

일반 땅콩과 Salting 및 Defatting
방법으로 특수 처리한 땅콩의
면역학적 비교 연구

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 현 희

일반 땅콩과 Salting 및 Defatting
방법으로 특수 처리한 땅콩의
면역학적 비교 연구

지도교수 이 기 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 현 희

이현희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

한 해를 마무리하면서 미흡하나마 저의 논문이 나오게 되어 무어라 말로 표현할 수 없을 만큼 기쁩니다. 이 논문이 나오기까지 많은 가르침을 주셨던 여러 교수님들의 고마움을 이루 표현할 수가 없습니다. 임상과 연구를 함께 열심히 해야 함을 늘 강조하시며 많은 배려를 해주신 이기영 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 여러모로 부족한 저에게 지도와 격려를 아끼지 않으시고 귀한 시간 내주시며 자문을 하여주신 홍천수 교수님, 김동수 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 특히 많은 연구방법과 지식을 아낌없이 가르쳐 주신 김규연 교수님께도 진심으로 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

이 논문이 나올 때까지 옆에서 힘이 되어주고, 묵묵히 응원해 주었던 남편에게 고마움과 사랑의 마음을 전하고 싶습니다. 세상에 필요한 사람이 되라고 가르치시며 사랑을 베풀어주신 부모님, 항상 제 입장에서 저를 배려해 주시는 시부모님, 같은 병원에 근무하면서 동료로서 정신적으로 많은 격려를 아끼지 않은 명지병원 소아과 선생님들, 모두 다 함께 이 기쁨을 나누고자 합니다.

끝으로 부족한 저를 항상 좋은 길로 인도해주시는 하나님께 이 모든 결과를 돌리고 싶습니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	4
1. 대상 환아 및 검사방법	4
2. 저항원성 땅콩의 제조 방법	5
가. Salting 방법	5
나. Defatting 방법	6
3. 항원 제조	7
4. SDS-PAGE (Sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)	8
5. Electroimmunoblotting	8
III. 결 과	10
1. 임상검사 결과	10
2. SDS-PAGE	11
3. Electroimmunoblotting	13
IV. 고 찰	15
V. 결 론	19
참고문헌	20
영문요약	25

그림 차례

Fig. 1. Preparation method of salted peanut	6
Fig. 2. Preparation method of defatted peanut	7
Fig. 3. Schematic diagram of study method	9
Fig. 4. SDS-PAGE analysis of crude raw & processed peanut extract	12
Fig. 5. Autographs of SDS-PAGE-separated components of crude raw & processed peanut extract after electroblotting on NC membranes and followed by immunodetection with human IgE antibodies	14

표 차례

Table 1. Clinical profiles of the patients with peanut allergy	5
Table 2. Laboratory characteristics and oral provocation test in the patients with peanut allergy	11

국문요약

일반 땅콩과 salting 및 defatting 방법으로 특수 처리한 땅콩의 면역학적 비교 연구

식품에 의한 알레르기 질환 중 땅콩에 의한 알레르기는 외국의 경우 매우 흔하며 그 증상이 심한 것으로 보고된다. 최근 국내에서도 식품의 기호가 다양해지면서 땅콩 알레르기의 빈도가 증가하는 것으로 보여지고 있다. 이에 국내에서 아직 연구가 미흡한 땅콩 알레르기의 면역학적 특성을 살펴보고, 일반 땅콩과 본 연구자들이 특수 처리하여 제조한 땅콩의 항원성을 비교 분석하여 그 유용성은 어떠한지 알아보고자 하였다.

우리 나라에서 시판되는 국내산 땅콩으로 조항원(crude extract)을 만들고 동일한 땅콩을 0.5M NaCl을 이용한 salting 방법과 99.9% ethyl alcohol을 이용한 defatting 방법으로 특수 처리하여 조항원을 제조하였다. 제조된 각각의 조항원으로 SDS-PAGE를 시행하여 항원을 분석하였고, 대상 환아의 혈청으로 일반 땅콩 및 특수 처리한 땅콩에 대한 항원 결합 특이 IgE 면역검출을 시행하였다. 1차 분리해낸 조항원으로 SDS-PAGE를 시행한 결과 일반 땅콩은 30개 이상의 단백 항원이 관찰되었으며 이 중 64kDa, 36kDa, 30kDa, 17kDa, 15kDa의 항원이 강하게 관찰되었다. Salting 방법으로 특수 처리한 땅콩은 관찰된 20여개의 단백 항원 중 30kDa, 17kDa의 항원만이 비교적 강하게 관찰되었다. Defatting 방법으로 특수 처리한 땅콩은 10여개 정도의 단백 항원이 관찰되었는데 32kDa, 26kDa의 항원만이 그대로 관찰되었고 36kDa, 30kDa의 항원은 거의 관찰되지 않았다. 땅콩 알레르기 대상 환아의 혈청으로 항원 결합 특이 IgE 면역검출을 시행한 결과 일반 땅콩의 경우 이들 항원 중 10개 이상의 알레르겐이 관찰되었으며 그 중 98kDa, 64kDa, 26kDa, 15kDa, 6kDa의 알레르겐이 비교적 강하게 관찰되었다. Salting 방법으로 처리한 땅콩의 경우 98kDa, 64kDa, 17kDa의 알레르겐이 관찰되었으며, defatting 방법으로 처리한 땅콩의 경우 98kDa, 17kDa의 알레르겐이 약하게 관찰되었다.

