

췌장 추출물 흡입에 의한 병언근무자의 직업성 알레르기에서 주요 알레르겐 규명

연세대학교 원주의과대학 내과학교실, 아주대학교 의과대학 알레르기-류마티스내과학교실¹

김상하 · 예영민¹ · 김현미¹ · 이명규 · 서창희¹ · 남동호¹ · 박해심¹

Occupational Allergy Caused by Inhalation of Pancreatic Extracts in the Medical Personnel and Identification of the Major Allergens

Sang-Ha Kim, Young-Min Ye¹, Hyun-Mi Kim¹, Myoung-Kyu Lee¹, Chang-Hee Suh¹, Dong-Ho Nahm¹ and Hae-Sim Park¹

Department of Internal Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, ¹Department of Allergy and Rheumatology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Background: Digestive drugs, including pancreatic extracts, have been widely prescribed in this country. There have been several reports of occupational asthma and rhinitis caused by digestive enzymes in workers in pharmaceutical industries; however, there has been no epidemiologic study among the medical personnel.

Objective: We evaluated the prevalence of occupational allergy and sensitization rates to digestive drugs in medical personnel and its pathogenic mechanisms.

Method: Eighteen pharmacists, 135 nurses and 123 non atopic normal controls were enrolled. Skin prick tests with 12 common aeroallergens and 5 commonly exposed drugs and its ingredients were performed. Serum specific IgE, IgG₁ and IgG₄ to α -amylase were measured by ELISA. SDS-PAGE followed by IgE and IgG₄ immunoblot analysis was performed.

Result: Work-related allergy symptoms were observed in 27.8% of pharmacists and 27.4% of nurses. IgE immunoblot analysis demonstrated 3 components which of 19 and 24 kDa were more frequently identified in sera from symptomatic subjects. IgG₄ immunoblot analysis demonstrated 2 components of which 19 kDa was more frequently identified in sera from asymptomatic subjects.

Conclusion: Digestive drug powders could induce IgE-mediated respiratory allergy symptoms in the medical personnel. Two major allergenic components of α -amylase (19, 24 kDa) were identified. Specific IgG₄ response to 19 kDa might have a role for preventing the development of work-related allergy symptoms after exposure to α -amylase powder. (Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2007; 27:10-19)

Key words: Pancreatic extracts, Occupational allergy, Alpha-amylase, Medical personnel, Major allergen

서 론

직업성 알레르기는 그 직업에 관련된 특정물질에 노출된 후 나타나는 질환으로 직업성 천식과 비염, 과민성폐장염 등이 있으며 기침, 객담, 호흡곤란 등의 천식 증상이나 콧물, 재채기, 코간지럼증과 같은 비염 증상이 발생되거나 혹은 악화되며 직장을 쉬거나 그만두면 증상이 소실되거나

현저한 개선을 보이는 것이 특징이다.

이러한 직업성 알레르기 질환의 원인이 되는 물질은 지금까지 세계적으로 약 300가지 이상이 보고되어 있다. 이들 가운데 생물학적 효소제에 의한 직업성 알레르기 질환에 대한 보고가 있었으며 이들은 대부분에서 IgE 매개 반응에 의한 기전임이 밝혀졌다.¹⁻⁴⁾ 본 연구에서 다루고자 하는 돼지 췌장 추출물은 α -amylase와 lipase 등이 포함된 효소 복합체로 주로 소화제의 원료로 사용되는 물질이다. 소화제는 특히 국내에서 흔히 처방되어 복용되거나 필요에 따라 직접 약국에서 쉽게 구매하여 복용할 수 있는 약제로, 소화제 분말 흡입에 의한 직업성 천식이 보고된 것은 국내 보고인 제약회사에서 biodiastase 분말을 다루는 일에 종사하는 근로자에서 발생한 직업성 천식과⁵⁾ 대학병원에 근무하는 간호사에서 소화제 성분인 돼지 췌장 추출물 분말에 의해 발생한

본 연구는 보건의료기술연구개발사업(03-PJ10-PJ13-GD01-0002)의 지원으로 이루어진 것임.

책임저자 : 박해심, 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지
아주대학교 의과대학 알레르기-류마티스내과학교실, 우: 443-721
Tel: 031) 219-5196, Fax: 031) 219-5154
E-mail: hspark@ajou.ac.kr

접수: 2006년 4월 28일, 통과: 2006년 10월 31일

직업성 천식의 예⁶⁾를 제외하고는 국내의 보고가 없는 실정이며, 이에 대한 역학 및 병인기전에 대한 연구가 부족하다.

또한 직업적 노출에 의한 원인물질은 민감한 환자에서 특이 IgE 반응을 일으킬 뿐 아니라 특이 IgG 반응을 일으키기도 한다. 직업성 알레르기 질환에서 IgG 반응의 임상적인 의미는 아직 명확하지는 않으나, 원인물질에 대한 폭로의 강도나 기간과 관련이 있다는 보고와 증상의 유발과 관련이 있다는 보고가 엇갈리고 있다.^{7,8)} 특이 항원 면역요법에 의한 특이 IgG₄의 증가를 통해 혈청 IgG₄를 IgE와 길항작용을 하는 차단항체로 설명하기도 하지만 직업성 알레르기 질환에서의 그 역할은 아직 명확하지 않다.

이에 본 연구자들은 병원에서 흔히 처방되는 소화제를 가루로 조제하고 이를 다루는 과정에서 약제 분말에 노출되는 강도가 다를 것으로 판단되는 병원 약제실 근무자 및 병동 간호사에 대하여 소화제 분말 흡입에 의한 감작률을 비교하고, 이로 인한 직업성 알레르기의 유병률을 조사하고자 하였다. 또한 소화제 분말 흡입에 의한 호흡기 증상의 유무에 따라 작업관련 증상을 호소한 환자군(증상군)과 무증상군으로 나누어 이들 간의 IgE 및 IgG 아형의 결합양상을 비교하여 이에 관여하는 병인기전과 주요 알레르겐을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

약제의 분말에 노출 강도가 비교적 클 것으로 판단되는 대학병원 약제실에 근무하는 보조원을 포함한 약사 18명(약제실군)과 병동에 근무하는 간호사 135명(간호사군), 알레르기 질환의 과거력이 없고 알레르기 피부단자시험 음성 반응을 보인 정상 대조군 123명을 대상으로 하였다. 약제실군과 간호사군 모두 여자였으며, 비흡연자였다.

