

수동피부아나필락시스 시험, immunoblot, 식품알레르기 생쥐모델에 의한 난백 처리물의 알레르기성 평가

김현정 · 류주현 · 이수영¹ · 손동화*
한국식품연구원, ¹아주대학교 의과대학 소아과

Allergenicity of Treated Chicken Egg Whites as Determined by a Passive Cutaneous Anaphylaxis Test, Immunoblot Analysis, and a Mouse Model of Food Allergy

Hyun-Jung Kim, Ju-Hyune Ryu, Soo-Young Lee¹, and Dong-Hwa Shon*

Korea Food Research Institute

¹Department of Pediatrics, School of Medicine, Ajou University

Abstract The allergenicity of treated chicken egg whites (EW) was evaluated by a passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test, immunoblot analysis, and a mouse model of food anaphylaxis. The results of the PCA test revealed that treatment with 0.3% NaOH (w/v) decreased the antigenicity of native EW to 1/4. In addition, treatment with heat (121°C, 30 min) or 1% NaOH (w/v) decreased the antigenicity to 1/8 and combined treatment with 1% NaOH (w/v) and heat (70°C, 15 min) decreased the antigenicity to 1/32 of that of the native EW. Immunoblot analysis revealed that the density of EW protein bands decreased in response to heat treatment, and were almost not detectable following the combined treatment. Finally, the murine model of EW anaphylaxis revealed that the mean score of systemic anaphylactic symptoms in EW challenged mice was 1.85, while the mean score in mice challenged with EW that had been subjected to the combined treatment was only 0.20. The results of this study indicate that the most effective method of reducing EW allergenicity is combined treatment with 1% NaOH (w/v) and heat (70°C, 15 min).

Keywords: egg white, allergenicity, passive cutaneous anaphylaxis test, immunoblot, mouse model

서 론

일반적으로 이물질에 대한 생체의 과민반응은 4가지 type으로 알려져 있고 그 중 식품에 의한 것은 제I형, 제III형, 제IV형으로 알려져 있다(1). 제I형은 즉시형 과민반응으로 IgE에 의하여 일어나며 제III형은 혈액 내 IgG와 항원의 복합체가 다량으로 생성되어 조직에 손상이 야기되어 일어난다. 제IV형은 T세포와 macrophage에 의한 면역반응에 의하여 일어나는데 식품 섭취 8시간 이후에 발생하기 때문에 지연형 과민반응으로 알려져 있다.

특히 제I형은 식품 알레르기의 주요한 원인으로 그 메커니즘은 다음과 같이 설명된다. 식품에 포함된 특정 알레르겐이 장관을 통하여 체내에 유입되면, 알레르겐에 특이적인 IgE 항체가 만들어지게 되고 이 항체는 비만세포의 FcεR(receptor)에 가서 붙게 된다. 여기에 같은 알레르겐이 재 침입하게 되면, 여러 epitope을 가진 알레르겐이 비만세포표면에 최소 두 분자 이상의 IgE와 결합하게 되어 일종의 bridge를 형성한다. 이러한 bridge형성은 비만세포에 탈 과립의 신호를 전달하여 과립내의 histamine, serotonin

등의 mediator들을 방출하게하고 이러한 mediator에 의하여 평활근수축, 모세혈관 투과성항진, 혈관확장이나 수축 등의 혈관반응이 일어나게 된다(2,4).

단백질의 항원성 및 알레르기성을 조사하기 위해서 사용되는 ELISA는 비교적 간단하면서도 항원과 특이항체와의 결합정도를 수치적으로 분석할 수 있기 때문에 자주 이용되지만, 여기에서 나타나는 항원성은 한 개의 항원과 한 개의 항체가 반응하는 일가(monovalent) 항원성이므로 실제 생체 내에서의 반응과는 차이가 있다고 할 수 있다. 즉, 인체 내에서 알레르기는 한 개의 항원에 두 분자 이상의 특이항체가 결합하는 다가(polyvalent) 항원성에 의해서 일어나기 때문이다. 알레르겐의 다가 항원성을 알아보기 위해서는 passive cutaneous anaphylaxis(PCA) test를 실시하는데 이는 동물의 피내에 항체(항혈청)를 투여하고 일정시간 경과 후 항원과 색소를 정맥 주사하여 피부에 누출된 색소의 정도를 측정하는 방법이다(5).

