View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Yonsei University Medical Library Open Access Repository

천식 및 알레르기 제 24 권 제 4 호
Vol. 24, No. 4, Dec., 2004

□원 저□

집먼지진드기 기관지유발시험 결과에 따른 특이 IgE 및 IgG 항체 반응의 Immunoblot 분석

인하대학교 의과대학 내과학교실[1], 연세대학교 의과대학 내과학교실 및 알레르기연구소[2]

김철우[1]·김영신[1]·문중식[1]·최수영[2]·홍천수[2]

Immunoblot Analysis of Specific IgE and IgG Responses to Dermatophagoides Farinae according to Allergen Bronchial Challenge Test

Cheol-Woo Kim[1], Young-Sin Kim[1], Jung-Sik Moon[1], Soo-Young Choi[2] and Chein-Soo Hong[2]

[1]Department of Internal Medicine, Inha University College of Medicine, Incheon, [2]Department of Internal Medicine and Institute of Allergy, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: House dust mite (HDM) elicit not only specific-IgE (sIgE) but also IgG (sIgG) responses, but the exact role of sIgG has not been clearly clarified. There has been no published report on antigenic components of HDM directly associated with the asthmatic reaction following HDM exposure in patients with HDM-sensitive bronchial asthma.
Objective: This study was performed to evaluate the role of antibody response to HDM and to confirm the asthma related-antigenic components of HDM in patients with HDM-sensitive asthma.
Method: A total of 49 patients with HDM-sensitive asthma were enrolled. We preformed *D. farinae*-bronchial challenge test, and analyzed sIgE, sIgG, sIgG1 and sIgG4 response to *D. farinae* by immunoblotting according to the results of challenge test.
Result: Twenty-six patients (53.1%) showed positive asthmatic reaction after exposure to *D. farinae* extracts, but 23 (46.9%) showed no significant response. For statistical convenience, we chose 8 specific IgE binding bands with molecular weight of 65, 34, 30, 28, 19, 15, 13 and 12.5 kDa and compared antibody binding rate to each components. Positive sIgE binding reactions to 34, 15 and 13 kDa were significantly higher in challenge positive group than in negative group. Positive sIgG reactions to 15, 13 and 12.5 kDa and sIgG1 binding to 15 and 13 kDa were significantly higher in challenge positive group. However, positive sIgG4 responses to 30 and 19 kDa were significantly higher in challenge negative group.
Conculsion: These results suggest that low molecular weight proteins of *D. farinae* such as 34, 15 and 13 kDa are important antigens associated with IgE-mediated asthmatic reaction, but sIgG4 response to certain allergenic components (30 and 19 kDa) might have a role in prevention of asthmatic reaction after allergen exposure. **(Korean J Asthma, Allergy Clin Immunol 2004;24:394-402)**

Key words: House dust mite, Allergen, Bronchial asthma, Specific IgE and IgG, Immunoblot

서 론

알레르겐은 민감한 환자에서 특이 IgE 반응을 일으킬 뿐만 아니라, 단순히 감작만 된 사람 또는 감작되지 않은 일반인에서도 특이 IgG, IgG1 또는 IgG4 반응을 일으킨다.[1-4] 이러한 특이 IgG 항체 반응은 환자에서 건강한 일반인보다 높게 나타나나, 알레르기 질환에서 IgG 및 IgG 아형 항체의 역할은 명확히 규명되어 있지 않다.[1,2] 순수 분리한 집먼지진드기 알레르겐을 이용한 최근의 연구에 의하면 특이 IgG 반응은 일반인 및 감작만 된 무증상 대조군에 비하여 집먼지진드기에 민감한 알레르기 환자에서 양적으로도 많고 면역반응의 특이성도 달라, 환자와 대조군 사이에 항체가 결합하는 항원결정기가 다른 것으로 추정되고 있다.[3] IgG 반응의 이러한 차이는 집먼지진드기뿐만 아니라 꽃가루 알레르기 모델에서도 동일한 소견을 보이며,[4] 이러한 결과는 알레르겐에 대한 IgG 반응은 환자와 대조군 사이에 양적인 반응뿐만 아니라 질적인 반응에서도 차이가 있음을 시사하고 있다. 그러나 이러한 연구는 주로 ELISA 또는 ELISA 억제실험을 이용하여 항체 값을 비교한 것으로 개별 알레르겐 성분에 대한 특이 IgE 및 IgG 반응의 분석은 없으며, 환자와

본 연구는 한국엠에스디주식회사의 연구비 보조로 이루어졌음.
책임저자 : 홍천수, 서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 내과학교실, 우: 120-752
Tel: 02-361-5410, Fax: 02-393-6884
E-mail: cshong@yumc.yonsei.ac.kr
접수: 2004년 7월 19일, 통과: 2004년 11월 8일

대조군 사이의 차이를 주로 조사한 것이 대부분으로 개별 환자에서 천식 반응과 관련된 비교분석은 없는 상태이다. 집먼지진드기 알레르기에 의한 천식환자에서 천식 반응을 유발 또는 억제시키는 항원 성분이 존재한다면 그 분획을 찾아내고 특성을 규명하는 것은 알레르기 면역조절과 관련된 치료전략을 세우는 데 있어서 기본적인 자료를 제공하는 중요한 연구분야라고 할 수 있다.

