each group) were obtained weekly following initial buckwheat sensitization and intranasal immunization. Specific IgE levels were measured by ELISA. Data was given as mean $\pm$ SE of individual sera.



**Fig.11.** Buckwheat specific IgE and specific IgG<sub>2a</sub> levels at experimental week 4. Individual sera from different groups of mice(n=6~8 in each group) were obtained after 2 weeks sensitization and 2 weeks intranasal immunization. Antibody levels were determined by ELISA. Data was given as mean±SE of 6~8 individual sera.



**Fig.12. Proliferation index of splenocytes induced by buckwheat and Con A stimulation.** Splenocytes obtained from sacrificed mice after 2 weeks sensitization and 2 weeks intranasal immunization. Spleen cells from buckwheat allergic mice(n=2) and cholera toxin control mice(n=2) were stimulated with 250 µg/mL of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Three days later, the cultures were treated with 1 µCi per well of <sup>3</sup>H-thymidine. And the cells were harvested 18 hours after <sup>3</sup>H-thymidine treatment and the incorporated radioactivity was counted. The results were expressed as counts per minute (cpm). The proliferative potency was given as stimulation index(SI) over negative control.



**Fig.13.** IL-4 production from splenocytes at 4th week in experiment B. Spleen cells from buckwheat allergic mice(n=2) and cholera toxin control mice(n=2) were stimulated with 250 µg/mL of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Levels of IL-4 were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data was given as mean±SE.

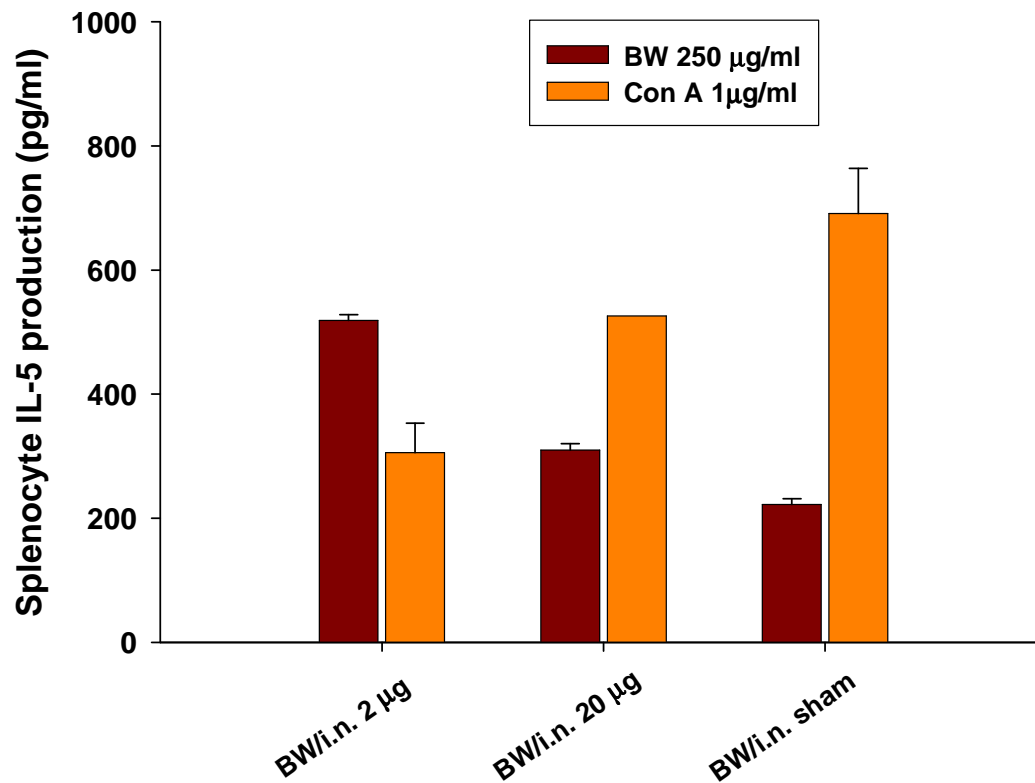
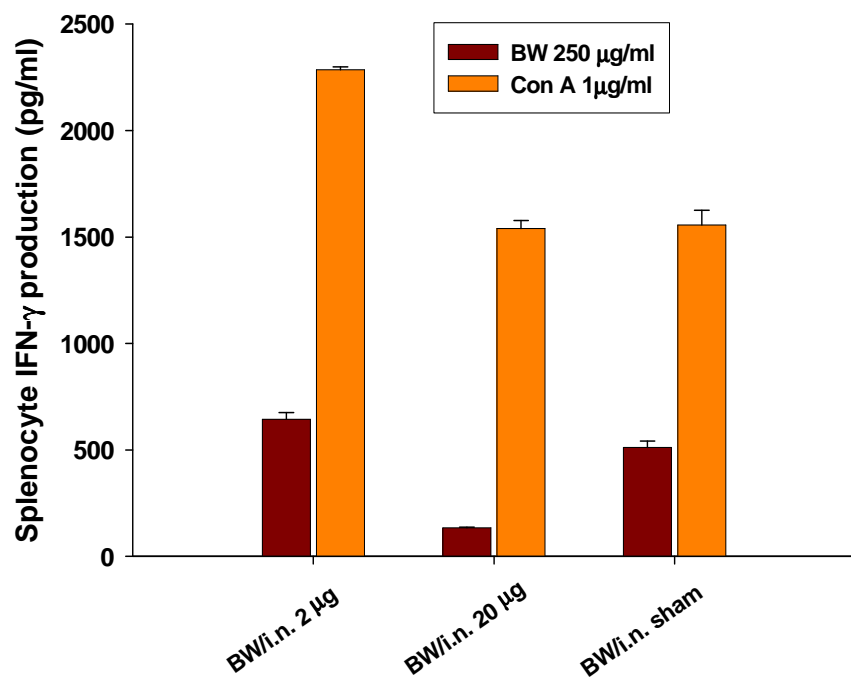
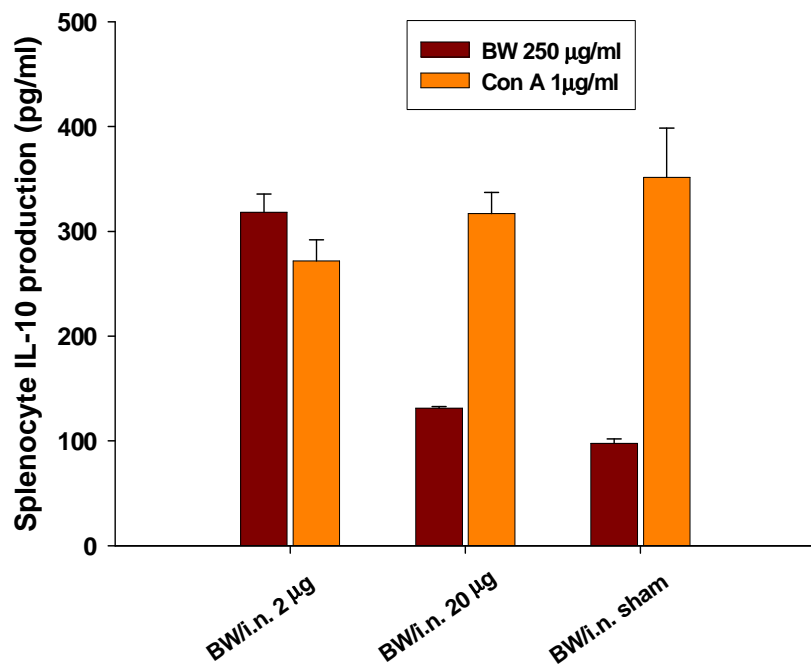