2. 방법

1) 작업관련 호흡기 알레르기 증상 유무를 관찰하기 위한 설문지 조사: 설문지는 알레르기 질환의 역학 조사를 위하여 ISACC에서 제안한 설문지⁹⁾를 변형하여 시행하였으며, 천식, 알레르기 비염, 아토피피부염과 같은 알레르기 질환의 동반여부, 흡연력, 약제에 대한 노출기간과 노출 후 증상이 나타날 때까지의 기간, 호흡기 증상을 포함한 작업과 관련된 증상들을 확인하였다. 호흡기 증상은 콧물, 재채기, 코막힘과 같은 비염 증상이 있거나 호흡곤란, 가슴답답함, 천명과 같은 천식 증상이 있는 경우로 정의하였다. 또한 이러한 증상들이 약제를 다루는 작업 중에 악화되고 작업을 마

치고 난 후이나 쉬는 동안에는 호전되는 양상을 보일 때 작업관련 호흡기 증상이 있는 것으로 정의하였다. 이와 함께 증상 유발과 관련이 있을 것으로 생각되는 약물을 설문하여 그 빈도에 따라 확인하였다. 설문지에서 직업성 천식이 의심될 때 환자의 동의를 얻어 메타콜린 기관지유발시험을 시행하여 천식의 유무를 확인하였다.

2) 알레르기 피부단자시험: 알레르기 피부단자시험은 우리나라의 흔한 여덟 가지 흡입 항원, *Dermatophagoides pteromyssinus*, *D. farinae*, tree mixture, grass mixture, mugwort, ragweed, cat fur, dog fur와 호흡기 알레르기 증상 발현과 관련이 있는 것으로 설문이 된 네 가지 소화제, Pancron[®], Beszyme[®], Bearse[®], Festal[®] 및 이들 소화제의 공통성분인 pancreatin의 주성분인 α -amylase (Sigma Co., St. Louis, MO)에 대하여 피부단자시험을 시행하였다. 네 가지 약제는 각각 phosphate buffered saline (PBS)에 녹인 후 원심분리하여 얻은 상층액에 동량의 glycerine (Sigma Co., St. Louis, MO)을 첨가하여 피부단자시험을 시행하였고 양성 대조액으로 1 mg/mL 히스타민을, 음성 대조액으로 생리식염수를 사용하였다.

관독은 검사시작 15분 후 팽진과 발적의 크기를 측정하여 히스타민의 팽진과 비교하여 항원의 반응 정도를 알레르겐/히스타민 팽진비(A/H비)에 따라 관독하였으며, A/H비가 1 미만이면서 홍반의 크기가 21 mm 미만인 경우를 1+로, A/H비가 1 미만이면서 홍반의 크기가 21 mm 이상인 경우를 2+로, A/H비가 1 이상인 경우를 3+로, A/H비가 2 이상인 경우를 4+로 판정하였다.

3) 약제에 대한 혈청 특이 IgE 항체 측정: 혈청 내 존재하는 각 소화제 약물과 이들의 주요 성분에 대한 특이 IgE 항체를 측정하기 위하여 면역효소법을 시행하였다. 네 가지 소화제의 공통성분인 pancreatin (Sigma Co., St. Louis, MO)과 그 주성분인 α -amylase, 그리고 biodiastase (Sigma Co., St. Louis, MO)와 이를 구성성분으로 하는 소화제인 Bearse[®]를 각각 항원으로 하여 예비 실험을 통해 항원의 적정 농도를 결정하였다. 각각의 항원을 0.05 M carbonate bicarbonate buffer에 녹여 96-well microplate (Corning, NY)에 각 well 당 100 μ L씩 넣고 4°C에서 12시간 이상 작용시킨 후 이를 0.05% PBS-Tween 20으로 3회 세척하였다.

비특이적 결합을 방지하기 위하여 10% fetal bovine serum-PBS를 각 well당 200 μ L씩 넣고 상온에서 1시간 작용시켰다. 3회 세척 후, 대상 환자들의 혈청과 대조군의 혈청을 각각 1/2로 희석하여 50 μ L씩 넣고 30°C에서 1시간 작용시켰다. 다시 3회 세척 후 1 : 1,000 v/v biotin labeled goat anti-human IgE (Vector Lab, Burlingame, CA)항체를 well당 100 μ L씩 넣고 1시간 작용시킨 후 3회 세척하였다. 여기에 1 : 1,000 v/v streptavidine-peroxidase (Sigma Co., St. Louis, MO)를 well당 100

μL씩 투여하고 30분간 작용시킨 후 3회 세척하였다. 발색제(3' 5'-tetraethylbenzidine one tablet, phosphate citrate buffer 10 mL, 30% H₂O₂ 2 μL)를 well당 100 μL씩 넣어 상온에서 10분간 발색 후 2N H₂SO₄로 발색을 중지시키고 plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군의 평균 흡광도에 3배의 표준편차치를 더하여 cut-off치를 산출하여, 그 이상인 경우를 증가된 것으로 간주하였다.

4) 면역효소억제시험: 소화제 및 구성성분에 대한 항원 특이성을 확인하기 위하여 pancreatin, biodiastase, Bearse[®]에 대하여 면역효소억제시험을 시행하였다. Pancreatin에 대하여는 pancreatin, α-amylase, biodiastase, *D. pteronyssinus*를 억제제로, biodiastase에 대하여는 biodiastase, Bearse[®], α-amylase, *D. pteronyssinus*를 억제제로, Bearse[®]에 대하여는 Bearse[®], biodiastase, α-amylase, *D. pteronyssinus*를 억제제로 사용하였으며, 각각의 억제제는 0, 1, 10, 100 μg/mL 농도로 각각 약제에 대한 혈청 특이 IgE치가 높았던 환자들의 혈청과 4°C에서 12시간 이상 반응시켰다. 이를 각각의 항원이 부착된 microplate에 well당 50 μL씩 넣고 1시간 작용시킨 후 항체 측정시와 같은 방법으로 IgE 항체에 대해 면역효소법을 시행하였다. 억제제 대신 동량의 PBS를 작용시킨 경우를 대조군으로 하였다. 특이 항체 결합의 억제 정도(%)는 [(대조군의 흡광도 - 억제제가 포함된 sample의 흡광도) / 대조군의 흡광도] × 100을 곱한 값으로 정의하였다.

5) α-amylase에 대한 혈청 특이 IgG₁, IgG₄ 항체 측정: 혈청 내 존재하는 α-amylase에 대한 특이 IgG₁, IgG₄ 항체를 측정하기 위하여 면역효소법을 시행하였으며, 예비 실험을 통해 항원의 적정 농도를 결정하였다. 대상 환자들의 혈청과 대조군의 혈청을 각각 1/2로 희석하여 사용하였고, 혈청 특이 IgG₁, IgG₄ 항체를 측정을 위하여 각각 1 : 2,000 v/v biotin labeled goat anti human IgG₁와 IgG₄ 항체를 사용하였으며, 1 : 1,000 v/v streptavidine peroxidase를 작용시켜 관찰하였고 나머지 방법은 혈청 특이 IgE 항체 측정 방법과 동

일한 방법으로 하였다.