이상으로 땅콩의 알레르기 항원성을 살펴본 결과 salting 및 defatting 방법으로 특수 처리한 저항원성 땅콩과 일반 땅콩은 항원성에서 의미있는 차이를 보였으며, 이러한 연구 결과를 토대로 저항원성 땅콩의 대치 식품으로서의 유용성을 기대해 볼 수 있을 것이다.

핵심되는 말 : 땅콩 알레르기, 항원성, 저항원성 땅콩

일반 땅콩과 Salting 및 Defatting 방법으로 특수 처리한 땅콩의 면역학적 비교 연구

<지도교수 이 기 영>

연세대학교 대학원 의과학사업단

이 현 회

I. 서 론

식품에 의한 알레르기 질환은 전체 인구의 0.1 내지 7.0%로 비교적 흔하며, 이중 땅콩에 의한 알레르기는 우리 나라에 비하여 외국에서 발생률이 높은 것으로 알려져 있다¹. 그러나 최근 들어 국내에서도 땅콩의 수요가 증가하면서 땅콩 알레르기의 빈도도 증가하는 것으로 보고되고 있다. 식품 알레르기 중 땅콩에 의한 알레르기는 1916년 Johns²가 처음으로 보고한 이후 여러 증례들이 보고되었으며 보고자에 따라 다르지만 김등³이 보고한 바에 의하면 식품알레르기 중 2.4%를 차지하는 중요한 식품 항원이다. 김등³이 보고한 바에 의하면 천식으로 진단받은 환자 중 식품알레르기의 빈도는 11.4%였으며 이중 땅콩 알레르기는 10위의 빈도를 나타낸 것으로 보고하였다.

땅콩은 콩과식물에 속하며 학명은 *Arachia hypogea*이다⁴. 완두콩류나 콩류와 연관성이 많으며 같은 콩과식물에 속하는 것들로는 완두콩(peas), 강낭콩 beans), 콩(soy beans), 렌즈콩(lentils), 클로버 종자(clover lupines), kidney beans, garbanzo beans, carob beans 등이 있다⁵. 땅콩은 북미 지역에서는 가장 빈도가 많은 식품 알레르겐으로 알려져 있다⁶. 알레르기 질환을 유발하는 경우 나타나는 증상으로는 두드러기, 기관지 천식, 아토피 피

부염, 설사나 구토 등의 위장관 증상 및 심한 경우 아나필락시 쇼크를 일으키기도 한다⁷. 식품에 의한 알레르기 질환 중 땅콩 알레르기는 외국의 경우 매우 흔하며 그 증상이 심한 것으로 보고되고 있다. 최근 들어 국내에서도 땅콩이 값싸고 질 좋은 단백질의 공급원으로 많은 식품에 흔히 첨가되고 있어 그 수요가 점차 증가하는 추세이며 아직까지 땅콩 알레르기에 대한 국내 보고는 미흡한 실정이지만 식품의 기호가 다양해지고 서구화되면서 땅콩 알레르기의 빈도도 증가하는 것으로 보고되고 있다. 땅콩 알레르기의 발생기전은 현재 전형적인 I형 알레르기 반응으로 알려져 있으며⁸, 땅콩항원의 분리와 특성 규명을 위한 노력으로 외국에서는 땅콩의 알레르기 항원성에 관한 면역학적 연구를 활발히 진행하였으나 아직까지 우리나라에서의 연구는 미흡한 실정이다.