한편, PCA test는 *in vivo* 실험이기는 하나, 알레르겐을 정맥 주사하여 항체와의 반응을 살펴보는 것이므로, 알레르겐을 경구적으로 섭취하였을 때 발생하는 식품알레르기와 그 반응 경로에 차이가 있을 수 있다. 이러한 차이를 극복하기 위하여, 동물에게 특정 식품 알레르겐을 경구적으로 섭취시켜 알레르기 반응을 유도하는 동물 모델(animal model)이 이용되고 있고(6-9) 이는 식품 알레르겐의 장관 흡수에서부터 전신적인 알레르기 증상이 나타나기까지의 기전이 사람의 식품 알레르기 발증 경로와 유사하여 특정 식품의 알레르기 유발성이나 저 알레르기성 식품의 유효성

*Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi-do 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9133
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: dhs95@kfri.re.kr
Received April 5, 2008; revised July 21, 2008;
accepted July 21, 2008

을 평가하는데 적합하다(6). 더구나, 임상실험이 가장 효과적이지만 까다로운 절차와 많은 위험성을 내포하고 있는 점을 감안할 때, 동물 모델은 이러한 임상실험을 대체할 수 있는 효과적인 방법으로 생각된다.

본 연구에서는 각종 효소, trifluoromethanesulfonic acid(TFMS), 방사선, 열, NaOH 등으로 처리한 난백시료의 다가 항원성을 PCA test를 통하여 조사하였다. 이중 효과적인 항원성 감소를 보였던 난백에 대한 계란 알레르기 환자 IgE 항체의 반응성을 immunoblot을 통하여 알아보았다. 또한, 난백을 생쥐에 경구적으로 투여하여 유발한 계란 알레르기 동물 모델을 이용하여 복합처리한 난백의 알레르겐 저감화 정도를 평가하였다.

재료 및 방법

실험 재료

Hartly계 guinea pig(250-300 g) 12마리는 한림실험동물(Pyungtaek, Korea)로부터 구입하였고 C3H/HeJ mouse(5주령) 80마리는 Charles River Japan(Tokyo, Japan)사로부터 구입하였다. Cholera toxin, ficin, pancreatin, *streptomyces caespitosus* 유래의 protease(SC protease), TFMS, Evans blue, goat anti-human IgE-alkaline phosphatase들은 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 난백분말은 SKM Egg Product Export Ltd.(New Delhi, India) 제품을 사용하였다. 환자의 혈청은 아주대학교병원 소아과에 내원하였던 계란 알레르기 환자의 혈청(CAP: 4.87 kUA/L; Class 3)을 사용하였다.

난백의 처리

난백의 알레르기성 저감화를 위하여 우선 효소, 열, NaOH 등의 처리를 실시하였다. 우선, 효소는 ficin, pancreatin, SC protease로 총 3종을 사용하였다. 난백을 균질화한 후 각 효소 반응의 최적 pH로 조절하고 난백의 단백질 농도는 6%(w/v)으로 맞추고 단백질 농도의 1%의 효소를 여기에 첨가하였다. 각 효소의 최적반응 온도에서 24시간 반응시켰고 반응 종결을 위하여 90°C에서 10분간 열처리 하였다. 열처리를 위하여 분말난백을 증류수에 1%(w/v) 농도로 녹인 후 water bath를 이용하여 80, 100°C에서, autoclave를 사용하여 121°C에서 30분간 처리하였다. NaOH처리는 Hisatomi 등(10)과 Ryu 등(11)의 방법을 참조하여 행하였다. 즉, 분말 난백을 증류수에 녹여 5%(w/v) 농도로 만든 후, NaOH를 0.1, 0.3, 1, 3%(w/v)의 농도로 첨가하여 50°C water bath에서 2시간 동안 반응시켰다. 처리된 난백의 일부는 증류수로 투석하여 사용하였고 일부는 water bath에서 70°C에서 15분간 열처리를 추가한 후, 증류수에 투석하였다. 그 외 TFMS, 방사선조사는 Ryu

등(11)의 방법에 따라 준비하였다.

Passive cutaneous anaphylaxis(PCA) test

처리 난백의 생체 내 알레르기 반응을 알아보기 위해 이중간 PCA test를 Lee 등(12)과 Ha 등(4,13)의 방법을 참조하여 실시하였다. 즉, 건강한 guinea pig를 실험동물로 하여 등의 털을 제거하고 ether로 국부마취 시켰다. Phosphate buffered saline(PBS: 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl)으로 1/10에서 1/2,560까지 2배씩 9단계로 희석한 토끼 anti-ovomucoid 항체(11,16)를 각각 100 µL씩 등 부위 여러 곳에 피내 주사하여 4시간 동안 guinea pig를 감작시켰다. 그 다음 PBS에 용해한 항원용액을 1%의 Evans blue 용액과 동량 혼합한 후, 마리당 3 mg씩 항원을 뒷다리 정맥에 각각 1 mL씩 주사하였다. 30분 경과 후, guinea pig를 치사시키고 피내주사한 부위의 피부를 절개하여 피부 안쪽에 나타난 청색반점의 직경을 측정하였다. 직경 5 mm 이상의 반점을 양성으로 판정하였다.