이에 본 연구에서는 집먼지진드기 알레르겐 중에 천식 반응과 관련이 많은 알레르겐 분획을 알아보고자 하였다. 즉 집먼지진드기 항원 흡입 기관지유발시험에 양성 반응을 보이는 환자와 음성 반응을 보이는 환자 사이에 집먼지진드기 알레르겐에 대한 특이 IgE, IgG, IgG1 및 IgG4 항체의 결합양상에 차이가 있는지를 분석하여 기관지천식의 병인에서 이러한 면역반응의 역할을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

2000년 1월부터 2002년 10월까지 연세의대 세브란스병원 및 인하대병원에 내원하여 기관지천식으로 진단된 환자 중 병력에서 집먼지진드기 알레르기에 의한 천식이 의심되면서, 알레르기 피부단자시험에서 두 종(*Dermatophagoides farinae* 및 *Dermatophagoides pteronyssinus*)의 집먼지진드기에 양성반응을 보이고, 집먼지진드기에 대한 특이 IgE 검사(CAP system)에서 class 2 이상의 반응을 보인 환자 중 면역치료를 받은 병력이 없는 환자를 대상으로 하였다. 기관지천식의 진단은 기침, 호흡곤란, 천명음과 같은 호흡기 증상을 호소하면서 기관지 확장제 흡입 후 1초간 강제호기량(FEV_1)이 12% 이상 증가하는 기도폐쇄의 가역성이 있거나 메타콜린 기관지유발시험에서 기관지 과민성이 있는 경우(PC20≤25 mg/ml)로 하였다. 음성 대조 혈청은 피부단자시험에서 집먼지진드기에 음성반응을 보이는 건강한 일반인 10명의 혈청을 모아서 사용하였다.

2. 집먼지진드기 조항원 제조

조항원 제조를 위해서 건조된 *D. farinae*를 ethylether로 탈지방화 시킨 후 4°C에서 1 : 50 w/v phosphate buffered saline (PBS)으로 72시간 추출하였다. 이를 1시간 동안 10,000×g로 원심 분리하여 상층액을 모은 후 삼투막에 넣어 72시간 동안 4°C에서 PBS로 투석하였다. 투석 후 추출액을 다시 4°C에서 10,000×g로 1시간 동안 원심 분리하고 그 상층액을 조항원으로 사용하여 일부는 동결 건조하여 조항원 분말을 만든 후 -20°C에서 냉동보관 후 특이 항체 측정 및 immunoblotting에 사용하였다. 집먼지진드기 기관지유발시험에 사용할 시약은 같은 방법으로 phenolized-saline 용액에서 추출하여 동결건조 후 사용하였다.

3. 알레르기 피부단자시험

알레르기 피부단자시험은 집먼지진드기 항원을 포함한 흔한 흡입성 항원 55종을 이용하여 환자의 등에 시행하였다. 양성 대조액으로 히스타민(1 mg/ml)을, 음성 대조액으로 생리 식염수를 사용하였으며, 검사시작 15분 뒤에 팽진과 발적의 크기를 측정하였다. 히스타민의 팽진과 비교하여 항원의 반응정도를 알레르겐/히스타민 팽진 비를 구한 후 Scandinavian 알레르기 학회의 기준에 따라 판독하였으며, 2+ 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

4. 혈청 IgE 및 비특이적 기관지과민성 측정

UniCAP System을 이용하여 혈청 총 IgE를 측정하였고, 기관지과민성은 메타콜린 기관지유발시험을 시행하여 측정하였다. 즉 methacholine chloride를 0.075 mg/ml부터 25 mg/ml까지 9단계의 농도로 나누어 각각 5회씩 노력성 폐활량(Forced vital capacity, FVC)까지 깊이 들여마시고 3분 후 시행한 폐기능 검사상 FEV_1이 기저치보다 20% 감소하는 메타콜린의 농도(PC_{20})를 계산하였다.

5. 집먼지진드기 항원 흡입 기관지유발시험

집먼지진드기에 양성 반응을 보이는 환자 중 폐기능 검사 상 기저치 FEV_1이 예측치의 75% 이상을 유지하고 본 연구의 목적에 동의한 환자를 대상으로 집먼지진드기 항원 흡입 기관지유발시험을 시행하였다. 흡입 유발시험은 *D. farinae* 추출액으로 이전에 보고된 방법[5]을 일부 변형하여 시행하였다. 즉, 제조한 집먼지진드기 조항원 1 : 10,000 w/v 희석액을 일호흡용적(tidal volume)으로 2분간 흡입하고 10분 후 폐기능 검사를 시행하였다. FEV_1의 감소가 없는 경우 다시 1 : 2,500 w/v 희석액을 흡입하여 10분, 20분, 30분, 1시간, 4시간, 5시간, 6시 및 7시간 후에 폐기능 검사를 시행하였다. 항원 기관지유발시험은 FEV_1이 기저치에 비하여 20% 이상 감소하는 경우 양성반응으로 평가하였다.

6. 집먼지진드기에 대한 특이 IgE, IgG 및 IgG 아형 항체 측정

혈청 내 *D. farinae*에 대한 특이 IgE, IgG, IgG1 및 IgG4 항체는 이전에 보고한 방법[6]을 일부 변형한 ELISA법으로 측정하였다. 제조한 집먼지진드기 조항원을 carbonate 용액(pH 9.6)에 적당한 농도로 희석한 다음 이를 96 well microtiter plate (Costar, Cambridge, MA, USA)의 well에 넣어 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. Tween phosphate buffered saline (PBS-

T)으로 3회 세척 후 0.1% bovine serum albumin (BSA)-PBS 200 ㎕를 well에 넣어 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 단백질 결합을 차단하였다. 3회 세척 후 환자 또는 대조군의 혈청을 항체의 형태(IgE 희석안함, IgG 1 : 100 희석, IgG1 1 : 20 희석, IgG4 1 : 2 희석)에 따라 희석하여 50㎕씩 넣어 실온에서 1시간 반응시키고 PBS-T로 세척 후 희석된 biotinylated anti-human IgE (Vector), IgG, IgG1 또는 IgG4 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 항체 50㎕를 실온에서 1시간 반응시켰다. 세척 후 희석된 streptavidin-peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50㎕를 30분간 반응시켰으며, ABTS 용액 (2,2-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfuric acid를 citrate phosphate buffer에 녹임)으로 발색시킨 후, 2 mM NaN_3 100㎕로 반응을 중단시킨 다음 405 nm 자외선에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군으로 피부단자시험에서 모든 항원에 음성 반응을 보인 10명의 혈청을 사용하였다.