이에, 외국에서는 활발하지만 국내에서 아직 연구가 미흡한 땅콩 알레르기의 면역학적 특성을 살펴보고, 일반 땅콩의 항원성 및 특수 처리하여 제조한 땅콩의 알레르기 항원성을 비교 분석하여 우리나라에서 중요한 항원 단백질 및 임상적 유용성이 어떠한지를 연구함으로써 점차 증가하는 추세이며 그 증상이 심각한 땅콩 알레르기 질환의 예방 및 치료에 특수 처리하여 제조한 저항원성 땅콩을 보다 광범위하게 응용하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 환자 및 검사방법

연세대학교 의과대학 소아 알레르기 클리닉에 내원하여 알레르기 피부시험을 시행한 결과 땅콩항원에 양성 반응을 보인 환자 중 경구유발시험 및 재 알레르기 피부시험이 가능한 환자 4명을 대상으로 하였다. 대상 환자의 연령 분포는 8세부터 18세까지였고 남아가 4명이었다. 4명 모두 천식이 있었으며 그 외에 알레르기 비염, 결막염 및 운동 유발성 천식이 있었다. 이들 환자들은 알레르겐 63종(Torii Co, Tokyo, Japan)으로 소피법에 의한 피부시험을 시행하였고 혈중 총 호산구수, 혈청 총 IgE(PRIST) 및 땅콩항원에 대한 RAST(Phadebas RAST disc, Pharmacia diagnostics, Little Chalfont, England)를 시행하였다. 환자 모두에서 국내산 일반 땅콩가루 및 salting 및 defatting 방법으로 처리하여 제조한 땅콩가루로 경구유발시험(개방식품유발검사)을 시행하였다. 먼저 salting 및 defatting 방법으로 처리하여 제조한 땅콩가루 소량을 입술에 묻힌 뒤 이후 10g씩 증량하여 총 100g까지 섭취하게 하였으며, 일반 땅콩가루도 동일한 방법으로 경구유발시험을 시행하였다. 대상 환자에게 일반 땅콩과 salting 및 defatting 방법으로 처리하여 제조한 땅콩의 조항원으로 알레르기 피부시험을 소피법으로 재시험하고, 결과는 검사 후 15-20분 뒤에 Scandinavian Society of Allergology의 판독 기준⁹에 따라 판정하였다(Table 1).

Table 1. Clinical profiles of the patients with peanut allergy

Case	Age (years)	Sex	Allergens Detected by Allergy Skin Test
1	11	M	HD,DF,DP,CR,CH,RT,PN
2	14	M	HD,DF,DP,RT,Ri,PN
3	18 6/12	M	HD,DF,DP,CW,RT,PN
4	8	M	HD,DF,DP,To,So,Oy,RT,PN

PN:peanut, HD: house dust, DF: D.farinae, DP:D.pteronissynus, CR: cockroach, CH: cat hair, RT: red top, Ri:rice, CW: cedar wood pollen, To: tomato, So: soybean, Oy: oyster

2. 저항원성 땅콩의 제조 방법

가. Salting 방법

우리 나라에서 시판되는 국내산 땅콩을 껍질을 벗긴 후 가루로 만들고, 이 땅콩가루를 이용하여 Ikezawa등¹⁰이 저항원성 쌀 및 밀을 제조하는데 사용한 salting법으로 저항원성 땅콩을 제조하였다. 땅콩가루 1kg에 0.5M NaCl 5L를 첨가하여 10°C에서 1시간동안 저은 후 상층액을 제거하였다. 이것을 침전시킨 후 다시 0.5M NaCl 2L를 첨가하여 10°C에서 1시간동안 저은 후 상층액을 제거한 뒤 이 과정을 반복하였다. 침전물에 다시 증류수 2L를 첨가하여 10°C에서 30분간 저은 후 상층액을 제거하고 이 과정을 한번 더 반복하여 시행하였다. 남은 침전물을 -20°C에 냉동 건조시킨 후 다시 가루로 제조하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