6) α-amylase에 대한 혈청 특이 IgE 및 IgG₄ immunoblotting: α-amylase를 non-reducing sample buffer (0.5 M Tris HCl, 25% glycerol, 10% wt/vol sodium dodecyl sulfate, 0.1% bromophenol blue)에 녹이고 5분간 가열시킨 후, 4% stacking gel 및 12% SDS gel에 well당 30 μg의 농도로 loading하여 120 V로 1시간 30분간 전기영동하였다. 표지자(4~250 kDa, Invitrogen, San Diego, CA)는 6 μL를 넣었다. 전기영동을 한 후, PVDF membrane (Millipore Co., Bedford, MA)에 250 mA로 2시간 전이시키고 4 mm 간격으로 절단한 후, 비특이적 결합을 방지하기 위하여 5% skim milk TBST (Tween-20 Tris-buffered saline)를 첨가하여 2시간 가량 반응시켰다. α-amylase에 대한 혈청 특이 IgE 및 IgG₄ immunoblotting을 위해서 1/2 희석한 대조군을 포함한 환자들의 혈청을 4°C에서 12시간 이상 작용시켰다. 다시 TBST로 세척한 다음 각각 1 : 1,000 biotinylated anti-human IgE 및 IgG₄를 상온에서 1시간 작용시킨 후 TBST로 세척하였다. 그 후 alkaline phosphatase가 결합된 goat anti-human IgE 및 IgG₄ (Sigma, St. Louis, MO)를 1 : 1,000 희석 후 상온에서 30분 반응시켰다. TBST로 10분간 4회, TBS로 10분간 1회 세척 후 nitroblue tetrazolium/bromochloro-indolyl phosphate (NBT/BCIP; Promega, Madison, WI)를 이용하여 약 10분간 발색시켰다.

7) 통계 분석: 연구 결과의 통계학적 분석은 SPSS v11.0을 이용하였고, 서로 다른 군 간의 비교는 Chi-square test를 사용하였고, 수치 간의 연관성은 Pearson's correlation을 시행하였다. 측정치는 평균값 ± 표준편차로 나타내었으며, P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특성

대학병원 약제실 근무자 18명, 병동 근무하는 간호사 135명과 비아토피성 정상 대조군 123명을 대상으로 하였으며,

Table 1. Clinical characteristics of study subjects

	Pharmacists (n=18)	Nurses (n=135)	Normal controls (n=123)
Age (years)*	26.1 ± 3.2	27.5 ± 3.1	37.3 ± 15.2
Gender (male/female)	0/18	0/135	66/57
Atopy (%)	8 (44.4)	43 (31.9)	—
History of allergic rhinitis (%)	2 (11.1)	19 (14.1)	—
History of bronchial asthma (%)	0 (0)	8 (5.9)	—
Exposure period (month)*	37.3 ± 35.7	43.8 ± 26.9	—
Work related respiratory symptom (%)	5 (27.8)	37 (27.4)	—

*Mean ± SD.

아토피의 유무를 확인하기 위하여 시행한 알레르기 피부단자시험에서 약제실군 8명(44.4%), 간호사군 43명(31.9%)이 아토피가 있었으며, 두 군 간의 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1). 평균 나이는 약제실군 26.1±3.2세, 간호사군 27.5±3.1세, 정상 대조군 37.3±15.2세로 세 군 간의 유의한 차이는 없었다.

알레르기 질환의 과거력을 조사하였을 때, 알레르기 비염의 빈도가 가장 높아서 약제실군 2명(11.1%), 간호사군 19명(14.1%)이었고, 기관지천식의 경우는 약제실군 0명(0%), 간호사군 8명(5.9%)으로 관찰되었으나 두 질환에서 모두 두 군 간의 빈도상 유의한 차이는 없었다. 직업력상 대상 환자들의 약제분말에 대한 폭로기간이 되는 약제실 및 병동에서의 근무기간이 각각 37.3±35.7개월, 43.8±26.9개월로 두 군 간의 유의한 차이는 없었다.

대상 환자에서 소화제를 가루로 조제하거나 분말을 다루는 작업과 관련하여 발생하는 호흡기 증상 즉 콧물, 재채기, 코막힘과 같은 비염 증상이 있거나 호흡곤란, 가슴답답함, 천명과 같은 천식 증상이 있는 경우가 약제실군 5명(27.8%), 간호사군 37명(27.4%)이었다.

2. 작업관련 증상 유무에 따른 대상 환자들의 임상적 특성

약제실군과 간호사군 총 153명 중 42명(27.5%)이 소화제 분말을 다루는 작업과 관련된 비염 또는 천식 증상을 호소하였다. 대상 환자를 작업관련 증상 유무에 따라 증상군과 무증상군으로 분류하였을 때, 나이와 아토피 등은 두 군 간에 유의한 차이가 없었으며 대상 환자 전원 모두 비흡연자 여성이었다. 하지만, 증상군은 무증상군에 비해 과거력상 알레르기 질환으로 알레르기성 비염($P=0.026$, $OR=2.8$)과 기관지천식($P=0.036$, $OR=4.9$)이 있는 경우가 유의하게 더

Table 2. Clinical characteristics of study subjects according to work related symptoms

	Work related symptoms		P value
	Yes (n=42) (%)	No (n=111) (%)	
Age (years)*	27.9±3.0	27.1±3.2	NS
Atopy	16 (38.1)	35 (31.5)	NS
History of allergic rhinitis	10 (23.8)	11 (9.9)	0.026 [†]
History of bronchial asthma	5 (11.9)	3 (2.7)	0.036 [†]
Exposure period (months)*	54.6±27.2	38.6±27.2	0.001 [†]
Latent period (months)*	16.8±15.1	—	—

*Mean±SD, [†] $P < 0.05$. NS = not significant.

높았다(Table 2). 또한 소화제 분말에 대한 노출기간을 비교하였을 때, 증상군(54.6±27.2개월)이 무증상군(38.6±27.2개월)보다 노출기간이 유의하게 증가되어 있었다. 또한 소화제 분말 흡입에 의한 작업관련 호흡기 알레르기 증상의 잠복기간은 16.8±15.1개월이었다.

3. 작업관련 증상 유무에 따른 대상 환자들의 소화제에 대한 피부단자시험 결과

피부단자시험을 시행하였던 Pancron[®], Beszyme[®], Bearse[®], Festal[®] 및 α -amylase 각각에 대한 피부단자시험의 양성률을 비교하였을 때, 증상군(28.6~31.0%)이 무증상군(10.8~14.4%)보다 양성률이 모두 유의하게 높았다(Table 3).

4. 작업관련 증상 유무에 따른 대상 환자들의 소화제에 대한 혈청 특이 IgE의 양성률

Pancreatin, α -amylase, biodiastase, Bearse[®]에 대하여 측정된 혈청 특이 IgE 항체의 양성률을 비교하였을 때(Table 4), pancreatin은 증상군 11명(26.2%), 무증상군 4명(3.6%), α -

Table 3. Skin prick test to digestive drugs according to work related symptoms

Positive skin prick test to digestive drugs	Work related symptoms		
	Yes (n=42) (%)	No (n=111) (%)	P value (OR)
Pancron [®]	13 (31.0)	12 (10.8)	0.003* (3.7)
Beszyme [®]	12 (28.6)	16 (14.4)	0.043* (2.4)
Bearse [®]	12 (28.6)	13 (11.7)	0.012* (3.0)
Festal [®]	13 (31.0)	13 (11.7)	0.005* (3.4)
α -amylase	12 (28.6)	12 (10.8)	0.007* (3.3)

* $P < 0.05$. OR = odd ratio.