7. 집먼지진드기에 대한 특이 IgE, IgG, IgG1 및 IgG4 immunoblotting

D. farinae 조항원을 loading buffer (60 mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 녹이고 끓는 물에 5분간 반응시킨 후, 5% stacking gel 및 13.5% SDS-polyacrylamide gel에서 각각 50 V 및 100 V 전압으로 전기영동 (Small mighty, Hoeffer, San Francisco, CA, USA)을 실시하였다. Gel을 25 V로 60분간 nitrocellulose membrane (NC; pore size 0.45㎛, Amersham, Buckinghamshir, UK)에 전이시키고 4 mm 간격으로 절단한 후, 3% skim milk-TBS-T (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) 용액으로 반응시켜 비특이적 단백질 결합을 차단하였다. 집먼지진드기 특이 IgE, IgG, IgG1 및 IgG4 blotting을 위해서 적당량 희석한 환자 혈청으로 상온에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 alkaline phosphatase가 결합된 goat anti-human IgE, IgG, IgG1 및 IgG4 (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1 : 1,000 희석 후 상온에서 2시간 반응시켰다. PBS-T로 10분간 3회, TBS로 10분간 1회 세척 후 nitroblue tetrazolium/bromo-chloro-indolyl phosphate (NBT/BCIP; Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 발색시켰다.

8. 통계분석

유발시험 양성군 및 음성군 사이의 비교는 t-검정 및 Mann-Whitney U 검정을 이용하였다. 유발시험 결과에 따른 immunoblotting에서의 결합 양상의 비교는 카이 제곱 검정을 이용하였다. 통계는 SPSS 10.0 프로그램을 이용하였으며, *P*값이 0.05 이하인 경우 의미 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. 대상 환자

2000년 1월부터 2002년 10월까지 기관지천식으로 진단된 환자 중 환자 선정기준에 부합하면서 본 연구의 목적에 동의한 57명을 대상으로 집먼지진드기 항원 흡입 기관지유발시험을 시행하였다. 항원 흡입 기관지유발시험을 시행한 57명 중 49명의 환자에서 임상자료 및 혈청 확보가 가능하여 이후의 분석과정에 포함하였다. 49명 중 남자는 34명(69.4%), 여자 15명(30.6%)이었으며, 평균연령은 29.9±8.7세(최저 21세, 최고 49세)였다.

2. 집먼지진드기 항원 흡입 기관지유발시험 결과에 따른 대상 환자의 특성

집먼지진드기 항원 흡입 기관지유발시험에서 26명(53.1%)의 환자가 양성반응을 보였고, 23명(46.9%)에서 음성반응을 보였다. 양성반응을 보인 26명 중 13명(50.0%)은 조기 천식반응을, 4명(15.4%)은 후기 천식반응을 그리고 9명(34.6%)은 이중 천식반응을 보였다. 집먼지진드기 흡입 유발시험 양성군과 음성군 사이에 성별, 연령, 키, 몸무게, 혈청 IgE, FVC, FEV_1 또는 기관지과민성의 의미 있는 차이는 없었다(Table 1).

3. 집먼지진드기-특이 IgE, IgG 및 IgG 아형 항체 측정

ELISA 법으로 *D. farinae*에 대한 혈청 특이 IgE, IgG, IgG1 및 IgG4 항체를 측정한 결과, 특이 IgE는 유발시험 양성군

Table 1. Characteristics of subjects according to the results of *D. farinae* inhalation bronchial challenge test

	Bronchial challenge test		*P* value
	Positive (n=26)	Negative (n=23)	
Sex (M/F)	18 / 8	16 / 7	NS
Age	27.9±1.6	32.3±1.9	NS
Height (cm)	169.7±1.9	170.1±1.6	NS
Weight (kg)	65.2±9.7	67.3±9.7	NS
Serum IgE (IU/ml)*	439.6±1.2	279.4±1.4	NS
Eosinophil count (/mm^3)	426.0±49.6	676.2±154.7	NS
FVC (L)	3.91±0.16	4.00±0.17	NS
FEV_1 (L)	3.07±0.13	3.18±0.13	NS
FEV_1/VC	78.9±1.4	79.9±1.5	NS
Methacholine PC_{20} (mg/ml)*	0.45±1.35	0.64±1.35	NS

NS = not significant; All values except sex, serum IgE and PC_{20} are described as mean±SEM; Serum IgE and PC_{20} are described as geometric mean±geometric SEM.

및 음성군 모두 대조군에 비하여 의미 있게 높았으나 두 군 간에 차이는 없었다. *D. farinae*-특이 IgG4는 유발시험 양성군에서 대조군에 비하여 의미있게 높았으나 음성군과 대조군 사이에 차이는 없었다(Fig. 1). 반면 대조군과 환자군 사이에 특이 IgG 및 IgG1의 의미 있는 차이는 없었다.

3. 집먼지진드기 개별항원에 대한 특이 IgE, IgG, IgG1 및 IgG4 immunoblotting

집먼지진드기에 민감한 기관지천식 환자에서 개별 항원에 대한 감작 상태에 따라 집먼지진드기에 노출되었을 때 나타나는 반응에 차이가 있는지 알아보고자 *D. farinae*에 대한 immunoblotting을 시행하였다. Immunoblotting 후 개별 성분에 대한 결합 양상을 쉽게 비교하기 위하여 편의상 blotting에서 쉽게 결합 여부를 확인할 수 있으면서 중요한 결합 양상을 보인 8개의 항원 성분을 선택하였다. 즉 분자량 65, 34, 30, 28, 19, 15, 13 및 12.5 kDa 부위를 선택하였으며, 모든 blotting 결과에서 이들 성분에 대하여 개별 항체의 특이적인 결합이 있는지를 확인하였다(Fig 2).

