

Casein을 장기간 섭취한 마우스에서 유도된 경구관용의 면역학적 특성

김 순 미 · 上野川修一*

경기전문대학 식품영양과
동경대학교 응용생물화학과*

Immunological Properties of Orally Induced Tolerance in Long-term Administered Mice with Casein

Kim, Soon-Mi · Kaminogawa, Shuichi*

Department of Food and Nutrition, Kyungki Junior College, Kyungkido, Korea

Department of Applied Biological Chemistry,* The University of Tokyo

ABSTRACT

We have examined the antigen specificity in orally tolerant mice fed with the casein(CN) diet. In contrast to previous reported results of studies on oral tolerance, these mice responded poorly to ovalbumin(OVA) and ovomucoid(OM), as well as α s1-CN, indicating that the tolerance was induced antigen-non-specifically on T cell proliferation assay.

To elucidate the mechanism of oral tolerance, lymph node cells(LNC) were adoptively transferred to naive or previously immunized mice. The whole LNC and T cell-enriched fraction of these cells suppressed anti α s1-CN antibody production of naive mice, but could not significantly suppressed antibody response of previously immunized recipient mice. These results indicate that oral tolerance was not mediated through suppressor T cell activities.

KEY WORDS : casein diet · oral tolerance · α s1-casein · antigen non-specificity · adoptive transfer.

서 론

사회적, 경제적 변화에 따른 인공영양아의 증가는 유아에게서 우유알레르기의 발병빈도를 증가시켰으며, 우리나라의 우유섭취의 역사가 서구여러나라에 비해 상대적으로 짧은 점을 감안할 때 이러한 현상은 앞으로 더욱 심화될 것으로 생각된다. 그러나 우유알레르기를 비롯한 식품알레르기의 발병

에 영향을 미치는 요소가 매우 다양한 만큼 그에 대한 발병기전은 아직 분명하게 밝혀져 있지 않다. 최근 식품알레르기 및 자가면역질환의 기전을 밝히는 방안의 하나로 경구관용에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 경구관용이란 다양한 항원을 adjuvant 없이 경구투여하면 항체생성을 유도하기는 어렵고, 일반적으로 그 항원에 대한 전신적인 무반응 상태를 나타내는 현상으로^{1,2)}, 실험적으로는 항원의 경구투여 후 동일 항원을 비경구적으로 면역하므로써 유도할 수 있다. 이 현상이 최초로

Casein에 대한 경구관용의 면역학적 특성

소개된 것은 1909년 Besredka에 의해서였으며, 그는 미리 우유를 먹인 guinea pig에 비경구적으로 우유를 투여하면 이 항원에 대한 반응능력을 상실한다는 사실을 발견하였고, 1946년 Chase는 이 사실을 재확인하였다⁶⁾. 즉, 경구관용은 사람 및 동물에게 있어서 중요한 영양급원이자 항원이기도 한 식품단백질이 다량으로 장내에 들어올 경우 국소적, 전신적 면역반응이 유도되어 그 부작용으로 인한 염증, 습진, 천식, 두드러기와 같은 증상이 일어나지 않도록 하는 방어기전의 하나이며, 이러한 기전에 어떠한 이상이 야기될 경우 식품알레르기가 나타날 수 있다고 생각되고 있다.

한편, 이제까지의 연구들은 경구관용이 항원의 종류, 투여하는 항원의 양, 투여빈도, 실험동물의 종류 및 투여방법의 종류에 따라서도 크게 영향을 받는다고 하였다⁷⁻¹²⁾. 예를 들어 동일한 항원의 경우에도 투여방법에 따라서도 차이가 있어서 Stokes¹¹⁾은 ovalbumin(OVA)을 음료수에 넣어 투여하면 gastric intubation으로 투여한 마우스에 비해 항체생성능이 유의적으로 감소한다고 보고하였다. 그러나, 항원을 음료수에 넣어 투여하면 섭취하는 항원의 양을 조절하기 어려우므로 gastric intubation처럼 다량의 항원을 일시적 또한 간헐적으로 투여하는 방법을 사용하여 경구관용을 유도한다. Mowat⁵⁾는 이러한 방법에 의해 OVA 1mg이상을 단 1회 투여하므로써 면역반응이 90% 이상 억제되었다고 하였다. 그러나 저자들은 예비실험 결과 전 casein(whole casein, w-CN)을 음료수에 섞어서 또한 gastric intubation에 의해 투여한 결과 유의적인 면역반응의 저하를 관찰할 수 없었으며, w-CN을 유일한 단백질 급원으로 하는 식이를 섭취시켜 1일 평균 500mg의 w-CN(as1-CN으로는 230mg)을 투여하므로써 유의적인 항체생성의 감소를 관찰할 수 있었다¹³⁾. 이는 경구관용에 있어서 항원의 차이 및 투여방법의 차이에 기인하는 것으로 볼 수 있으며 이러한 항원투여방법은 일상의 식생활을 통해 우유단백질을 지속적으로 또한 다량으로 섭취하는 사람에게서 유도되는 경구관용의 성질을 반영하는 바람직한 방법으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 casein식이를 섭취시킨 후 면역을 하므로써 유도된