Table 4. Prevalence of specific IgE to digestive drugs according to work related symptoms

Prevalence of specific IgE to digestive drugs	Work related symptoms		
	Yes (n=42) (%)	No (n=111) (%)	P value (OR)
Pancreatin	11 (26.2)	4 (3.6)	<0.001* (9.5)
α -amylase	11 (26.2)	4 (3.6)	<0.001* (9.5)
Biodiastase	3 (7.1)	0 (0.0)	0.02* (3.8)
Bearse [®]	10 (23.8)	4 (3.6)	<0.001* (8.4)

* $P < 0.05$. OR = odd ratio.

Table 5. Skin prick tests and serum specific IgE bindings to digestive drugs by ELISA

Positive specific IgE to digestive drugs	Skin prick test			
	2+	3+	≥4+	
Bearse [®]	1/9 (11.1)	4/10 (40.0)	6/6 (100.0)	r=0.612, P<0.001
α-amylase	1/10 (10.0)	4/5 (80.0)	9/9 (100.0)	r=0.782, P<0.001
Pancreatin	1/11 (9.1)	6/8 (75.0)	8/9 (88.9)	r=0.717, P<0.001

*Blanks express percentage.

amylase는 증상군 11명(26.2%), 무증상군 4명(3.6%), biodiastase는 증상군 3명(7.1%), 무증상군 0명(0.0%), Bearse[®]는 증상군 10명(23.8%), 무증상군 4명(3.6%)이었다. 모든 약제에 대한 혈청 특이 IgE 항체의 양성률은 증상군에서 통계적으로 유의하게 높았다(Table 4).

5. 소화제에 대한 혈청 특이 IgE 항체 측정과 피부반응도와와의 관련성

소화제에 대한 피부단자시험을 시행한 약제실 및 간호사군에서 약제에 대한 피부반응도에 따른 혈청 특이 IgE 항체의 양성률을 확인하였을 때, Bearse[®], α-amylase, pancreatin에 대하여 피부반응도가 증가할수록 특이 IgE 항체의 양성률이 증가되는 양상을 보였으며(Table 5), 세 가지 약제 각각에 대한 특이 IgE 항체치도 피부반응도가 증가할수록 모두 증가되는 양적 상관관계를 보였다(r=0.612, P<0.001; r=0.782, P<0.001; r=0.717, P<0.001).

또한 작업관련 증상 유무에 따른 대상 환자의 혈청 특이 IgE 항체치의 평균을 비교하였을 때, 증상군이 무증상군 및 정상 대조군보다 모두 유의하게 높았다(Fig. 1).

한편, 각각의 소화제에 대한 피부단자시험의 양성률을 약제실군 및 간호사군으로 나누어 비교하였을 때, 약제실군에서 증가된 경향은 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 또한 pancreatin, α-amylase, biodiastase, Bearse[®]에 대한 혈청 특이 IgE 항체의 양성률은 pancreatin의 경우 약제실군 3명(16.7%), 간호사군 12명(8.9%), 대조군이 1명(0.8%)이었으며, α-amylase의 경우 약제실군 3명(16.7%), 간호사군 12명(8.9%), 대조군이 2명(1.6%)이었고, Bearse[®]의 경우 약제실군 2명(11.1%), 간호사군 12명(8.9%), 대조군이 0명(0%)이었다. Biodiastase를 제외한 약물에 대하여 약제실군, 간호사군, 대조군의 순으로 약제에 대한 특이 IgE 항체의 양성률이 높은 경향을 보였으며, 통계적으로도 유의하였다(P<0.05).

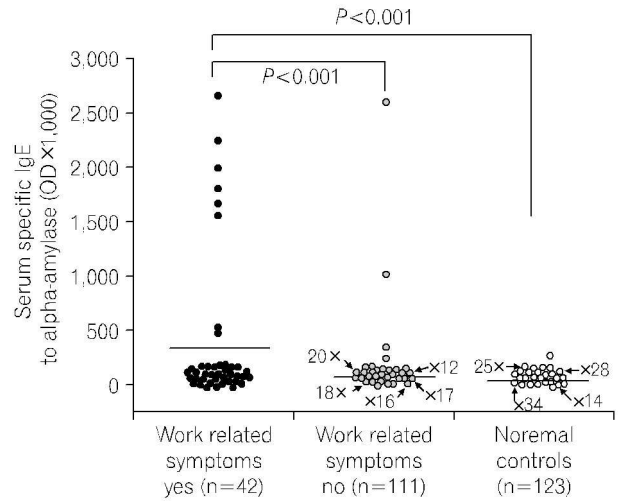


Fig. 1. Specific IgE binding to alpha α-amylase detected by ELISA in the three groups. The levels of specific IgE antibodies to α-amylase are different among the groups. The mean values ±SD are 336.3±705.1, 60.4±263.9, and 32.7±15.1 OD units, respectively (P<0.001).

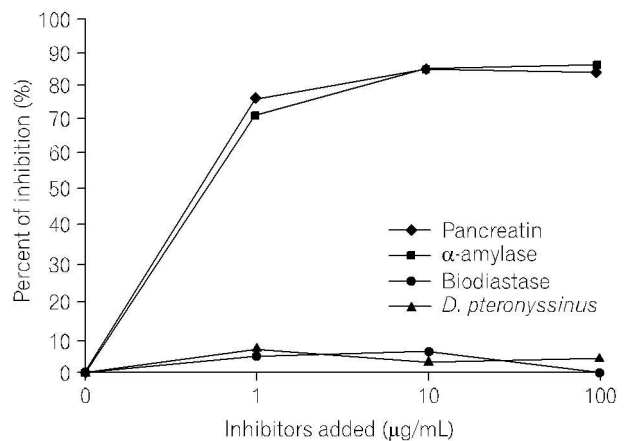


Fig. 2. IgE-ELISA inhibition in pancreatin coated wells with serial additions of pancreatin, α-amylase, biodiastase and *D. pteronyssinus*.

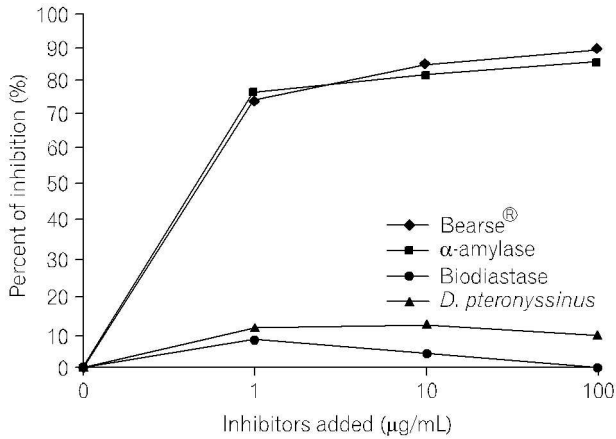


Fig. 3. IgE-ELISA inhibition in Bearnse® coated wells with serial additions of Bearnse®, α-amylase, biodiastase and D. pteronyssinus.