모든 환자를 대상으로 선택된 8개의 항원 성분별 결합 양상을 살펴보면 특이 IgE 항체 결합은 Der f 2로 추정되는 부위인 15 kDa에서 79.6%의 결합을 보여 가장 많은 IgE 결합 양상을 보이는 중요한 알레르겐임을 확인할 수 있었으며, 그 외 13 kDa 부위 65.3%, 12.5 kDa 38.8%, 34 kDa 38.8%, 28 kDa 36.7%에서 특이적인 결합을 보이는 등 주로 40 kDa 이하의 저분자량 항원 성분에 많은 양성반응을 보였다 (Table 2). 이에 비하여 특이 IgG 결합은 65 kDa 87.8%로 많은 결합 양성을 보였으나, 그 외 28 kDa 75.5%, 34 kDa 69.4%, 15 kDa 67.3% 등과 같이 고분자량을 포함한 여러 항원성분에서 다양한 결합 양상을 보였다. 특이 IgG1 항체는 15 kDa 부위에서만 53.1%의 결합을 보였으며 그 외의 성분에서는 50% 이하의 낮은 양성률을 보였으며, 특히 30, 19 및 12.5 kDa에서는 매우 낮은 결합 양상을 보였다. 특이 IgG4 항체는 15 kDa에서 91.8%로 가장 높은 결합을 보여 15 kDa 부위가 특이 IgG4 항체에 가장 중요한 항원 성분임이 확인되었

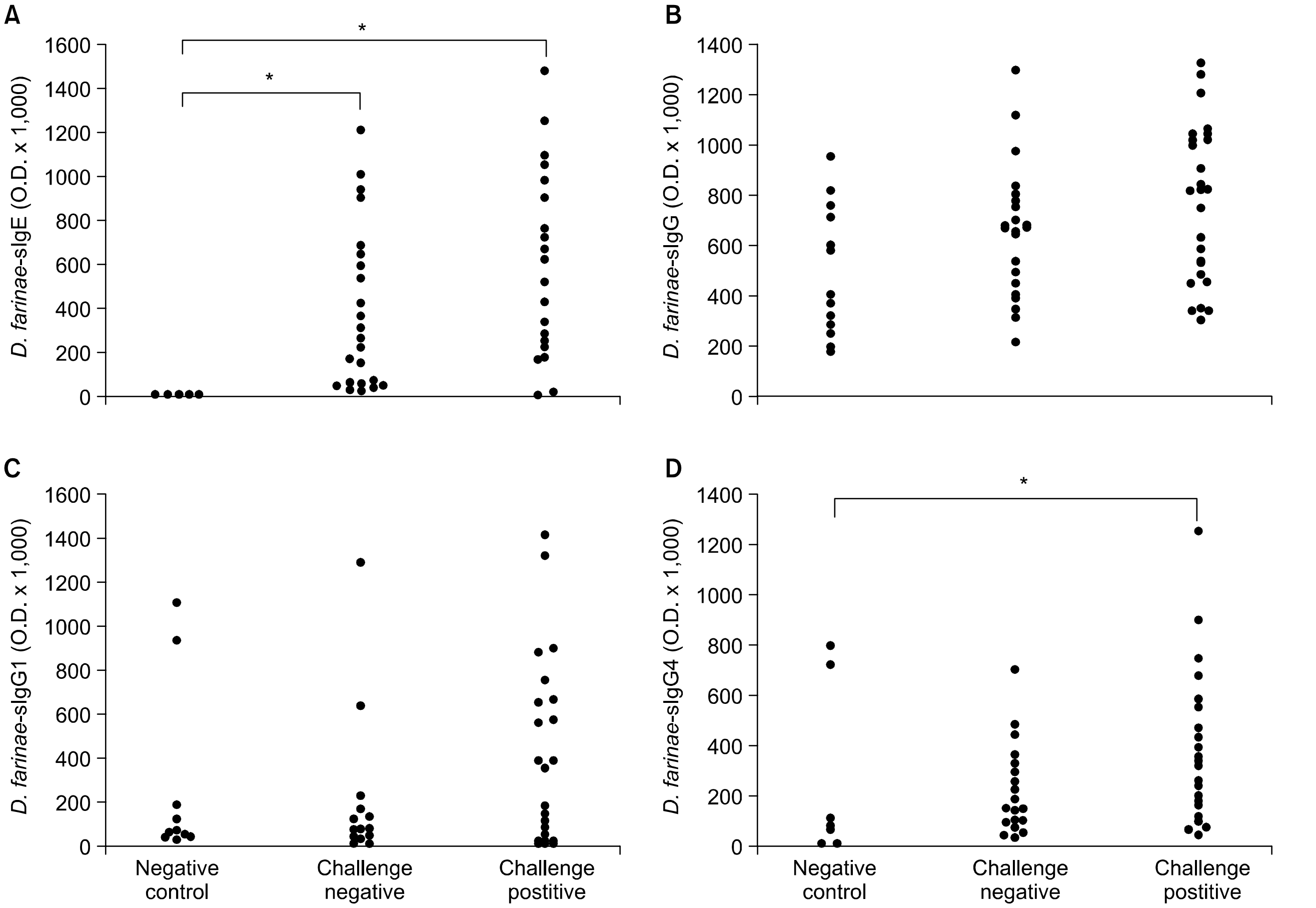

Fig. 1. Level of *D. farinae*-specific IgE (A), IgG (B), IgG1 (C) and IgG4 (D) antibodies according to the results of *D. farinae*-inhalation bronchial challenge test. Asterisk indicates *P* value is less than 0.05.