경구관용이 항원특이적으로 유도되는지 즉, 경구관용은 항원특이적으로 유도된다⁶⁾는 기존의 연구 결과들이 항원의 종류 및 항원의 투여방법을 달리한 경우에도 일치하는지를 살펴보기 위하여 casein 및 이와 면역학적, 화학적으로 교차반응을 나타내지 않는 단백질항원에 대한 면역반응의 감소를 조사하였다. 한편, 이러한 경구관용의 유도에 T세포와 B세포중 어느 세포가 관여하였는지 또한 T세포라면 이를 세포중 어떠한 분획이 영향을 미쳤는지를 경구관용이 유도된 마우스의 림프절 세포를 동일 계통의 마우스에 이입하여 수용체마우스의 항체생성억제정도를 측정하므로써 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

면역반응을 지배하는 MHC유전자가 서로 다른 BALB/c(H-2^d), C3H/He(H-2^k) 및 C57BL/6(H-2^b)의 3계통의 암컷 마우스(생후 3주~8주)를 Charles River사(일본 생물재료 센타)로 부터 구입하였다. 이들 마우스는 실험에 사용하기 전까지 우유 및 계란단백질에 경구, 비경구적으로 감작된 적이 없음을 확인하였다.

마우스의 식이는 전 실험기간을 통해 자유섭취하도록 하였으며, casein식이(CN식)의 구성은 Table 1에서와 같다. Casein은 SIGMA(C-3400), 옥수수 전분은 관동화학, 콩기름은 Sankko제약, cellulose 분말은 오리엔탈 효모, 비타민과 무기질 혼합물은 일본 농산, 염화 choline은 Wako pure chemicals로부터 각각 구입하였다. 이들 재료는 Funabashi농장에 의뢰하여 고형사료로서 조제하였으며, 탈기, 밀봉 후 -5°C에 저장하며 사용하였다. 또한 대조식으로서는 우유, 계란 단백질을 전혀 포함하지 않는 사료인 MF(오리엔탈 효모)를 사용하였다.

2. 항 원

전 casein(whole casein, w-CN)은 SIGMA사의 것을 정제하지 않고 사용하였다. as1-casein(as1-CN, varient B)은 신선한 탈지유로부터 이미 보고된 방법¹⁴⁾에 의하여 분리하였다. 경구관용의 항원특이성을

알아보기 위하여 사용한 항원인 ovomucoid(OM)는 신선난백으로부터 Enomoto 등¹⁵⁾의 방법에 의해 분리, 정제하였으며, ovalbumin(OVA)은 생화학 공업, 밀혈청 albumin(HrSA, Fraction V powder)은 SIGMA사, keyhole limpet hemocyanin(KLH)은 Calbiochem-Behring Corp.로부터 각각 구입한 것을 더 이상의 정제과정없이 사용하였다.

3. 항 as1-CN항체량의 측정

Casein에 대해 경구관용이 유도된 마우스와 그렇지 않은 마우스사이의 항 as1-CN항체량의 차이가 상당히 커서 혈청을 동일배율로 희석할 경우 정확한 비교수치를 얻기가 어렵기므로, as1-CN에 특이적인 항체를 정제하여 표준혈청으로 사용하였다. 즉, as1-CN을 adjuvant와 함께 과면역시킨 BALB/c마우스의 항혈청을 pool로 하여, Affi-gel protein A MAPSII kit(Bio-Rad사)에 의해 IgG분획을 회수하였다. 이 것을 농축시킨 후, as1-CN을 결합시킨 항체 affinity 정제 colum(ΑF-Tresyl Toyopcarl 650M, TOSOH)에 농축시킨 항체를 통과시켜 as1-CN에 특이적인 항체만을 회수하였다. 이 표준혈청중의 as1-CN특이적인 항체량은 18.0μg/ml이었다. 이렇게 얻어진 표준혈청을 이용하여 표준곡선을 작성하고, 시료중의 특이항체량을 ELISA수치로부터 정량하였다.