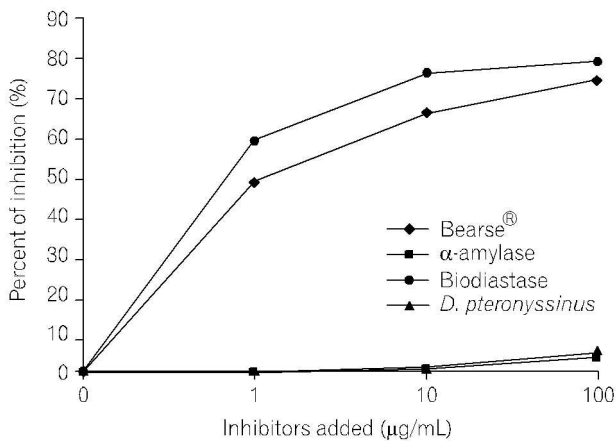


Fig. 4. IgE-ELISA inhibition in biodiastase coated wells with serial addition of Bearnse®, α-amylase, biodiastase and D. pteronyssinus.

6. 면역효소억제시험

소화제 및 구성성분에 대한 IgE 면역 반응의 특이성을 확인하기 위하여 각 약제에 대한 혈청 특이 IgE치가 높았던 환자들의 혈청을 이용하여 시행한 면역효소억제시험에서, pancreatin의 경우 pancreatin과 α-amylase를 억제제로 사용했을 때에만 용량반응곡선 양상으로 강한 억제 반응을 보였다(Fig. 2). Bearnse®의 경우 Bearnse®와 α-amylase를 억제제로 사용했을 때 강한 억제 반응을 보였고(Fig. 3), biodiastase의 경우 biodiastase와 Bearnse®를 억제제로 사용했을 때에만 마찬가지로 강한 억제 반응을 보였으며(Fig. 4), 그 외의 약제 및 집먼지진드기에 대한 억제 반응은 미미하였다.

7. α-amylase에 대한 특이 IgE 및 IgG₄ immunoblotting

연구에 사용된 소화제 약물 및 구성성분에 대하여 시행

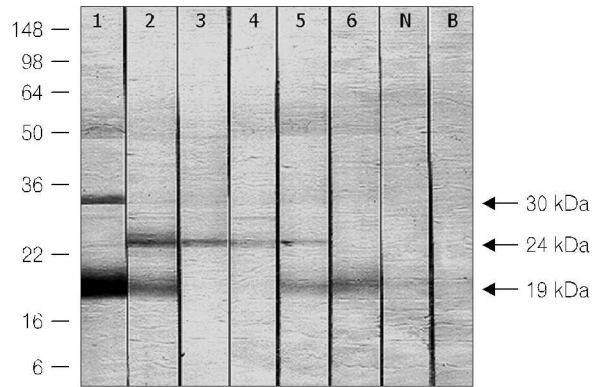


Fig. 5. IgE-immunoblot analysis of α-amylase in the sera from sensitized patients (lanes 1~6), non-atopic control (N), and buffer control (B). Five patients (lane 1, 2, 3, 5 and 6) have work related respiratory symptoms.

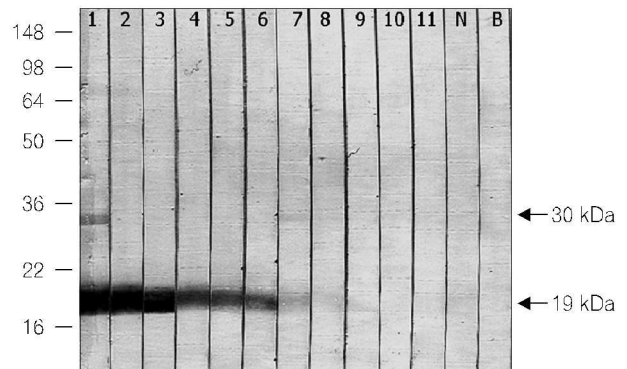


Fig. 6. IgG₄-immunoblot analysis of α-amylase in the sera from sensitized patients (lanes 1~11), non-atopic control (N), and buffer control (B). Four patients (lanes 8~11) have work related respiratory symptoms.

한 면역효소억제시험 결과를 통해 이들에 의한 알레르기 반응은 주로 그 성분을 이루고 있는 α-amylase에 의한 것임을 알 수 있었다. α-amylase에 대한 혈청 특이 IgG₁ 및 IgG₄ 항체를 측정하였을 때 혈청 특이 IgG₁ 항체치는 대상군 간의 유의한 차이를 보이지 않고 흡광도 값이 고르게 분포하는 양상으로 관찰되어 더 이상의 분석을 하지 않았으며, α-amylase에 대한 IgE 및 IgG₄ immunoblotting을 각각 시행하였다.

α-amylase 항원에 대해 SDS PAGE를 시행한 후 이를 α-amylase에 대한 혈청 특이 IgE 항체치가 가장 높았던 6명의 환자의 혈청으로 IgE immunoblotting을 하였을 때, 3개(19, 24, 30 kDa)의 특이 IgE 항체에 반응하는 단백질이 관찰되었다(Fig. 5). 이 단백질들 중에서 19, 24 kDa의 단백질은 대상 환자의 66.7%(4명)에서 각각 관찰되었다. 또한 α-amylase에 대한 혈청 IgG₄ 항체치가 가장 높았던 11명의 환자의 혈청으로 IgG₄ immunoblotting을 하였을 때, 2개(19, 30 kDa)의 특이 IgG₄ 항체에 반응하는 단백질이 관찰되었으며(Fig. 6), 19

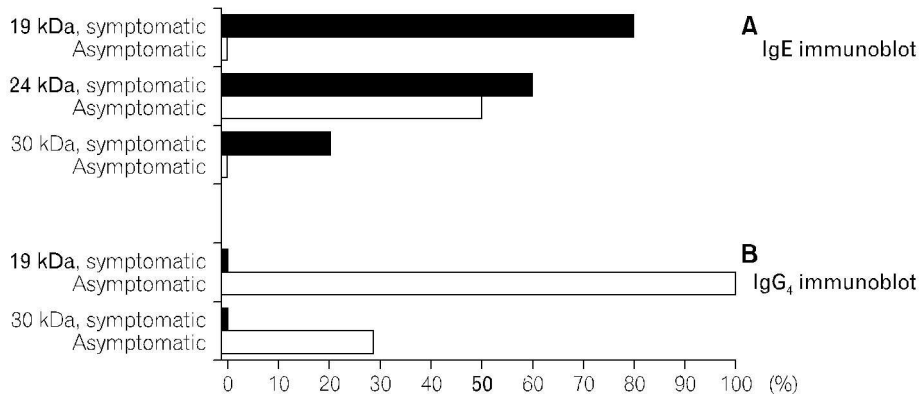


Fig. 7. Serum specific IgE and IgG₄ binding according to work related symptoms by immunoblot analysis.

kDa의 단백대가 대상 환자의 63.6% (7명)에서 관찰되었다.