Immunoblot

처리난백의 항원성과 알레르기성 변화를 조사하기 위해 immunoblot을 실시하였다. 시료의 단백질량은 1.6 µg으로 맞추었고 Laemmli(14)의 방법으로 SDS-PAGE를 실시하였으며, 단백질의 분자량 측정에는 prestained marker(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. Towbin 등(15)의 방법으로 immunoblot을 실시하였다. 앞서 전개시킨 겔의 단백질을 transfer buffer(Tris-glycine buffer; 25mM Tris, 192mM glycine, 10% MeOH, 0.1% SDS)로 nitrocellulose membrane(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 100 V로 2시간 동안 Mighty small transfer(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 transfer시켰다. Transfer 후, membrane을 blocking solution(BSA 1%/Tris-buffered saline with Tween 20)에 넣어 하룻밤 동안 4°C에서 방치하였다. 계란 알레르기 환자혈청 1차 항체로서 1/40로 희석하여 사용하였고, 2차 항체는 goat anti-human IgE-AP conjugate를 1/100으로 희석하여 사용하였다. 희석한 1차 항체는 1 시간 동안 상온에서 membrane과 반응시키고 TBST를 이용하여 15 분씩 세 번 세척하였다. 희석된 2차 항체는 1 시간 동안 상온에서 반응시킨 후, 위의 방법으로 세척하였다. BCIP/NBT phosphatase substrate system(Bio-Rad)으로 발색시킨 후, membrane을 증류수로 세척하여 발색을 중지시켰다.

계란알레르기 유발 생쥐모델

Li 등(9)의 방법을 응용하여 C3H/HeJ 생쥐에 처리난백을 경구 투여하여 인위적으로 계란 알레르기 증상을 유발시킨 다음, 이 동물계를 이용하여 처리 난백의 알레르기성 변화를 조사하였다

Table 1. The schedule of the sensitization and challenge for the murine model of egg white (EW) hypersensitivity

Group	Sensitization	Challenge	No. of head
1	None	EW: 20 mg	8
2	Cholera toxin: 10 µg	EW: 20 mg	8
3		EW: 20 mg	16
4	EW (low dose): 10 mg	EW [NaOH (1%)+heat ¹⁾]: 20 mg	8
5	Cholera toxin: 10 µg	EW [NaOH (3%)+heat]: 20 mg	8
6		EW : 20 mg	16
7	EW (high dose): 50 mg	EW [NaOH (1%)+heat]: 20 mg	8
8	Cholera toxin: 10 µg	EW [NaOH (3%)+heat]: 20 mg	8
Total			80

¹⁾Heat treatment at 70°C for 15 min

Table 2. The assessment score of hypersensitivity responses

Score	Systemic anaphylaxis
0	No symptoms
1	Scratching and rubbing around the mouth and head
2	Puffiness around the eyes and mouth, diarrhea, pilar erection, reduced activity, and/or decreased activity with increased respiratory rate
3	Wheezing, labored respiration, and cyanosis around the mouth and the tail
4	No activity after prodding or tremor and convulsion
5	Death

(Table 1). 즉, 난백 10 mg(저용량) 또는 50 mg(고용량)과 cholera toxin 10 µg을 0.9% 생리 식염수에 희석하여 500 µL로 만든 후 각각의 생쥐(6주령)에게 각각 존대(sonde)를 이용하여 경구투여 하였다. 이러한 감작(sensitization)은 0주(week)와 1주째에 실시하였고, 저용량군과 고용량군에 각각 32마리씩의 생쥐를 배정하였다. Challenge는 총 3회(3, 4, 6주) 실시하였고 난백 또는 NaOH 처리와 열처리를 병행하여 실시한 난백 20 mg을 0.9% 생리 식염수에 희석하여 500 µL로 만든 후 이를 30~40분 정도의 간격으로 2번에 나누어 challenge하였다. Challenge 후 30~40분 동안 알레르기 증상을 관찰하여 Table 2를 기준으로 평가한 점수를 기록하였다.