4. 항체생성 및 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)

일정기간 CN식이, MF식이를 섭취한 마우스의 복강내로 100μg의 항원을 complete Freund's adjuvant(CFA, Difco, Detroit, USA)과 함께 w/o emulsion을 만들어 주사하였다. 2주후 동량의 항원을 incomplete Freund's adjuvant(IFA)와 함께 2차 면역하였다. 2차 면역후 1주후부터 혈청을 채취하여 ELISA에 사용하였다.

ELISA는 Kim 등¹³⁾의 방법을 사용하였다. Microtiter plate에 100μg/ml의 항원을 넣고 overnight시키고, 수세 후 희석된 혈청시료를 well에 넣었다. 2시간후 plate를 수세하고 alkaline-phosphatase conjugated anti-mouse Ig(G+A+M) [Cappel, Durham, USA] 용액을 가한후 2시간 incubate하였다. 다시 수세후 효소기질용액(0.1% p-nitrophenylphos-

phate)을 가하고 30분후 NaOH용액으로 반응을 정지시킨 다음 405nm에서의 흡광도를 측정하였다.

5. T세포 증식 시험

T세포 증식시험은 Enomoto 등¹⁶⁾의 방법을 응용하였다. CN식이, MF식이 마우스의 꼬리 기저부 및 양쪽 뒷발바닥 3개소에 항원용액과 CFA(H37Ra, Difco, Detroit, USA)의 emulsion 200μl를 피하주사하였다. 약 1주일후 림프절(inguinal and popliteal lymph node)을 적출하여 얇은 단세포 혼탁액을 항생제, 2-mercaptoethanol 및 1% 동계마우스의 정상혈청을 포함하는 RPMI 1640배지에 4×10⁶ cells/ml로 조정하였다. 96well plate에 100μl씩 분주하여 CO₂ incubator에 4일간 배양하였다. 마지막 18~22시간의 ³H-thymidine의 incorporation 정도를 액체 scintillation counter로 측정하였다.

6. 경구관용의 항원특이성

마우스는 생후 3주부터 CN식이 또는 MF식이로 사육하였다. 4주후, w-CN, OM, OVA, HrSA 및 KLH를 CN군 및 MF군에 각각 면역하여, 각각 항체 생성량과 T세포 증식 활성을 측정하였다.

7. 경구관용 마우스 림프구의 *in vivo*에 의한 면역 억제 작용

1) 면 역

생후 3주부터 3주간 CN 또는 MF식이로 사육한 마우스에게 w-CN(50μg) 또는 대조군으로 phosphate buffered saline(PBS)을 CFA와 함께 면역하여 얻은 림프절 세포를 공여세포로 사용하였다.

2) X선 조사

세포 공여 마우스의 haplotype, 나이 및 성별을 일치시킨 수용체(recipient) 마우스는 세포 이입 직전에 310rad의 X선을 조사하였다.

3) 림프절 세포의 분리

면역을 실시하고 7~10일후, 마우스의 림프절을 적출하여 단세포 혼탁액을 만들었다. 여기에 anti-mouse immunoglobulin antiserum(IgG+IgM+IgA, Cappel)과 보체(Low-Tox-M rabbit complement, Cedarlane) 또는 anti-mouse brain-associated Thy-1

Casein에 대한 경구관용의 면역학적 특성

antiserum, Cedarlane)과 보체로 처리하여 각각 B 세포 결여 분획(T cell-enriched fraction) 및 T세포 결여 분획(B cell-enriched fraction)을 얻었다.

4) Adoptive transfer

세포 공여 마우스와 동일계통의 수용체 마우스에 전립프절 세포 또는 3)의 방법에 의해 얻은 세포 분획을 복강내로 이입하였다. 또한 수용체 마우스의 면역은 CN군, 대조군 모두 세포이입의 약 4시간 후에 w-CN으로 실시하였다. 그 후 혈청중의 특이 항체 수준을 조사하므로써 이입된 세포의 *in vivo*에 따른 면역 억제 반응을 검토하였다.

8. 항체생성 및 T세포 증식의 억제율

항체생성 및 T세포 증식 시험에 있어서의 억제율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{억제율} (\%) = \frac{\text{대조군의 평균치} - \text{CN군의 평균치}}{\text{대조군의 평균치}} \times 100$$

9. 통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, Student's t-test에 의하여 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 경구관용의 항원특이성