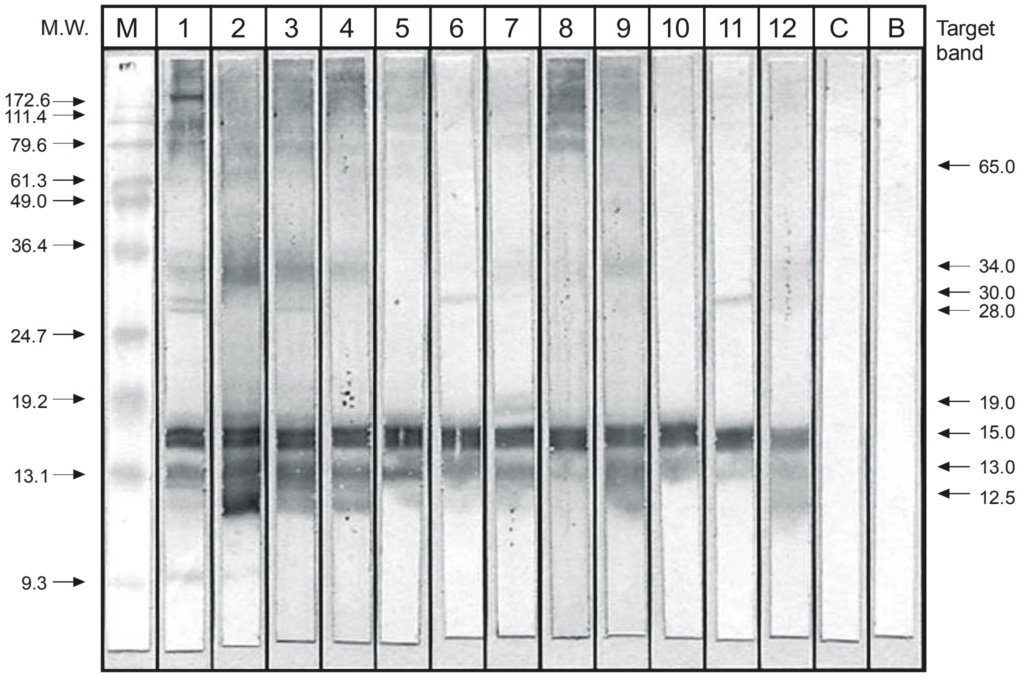

Fig. 2. Example of IgE-immunoblotting to *D. farinae.* Eight important allergenic components (target band in right side) were selected, and binding patterns of specific antibodies to these components were analysed. M = marker; C = negative control; B = buffer control.

Table 2. Percent of positive binding of *D. farinae*-specific antibody to each antigenic component in all enrolled subjects (%)

Allergen (M.W. kDa)	IgE	IgG	IgG1	IgG4
65	40.8	87.8	16.3	8.2
34	38.8	69.4	10.2	24.5
30	16.3	65.3	6.1	46.9
28	36.7	75.5	10.2	36.7
19	6.1	38.8	4.1	8.2
15	79.6	67.3	53.1	91.8
13	65.3	36.7	34.7	20.4
12.5	38.8	16.3	0	28.6

M.W. = molecular weight.

으며, 그 외 특이 IgE 항체와 유사하게 저분자량 항원 성분에 비교적 높은 결합률을 보였다(Table 2).

4. 집먼지진드기 흡입 유발시험 결과에 따른 immunoblotting에서의 특이 항체 결합 양상의 비교

유발시험 양성 및 음성에 따라 개별 항원성분에 대한 결합 양상을 비교해 보았다. 특이 IgE 항체의 결합은 먼저 15 kDa 부위에서 유발시험 양성군에서 96.2%의 결합을 보여 음성군의 60.9%에 비하여 통계적으로 높은 결합률을 보였으며, 13 kDa부위에서도 양성군 88.5%, 음성군 39.1%로 양성군에서 유의하게 높았다. 또한 34 kDa 부위에서도 61.5% 대 13.0%로 양성군에서 의미 있게 높았으나, 그 외의 항원성분에 대한 결합은 양성군과 음성군에 차이가 없어 34, 15 및 13 kDa 부위가 항원 노출 후 천식반응을 보이는 데 있어서 중요한 IgE 면역반응을 일으키는 알레르겐 성분으로 추정되었다(Table 3).

특이 IgG 항체의 결합 양상을 살펴보면 특이 IgE와 마찬가지로 15 kDa 부위에서 양성군에서 88.5%의 결합을 보여 음성군의 43.5%에 비하여 유의하게 높은 결합양상을 보였으며, 12.5 kDa 부위에서 양성군 26.9%, 음성군 4.3%로 양성군에서 통계적으로 높은 결합 양상을 보였다(Table 3). 그러나 그 외의 항원 성분의 결합에 대한 유발시험 양성군과 음성군 간의 차이는 관찰되지 않았다.

특이 IgG1 항체의 결합은 15 kDa 부위에서 양성군 73.1%로 음성군의 30.4%에 비하여 유의하게 높은 결합양상을 보였으며, 13 kDa 부위에서는 양성군 57.7%, 음성군 8.7%에서 결합하였으며 28 kDa 부위에서는 양성군 19.2%, 음성군 0%의 결합으로 양성군에서 음성군에 비하여 통계적으로 높은 결합을 보였다(Table 4).