결과 및 고찰

PCA test를 이용한 항원성 평가

토끼의 항체를 guinea pig에 피내주사하고 처리항원을 정맥주사하는 방식의 PCA test법에 의하여 다가 항원성을 분석하였다. PCA test를 통한 난백처리군의 다가 항원성은 토끼 anti-OM 항

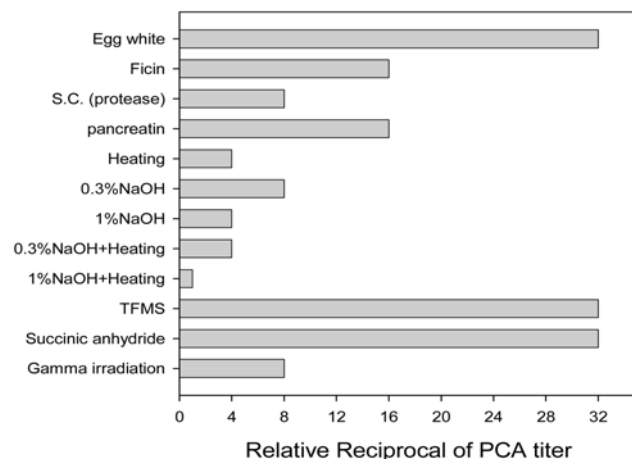


Fig. 1. The allergenicity of the treated egg white to rabbit anti-ovomucoid (OM) antiserum on guinea pig PCA. The reaction with blueing of more than 5 mm in diameter was regarded as a positive. Data are reciprocals of limiting dilution factor of antiserum divided by the highest dilution ratio showing positive PCA results (1/32). EW was hydrolyzed by respective enzymes (ficin, pancreatin, protease from *Streptomyces caespitosus* (SC protease), heated at 121°C for 30 min, treated with NaOH (0.3% or 1%) at 50°C for 2 hr, NaOH (0.3% or 1%), followed by heating at 70°C for 15 min, and trifluoromethanesulfonic acid (TFMS). EW was irradiated with Co-60 source (10 kGy).

체를 희석하여 분석하였고 그 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에 나타났다. 푸른색 반점의 직경이 5 mm 이상을 보인 항체의 희석배율에 처리군 중 최소 희석배율로 나타난 1% NaOH와 열의 복합처리군의 결과인 1/8로 나눈 후 그 역수를 취한 PCA titer를 Fig. 1에 나타내었다. Ficin의 경우 난백의 항원성이 1/2로 감소되었음을 알 수 있었고 pancreatin과 SC protease로 가수분해한 난백에 대한 두 종류의 효소처리는 항원성이 각각 1/2과 1/4로 감소된 것으로 나타났다. 121°C의 열 처리군은 PCA test 결과 1/8정도 항원성이 감소하였고 NaOH의 단독처리군도 0.3% 처리 시 1/4로 1%처리 시 1/8로 효과적인 항원성 감소를 보였다. 처리군 중 가장 큰 효과를 보였던 1% NaOH와 열(70°C, 15 min)로 복합처리한 EW는 다가 항원성이 1/32정도의 감소 효과를 보였고 이는 Fig. 2의 (F)와 같이 다른 처리군과 구별되는 시각적 차이를 보였다. 방사선 선량 10 kGy로 조사된 난백은 PCA test에서 항원