Kim 등¹³⁾은 이미 소의 w-CN을 식이 단백질로써 지속적으로 섭취시킨 마우스는 as1-CN에 특이적인

항체가 생성되었음에도 불구하고 이러한 마우스에게 동일 항원을 면역시켰을 경우 w-CN을 섭취시킨 않은 마우스에 비해 특이항체 생성이 감소하여 경구관용이 유도되었음을 보여주었다. 이는 우유에 대해 알레르기반응을 나타내지 않는, 즉 우유단백질에 대해 경구관용이 성립된 것으로 생각되는 정상인의 혈청중에도 이들 단백질에 대한 특이적인 항체가 생성되는 현상과 일치한다고 볼 수 있다. 본 실험에서는 CN의 장기간에 걸친 경구투여에 의해 유도된 경구관용현상이 항원특이적으로 유도되는지를 살펴보았다. 즉, CN식이를 3주간 섭취시켜 경구관용이 유도된 마우스에게 w-CN, OVA, OM, HrSA 및 KLH로 면역하여 MF식이를 섭취한 대조군과 비교하였다. 항체생성능에서는 w-CN에 대해서는 96%의 억제율을 나타내었으나 OVA, OM 및 HrSA에 대해서는 유의적이지는 않지만 각각 16%, 40%, 34%의 항원 비특이적인 억제율을 나타내었다. 그러나 KLH에 대해서는 오히려 항체생성능이 증가하였다(Table 2). 또한 T세포 증식 시험에서는 항원 비특이적인 억제정도가 더욱 뚜렷하여 OVA, OM에 대하여 각각 47%, 31%(p<0.05)의 억제율을 나타내었다(Fig. 1).

경구관용에 대한 연구들은 여러 특성 중 항원 특이성이 가장 특징적으로 나타난다고 보고하고 있으나^{6) 17)}, 본 연구에서는 CN과는 화학적, 면역학적인 교차반응을 보이지 않는 난백 단백질에 대해서도 약하나마 T세포 증식반응이 억제되었는데 이는 매우 흥미있는 현상이라고 볼 수 있다. 이러한 항원 비특이적인 억제유도가 어떠한 기전에

Table 1. Composition of experimental diet
(% w/w diet)

Ingredients	%
Casein	20.1
Corn starch	62.7
Corn oil	6.2
Cellulose	5.0
Mineral mixture ¹⁾	5.0
Vitamin mixture ²⁾	1.0
Choline chloride	0.02

1) 2) AIN '76

Table 2. Antigen specificity on humoral tolerance to w-CN(BALB/c)

Antigen	ELISA value(A405) ¹⁾		
	MF	CN	supp(%)
w-CN	1.647±0.979	0.071±0.024	96 p<0.05
OVA	1.937±1.030	1.624±0.493	16 NS
OM	1.258±0.652	0.753±0.460	40 NS
HrSA	1.483±0.308	0.973±0.522	34 NS
KLH	1.352±0.459	1.673±0.511	—24 NS

1) Each serum was diluted with 5000, 10000, 5000, 40000 and 20000 times in PBS for w-CN, OVA, OM, HrSA and KLH respectively.

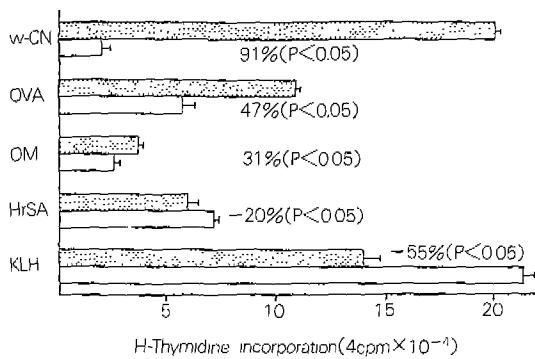


Fig. 1. Antigen specificity on cellular tolerance to w-CN (BALB/c). LNCs primed with various antigens 7 day previously were challenged in vitro with the same antigen of 10 μ g/ml. Dotted bars and open bars show control and CN diet fed mice, respectively.

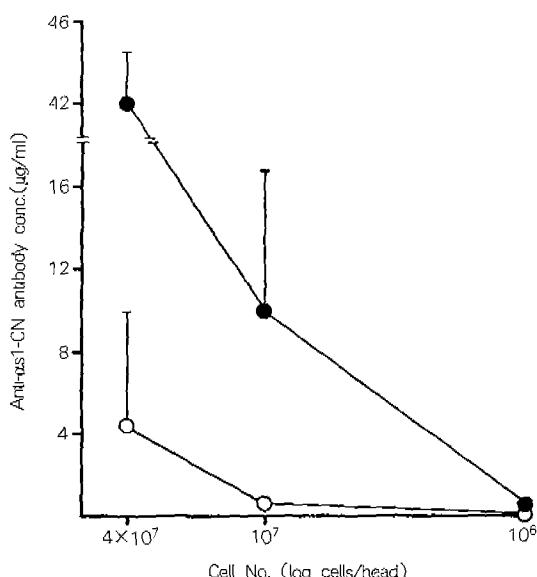


Fig. 2. Adoptively transferred cell dose response (BALB/c). LNCs derived from CN group(open circles) or control group(closed circles) were transferred to naive syngeneic mice. These mice were immunized 4hr and 14d after the cell transfer. Antiserum was obtained on 21 day.