특이 IgG4 항체의 결합은 15 kDa 부위에서는 양성군 88.5%, 음성군 95.7%로 두 군 모두에서 높은 결합 양상을 보여 차이가 없었다. 그러나 30 kDa 부위에서 양성군 30.8%, 음성군 65.2%로 음성군에서 유의하게 높은 결합양상을 보

Table 3. Comparison of *D. farinae*-specific IgE and IgG binding to each antigenic component according to the results of *D. farinae*-bronchial challenge test

Allergen (M.W)	Specific IgE binding (%)			Specific IgG binding (%)		
	Challenge (+)	Challenge (-)	*P* value	Challenge (+)	Challenge (-)	*P* value
65	30.8	52.2	NS	92.3	82.6	NS
34	61.5	13.0	<0.05	61.5	78.3	NS
30	23.1	8.7	NS	73.1	56.5	NS
28	42.3	30.4	NS	73.1	78.3	NS
19	3.8	8.7	NS	34.6	43.5	NS
15	96.2	60.9	<0.05	88.5	43.5	<0.05
13	88.5	39.1	<0.05	61.5	8.7	<0.05
12.5	46.2	30.4	NS	26.9	4.3	<0.05

Table 4. Comparison of *D. farinae*-specific IgG1 and IgG4 binding to each antigenic component according to the results of *D. farinae*-bronchial challenge test

Allergen (M.W)	Specific IgG1 binding (%)			Specific IgG4 binding (%)		
	Challenge (+)	Challenge (-)	*P* value	Challenge (+)	Challenge (-)	*P* value
65	19.2	13.0	NS	7.7	8.7	NS
34	11.5	8.7	NS	30.8	17.4	NS
30	3.8	8.7	NS	30.8	65.2	<0.05
28	19.2	0	<0.05	34.6	39.1	NS
19	7.7	0	NS	0	17.4	<0.05
15	73.1	30.4	<0.05	88.5	95.7	NS
13	57.7	8.7	<0.05	30.8	8.7	<0.05
12.5	0	0	NS	34.6	21.7	NS

였으며, 19 kDa 부위에서도 양성군은 결합하지 않았으나 음성군에서는 17.4%에서 반응하여 음성군에서 통계적으로 높은 결합을 보였다(Table 4).

결 과

집먼지진드기는 현재 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 가장 중요한 흡입성 알레르겐으로 천식을 일으키는 매우 중요한 원인 중의 하나이다. 집먼지진드기 알레르겐에 대한 연구결과, 집먼지진드기에는 30～50개의 항원 성분이 있음이 밝혀졌고 알레르기 피부반응시험에서 강양성을 보인 환자의 혈청과 항원을 반응시킨 결과, 환자의 IgE와 결합하는 알레르겐 성분이 확인되었다.[7-12] 집먼지진드기에 강한 피부반응을 보이는 천식환자를 대상으로 집먼지진드기 항원 흡입 기관지유발시험을 시행하면 조기반응, 후기반응 또는 이중반응 등을 보인다.[5] 그러나 피부시험에 양성반응을 보이고 혈중 특이 IgE 항체를 가지고 있지만 유발시험에서 천식반응이 나타나지 않는 환자도 있다. 항원 흡입 기관지유발시험에서 나타나는 이러한 기관지 수축반응은 환자의 기관지과민성, 총 IgE, 특이 IgE 및 비반세포 유리능 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다.[13]

기관지천식과 집먼지진드기에 대한 특이 IgE에 관한 연구는 널리 보고된 반면에 특이 IgG 및 IgG 아형에 대한 연구는 별로 없는 상태이다. 초기의 연구에 의하면 집먼지진드기 특이 IgG4 항체가 면역치료 후에 증가되며 특이 IgE와 길항작용을 하여 알레르기 반응을 억제하는 기능이 있어 차단항체로 작용할 수 있는 것으로 알려졌다.[14,15] 그러나 면역요법의 효과가 없는 환자에서도 특이 IgG4가 증가하고 직업성 천식에서는 직업성 물질에 대한 IgG 항체가 직업성 물질에 대해 노출된 정도를 나타내는 지표로 알려져 있다.[16] 또한 집먼지진드기에 대한 특이 IgG 항체는 특이 IgE 양성인 아토피성 천식환자뿐만 아니라 비아토피성 천식이

나 정상 대조군에서도 검출된다.[17] 그러나 최근 연구에서 이러한 특이 IgG 및 IgG 아형 항체 반응은 환자와 대조군 사이에 서로 다른 항원결정기를 보이는 등 다양한 반응양상을 나타내는 것으로 보고하고 있다.[3,4] 환자와 대조군 사이에 나타나는 특이항체 반응의 이러한 다양성은 환자 사이에서도 나타날 수 있으며 IgG4가 차단항체로 작용할 수 있다는 점을 생각하면 일부 환자에서는 항원에 대한 IgG4 반응으로 비록 알레르겐에 감작은 되어 있어도 항원 노출 후 천식반응이 나타나지 않을 수도 있다고 가정할 수 있다. 이러한 가정하에 집먼지진드기에 민감한 기관지천식 환자에서 천식반응을 일으키는 알레르겐 분획을 찾아내고, 현재까지 그 기능이 밝혀져 있지 않은 IgG 및 IgG 아형 항체에 대한 반응을 확인하여 알레르기 천식반응에서 IgG 항체의 기능을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

Immunoblotting에서 나타난 특이 IgE 항체의 결합을 살펴보면 15 kDa 항원 성분에서 79.6%의 결합을 보여 가장 많이 IgE 결합양상을 보이는 중요한 알레르겐 성분임이 확인되었다. 그 외 13, 12.5 및 28 kDa과 같이 분자량이 비교적 적은 항원 성분에 높은 결합 양상을 보여 집먼지진드기에 대한 IgE 반응에서 저분자량 항원이 중요하게 작용함이 관찰되었다. Ford 등[18]이 보고한 *D. pteronyssinus* 충체에 대한 immunoblotting 결과에 따르면 32개 단백분획이 환자 IgE와 결합하는 것을 보고하였다. 이 중 9개의 단백 분획, 즉 95, 56, 32, 30, 26, 25, 16 및 15 kDa가 중요한 알레르겐이라 하였고, 이 중에 50% 이상의 환자와 반응을 보인 것은 32, 30, 26, 16 및 15 kDa 등 5개이며, 그 중에서 15 kDa, 즉 Der p 2 가 88%의 환자 혈청과 반응하여 가장 중요한 알레르겐이라고 하였다. 본 연구에서 가장 높은 IgE 결합 양상을 보인 15 kDa 항원은 *D. farinae*의 group 2 주알레르겐인 Der f 2로 추정되는 부위이며, group 1 주알레르겐인 24 kDa 부위의 Der f 1 알레르겐은 열에 약하여 immunoblotting 실험 중에 필요한 가열과정에서 단백성분의 변형이 나타나 blotting에서는 확인되지 않았다.