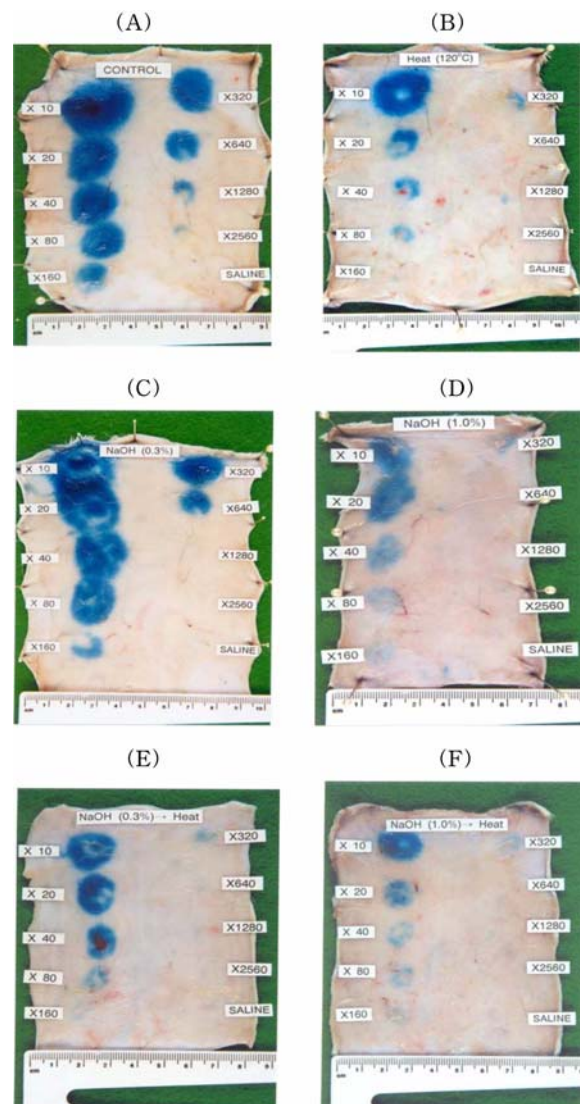


Fig. 2. Typical profiles of PCA tests of the treated egg whites with rabbit anti-OM antiserum. Hundred microliters of serially two-fold diluted antiserum (1/10-1/2,560) were injected into guinea pig subcutaneously. 4 hr later, 1 mL of 0.5% Evans blue solution containing 3 mg of control EW (A), heated (121°C) EW (B), treated with 0.3% NaOH (C), treated with 1% NaOH (D), treated with 0.3% NaOH, followed by heating (70°C, 15 min) (E) or 1% NaOH, followed by heating (F).

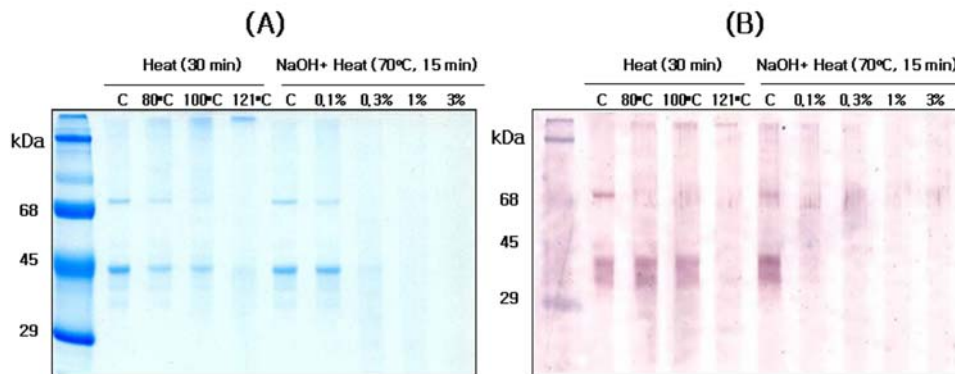


Fig. 3. SDS-PAGE patterns (A) and immunoblot analysis (B) of the treated EW. The proteins were run on a 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with blocking solution and exposed to human IgE of a patient. Lane 1; MW marker, lane 2; control EW of heat treatment, lane 3; heated EW (80°C, 30 min), lane 4; heated EW (100°C, 30 min), lane 5; heated EW (121°C, 30 min), lane 6; control EW of NaOH-heat (70°C, 15 min) treatment, lane 7, 8, 9, and 10; EW treated with 0.1, 0.3, 1, 3% NaOH followed by heat treatment (70°C, 15 min), respectively.

성이 1/4로 감소하였다. TFMS 처리는 최대 희석 항혈청에서도 여전히 청색반점을 보여, 항원성 감소에 효과가 없는 처리로 나타났다.

본 연구의 PCA test 결과와 이전 ELISA 연구 결과(16,17)는 대체로 비슷한 경향을 보였으나 효소, 방사선, TFMS 처리구에서 다음과 같은 차이를 보였다. 첫째, pancreatin과 SC protease 효소 처리 및 방사선조사는 ELISA의 분석(16,17)의 결과와 다르게 PCA test에서 항원성이 감소하는 것으로 나타났다. 그 까닭은 감작된 비만세포에 항원이 결합하는데 요구되는 두 분자 이상의 항원결정기가 부분적으로 소실되어 다가 항원성의 감소를 보인이라고 추측할 수 있었다. 둘째, 난백에 대한 TFMS 처리구의 PCA test 결과는, 계란 알레르기 환자의 IgE 항체를 이용한 알레르기성 분석한 결과와는 유사하였으나(16), 토끼의 IgG 항체를 이용한 ELISA 분석에서는 항원성이 10^{-4} 로 감소되었던 점(17)과는 대조적이었다. 이러한 현상은 기본적으로 토끼항체를 이용한 ELISA에서는 IgG 항체가 관여하였던 반면 PCA 반응과 환자혈청 반응에서는 IgE 항체가 관여하였던 것으로 설명된다. 이는 IgG 항체가 인식하는 항원 결정기는 OM의 당쇄부분인 반면, IgE 항체의 항원결정기는 비당쇄부분인 것(16)으로 나타나 토끼의 혈청 중 미량이지만 존재하는 IgE 항체가 PCA test의 초기반응에 관여하여 4시간 후에 나타난 결과로 추측된다. 또한 동종의 항체로 PCA test를 할 경우 IgE 항체에 의하여 반응이 나타나는 데는 1-2일 정도의 시간이 소요되지만 본 연구에서와 같이 이중의 항체로 PCA 반응을 유도한 경우에는 단시간(2시간 전후)내에 반응이 일어나기 때문이다(18).