의해 생성되었는가에 대한 연구는 실행하지 않았지만, 다른 연구에서 볼 수 없었던 현상을 관찰할 수 있는 이유증의 하나는 항원 투여 방식의 차이

즉 다양한 항원을 계속적으로 투여함에 따라 나타난 결과로도 해석할 수 있다. 즉 항원의 계속적인 자극은 면역관용의 원인이 되는 면역 담당세포의 영역(repertory)을 확대시키고, 이 과정에서 항원 비특이적인 억제활성을 갖는 세포 또는 액성인자 유도됨에 따라 비특이적 억제 현상이 나타날 가능성을 내포하고 있다. Salgame 등¹⁸⁾은 *M. leprae* 항원에 특이적으로 유도된 suppressor T세포(Ts) 클론이 항원 비특이적인 양식으로 작용했다고 보고하였으며, 최근 Miller 등¹⁹⁾은 myelin basic protein(MBP)을 경구투여한 Lewis 쥐의 비장세포를 항원으로 자극할 때 Ts세포의 증식은 항원특이적으로 유도되나, 이때 생성되는 액성인자는 MBP cell line뿐 아니라 OVA에 특이적인 cell line도 억제시키므로써 경구 관용에 의해 항원 비특이적인 액성인자가 유도된다는 사실을 최초로 시사하였다.

2. 경구관용 마우스 림프구의 adoptive transfer
as1-CN에 대해 유도된 경구관용의 작용 기전을 알아보기 위하여 관용이 유도된 마우스의 림프절 세포를 동계의 정상 마우스에게 이입하므로써 수용체 마우스의 as1-CN에 대한 면역반응이 저하되는지를 살펴 보았다.

1) 면역관용의 이행

as1-CN에 대해 관용이 유도된 마우스의 세포를 수용체 마우스 한마리당 1×10^6 개부터 4×10^7 개까지 조정하여 정상마우스에 이입하므로써 as1-CN에 대한 관용현상도 이행하는지를 검토한 결과, 적어도 1×10^7 개 이상의 림프구를 이입하므로써 관용현상도 이행됨을 알 수 있었다(Fig. 2). 즉, 림프절 세포 중에 면역관용의 원인이 존재함을 알 수 있었다.

2) 수용체 마우스에 있어서의 X선조사의 영향

공여세포(donor cell)를 이입하기 전, 수용체 마우스에 X선을 조사하여 면역활성을 저하시킬 필요가 있는지를 살펴보았다(Fig. 3). 1차 항체 반응에서는 X선 조사군과 비조사군 모두 관용 마우스 세포의 이입에 따른 유의적인 항체반응성의 감소를 나타내었으나, 2차 항체 반응에서는 X선 조사군에서만 항체생성이 억제되었다. 그러나, 1차 항체

Casein에 대한 경구관용의 면역학적 특성

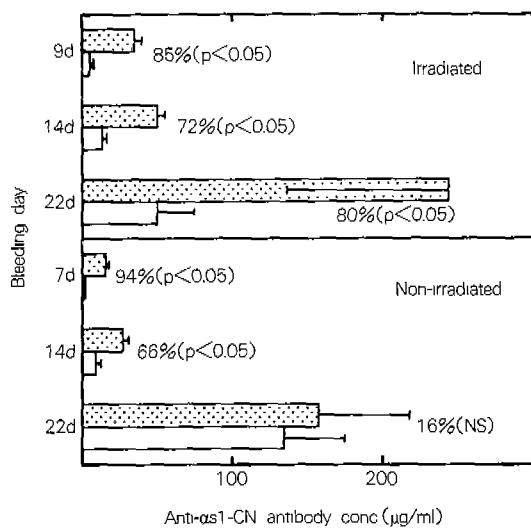


Fig. 3. Effect of irradiation to recipient mice on adoptive transfer of LNCs(BALB/c). Donor mice were raised on CN(open bar) or control(dotted bar) diet and immunized s.c.. Seven days later, LNCs (1.5×10^7 cells/head) derived from donor mice were transferred into the irradiated(310 rad) or non-irradiated recipient mice(0 day). These recipient mice were immunized on 0 day and 14 day.

반응만을 본다면 수용체 마우스에 X선을 조사하지 않아도 같은 반응을 나타내었으므로 이후의 실험에서는 X선을 조사하지 않았다.