호흡기 알레르기 질환에서 항원 특이 IgG1 항체의 역할은 명확히 밝혀져 있지 않다. 흡입 항원에 노출되었을 때 Th1 또는 Th2 면역반응이 모두 나타날 수 있으며 어떤 반응이 나타나는지에 따라 IgG 아형 항체의 생산이 조절된다. 즉 IgG4 항체는 Th2-의존형 반응에서 주로 나타나는 반면, IgG1 및 IgG3는 보체를 활성화하며 IgG2는 탄수화물 항원과 주로 결합하는 항체로 Th1 반응과 밀접한 관계가 있다.[19] 유아 및 소아를 대상으로 시행한 연구를 보면 집먼지진드기에 대한 IgG 반응은 생후 12개월까지는 IgG1 반응만 관찰되며 IgG4 반응은 18개월이 되어야 나타난다.[20,21] 자작나무 알레르겐을 이용한 연구에서는 이러한 항체반응을 더 구체적으로 확인할 수 있다. 즉 비아토피 환아뿐만 아니라 아토피 환아에서도 자작나무 항원에 대한 IgG1 반응은 18개월에서부터 8세에 이르기까지 감소하나 IgG4 항체는 비아토피 환아에서만 감소한다.[22] 한편 성인에서의 IgG 아형 항체는 주로 IgG1 및 IgG4 반응으로 나타나며 IgG2 및 IgG3 반응은 강력한 면역보강제에 의한 자극이 있어야만 나타난다.[19] 이러한 이유로 본 연구에서는 IgG2 및 IgG3 항체는 제외하고 IgG1 및 IgG4 항체만 측정하였다. 그 결과 IgG1 항체 반응이 일부 환자에서 측정되었으나 IgE 및 IgG4 반응에 비하여 ELISA에서 측정한 특이 항체치의 정도가 적었으며, immunoblotting으로 측정한 항원에 대한 결합의 빈도가 상대적으로 낮은 양상을 보였다. 또한 음성 대조군과도 IgG1치의 차이가 나타나지 않아 기관지천식에서 IgG1 항체의 중요성은 본 연구에서는 크게 나타나지 않았다. 재조합 항원을 이용한 최근의 연구에 의하면 항원 특이 IgE 및 IgG4 항체는 아토피 환자에서만 측정되고 디설피드결합(disulfide bond)을 없애 구조를 변형시킨 항원에는 반응하지 않으나, IgG1 항체는 아토피 여부에 관계없이 측정되며 구조를 변형시킨 항원에도 반응을 하여, IgE 및 IgG4는 3차원 구조의 항원결정기에 반응을 하는 중요한 역할을 하는 반면 IgG1은 항원결정기 이외의 다른 구조에 반응을 하는 항체로 보고하고 있다.[23] 따라서 기존에 이루어진 연구 및 본 연구 결과를 살펴보면 집먼지진드기 항원에 대한 IgG1 항체는 호흡기 알레르기 질환의 발병에 직접적인 관여를 하지 않는 것으로 판단되나, 정확한 역할을 확인하기 위해서는 추후 보다 많은 연구가 필요할 것이다.

유발시험 양성 및 음성에 따른 특이 IgE 항체의 결합양상을 비교해 보면, Der f 2로 추정되는 부위인 15 kDa 부위에서 유발시험 양성군에서는 96.2%의 결합을 보인 반면, 음성군에서는 60.9%의 결합률을 보여 이 부위가 천식반응을 일으키는 데 중요한 항원 성분으로 추정되었다. 또한 13 kDa 부위에서도 양성군 88.5%, 음성군 39.1%로 양성군에서 유의하게 높았으며 34 kDa 부위에서도 61.5% 대 13.0%로 양성군에서 의미 있게 높았으나, 그 외의 항원성분에 대한 결합은 두 군 간에 차이가 없어 34, 15 및 13 kDa 부위가 반응을 보이는 데 중요한 항원성분으로 추정되었다.

IgG4 immunoblotting을 시행하여 유발시험에서 나타난 양상에 따른 특이항체 결합 분획의 차이를 확인한 결과, 천식 유발시험 음성군에서 특이 IgG4는 19 kDa 성분에서 양성군은 결합하지 않았으나 음성군에서는 17.4%에서 반응하였고, 30 kDa 부위에서는 양성군 30.8%, 음성군 65.2%로 음성군에서 유의하게 많이 반응함을 알 수 있었다. 즉 19 및 30 kDa 부위에 대한 특이 IgG4가 기관지유발시험 음성군에서 현저하게 높은 사실에서 *D. farinae*-특이 IgG4가 천식반응을

억제하는 역할을 수행할 수 있다고 추정할 수 있다. 그러나 이는 immunoblotting에서 나타난 결합 양상의 차이만 가지고 추정한 것으로 개별 성분에 대한 기능적인 역할을 연구한 것은 아니다. 또한 ELISA로 측정한 *D. farinae*에 대한 특이 IgE는 유발시험 양성군 및 음성군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았으나 양성군에서 음성군에 비하여 보다 높은 경향을 보였으며, 특이 IgG4도 양성군에서 높은 경향을 보였다. Immunoblotting에서 보이는 결합양상의 차이는 단지 이러한 항체 값의 차이를 반영한 현상일 가능성도 배제할 수 없다. 즉 양성군에는 여러 성분의 항원에 반응하는 특이 IgE가 많아 다양한 결합양상을 보였을 수 있다. 그러나 19 및 30 kDa 부위에 대한 특이 IgG4 반응은 음성군에서 높게 나와 단순한 항체 값으로는 이런 현상을 설명할 수 없는 상태이다. 따라서 추후 30 및 19 kDa 알레르겐의 순수분리 및 유전자재조합 알레르겐을 제조하여 각각의 단백 항원과 특이 항체의 반응을 살펴보고, 또한 직접 이런 성분을 이용한 유발시험을 시행하여 그 결과를 살펴보는 알레르겐의 기능에 대한 연구를 진행하여야 보다 정확히 판단할 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