Fig.14. IL-5 production from splenocytes at 4th week in experiment B. Spleen cells from buckwheat allergic mice(n=2) and cholera toxin control mice(n=2) were stimulated with 250 µg/mL of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Levels of IL-5 were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data was given as mean±SE.

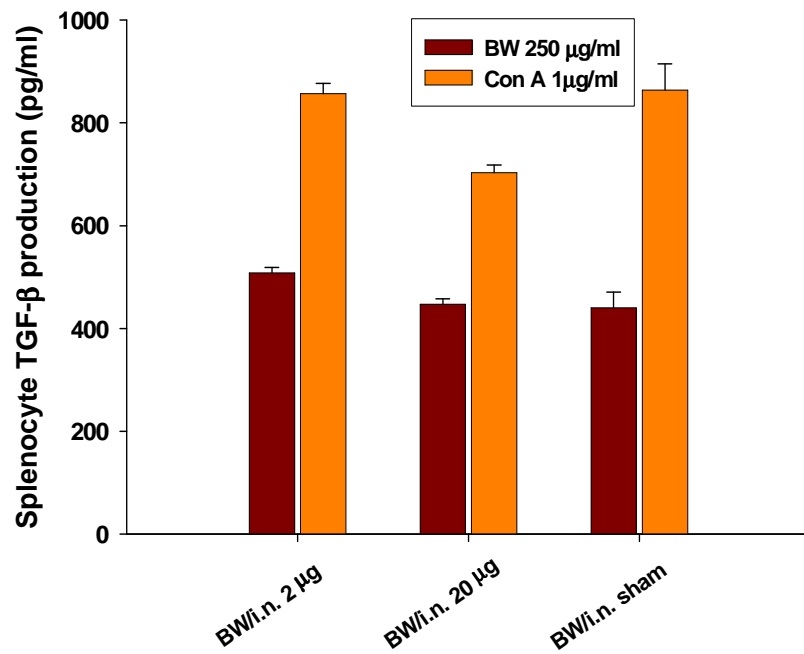


**Fig.15. IFN- $\gamma$  production from splenocytes at 4th week in experiment B.** Spleen cells from buckwheat allergic mice(n=2) and cholera toxin control mice(n=2) were stimulated with 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Levels of IFN- $\gamma$  were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data was given as mean $\pm$ SE.





**Fig.16. IL-10 production from splenocytes at 4th week in experiment B.** Spleen cells from buckwheat allergic mice(n=2) and cholera toxin control mice(n=2) were stimulated with 250 µg/mL of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Levels of IL-10 were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data was given as mean±SE.