3) 림프구의 분획에 의한 관용현상의 이행

이상에서 as1-CN에 대해 경구관용이 유도된 마우스의 림프구를 그대로 이입하므로써 관용현상이 이행됨을 알 수 있다. 다음으로는 림프구중 어떤 세포가 이러한 관용현상의 이행에 관여하는지를 살펴보았다. 즉, 림프절 세포에 항체-보체처리를 하여 B세포 결여 분획과 T세포 결여 분획을 얻어

각각 이입하였다. 그 결과 B세포 결여 분획(T cell-enriched fraction)에서는 전세포를 이입한 경우와 마찬가지로 항체반응이 감소하였으나, T세포 결여 분획(B cell-enriched fraction)에 의해서는 유의적인 감소를 보이지 않았으므로 경구관용에 관여하는 세포는 역시 T세포임을 알 수 있었다(Table 3). 또한 림프절 세포를 얻기 위하여 w-CN으로 면역하지 않고 PBS와 adjuvant만으로 면역한 경우도 같은 결과를 나타내었다(Fig. 4). 이는 CN식이를 섭취한 마우스의 림프절에는 w-CN으로 면역하여 항원에 특이적인 림프구의 증식을 유도하지 않아도 수용체 마우스의 면역관용을 유도할 수 있는 충분한 수의 세포를 포함하고 있음을 알 수 있었다.

4) 경구관용 마우스 림프구의 *in vivo*적 억제

마지막으로 이러한 면역관용기전에 특이적인 Ts가 관여하는지를 살펴보았다. 즉, 수용체 마우

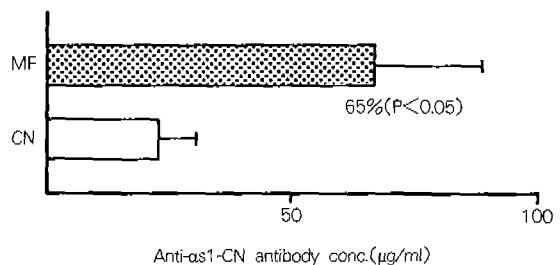


Fig. 4. Adoptive transfer of orally induced suppression in BALB/c mice. Donor mice(3wk-olds) were fed on control diet(MF) or CN diet(CN). Four weeks later, all mice were sham-immunized with PBS/CFA. LNCs derived from donor mice were adoptively transferred into the irradiated(310 rad) recipient mice(0 day). These mice were immunized on 0 day and 14 day. Antiserum obtained on 24 day was used for this assay.

Table 3. Adoptive transfer of orally induced suppression in C57BL/6 mice

	Cell No.	MF	CN	supp. (%)
Whole	4×10^7	$100.0 \pm 21.8^{1)}$	23.7 ± 5.9	76 p<0.05
Whole	1×10^7	30.7 ± 18.1	6.8 ± 5.9	78 NS
T	1×10^7	16.1 ± 8.0	4.7 ± 4.4	71 p<0.05
B	1×10^7	5.0 ± 2.8	2.8 ± 2.3	44 NS

1) Anti as1-CN IgG concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)

2) Not determined

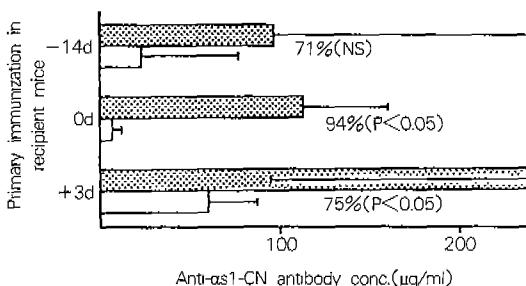


Fig. 5. Active *in vivo* suppression of lymph node cells derived from CN(open bar) or control(dotted bar) diet fed and w-CN primed mice were transferred to recipient mice(0 day). These recipient mice were primarily immunized on -14day, 0 day or 3 day and boosted 2 weeks after the cell transfer.