8. 작업관련 증상 유무에 따른 immunoblotting에서의 특이 항체 결합 양상의 비교

α -amylase에 대한 IgE immunoblotting을 시행한 혈청 특이 IgE 항체치가 높았던 6명의 환자 중 작업관련 증상이 있었던 환자(lane 1, 2, 3, 5, 6)의 80% (4명)에서 19 kDa의 단백대의 결합이 관찰되었다. 또한 α -amylase에 대한 IgG₄ immunoblotting을 시행한 혈청 특이 IgG₄ 항체치가 높았던 11명의 환자 중 작업관련 증상이 없었던 환자(lane 8, 9, 10, 11) 모두에서 19 kDa의 단백대의 결합이 관찰되었다(Fig. 7).

고찰

췌장 추출물에 의한 알레르기 질환은 췌장 추출물이 췌장 낭포성 섬유증의 치료제로 사용되면서 복용중에 발생하는 분말의 흡입을 통해 발생되었던 것이 보고된 바 있다.¹⁰⁾ 직업적 노출에 의한 것으로는 췌장 추출물 분말에 장기간 노출되었던 제약회사 직원 및 실험실 연구원에서 발생되었으며,¹¹⁻¹³⁾ 그 병인기전에 대해서는 아직 완전히 규명되지 못한 상태이다. 제약회사 근로자에서 췌장 추출물에 장기간 노출된 이후 천식 증상이 발생하였던 14명을 보고한 내용에 따르면, 피부단자시험과 기관지유발시험을 통해 췌장 추출물 성분 중에 하나인 α -amylase에 의한 IgE 매개 면역반응이 주된 기전임을 주장하였다.¹⁴⁾ 또한 췌장 추출물에 의한 직업성 폐질환의 기전으로, (1) 기관지천식을 유발하는 제I형 과민반응, (2) 폐포염과 폐섬유화를 유발하는 제III형 과민반응, (3) 단백 분해효소에 의한 비특이적인 기도과민성 등을 제안하였다.¹⁴⁾

제I형 과민반응으로 유발되는 α -amylase에 의한 기관지천식은 제빵공 천식에서 잘 알려져 있는데,^{15,16)} 125명의 제빵공을 대상으로 작업관련 호흡기 알레르기 증상의 조사와 α -amylase에 대한 피부단자시험을 시행한 전향적인 연구에

서, 조사기간 30개월째에 대상 환자의 9.0%에서 작업관련 증상이 나타났으며, α -amylase에 대한 피부단자시험에서 10.1%의 감작률을 보였다.¹⁷⁾ 또한 알레르기 질환의 과거력이 있는 군에서 작업관련 증상의 발생이 유의하게 높았다.¹⁷⁾

본 연구에서는 α -amylase를 구성성분으로 하는 소화제 분말에 노출되었던 대상 환자의 27.5% (42/153명)에서 작업관련 호흡기 알레르기 증상이 관찰되었으며, 약제를 가루로 조제하는 작업을 주로 하는 약제실군에서 이들 약제에 대한 노출 강도가 보다 높을 것으로 판단하여 간호사군과 비교하였을 때, 작업관련 증상 빈도에는 유의한 차이는 없었다. 소화제 분말 노출 대상 환자 153명의 평균 노출기간은 43.0±28.0개월이었으며, 본 연구에서 작업관련 증상의 빈도가 보다 높게 관찰된 것은 제빵공을 대상으로 한 연구보다 원인 물질에 대한 노출기간이 길었으며 노출된 분말에 포함된 α -amylase의 농도의 차이가 관여하였을 것으로 추측되나 이에 대한 추가 연구가 더 필요하리라 생각된다. 또한 알레르기 비염의 과거력이 있는 경우($P=0.026$)와, 기관지천식의 과거력이 있는 경우($P=0.036$)에 작업관련 증상의 빈도가 유의하게 높게 관찰되었으므로, 알레르기 질환의 과거력이 있는 근로자를 소화제 분말에 노출될 수 있는 작업장에 투입할 경우에는 주의가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 작업관련 증상이 있었던 군에서 소화제 분말에 대한 노출기간의 유의한 증가를 보였는데, 노출기간이 증가할수록 작업관련 증상의 발생 빈도가 증가된다는 한 보고에서도¹⁷⁾ 노출기간 6개월에 3.4%의 빈도를 보이던 것이 18개월에 4.8%, 30개월 9.0%의 빈도로 발생률의 증가를 보였다.

α -amylase 분말에 노출된 제약회사 근로자 83명을 대상으로 조사한 연구에서 근로자 26명(31.3%)이 α -amylase에 대한 피부단자시험에 양성 반응을 보였으며, 혈청 특이 IgE 항체가 피부단자시험에서 양성 반응을 보였던 환자에서 보다 높은 것이 관찰되었다.¹⁸⁾ 89명의 제빵공을 대상으로 한 연구에서도 작업관련 증상이 있었던 43명 중에서 14명(32%)

이 α -amylase에 감작된 것을 보고하였다.¹⁹⁾ 본 연구에서 α -amylase를 포함하는 소화제 분말에 대한 피부단자시험을 시행하여 증상군 28.6~31.0%, 무증상군 10.8~14.4%에서 양성 반응이었다(Table 3). 이처럼 증상군에서 감작률이 유의하게 증가되어 있으면서 면역효소법을 통해 혈청 특이 IgE 항체를 측정할 수 있었고, 증상군에서 특이 IgE 항체의 양성률과(Table 4) 평균치가(Fig. 1) 유의한 증가를 보이고 피부반응도에 따른 특이 IgE 항체의 양성률 증가 소견(Table 5) 등을 통해 소화제 분말 흡입에 의한 알레르기 질환의 발생은 IgE 매개반응에 의한 반응임을 알 수 있었다.

약제실군과 간호사군으로 나누어 약물에 대한 피부단자시험 및 혈청 특이 IgE의 양성률을 비교하였을 때, α -amylase를 포함한 소화제 약물에 대한 피부단자시험에서는 통계학적으로 유의한 수준은 아니었으나 약제실군에서 증가된 양상을 보였고, 혈청 특이 IgE 양성률은 biodiastase를 제외하고는 나머지 약물에서 모두 약제실군에서 유의하게 높은 빈도를 보였다. 소화제 약물을 분말로 조제하는 과정이 진행되는 약제실에서 근무할 때 더 강한 강도로 노출될 것으로 생각한다면 원인 약제의 분말의 노출강도가 강할수록 이에 대한 감작률도 증가한다고 할 수 있을 것이다. 원인 물질에 대한 노출은 직업성 알레르기의 가장 중요한 위험요소 중에 하나로, 원인 물질의 노출정도와 감작률과의 관계를 보고한 연구에서 제빵공에서 α -amylase의 노출용량과 이에 대한 감작률간에 용량-반응 관계가 있음이 보고되었다.²⁰⁾ 이러한 연구들로 작업장에서 허용할 수 있는 원인 물질에 대한 최소한의 용량을 제시하여 작업환경의 개선을 유도할 수도 있겠으나, 원인 물질의 양에 대한 정량적인 측정방법이 서로 다른 작업공정과 개별 노출정도 차이에 대한 고려의 어려움으로 인해 표준화되어 있지 못한 것이 제한점이다.