**Fig.17. TGF- $\beta$  production from splenocytes at 4th week in experiment B.** Spleen cells from buckwheat allergic mice(n=2) and cholera toxin control mice(n=2) were stimulated with 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of crude buckwheat extracts, or with Con A. The cells cultured without any stimulation were served as a negative control. Levels of TGF- $\beta$  were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data was given as mean $\pm$ SE.

## IV. 고찰

메밀에 대한 감각은 대개는 섭취를 통해서 이뤄지며(Wieslander, 1996; Smith, 1909; Kwon과 Lee, 1985; Park 등, 2000; Kondo 등, 1993), 메밀알레르기 와 관련된 임상 보고서와 논문이 지난 30년 동안 주로 아시아와 유럽에서 보고 되어왔다. 그러나 역학적 연구의 부족으로 인해 유병률이나 발생률을 알기가 어려운 실정이다. 우리나라에서 메밀가루는 학동기와 어른에서 중요한 식품 항원 중의 하나이고, 피부단자시험에서 메밀에 대한 양성률은 약 5%이나(Lee와 Kim, 1988), 영양학적인 장점 때문에 건강식품으로 메밀의 섭취요구가 증가하고 있다. 몇몇 메밀에 대한 과민반응에 대한 증례보고는 우리나라에서(Kwon과 Lee, 1985; Lee 등, 2001; Park과 Nahm, 1996), 일본에서(Matsumura 등, 1964), 더 최근에는 유럽에서(Schiffner 등, 2001) 보고 되어 왔다. 땅콩알레르기에서와 같이 메밀에 대한 알레르기 반응은 종종 심하고 때때로는 거의 치명적인데, Lee 등의 연구에 의하면 밀이나 쌀과 어느 정도 교차항원이 있음을 알 수 있었다(Lee 등, 1993). 그러나 메밀알레르기에 대한 면역학적인, 임상적인 연구들이 부족하다. 따라서 메밀알레르기와 같은 식품 알레르기의 면역병인을 규명하고, 면역 관용의 유도를 위한 면역치료제 개발 및 방법 등의 연구를 위해 사람의 면역학적 특징과 유사한 동물모델을 사용한다면, 인체를 이용한 연구를 직접 시행한다는 윤리적인 문제가 없이 다양한 대조군과 다양한 방법을 이용한 연구를 할 수 있다. 외국에서는 오래전부터 동물모델을 이용한 알레르기 질환의 연구가 활발하였으나 주로 천식에 대한 연구들이었으며, 경구 감각에 의한 식품 알레르기의 동물모델은 1997년 이후부터 보고 되기 시작하였으며, 이들 연구는 난알부민(ovalbumin, 이하 OVA)과 우유 단백질(beta-lactoglobulin, 이하 BLG)에 의한 식품 알레르기 동물모델이었다. 국내에서는 Lee가 공동 개발하여 보고한 땅콩알레르기의 동물모델이 있다(Li 등, 2000). 본 연구는 메밀알레르기 동물모델로는 첫 보고이다.

소화관 과민증(gut hypersensitivity)에 대한 연구는 이미 1980년대 초부터 활발하였는데, 능동 감각(active sensitization)과 수동 감각(passive sensitization)

에 대한 연구가 진행되었고, 주로 이용한 항원은 BLG와 OVA였다. OVA를 이용한 쥐(rat)모델에서 수동적 피부 아나필락시(passive cutaneous anaphylaxis) 반응과 생리반응이 항원 특이 IgE의 생성 정도와 비례한다는 연구가 있는 후, IgE 생성을 유도하는 동물모델을 확립하려는 시도가 활발해 졌다(Crowe와 Perdue, 1992). 1990년대 초반 이전의 연구는 주로 쥐(rat)와 돼지쥐(guinea pig)에서 식품 항원 특이 IgE, IgG 및 IgA 항체의 생성 유도에 관련된 연구와 항원 유발 시험에 의한 생체반응, 항원 운반, 장 점막의 분비능 및 투과성, 장운동, 조직학적 변화 등에 초점을 둔 연구들이었고, 이후에는 주로 쥐와 생쥐모델을 이용한 면역병리학적 연구가 시작되었다. 식품 알레르기 연구에 있어 생쥐모델에 역점을 두어 개발하는 이유는 생쥐의 조직이나 세포 및 이와 관련한 면역물질의 개발이 급속히 발전하고 있어 시약이나 kit의 구입이 용이하고, 사육과 희생 시에 조작이 쉬워 실험하기가 적절하기 때문이다. 더욱이 다양한 transgenic mice(cytokine knockout mice, IgE deficient mice, enzyme deficient mice 등)의 생산에 힘입어 면역 및 분자생물학적 연구에 박차를 가하고 있다. 그러나 아직도 사람과 유사한 생쥐모델의 개발하는데 여러 어려움이 있는데 가장 큰 방해 요소는 경구 투여된 항원에 대한 타고난 면역관용 경향이 있다는 것이다(Ngan과 Kind, 1978; Mowat, 1987; Stroke 등, 1987; Melamad와 Friedman, 1994). 경구 면역관용(oral tolerance)이란 이전에 먹었던 식품항원의 경구투여로 알레르기를 유발시켰을 때 특정한 면역반응이 일어나지 않은 것으로 정의된다(Garside 등, 1999; Weiner, 1997). 동물모델에서 경구 면역관용의 가장 흔한 T세포 관련 기전으로는 clonal anergy, clonal deletion, 조절 T세포(regulatory T cell)의 유도가 있으며, 특히 조절 T 세포는 다양한 사이토카인의 영향을 받는다(Smith 등, 2000). 물론 이러한 기전이 경구 면역관용에서 모두 다 나타나는 것은 아니며, 쥐의 품종(Ito 등, 1997; Kiyono 등, 1982), 식이 단백질에 처음 노출된 시기(Hanson, 1981; Strobel과 Ferguson, 1984; Strobel, 1996), 투여되는 항원의 종류와 양(Mowat, 1987; Lamont 등, 1989), 그리고 항원과 함께 사용한 면역보강제(Saloga 등, 1993; Sampson 등, 1991)에 의하여 강력히 영향을 받으므로, 이러한 요인들을 적절히