스를 2주전에 w-CN으로 복강면역하여 CN에 특이적인 면역반응을 야기시킨 후 관용이 성립된 마우스의 림프구를 이입하였다. 그러나 관용마우스의 세포는 수용체 마우스에서 유도된 as1-CN에 특이적인 effector 세포의 활성을 유의적으로 억제시키는데는 실패하였다(Fig. 5). 이것은 적어도 장기간 다량의 CN에 의해 관용이 유도된 마우스의 림프구에는 effector Ts가 결여되어 있음을 간접적으로 나타내 주는 결과라고 볼 수 있다. 그런데, 많은 연구자들²⁰⁾²¹⁾은 관용현상에 있어서 국소적으로 유도된 Ts의 중요성을 시사하였다. Mattingly 등²²⁾은 SRBC투여 2일후 쥐의 Peyer's patch 및 장간막 림프절의 Ts를 정상마우스에 이입하므로서 이 항원에 대한 PFC, DTH반응 등을 억제시켰다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서와 같이 장기간 항원으로 자극받은 마우스의 체내에는 활성화된 Ts가 결여되어 있을 것으로 생각된다. 이 결과는 OVA투여후 4주째 관용의 상태에 있는 마우스의 비장에는 Ts의 존재를 발견할 수 없었다고 하는 Richman²³⁾의 보고와도 일치한다. 그런데, Fig. 5의 결과를 Table 3의 T세포 분획에 의해 항체반응이 억제된 사실과 함께 생각해 볼 때, 본 실험에서 유도된 as1-CN에 대한 경구관용에는 Ts이외의 Th 클론의 결손과 같은 기전이 작용했을 가능성도 있다. Komatsu 등²⁴⁾도 역시 모유를 통해 HGG(human gamma-globulin)로 감작

시킨 마우스가 성숙 후 나타내는 HGG특이적인 관용은 Th기능의 선택적인 결손에 기인한다고 보고하였다. 그러나 여기에서도 Ts가 완전히 관여하지 않았다고는 볼 수 없다. 이것은 항원의 투여 초기에 유도된 short-lived Ts²⁵⁾가 항원에 특이적인 Th의 분화, 성숙을 저해한 후 negative feedback에 의해 불활성화된 결과인지도 모른다. 또는 장기간의 항원자극에 의해 Peyer's patch에서 유도된 Ts가 말초 림프조직으로 순환하여 전신성 면역 불응답(systemic immunological unresponsiveness)를 야기²²⁾²⁶⁾ 시킨 후 다시 원래의 장관 림프조직으로 homing 했을 가능성도 배제하기 어렵다. 그러나 현재의 결과만으로는 as1-CN에 대해 유도된 경구관용기전을 이해하기는 어렵고 앞으로 이에 관한 연구가 계속되어져야 할 것이다. 또한, 경구관용은 casein과 같은 항원이 될 수 있는 물질을 식이에 첨가시킨 후 실험동물의 면역반응을 연구하고자 할 때 반드시 고려하여야 할 중요한 특성이며, 경구관용 부전이 식품알레르기를 유발할 수 있다는 관점에서 더욱 많은 연구가 기대되는 분야이다.

결 론

본 연구는 casein을 다량으로 또한 지속적으로 섭취한 마우스에서 유도되는 경구관용의 항원특이 성 및 유도기전을 밝히기 위하여 행해졌다. 이유를 막 끝낸 생후 3주의 BALB/c, C3H/He마우스에게 CN식이를 3주이상 섭취시킨 후 as1-CN과 면역학적으로 교차반응을 나타내지 않는 단백질에 대한 항원특이성을 실현한 결과 w-CN에 대해서는 면역기능이 90% 이상 감소하였으나, 난백 단백질인 OVA, OM에 대해서도 항체반응의 경우 각각 16%, 40%로, T세포 종식시험에서도 각각 47%, 31%의 억제율을 보여 현재까지의 일반적인 견해와는 달리 항원 비특이적인 면역 억제 반응을 나타내었다.

또한, 경구관용이 유도된 마우스의 림프절 세포를 haplotype이 일치하는 정상마우스에 이입하였을 경우 수용체 마우스의 as1-CN에 대한 항체반응을 억제시킬 수 있었다. 이러한 현상은 수용체 마우스를 X선 조사하므로써 더 오래 지속시킬 수가

Casein에 대한 경구관용의 면역학적 특성

있었다.

림프절 세포를 분리하여 adoptive transfer한 경우 T세포 분획은 림프절 세포를 그대로 주입했을 때와 비슷한 정도의 항체생성 억제율을 보였으나, 이미 면역기능이 활성화된 수용체 마우스의 항체생성능력은 억제시키지 못한 것으로 보아 여기에서는 effector Ts이 유도되지 않았거나 초기에 유도된 Ts 및 그 밖의 어떠한 원인에 의해 Th 클론이 결손되었을 것으로 생각된다. 그러나 정확한 기전을 밝히기 위해서는 현재의 가설을 뒤틀침해 주는 연구가 더욱 필요할 것이다.

또한, 본 실험에서 사용한 경구투여방법은 기존의 투여방법과는 상당히 다른 것으로 이러한 유도방법의 차이가 면역학적 특성에 영향을 미친 것으로 생각된다. 더우기 이러한 투여방법은 일상의 식생활에서 식이 단백질을 섭취하는 방법과 매우 유사하며, 경구관용의 이상현상이라고도 할 수 있는 식품알레르기의 연구를 위해서도 바람직한 모델이라고 생각된다.