Immunoblot에 의한 난백분해물의 알레르기성 평가

열 및 복합처리한 난백의 전기영동 및 immunoblot의 패턴을 조사함으로써 난백분해물의 알레르기성을 평가하고자 하였다. 전기영동결과 처리난백의 주요 band는 70 kDa의 분자량대와 45 kDa의 분자량대에 존재하였다(Fig. 3A). 특히, 주요 단백질인 OA와 OM은 분자량의 차이가 15 kDa 정도로 있지만, 전기영동 상의 움직임이 비슷하여 OA와 거의 비슷한 분자량 대인 45 kDa 부근에서 조금 밑에 비슷한 분자량 대에 존재하는 것으로 나타났다(7). Immunoblot 분석결과, OM으로 생각되는 30-45 kDa 부근에서 뚜렷한 band가 확인되어 본 실험에서 사용한 환자의 혈청 중 IgE 항체가 주로 OM과 68 kDa 부근의 conalbumin에 반응하는 것으

로 생각되었다(Fig. 3B). 난백의 열처리 결과 처리온도 100°C 이하에서는 대조구와 비슷하게 band에 거의 변화가 없었고 121°C에서 주요 band가 흐려진 것으로 나타났다. 또한, 전기영동 결과와 마찬가지로 200 kDa 부근에서 새로운 band가 보였는데 이는 OA를 열처리하면 S-S 결합으로 열에 안정한 구조인 고분자량 중합체가 형성된다(19)고 한 보고와 같이 열에 의해 polymer를 형성하여 분자량이 커진 OA의 항원성이 더욱 증가되어 특이항체와 더 잘 결합하는 것을 알 수 있었다.

NaOH 및 열처리한 난백의 전기영동결과, 0.1%(w/v) NaOH 농도까지는 대조구와 band에 큰 차이가 없었지만, 0.3%(w/v) 농도부터는 특정 band들이 사라져서, 이 농도부터 난백의 주요단백질이 분해되기 시작하였음을 알 수 있었다. 이를 immunoblot한 결과, 0.1%(w/v) 농도부터 이들 band들이 많이 사라진 것으로 나타났고 OM으로 생각되는 난백의 단백질이 상당부분 분해되어 항체와의 반응성이 급격히 감소된 것을 알 수 있었다. 중합화된 OA로 생각되는 200 kDa 부근의 band도 확인되지 않았다. 따라서, EW에 NaOH 및 열처리를 하면 0.3%(w/v) NaOH 농도부터 항원성이 대부분 사라지는 것으로 확인할 수 있었다. 이와 같이 난백의 항원성이 효과적으로 감소된 까닭은 NaOH가 난백을 알칼리 분해시켰고 여기에 열처리(70°C, 15min)를 추가해 주면 그 분해가 촉진되었기 때문으로 생각된다.

생쥐모델에 의한 알레르기성의 평가

난백과 cholera toxin으로 경구 감작된 생쥐에게 처리난백을 투여하여 3차 challenge하였을 때 유발된 알레르기 증상의 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 난백을 투여하지 않은 군(naive)과 cholera toxin만을 투여한 군(CT)에 난백을 challenge하였을 때 알레르기 증상(전신반응)의 평균점수는 각각 0.25, 0.00점으로 나타났다. 저용량 난백에 감작된 군(10 mg)과 고용량 난백에 감작된 군(50 mg)에 난백을 challenge한 경우에는 알레르기 증상 평균 점수가 각각 2.00점, 1.69점으로 저용량군의 점수가 조금 높게 나타났다. 땅콩 알레르기 동물실험 모델을 개발한 Li 등(9)의 연구에 따르면, 땅콩으로 감작된 생쥐에 땅콩을 challenge하였을 때에는 저용량 군에서 3.00점이었고 고용량 군에서 2.37로 나타나 본 연구의 계란 난백의 경우보다 높은 점수를 보였다. 또한 일회 challenge로도 알레르기 증상이 강하게 유도되어 본 연구에서 유도된 알레르기 증상과는 차이를 보였다. 이는 알레르겐 특성의 차이로