선택하여 감각방법, 유발시험 방법, 항체 면역반응, 세포 면역반응, 조직 반응 등이 사람의 식품 알레르기와 유사한 동물모델을 만들려는 노력이 이뤄지고 있다.

현재까지 가장 확고히 확립된 식품 알레르기 동물모델은 Brown Norway rat을 이용한 모델(Knippels 등, 1998)이며, 생쥐모델의 경우는 아직도 연구의 시작 단계에 있다. 그리고 지금까지 보고된 식품 알레르기의 생쥐모델의 경우도 대개는 경구 감각과 경구 유발시험을 시행하지 못하고 복강 내 감각 혹은 복강 내 유발시험을 이용한 연구들이 많은데, 사람의 경우 식품 알레르기는 경구 감각 및 경구 유발에 의하여 증상이 나타나므로 엄밀히 말하면 이러한 복강 내 감각 및 유발을 통한 동물모델의 경우는 자연적인 식품 알레르기의 모델이라고 생각할 수 없다. 그러나 본 연구에서는 메밀의 위장관내 감각과 유발로 메밀알레르기의 생쥐모델을 만들어냈다. 비록 본 연구가 위장관내로 감각 시에 메밀 섭취후의 전신적인 아나필락시의 정확한 기전과의 관련성은 모르지만, 메밀 특이 혈청 IgE와 IgG<sub>1</sub> 항체는 현저하게 증가함을 관찰하였고, 메밀 자극 비장세포의 증식과 IL-4와 IL-5 생성이 명확하게 이 모델에서 유도되었다.

IgE는 즉시형 식품 알레르기를 조절하는데 중요한 역할을 함이 사람에서 뿐 아니라(Wieslander, 1996; Sampson, 1997; Rance 등, 2002; Knippels 등, 2000), 동물 모델에서도(Li 등, 2000; Knippels 등, 2000; Helm 등, 2002) 밝혀져 왔다. 본 연구에서는 C3H/HeJ 생쥐를 실험동물로 선택하였는데, 그 이유는 C3H/HeJ 생쥐가 BALB/c, AKR/J, CBA/J 생쥐보다 식품 항원에 대하여 감각이 용이하고 충분한 양의 항원 특이 IgE 생성 및 적절한 유발 증상을 나타내기 때문이다(Morafo 등, 2003). 본 연구에서 메밀 특이 IgE는 특별히 쥐에게 저용량 메밀감작 군(1 mg/dose)과 중간용량 메밀감작 군(5 mg/dose)에서 초기 감각 후 1주에서 4주 사이에 의미 있게 증가함을 알 수 있었다. 더 나아가 3주째 메밀 특이 IgE 값은 위장내로 메밀 유발 후에 측정된 아나필락시 증상점수와 일치하였다. 그러나 본 연구에서는 양성의 혈청에서 수동적 피부 아나필락시 반응을 실험하지 않았기 때문에 전신 아나필락시 증상이 IgE 값의 증가로부터 유래되었는지는 확인할 수 없었다. 이와는 반대로, 본 연구는 매일 먹이로 주는 생쥐의 사육

식이 단백질 추출물에 대한 IgE 반응을 알아내기 위해 사육 식이의 조단백 추출물에 대해 ELISA법을 이용하여 IgE 항체를 측정하였다. 본 연구에서는 실험기간 모든 생쥐군에서 무시할 정도의 사육 식이 IgE 항체 값을 발견하였고, 이것은 다른 식품 알레르기의 동물모델에서는 토의되지 않은 독특한 결과이다(Li 등, 2000; Knippels 등, 2000). 본 연구는 위장관을 통하여 감작시키는 동안 항원용량에 따른 효과를 평가하기 위해 메밀추출물을 3가지 다른 용량으로 쥐에게 감작시켰다. 흥미로운 것은 고용량 메밀감작 군(25 mg/dose)에서는 메밀 특이 IgE 반응의 초기 증가가 2주후에는 둔해졌고, 실험 3주째에 의미 있게 낮았다. 메밀로 감작시킨 후에 측정된 아나필락시 증상 점수는 메밀 특이 IgE 값에서와 같이 고용량 메밀감작 군에서 가장 낮았다. 메밀 특이 IgG<sub>1</sub> 반응도 IgE 반응과 비슷한 양상으로 실험 제 2주부터 저용량과 중간 용량 메밀감작 군에서 고용량 메밀감작 군에서와는 유의하게 다른 양상을 보였다. 향후 이 모델에서 두 종류의 항체의 정확한 역할에 대한 연구가 필요하다.