집먼지진드기에 노출되었을 때 천식반응이 나타나는 데는 Der f 2를 비롯한 저분자량의 항원 분획이 중요하며, 30 및 19 kDa에 대한 특이 IgG4 반응이 항원 노출 후 나타나는 천식반응을 억제하는 차단항체로서의 기능을 가질 수 있을 것으로 추정된다. 향후 30 및 19 kDa 알레르겐, 그리고 group 1 및 group 2 주 알레르겐을 비롯한 저분자량 항원의 순수분리 및 이를 이용한 유발시험 등을 통한 추가적인 연구를 통해 기관지천식과 집먼지진드기 항원과의 관련성을 명확하게 규명할 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

1) Kemeny DM, Urbanek R, Ewan P, McHugh S, Richards D, Patel S, et al. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. Clin Exp Allergy 1989;19:545-9
2) Olsen E, Fallang A, Mohapatra SS. Comparison of IgE and IgG antibody responses of atopic individuals with sensitization to tree and grass pollens. Allergy 1995;50:734-40
3) Duchateau J, Michils A, Michel O, Baras L. Mite allergy is associated with a specific profile of IgG epitopes recognized on antigen p I of *Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin Exp Allergy 1997;27:296-305
4) 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;29:832-39
5) Lee WK, Kim CW, Yoon YS, Park JW, Hong CS. Reaction patterns on the bronchial challenge in the adult bronchial asthmatics. Korean J Allergy 1996;16:325-34
6) Hong CS, Park JW, Nahm DH. Measurement of IgE and IgG subclass antibodies to whole body antigen and two major allergens (Der fI & Der fII) of *Dermatophagoides farinae* in normal subjects and asthmatics. Yonsei Med J 1994;35:453-63
7) Krilis S, Baldo BA, Basten A. Antigen and allergens from the common house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. Part II. Identification of the major IgE-binding antigens by crossed radioimmunoelectrophoresis. J Allergy Clin Immunol 1984;74: 142-6
8) Arlian LG, Bernstein IL, Geis DP, Vyszenski-Moher DL, Gallagher JS, Martin B. Investigations of culture medium-free house dust mites. III. Antigens and allergens of body and fecal extract of *Dermatophagoides farinae*. J Allergy Clin Immunol 1987;79:457-66
9) Arlian LG, Bernstein IL, Vyszenski-Moher DL, Gallagher JS. Investigations of culture medium-free house dust mites. Ⅳ. Cross antigenicity and allergenicity between the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus*. J Allergy Clin Immunol 1987;79:467-76
10) Sutton R, Wrigley CW, Baldo BA. Detection of IgE- and IgG-binding proteins after electrophoretic transfer from polyarylamide gels. J Immunol Methods 1982;52:183-94
11) Tang RB, Tsai LC, Hung MW, Hwang B, Wu KG. Detection of house dust mite allergens and immunoblot analysis in asthmatic children. J Asthma 1988;25:83-8
12) Hong CS, Lee MK, Oh SH. Identification of major allergens from the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* by electroblotting. Yonsei Med J 1991;32:24-32
13) Shapiro GG, Williams PV, Spector S: Inhalation Bronchoprovocation, In Bierman CW, Pearlman DS, Shapiro GG, Buss WW (ed.): Allergy, Asthma, and Immunology from Infancy to Adulthood. 3rd ed. p 173-186, WB Saunders, Philadelphia, 1996
14) Urbanek R, Kemeny DM, Richards D. Subclass 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
15) Kim MK, Kim YY. Changes of specific IgG subclass antibodies in dust-mite sensitive asthmatics during immunotherapty. Korean J Med 1990;39:204-12
16) 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 allergens. J allergy Clin Immunol 1987;79:505-5
17) Chapman MD, Platts-Mills TA. Measurement of IgG, IgA and

IgE antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* by antigen-binding assay, using a partially purified traction of mite extract (F4P1). Clin Exp Immunol 1978;34:126-36
18) Ford SA, Tovey ER, Baldo BA. Effect of reduction and heat on the detection of house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergen Der p Ⅰ by protein blotting. Int Arch Allergy Appl Immunol 1989;89:318-20
19) Lucas AH. IgG subclass-restricted immune responses to allergens. Springer Semin Immunopathol 1990;12:385-400
20) Mariani F, Price JF, Kemeny DM. The IgG subclass antibody response to an inhalant antigen (*Dermatophagoides pteronyssinus*) during the first year of life: evidence for early stimulation of the immune system following natural exposure. Clin Exp Allergy 1992;22: 29-33
21) Ruiz RG, Kemeny DM, Mariani F, Price JF. Early immune response to *Dermatophagoides pteronyssinus* and atopic predisposition. Arch Dis Child 1992;67:1023-6
22) Jenmalm MC, Bjorksten B. Development of immunoglobulin G subclass antibodies to ovalbumin, birch and cat during the first eight years of life in atopic and non-atopic children. Pediatr Allergy Immunol 1999;10:112-21
23) Olsson S, van Hage-Hamsten M, Magnusson CG. IgG1, IgG4 and IgE antibody reactivity to mutant forms of the major dust mite allergen Lep d 2 among atopic and nonatopic subjects naturally exposed to Lepidoglyphus destructor. Int Arch Allergy Immunol 2001;126:50-8