아토피는 직업성 천식의 발생에 중요한 역할을 하는데 특히 고분자물질에 의한 직업성 천식과의 관련성이 보고되어 있으며,^{15,21)} 제빵공에서 α -amylase에 의한 작업관련 증상의 발생과 이에 대한 감작률은 아토피 환자에서 높게 관찰된다는 보고가 있다.²²⁾ 하지만 본 연구에서는 작업관련 증상의 유무와 관련하여 아토피의 양상에는 유의한 차이는 없었다. 또 다른 연구에서도¹⁷⁾ 아토피와 작업관련 증상의 발생과는 연관성이 적은 것으로 보고되기도 하여 본 연구의 결과만으로 아토피와의 연관성을 규정하기는 어렵지만 비아토피 환자에서도 충분한 기간의 소화제 분말에 노출될 경우 IgE 매개 반응을 일으킬 수 있을 것으로 생각된다.

대부분의 면역반응을 기전으로 하는 직업성 알레르기의 원인물질들은 일정 기간의 잠복기간을 갖게 되는데 α -amylase를 포함하는 고분자물질에 의한 경우에는 아이소시

아네이트와 같은 저분자물질보다 잠복기간이 길다. 저분자물질은 1년 이내에 대상환자의 40%에서 증상이 발생하는 반면, 고분자물질의 경우 20%에서 증상이 발생한다는 보고가 있다.²³⁾ 본 연구에서 작업관련 증상이 발생할 때까지의 잠복기간은 16.8 ± 15.1 개월이었으며, 1년 이내에 증상이 발생한 경우는 대상환자 총 153명 중에 16.3% (25명)이었다.

Pancreatin을 이용한 면역효소억제시험에서 pancreatin 및 α -amylase에 의해 용량반응곡선 양상으로 강하게 억제되는 결과를 통해서, 췌장 추출물(pancreatin)에 의한 면역반응은 췌장 추출물에 포함된 α -amylase에 의한 IgE 매개 반응이 주된 기전임을 알 수 있다. 또한 복합소화제제에서 췌장 추출물 외에 구성성분으로 사용되는 biodiastase에 대한 반응의 특이성을 확인하기 위하여 biodiastase가 포함된 복합제제 Bearnse[®]와 그 성분인 biodiastase에 대한 면역효소억제시험을 각각 시행하였다. Bearnse[®]를 이용한 면역효소억제시험에서 Bearnse[®] 및 α -amylase에 의해 용량반응곡선 양상으로 강하게 억제되는 결과를 보인 반면 biodiastase에 대하여는 억제양상이 관찰되지 않았다. 따라서 Bearnse[®]와 같이 췌장 추출물 외에 biodiastase를 포함하는 복합소화제제에서 관찰되는 면역반응도 α -amylase에 의한 반응이 주된 기전임을 알 수 있다.

췌장 추출물에 포함된 α -amylase와 이로 인한 직업성 호흡기 알레르기 질환에서 특이 IgG 및 IgG 아형에 대한 연구는 없는 상태이다. 벌독 알레르기 환자에서 항원 특이 면역요법을 시행하였을 때, 증가된 혈청 특이 IgG₄ 항체는 특이 IgE와 길항작용을 하여 알레르기 반응을 억제하는 차단항체로 작용할 수 있을 것으로 제한된 바 있다.²⁴⁾ 한편, 직업성 천식에서 작업장 노출물질에 대한 IgG 항체의 역할에 관한 연구에서는 원인물질에 대한 노출정도를 나타내는 지표로서의 가능성을 제시하였다.²⁵⁾ 또한 알레르기질환 환자에서 관찰되는 정상인과 다른 면역반응은 원인물질의 항원결정기에 대한 혈청 특이 IgG 및 IgG 아형 항체 반응이 서로 다른 것에 기인할 것이라는 보고가 있었다.^{26,27)} 이러한 특이 항체 반응의 다양성에 따라서 질환의 발생에 영향을 미칠 수 있으며 특이 IgG₄ 항체가 차단항체로 작용할 수 있다는 점을 고려할 때, 직업성 알레르기 질환의 원인물질에 노출된 환자에서 IgG 아형 항체의 감작률을 확인하고, IgG₄ 항체 반응에 의해 감작은 되었어도 증상은 발생하지 않을 수도 있을 것이라는 가정으로 α -amylase에 대한 혈청 특이 IgG 아형 항체를 측정하였다. 한편 성인에서의 IgG 아형 항체 반응은 주로 IgG₁ 및 IgG₄ 항체 반응으로 나타나며 IgG₂ 및 IgG₃ 항체 반응은 강력한 면역보강제에 의한 자극이 있어야만 나타난다.²⁸⁾

이러한 이유로 본 연구에서 α -amylase에 대한 혈청 특이

IgG₁ 및 IgG₄ 항체를 측정하였으며, 혈청 특이 IgG₁ 항체치는 약제실균, 간호사균 및 정상 대조군 간의 유의한 차이를 보이지 않고 흡광도 값이 고르게 분포하는 양상으로 관찰되어 α -amylase에 의한 직업성 알레르기 질환에서의 역할은 적을 것으로 판단되었다. α -amylase에 대한 특이 IgE immunoblotting을 시행하였을 때 관찰된 세 개의 단백질, 즉 19, 24, 30 kDa의 비교적 저분자량의 단백질이 중요한 것으로 관찰되었고 이 중에서 대상 환자의 50% 이상에서 관찰된 19, 24 kDa의 단백질이 α -amylase와 반응하는 주요 단백질로 관찰되었다. Immunoblotting을 시행하였던 α -amylase에 대한 혈청 특이 IgE 항체치가 높았던 대상 환자 중에서 작업관련 증상이 있었던 환자에서 19 kDa의 단백대를 가지고 있는 경우가 80%로 가장 높았다. 이러한 결과는 이전 연구에서⁶⁾ 관찰되었던 55, 43, 41, 32, 31, 29 kDa의 5개의 단백질이 관찰되었던 것과 비교하면, 이번 연구에서는 sample buffer 및 가열에 대한 조건을 예비실험을 통해 51 kDa의 분자량을 가지는 α -amylase를 다양한 분자량의 단백질로 충분히 전기영동할 수 있도록 조정하였고 대상환자 4명의 serum pool을 사용한 것과는 달리 혈청 IgE 항체의 양성반응이 높게 관찰되었던 환자들 각각의 혈청에서 관찰되는 결합양상을 확인하였다. 그러므로 α -amylase에 대한 IgE와 IgG 아형 항체가 결합하는 서로 다른 항원결정기(epitopes)를 관찰하고자 하였던 이번 연구에 더 적합한 방법으로 진행된 결과라고 생각된다. IgG₄ immunoblotting을 시행하였을 때에는 19, 30 kDa의 두 개의 단백질이 관찰되었고 19 kDa의 단백질은 대상환자의 50% 이상에서 관찰되었다. 이 19 kDa의 단백질은 작업관련 증상이 없었던 환자 모두에서 관찰되었다. 즉 19 kDa 부위에 대한 혈청 특이 IgG₄ 항체의 생성과 이로 인한 면역반응이 α -amylase에 의한 작업관련 증상의 발생을 억제한 것과 관련이 있을 것으로 추정할 수 있다. 또한 19 kDa의 동일한 항원결정기에 대한 혈청 특이 IgE 항체 및 IgG₄ 항체 반응의 차이로 인해 증상의 발현이 조절 될 수 있을 것이라는 가정도 가능하다. 하지만 이것은 immunoblotting에 나타난 결합 양상의 차이만을 가지고 추정한 것이므로 개별 단백질의 성분에 대한 기능적인 역할에 대한 평가가 필요할 것으로 판단되며, 추후 19 kDa 단백질의 순수분리 및 유전자재조합 항원을 제조하여 각각의 단백질 항원과 특이 항체의 반응을 살펴보고 이런 성분을 이용한 유발시험 등을 시행하여 원인이 될 것으로 판단되는 주요 알레르겐 성분에 대한 기능적인 연구가 필요하다.