이 모델의 타당성을 평가하기 위해 비장세포 배양을 통해 메밀의 T 세포 반응을 알아보았다. 메밀로 감작된 생쥐의 비장세포의 증식은 메밀로 자극할 때에 의미 있는 증식반응을 보였다. 비록 비장세포의 증식정도가 Con A로 자극하여 배양한 실험에서 가장 높았지만(SI로 표시), 메밀로 자극하여 배양한 군의 실험에서도 상대적으로 높은(SI:7-10) 증식을 보였다. 또한 메밀 특이 IgE나 IgG 반응과는 달리 메밀 자극 증식 반응은 고용량 군에서도 저용량 군에서와 같이 강했다. 또한 메밀 특이 IL-4 반응은 저용량 군, 중간용량 군, 고용량 군에서 모두 유의한 증가를 확인하였고, 저용량 군에서 가장 많이 증가함을 알 수 있었다. 그러나 항원 특이 IL-5 반응은 저용량 군에서만 현저하게 증가하였다. 이 연구에서는 Con A는 Th2형 사이토카인에 상대적으로 저 자극효과를 가진 것을 알 수 있었다. Th2형 사이토카인 반응과 메밀 특이 IFN- $\gamma$  반응은 메밀로 자극된 생쥐에서 우세하였고, 저용량 군에서 가장 높았다. IFN- $\gamma$  생성은 Con A로 자극했을 때가 메밀로 자극했을 때보다 더 높았다.

한편 본 연구에서 사용된 생 메밀의 추출물에는 내독소(endotoxin)가 함유

되었을 가능성이 있으므로 본 모델에서의 내독소의 영향에 대하여도 고려하여 보았다. 쌀, 밀 및 메밀 등 저장 곡류에서 곰팡이와 세균의 오염 때문에 생긴 내독소가 생쥐 T세포에서의 사이토카인 생성에 직접적인 효과를 만들어 낸다는 연구가 있다(Abouzied 등, 1991; Zhou 등, 1998). 내독소는 그람 음성 세균의 세포 벽에 있는 pyogenic lipopolysaccharides(LPS)로 급 만성 질환을 일으키는 강력한 염증 전구물질이다. 동물실험에서 알레르겐에 감작되기 전에 저농도의 내독소는 Th1 반응을 도모시키는 면역반응을 유도하는 반면에, 고농도의 내독소는 독성과 염증반응을 일으키는 경향을 보인다고 알려져 있다(Liu, 2002). 내독소는 항원 특이 T 세포 기억유도에 기본적인 면역보강제로 알려져 있고, 내독소는 innate 항원전달면역세포, 특히 수지상세포에 영향을 주어 IL-12를 만들고, T 세포를 자극하여 effector T 세포를 만들어 IFN- $\gamma$ 를 분비하게 된다. 또 동시에 Th2 사이토카인(예를 들면 IL-4, IL-5, IL-13) 생성을 방해하여 아토피 면역발생이나 아토피 질환을 막는다고 알려지고 있다. 따라서 여러 표준화된 알레르겐 백신에 대한 내독소 농도를 측정하고자 한 시도도 있다(Trivedi 등, 2003). 연구자의 예상대로 본 연구에서 사용된 메밀가루 추출물에서는 내독소가 616EU/mg으로 측정되어 있었으나, 내독소의 제거 없이 연구에 사용하게 되었다. 그러나 본 연구에서는 내독소가 모든 종류의 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$  등) 생성과 비장세포 증식 반응에 미치는 영향이 없음을 간접적으로 알 수 있었다. 즉, naive mice나 CT sham 감작 군에서 동시에 시행된 메밀항원 자극에 의한 비장세포 증식능이나 사이토카인 생성 정도가 자극 항원에 포함되어 있는 내독소에 의하여 별 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 따라서 앞으로 내독소가 없는 상태에서 또는 열처리된 메밀 추출물로 실험의 반복이 필요하다고 생각되기는 하지만, 본 연구에서 확립된 메밀알레르기 동물모델은 긍정적인 도구가 될 수 있다고 결론지을 수 있겠다.

본 연구는 위장관내를 통한 감작과 유발을 통해 사람에서의 즉각형 식품 알레르기의 임상적, 면역학적 특징과 매우 유사한 메밀알레르기 생쥐모델을 완성하였는데, 본 모델에서 메밀 유도 알레르기 반응은 IgE나 IgG<sub>1</sub> 매개성 반응이고,

메밀은 T-세포 반응이 상향 조절 되도록 자극함을 관찰하였다. 이 모델을 이용하여 본 연구자들은 메밀추출물의 주 항원을 확인하거나, 다른 곡물과의 교차 알레르기를 확진하거나, 감작시키는 동안 면역보강제 없이 IgE를 유도할 수 있는지, 치료 방법을 개발할 수 있는지 등의 연구를 계속하고자 한다.