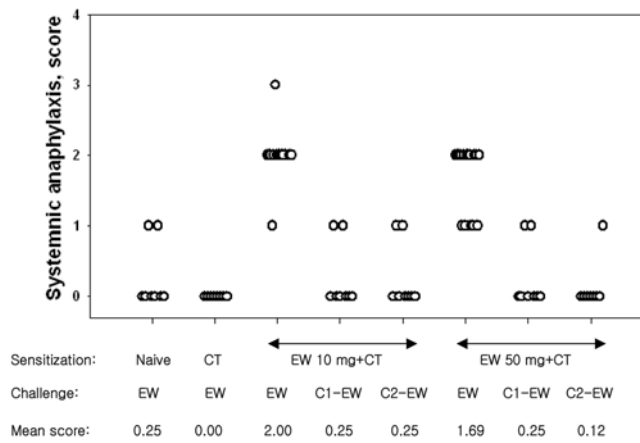


Fig. 4. Egg white (EW) antigen-induced systemic anaphylaxis. Mice (n=8~16) were sensitized by means of intragastric gavage with 10 mg or 50 mg of raw EW plus 10 µg of cholera toxin (CT). After week 6, mice were challenged orally with EW or two kinds of the combined treated EW which were treated with NaOH 1% (C1-EW) or 3% (C2-EW) followed by heat treatment (70°C, 15 min). Symptoms of anaphylaxis were scored as description in Table 2. Open circle indicates individual mouse.

인하여 땅콩과 계란 난백에 대한 실험동물의 알레르기증상이 서로 다르게 나타났기 때문인 것으로 생각된다.

처리 난백의 알레르기성 저감화 정도를 검토한 결과 난백의 challenge로 유발된 생쥐의 알레르기 증상점수의 전체평균은 1.85 점이었으나 복합처리군에서는 전체 평균점수가 0.2로 감소되어 naive군과 비슷한 수준으로 나타났다. 또한 복합처리 시 NaOH처리 농도인 1%, 3%간에는 결과의 차이가 거의 없었다. 따라서 생쥐모델에 의한 알레르기성 평가에서 1%이상의 NaOH 및 열처리 (70°C, 15 min)는 난백의 알레르기성을 효과적으로 감소시킴을 확인할 수 있었고 이는 PCA test와 immunoblot을 통하여 평가된 결과와 일치하였다.

식품알레르기성 평가방법의 특성비교

본 연구에서는 처리 난백의 알레르기성을 조사하기 위해 PCA test, immunoblot, 동물 모델을 이용하였고 이전 연구(11,16,17)에서 토끼와 사람의 항체를 이용한 ELISA로 항원성 및 알레르기성의 분석을 실시한 바 있다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 각각의 평가방법의 특성을 비교하고 고찰한 결과, 본 연구에서 사용된 PCA test는 생체의 알레르기반응을 잘 반영하는 알레르겐의 다가 항원성을 분석하기에 적합한 방법이지만 높은 숙련도가 요구되는 단점이 있었다. 한편, 사람의 IgE형 항체를 이용한 ELISA(16)로 평가한 난백의 알레르기성은 PCA test로 평가한 난백의 알레르기성과 그 상관도가 높았고 ELISA 분석법이 상대적으로 간단하므로 이를 알레르기성 평가에 활용하는 것이 편리하다고 생각되었다. 환자의 IgE 항체를 이용한 immunoblot은 식품 중 주요 알레르겐의 분석이 가능하였으나 처리에 의한 특정식품의 알레르기성 저감화를 정성적으로 분석하기는 어려울 것으로 판단되었다. 마지막으로 동물에게 식품 알레르겐을 경구투여하여 알레르기 반응을 유도하는 동물모델은 까다로운 임상실험을 대체할 수 있는 효과적인 대안의 하나로 활용될 수 있다고 기대한다.