Literature Cited

- 1) De Aizpurua HJ, Russell-Jones GJ. Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J Exp Med* 167 : 440-451, 1988
- 2) Elson CO, Ealding W. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with Cholera toxin. *J Immunol* 132 : 2736-2741, 1984
- 3) Hanson DG, Vaz NM, Maia LCS, Hornbrook MM, Lynch JM, Roy CA. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 55 : 526-532, 1979
- 4) Hanson DG, Vaz NM, Maia LCS, Lynch JM. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. II. Evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies. *J Immunol* 123 : 2337-2343, 1979
- 5) Mowat AMCI. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol Today* 8 : 93-98, 1987
- 6) Challacombe SJ, Tomasi TB. Food allergy and intolerance. pp255-268, Baillière Tindall, New York, 1988
- 7) Challacombe SJ, Tomasi TB. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J Exp Med* 152 : 1459-1472, 1980
- 8) Saklayen M, Pesce AJ, Pollak VE, Michael JG. Kinetics of oral tolerance. Study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 73 : 5-9, 1984
- 9) Strobel S, Ferguson A. Immune responses to fed protein antigens in mice. III. Systemic tolerance or priming is related to the age at which antigen is first encountered. *Pediatr Res* 18 : 588-594, 1984
- 10) Kiyono H, McGhee JR, Wannemuehler MJ, Michalek SM. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* 155 : 605-610, 1982
- 11) Stokes CR, Swarbrick ET, Soothill JF. Genetic differences in immune exclusion and partial tolerance to ingested antigens. *Clin Exp Immunol* 52 : 678-684, 1983
- 12) Tsuru S, Fusisawa H, Aiso S, Zinnaka Y, Nomoto K. Contradictory responses in induction of delayed type hypersensitivity in orally immunized mice. *J Clin Lab Immunol* 23 : 91-94, 1987
- 13) Kim SM, Enomoto A, Hachimura S, Yamauchi K, Kaminogawa S. Serum antibody response elicited by a casein diet is directed to only limited determinants of *as1*-casein. *Int Arch Allergy Immunol* 101 : 260-265, 1993
- 14) Ametani A, Kim SM, Kaminogawa S, Yamauchi K. Antibody response of three different strains of mice to *as1*-casein analyzed by using proteolytic and synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 154 : 876-882, 1988
- 15) Enomoto A, Aoki Y, Kurisaki J, Kaminogawa S, Yamauchi K. Comparison of four distinct idiotypes of monoclonal antibodies against hen's egg ovomucoid. *Agric Biol Chem* 51 : 3099-3106, 1987
- 16) Enomoto A, Aoki Y, Kurisaki J, Kaminogawa S, Yamauchi K. T cell response to hen's egg ovomucoid. *Agric Biol Chem* 52 : 2531-2536, 1988
- 17) Bruce MG, Ferguson A. The influence of intestinal

- processing on the immunogenecity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumin in mice. *Immunology* 59 : 295-300, 1986
- 18) Salgame P, Modlin RL, Bloom BR. On the mechanism of human T cell suppression. *Int Immunol* 1 : 121-126, 1989
- 19) Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 174 : 791-798, 1991
- 20) Miller S, Hanson D. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin. *J Immunol* 123 : 2344-2350, 1979
- 21) Mowat AMCl. The role of antigen recognition and suppressor cells in mice with oral tolerance to ovalbumin. *Immunology* 56 : 253-260, 1985
- 22) Mattingly JA, Waksman BH. Immunological suppression after oral administration of antigen. I. Specific suppressor cells formed in rat Peyer's patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration. *J Immunol* 121 : 1878-1883, 1978
- 23) Richman LK, Chiller JM, Brown WR, Hanson DG, Vaz NM. Enterically induced immunological tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J Immunol* 121 : 2429-2434, 1978
- 24) Komatsu T, Okao M, Miyamoto H, Chen T, Shinka S. Effects of early antigen exposure through lactation on later specific antibody responses in mice. *J Immunol* 141 : 2895-2906, 1988
- 25) Lamont AG, Gordon M, Ferguson A. Oral tolerance in protein-deprived mice. I. Profound antibody tolerance but impaired DTH tolerance after antigen feeding. *Immunology* 61 : 333-337, 1987
- 26) Richman L, Graeff A, Strober W. Antigen presentation by macrophage enriched cells from the mouse Peyer's patch. *Cell Immunol* 62 : 110-118, 1981