이어서 본 연구자가 확립한 메밀알레르기 생쥐모델에서 메밀 항원을 이용하여 비강내 면역요법을 시행해 보았다. 현재 식품 알레르기의 치료는 회피가 가장 좋은 방법이며, 고식적인 면역요법은 전신적인 부작용의 위험이 커서 몇몇 보고에서만 시행되었다(Nelson 등, 1997; Oppenheimer 등, 1992). 따라서 외국의 경우에는 monoclonal anti-IgE 항체를 이용하는 방법, probiotics, 전통 중국 약제를 이용한 방법, 변이된 알레르겐 단백을 이용한 면역요법, 또 이때 변형된 단백질 백신의 효율성을 증강시키기 위해 세균을 이용한 면역보강제를 사용하는 방법, 면역 펩타이드 면역요법, immunostimulatory sequence(ISS-ODN)를 세균의 DNA 어떤 자리에 지정시켜 항원 전달 세포, 자연살 세포나 B 세포를 활성화시키고 Th1 사이토카인(IFN- $\gamma$ )의 생성을 상향 조절시키는 등의 다양한 방법의 차세대 면역요법들이 활발히 연구되고 있다(Norwak-Wegrzyn, 2003).

알레르기 특이 면역요법은 알레르기 환자에서 알레르겐을 증량시켜 투여함으로써 저감작을 유도하고, 증상을 줄이는 실질적인 방법이다. Norman이 최근에 보고 된 연구들을 종합한 논문에 의하면(Norman, 2004), 면역요법후의 면역학적인 변화는 Th2 림프구 매개성 반응이 감소하고, Th1 반응은 증가하며, 알레르겐에 대한 호산구와 호염기구의 면역반응은 하향 조절한다는 것이다. 또한 Till 등에 의하면(Till 등, 2004), 면역요법은 알레르겐 특이 IgG, 특히 IgG<sub>4</sub> 아형을 증가시켜 호염기구에서 IgE-의존성 히스타민의 유리뿐만이 아니라 T 세포로의 IgE-매개성 항원전달도 억제한다는 것이다. 즉, 면역요법은 T 세포에 작용하여 알레르겐에 대해 말초와 점막의 Th2 반응을 Th1 반응으로 변화시킨다는 것이다. 또한 면역요법 이후에 말초 혈액과 점막표면에서 IL-10 생성의 증가가 확인되었는데, IL-10은 IgE-의존성 비만세포의 활성화와 Fc $\epsilon$ RI 표현을 억제하고, 호산구에서 사이토카인 생성 및 생존기간을 억제하고, T 세포에서 IL-5와 같은 알



레르기 사이토카인 전구물질의 생성을 억제하여 항원 특이 저반응이나 무반응을 일으키는 등의 강력한 항 알레르기 성질을 갖고 있다. 이 뿐만이 아니라 B 세포에도 작용하여 heavy chain class가 IgG<sub>4</sub>로 전환되게 하는 역할을 한다. 이와 같은 IL-10 생성 세포를 일명 조절 T 세포라 부르며, 이것은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 표현형을 가진다. 생쥐 연구에서는 수지상 세포가 조절 T 세포의 유도에 주도적인 역할을 한다고 알려져 있다. 이와 같은 내용은 기존의 면역요법이 알레르겐 방어 IgG 항체, 특히 IgG<sub>4</sub> 생성을 증가시키고, IgE-조절 CD8<sup>+</sup> T 세포를 만들어내고, 비만 세포와 호산구의 수, 이 세포들에서 유리되는 매개물들을 감소시키고, CD4<sup>+</sup> T 세포에서의 IL-4와 IL-5 생성을 감소시키고, IFN- $\gamma$ 의 생성이 증가하도록 이동하며, 말초 T 세포에서 무반응 또는 무력성 상태를 유도하고 조직의 미세 환경으로부터 사이토카인에 의한 반응의 재활성화가 중간 기전에 관여한다고 보고된 (Akdis와 Blaser, 2000) 내용과 대동소이하다.

한편 면역요법의 경로에 있어서는 지금까지는 주로 피하주사의 방법으로 이뤄져 왔지만 지난 세기동안 위장관, 비강내 또는 기관지 경로를 이용한 방법들에 대해서도 연구되어 왔다. 이것은 대체경로(alternative route), 비 비경구적 경로(nonparenteral route), 비 주사 경로(noninjection route) 또는 국소경로(local route)라고 불려져 왔다(Canonica와 Passalacqua, 2003). 경구경로는 1900년에 처음 제시된 후 몇 년 후에 처음 시도되었고, 1950년대에는 국소 기관지 경로가, 1970년대에는 국소 비강내 경로가 시도되었고, 1980년대에 경구 경로가 다시 시작되었다. 1977년 후부터는 국소 비강내 면역요법을 제외한 다른 국소 면역요법은 활발히 연구되어왔다. 그 후 1998년에 설하 면역요법과 국소 비강내 면역요법이 주사하는 방법을 대체하여 임상적으로 사용할 수 있을 것이라고 언급된 이후에 설하 면역요법은 주로 유럽국가에서 많이 사용되는 반면, 국소 비강내 면역요법은 주로 기술적인 제한으로 인해 점점 감소추세이다. 그러나 식품 알레르기의 치료를 위해서는 피하주사에 의한 면역요법은 부작용이 심하게 나타날 수 있다. Oppenheimer 등은 땅콩알레르기에서 급속면역요법을 이용하여 증상의 호전 및 피부단자검사에서의 반응의 감소를 보였으나 면역요법 중에 전신부작용이 13.3%를