결 론

병원근무자에서 채장 추출물을 성분으로 하는 소화제 분

말의 흡입에 의한 직업성 알레르기는 α -amylase에 대한 IgE 매개 반응에 의하며, α -amylase의 19, 24 kDa의 분획이 혈청 특이 IgE 항체와 결합하는 주요 분획임을 규명하였고, 약제에 노출된 환자에서 19 kDa에 대한 혈청 특이 IgE 항체 및 IgG₄ 항체 반응의 차이가 증상의 발현을 조절할 가능성이 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) Cartier A, Malo JL, Pineau L, Dolovich J. Occupational asthma due to pepsin. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:574-7
- 2) Forsbeck M, Ekenvall L. Respiratory hazards from proteolytic enzymes. *Lancet* 1978;2:524-5
- 3) Bernstein JA, Kraut A, Bernstein DI, Warrington R, Bolin T, Warren CP, et al. Occupational asthma induced by inhaled egg lysozyme. *Chest* 1993;103:532-5
- 4) Park HS, Nahm DH. New occupational allergen in a pharmaceutical industry: serratal peptidase and lysozyme chloride. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;78:225-9
- 5) Cho YJ, Kim MK, Kim YY. A case of occupational asthma due to biodiastase. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol* 1989;9:181-5
- 6) Park HS, Kim HY, Suh YJ, Lee SJ, Lee SK, Kim SS, et al. Alpha amylase is a major allergenic component in occupational asthma patients caused by porcine pancreatic extract. *J Asthma* 2002;39:511-6
- 7) Yokota K, Yamaguchi K, Takeshita T, Morimoto K. The significance of specific IgG₄ antibodies to methyltetrahydrophthalic anhydride in occupational exposed subjects. *Clin Exp Allergy* 1998;28:694-701
- 8) Park HS, Hong CS. The significance of specific IgG and IgG₄ antibodies to a reactive dye in exposed workers. *Clin Exp Allergy* 1991;21:357-62
- 9) Pearce N, Weiland S, Keil U, Langridge P, Anderson HR, Strachan D, et al. Self-reported prevalence of asthma symptoms in children in Australia, England, Germany and New Zealand: an international comparison using the ISAAC protocol. *Eur Respir J* 1993;6:1455-61
- 10) Sakula A. Bronchial asthma due to allergy to pancreatic extract a hazard in the treatment of cystic fibrosis. *Br J Dis Chest* 1977;71:295-9
- 11) Dolan TF Jr, Meyers A. Bronchial asthma and allergic rhinitis associated with inhalation of pancreatic extracts. *Am Rev Respir Dis* 1974;110:812-3
- 12) Nakamura S. Studies on asthma bronchiale. 6. On the occupational allergy caused by pancreatin among pharmacists. *Aerugi* 1971;20:361-4
- 13) Aiken TC, Ward R, Peel ET, Hendrick DJ. Occupational asthma due to porcine pancreatic amylase. *Occup Environ Med* 1997;54:762-4

- 14) Wiessmann KJ, Baur X. Occupational lung disease following long-term inhalation of pancreatic extracts. *Eur J Respir Dis* 1985;66:13-20
- 15) Blanco Carmona JG, Juste Picon S, Garces Sotillos M. Occupational asthma in bakeries caused by sensitivity to alpha amylase. *Allergy* 1991;46:274-6
- 16) Valdivieso R, Subiza J, Subiza JL, Hinojosa M, de Carlos E, Subiza E, et al. Bakers' asthma caused by alpha amylase. *Ann Allergy* 1994; 73:337-42
- 17) De Zotti R, Bovenzi M. Prospective study of work related respiratory symptoms in trainee bakers. *Occup Environ Med* 2000;57:58-61
- 18) Losada E, Hinojosa M, Quirce S, Sanchez-Cano M, Moneo I. Occupational asthma caused by alpha amylase inhalation: clinical and immunologic findings and bronchial response patterns. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:118-25
- 19) Baur X, Chen Z, Sander I. Isolation and denomination of an important allergen in baking additives: alpha amylase from *Aspergillus oryzae* (Asp o II). *Clin Exp Allergy* 1994;24:465-70
- 20) Baur X, Chen Z, Liebers V. Exposure-response relationships of occupational inhalative allergens. *Clin Exp Allergy* 1998;28:537-44
- 21) Sandiford CP, Tee RD, Taylor AJ. The role of cereal and fungal amylases in cereal flour hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 1994; 24:549-57
- 22) Houba R, Heederik DJ, Dockes G, van Run PE. Exposure-sensitization relationship for alpha-amylase allergens in the baking industry. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:130-6
- 23) Malo JL, Ghezzi H, D'Aquino C, L'Archeveque J, Cartier A, Chan-yeung M, et al. Natural history of occupational asthma: relevance of type of agent and other factors in the rate of development of symptoms in affected subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:937-44
- 24) Urbanek R, Kemeny DM, Richards D. Sub-class of IgG anti bee venom antibody produced during bee venom immunotherapy and its relationship to long term protection from bee stings and following termination of venom immunotherapy. *Clin Allergy* 1986;16:317-22
- 25) Platts-Mills TA, Longbottom J, Edwards J, Cockcroft A, Wilkins S. Occupational asthma and rhinitis related to laboratory rats: serum IgG and IgE antibodies to the rat urinary allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:505-15
- 26) Duchateau J, Michils A, Michel O, Baras L. Mite allergy is associated with a specific profile of IgG epitopes recognized on antigen p1 of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 1997;27:296-305
- 27) Michils A, Vervier I, Choufani G, Gossart B, Duchateau J. Relationship between allergic status and specificity of IgG antibody to inhaled allergens: the grass pollen model. *Clin Exp Allergy* 1999;29:832-9
- 28) Lucas AH. IgG subclass-restricted immune responses to allergens. *Springer Semin Immunopathol* 1990;12:385-400