요 약

난백의 알레르겐을 감소시키기 위해서 여러 가지 처리를 실시하고 처리난백의 알레르기성의 변화를 평가하고자 passive cutaneous anaphylaxis(PCA) test, immunoblot, 생쥐모델에 의한 알레르기 유발시험을 실시하였다. PCA test결과 열처리(121°C, 30 min)한 난백은 처리하지 않은 난백에 비하여 그 항원성이 1/8 정도로 감소되었으며, NaOH처리군은 0.3%와 1%에서 각각 1/4, 1/8로 항원성의 감소를 보였다. 특히, NaOH처리 후 열처리(70°C, 15 min)를 추가적으로 복합처리한 난백의 경우, NaOH 0.3%(w/v)에서는 1/8 정도로, NaOH 1%(w/v)에서는 1/32 정도로 강력하게 항원성이 감소되었다. 계란 알레르기 환자의 IgE 항체를 이용하여 immunoblot을 실시한 결과 121°C로 열처리한 시료에서 난백의 주요 단백질 band가 흐려지는 것으로 나타났고 NaOH와 열로 복합처리한 난백의 경우에도 NaOH 0.1%(w/v) 이상에서 band들이 대부분 소실되는 것으로 나타났다. 생쥐모델에 의한 시험을 실시한 결과, 난백으로 유도한 전신알레르기 증상의 평균점수는 1.85이었으나 복합처리한 난백의 경우 그 점수가 0.2로 현격하게 감소되었다. 결론적으로, 상기 3종의 시험에서 공통적으로 가장 효과적인 난백의 알레르기성 저감화 방법은 복합처리(NaOH(1%, w/v) 및 열(70°C, 15 min))임이 확인되었다.

감사의 글

본 연구에서 PCA test를 위하여 충북대 수의과대학 강종구 교수의 도움을, 시료의 방사선 조사를 위하여 한국원자력연구원 정읍 방사선 과학연구소 변명우 박사과 이주은 박사의 도움을 받았으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Mine Y, Zhang JW. Comparison studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *J. Agr. Food Chem.* 50: 2679-2683 (2002)
- Sampson HA. Immunologic mechanisms in adverse reactions to foods. *Immunol. Allergy Clin.* 11: 701-716 (1990)
- Anderson JA. Allergic reactions to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 19-38 (1996)
- Ha WK, Juhn SL, Kim JW, Lee SW, Lee JY, Shon DH. Antigenicity of whey protein hydrolysates against rabbit anti-a-lactalbumin antiserum. *Korean J. Food Sci.* 26: 436-441 (1994)
- Kang JK, Nam CJ, Lee HY, Park HS, You YK, Cho YM, You JK, Lee JS. Studies on antigenicity of urinary trypsin inhibitor(UTI). *Korea J. Lab. Anim. Sci.* 12: 261-267 (1996)
- Knippels LMJ, Penninks A, Smit JJ, Houben GF. Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized brown norway rats: Further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol. Appl. Pharm.* 156: 161-169 (1999)
- Knippels LMJ, Kleij HP, Koppelman SJ, Houben GF, Penninks AH, Felius AA. Comparison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients. *Allergy* 55: 251-258 (2000)
- Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J. Allergy Clin. Immun.* 106: 150-158 (2000)
- Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immun.* 103: 206-214 (1999)
- Hisatomi M, Kimera M, Inukai S, Oshida K, Morikawa A.

- Development of hen's egg with low antigenicity for allergic patients. *Arerugi* 40: 1454-1463 (1991)
11. Ryu JH, Lee JM, Shon DH. Changes in the antigenicity of chicken egg white by the treatments of protease, trifluoromethanesulfonic acid, heat, and NaOH. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 720-725 (2000)
 12. Lee SW, Ha WK, Juhn SL, Kim JW, Shon DH, Lee JY. Antigenicity of whey protein hydrolysates against rabbit anti- β -lactalbumin antiserum. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 532-538 (1994)
 13. Ha WK, Juhn SL, Kim JW, Lee SW, Lee JY, Shon DH. Reduction of the antigenicity of whey protein by enzymatic hydrolysis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 74-80 (1994)
 14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-682 (1970)
 15. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *P. Nat. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354 (1979)
 16. Ryu JH, Park CW, Lee JM, Shon DH. Antigenicity changes of ovomucoid and ovalbumin in chicken egg white by NaOH, heat, and protease treatments. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 147-151 (2004)
 17. Ryu JH, Kim HJ, Ahn GM, Lee SI, Shon DH. Allergenicity of ovomucoid in treated egg white to human IgE antibody from egg allergic patients. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 343-348 (2008)
 18. Ovary Z. Passive cutaneous anaphylaxis. pp. 33.1-33.9 In: ed. *Handbook of experimental Immunology* 4th ed. Weir DM (ed) Blackwell Scientific Publication. Oxford, London, Great Britain.
 19. Koch C, Jensen SS, Ter A, Houen G. A comparison of the immunogenicity of the native and denatured forms of a protein. *Acta Path. Micro. Im. C* 104: 115-125 (1996)