보였다고 보고하였다(Oppenheimer 등, 1992). 또 Nelson 등도 땅콩을 섭취한 후에 즉각적인 과민 반응을 보였던 환자에서 면역요법을 시행한 후에 땅콩으로 유발시험을 하여 내성이 증가함을 보고하였다(Nelson 등, 1997). 그러나 위의 보고에서도 유지요법 중에 반복적으로 전신반응을 보였다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 다소 불편하기는 하지만, 극소량의 항원으로 비교적 안전하게 시도할 수 있는 장점이 있는 비강내로의 면역요법 개발을 시도하여 보았다. 비강내로의 면역요법은 저농도의 알레르겐을 비점막에 반복적으로 자극 후에 저반응을 관찰할 수 있다는 연구(Taylor와 Shivalkar, 1971)이래로 지금까지 십여 개의 연구가 있는데, 한 연구보고를 제외하고는 모든 연구에서 증상의 의미 있는 감소나 약물복용 점수가 감소하였다(Canonica와 Passalacqua, 2003). 또한 국소 비강내 면역요법을 시행한 환자에서 알레르겐 특이 T 세포 클론의 증식이 감소함도 보고 되었다(Giannarini와 Maggi, 1998). 비강내 면역요법은 다른 비경구적인 면역요법에 비해 치명적인 위험이 없고(Andri 등, 1997; Passalacqua 등, 2003), 더 편안하게 알레르겐을 전달할 수 있고, 비강내 알레르겐 특이 유발검사를 이용하여 비강내 반응도를 평가함으로써 표적장기에서의 효과를 직접 모니터링을 할 수 있다(Marcucci 등, 2002). 그러나 비강내로 면역요법을 시행할 때 액체상태의 알레르겐의 안정도에 문제가 있어 lyophilized macronized powder를 개발하여 임상적 효과와 안전도에 기하고 있다. 그러나 식품 알레르기에서 치료목적으로 비강내 면역요법을 시도한 연구는 아직 없는 것으로 안다.

본 연구에서는 적절한 IgE 반응과 사이토카인 반응을 보인 메밀알레르기의 생쥐모델을 확립한 후, 비강내로 면역요법을 시행하여 효과적으로 메밀 특이 IgE의 생성을 조절할 수 있는지를 알아보려고 하였다. 결과적으로 면역요법시행 2주후인 실험 제 4주에 메밀 특이 IgE의 생성의 둔화를 관찰할 수 있었다. 또한 본 연구에서는 Fig. 16에서 보인바와 같이 메밀로 비강내로의 면역요법을 시행한 실험군 모두에서 비강세포에서의 IL-10의 생성이 대조군에서의 IL-10의 생성보다 증가하였다. 이것은 IL-10이 강력한 항알레르기 성질을 가졌으며, B 세포에 작용하여 IgG<sub>4</sub>로의 전환에 주된 역할을 한다고 알려졌던 최근의 연구에(Till 등,

2004) 비취보면 매우 의미 있는 결과라 할 수 있다. Barbey 등의 연구에서는 OVA으로 예방적으로 비강내로 면역요법을 시행한 후에 IL-10 mRNA 표현이 major T cell epitope OVA 323-339(이하 OVAp)이나 PBS 만으로 비강내 면역요법을 시행하였던 생쥐에서보다 2-3배 증가하였다(Barbey 등, 2004). 면역요법 후에 IgG<sub>4</sub>의 변화에 관하여 살펴보면, IgG<sub>4</sub>는 목초 화분 알레르기가 있던 소아에서 면역요법을 시행한 후에 IgE 값이나 피부단자시험은 큰 변화가 없지만 특이 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> 및 IgG<sub>4</sub>가 유의하게 증가하였다고 보고하였다(Gehlhar 등, 1999). 생쥐에서는 IgG<sub>2a</sub>가 사람에서의 방어항체인 IgG<sub>4</sub>에 해당하는데, 본 연구에서도 Fig. 11에서 보인바와 같이 실험 4주째에 측정된 IgG<sub>2a</sub>값이 면역요법을 시행하지 않은 메틸감작 군인 실험 제 8군에서 보다 메틸로 면역요법을 시행하였던 실험 6군과 7군에서 더 높았다. 또한 본 연구에서는 비강내로 메틸 20  $\mu$ g으로 비강내로 면역요법을 시행한 실험 7군에서 실험 6군이나 대조군인 실험 8군에서 보다 현저한 IL-4의 유의한 감소를 확인하였다. 그러나 IFN- $\gamma$ 는 오히려 메틸 2  $\mu$ g을 비강내로 면역요법을 하였던 실험 6군에서 증가하였으며, IgE 생성 면에서는 보다 확실한 면역요법 효과가 있다고 생각되는 실험 제 7군에서는 오히려 대조군에서보다 감소하였다. 이와 같은 결과는 Norman의 연구에서 제시된 IL-4의 감소는 면역요법 초기에 일어나고, IFN- $\gamma$ 의 증가는 후기에 일어난다는 연구(Norman, 2004) 결과에 의하여 시간적 개념을 추가하여 설명되어 질 수 있는 부분이다. 즉, 본 연구에서는 면역요법을 하면서 장기간의 면역반응을 관찰한 것이 아니라 실험 2주간의 짧은 기간동안 시행한 결과로 인하여 IFN- $\gamma$ 의 충분한 증가를 볼 수 있는 시기에 다다르지 못하였을 가능성이 있다. 따라서 앞으로 위의 동물모델에서 4~6주이상의 좀더 장기적인 면역요법에 대한 연구를 시행한다면, 다소 다른 결과를 얻을 수 있으리라 기대되는 부분이 있다. 또 다른 가능성은 비강내로 면역요법을 시행하기에 적절한 알레르겐 농도를 얻지 못하여 상기와 같은 사이토카인 사이에 어긋나는 결과를 보일 수 있겠다. 따라서 IgE, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-10 등의 반응이 서로 일치하는 최적의 면역요법 효과를 거둘 수 있는 적절한 농도를 찾아내는 것이 본 연구에 이어서 진행되어야 할 큰 과제이며, 궁극적으로는 사람의 메

밀알레르기 치료에 이용될 수 있는 발판이 될 것이다. 본 연구에서는 비장세포에서의 IL-5 생성은 대조군에 비해 감소하지 않았다. 이것은 면역요법을 비교적 장기간 시행한 후에 IL-5 생성의 감소를 보고하였던 논문(Oda 등, 1998; Meissner 등, 1999)과는 달리, 본 연구에서는 2주간의 면역요법 후에 IL-5 생성의 감소를 볼 수 없었다. Jutel 등은 집먼지 진드기에 의한 비염과 천식 환자에서 면역요법을 시행하였고, Der p 1로 자극하여 배양 시에 IL-10과 TGF- $\beta$ 에 의해 T 세포가 억제됨을 관찰하였다. 이 연구는 면역요법 시작 후 70일에 Th1(IFN- $\gamma$ )과 Th2(IL-5, IL-13)의 사이토카인 반응의 감소와 IL-10과 TGF- $\beta$  생성이 증가하였다고 하였다(Jutel 등, 2003). 그러나 본 연구에서는 면역요법을 시행하였던 실험 6군과 7군에서는 아주 약간의 증가만이 관찰되었다. 비록 본 연구가 면역요법 후에 이뤄지는 면역학적인 변화를 완전히 설명하진 못하지만, 본 연구를 통해 비강 내 면역요법에 대한 기본적인 가능성을 엿볼 수 있었다.

## V. 결 론

본 연구를 통하여 연구자들이 제조한 메밀 조항원으로 생쥐에게 위장관을 통하여 감작과 유발시험을 시켜서 사람에서의 IgE 매개형 식품 알레르기와 임상적으로나 면역학적으로 유사한 메밀알레르기 동물모델을 만들어내었다. 이 모델에서 메밀 알레르기 반응은 IgE 또는 IgG<sub>1</sub> 매개형 이었으며, 메밀은 T 세포 반응을 상향 조절함을 알 수 있었다. 특히 메밀의 위장관내로의 감작은 1 mg/dose/mouse + cholera toxin으로 실험 제 0, 1, 2, 7일에 감작시켜 효과적인 IgE 반응, IgG<sub>1</sub> 반응 및 비장세포 사이토카인 생성이 유도됨을 알 수 있었다. 비록 cholera toxin을 면역보강제로 사용하였으나, 이 모델은 앞으로의 메밀알레르기 연구에 좋은 도구로 사용할 수 있다.

실험 B에서는 실험 A에서 개발한 메밀알레르기 생쥐 모델에서 비점막을 통한 알레르겐 면역요법을 시행하였는데, 항원 특이 IgE의 생성이 둔화됨을 관찰할 수 있었다. 이는 비장세포의 항원 특이적 IL-4의 생성의 둔화와 일치하였다. 또한 본 연구에서는 면역요법 시행에 의하여 IL-10 생성이 증가함을 관찰할 수 있었는데, 이러한 결과는 사람에서의 면역요법 후 증가한 IL-10이 강력한 항알레르기 성질뿐 아니라, 방어항체인 IgG<sub>4</sub>의 전환에 주요 역할을 한다는 연구에 부합되는 결과이다. 다만, 본 연구에서는 면역 요법을 시행한 제 6군과 7군에서 동일한 정도로 증가하지 않고 저 농도로 면역요법을 시행하였던 제 6군에서 현저히 증가함을 관찰 할 수 있었는데, 이러한 결과는 추후 면역요법 시행을 위한 항원의 투여 농도를 결정하는데 참고 자료로 사용될 수 있으리라 생각된다. 그러나 IL-4 생성의 감소는 고농도 치료군인 제 7군에서 더 현저하게 감소하였으므로, 최적의 치료 농도를 알아내는 것이 쉬운 일이 아님을 예측할 수 있다.

결론적으로 본 연구를 통하여 연구자는 위장관내 감작을 통한 메밀알레르기 동물모델을 성공적으로 구축할 수 있었고, 실제적인 면역요법을 개발하기 위하여 항원농도의 결정, 면역보강제의 개발 및 치료기간 등에 대한 추가적인 연구가 필요하지만, 국소적 비강내 면역요법의 시행이 식품 알레르기의 치료방법으로서

의 기본적인 가능성이 있음을 알 수 있었다.