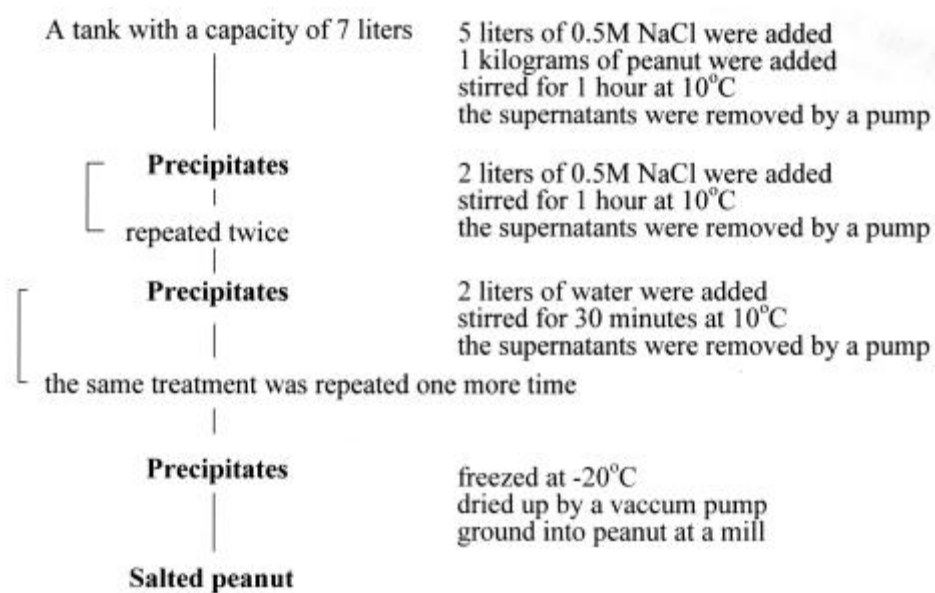


Fig. 1. Preparation method of salted peanut

나. Defatting 방법

우리 나라에서 시판되는 국내산 땅콩을 껍질을 벗긴 후 가루로 만들고, 이 땅콩가루를 이용하여 99.9% ethyl alcohol 2.5L와 땅콩가루 500g을 섞어 10°C에서 1시간동안 저은 후 상층액을 제거한 뒤 이 과정을 반복하였다. 침전물에 다시 99.9% ethyl alcohol 2.5L를 첨가하여 위의 과정을 4번 더 반복하였다. 상층액을 제거하고 남은 침전물을 -70°C에 냉동 건조시킨 후 다시 가루로 제조하여 실험에 사용하였다¹¹(Fig. 2).

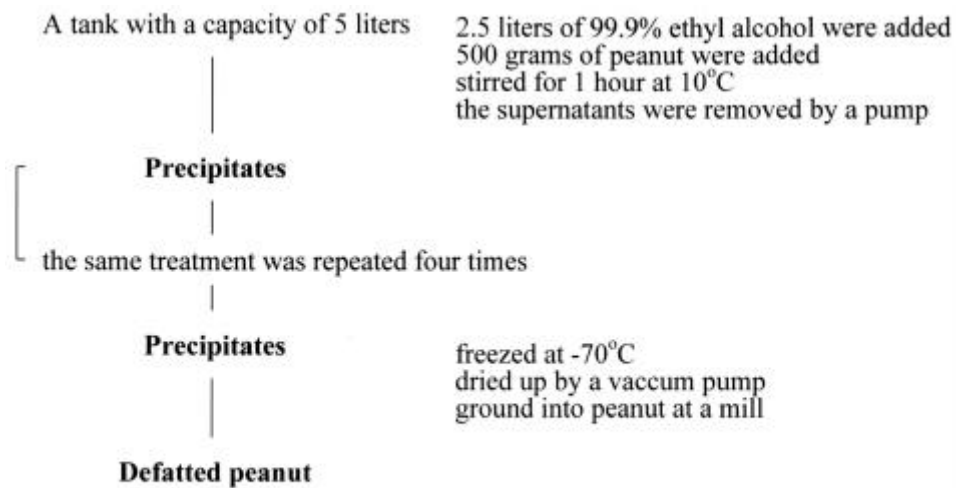


Fig. 2. Preparation method of defatted peanut

3. 향원 제조

우리 나라에서 시판되는 국내산 땅콩으로 제조한 땅콩가루와 salting 및 defatting 방법으로 제조한 땅콩가루를 각 각 Bernton과 Brown¹²의 방법을 변형한 방법으로 각각 1% PBS(Phosphate buffered saline) pH 7.4를 1:1 비율로 첨가하여 1-2시간 shaking한 뒤 3일간 가라앉힌 후 상층액을 채취하여 조향원(crude extracts)을 얻었다¹³.

4. SDS-PAGE(Sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

Laemmli방법¹⁴을 변형한 SDS-PAGE를 시행하였다. Stacking 겔의 농도는 4%, separating 겔의 농도는 20%를 사용하였다. 조항원을 loading buffer와 1:5의 비율로 섞은 후 3분간 중탕 가열하여 항원을 각 well에 20 μ L씩 loading한 후 125V, 30mA로 1시간 30분동안 전기영동을 시행하였고, 125V 12mA로 재 조절한 후 30분동안 전기영동을 하였다. 전기영동을 끝낸 겔은 Coomassie blue staining solution으로 염색하여 항원을 분석하였는데 이때의 분자량은 표준단백(Novex, San Diego, CA, USA)에 의거하여 계산하였다.

5. Electroimmunoblotting

전기영동이 끝난 항원을 0.45 μ M의 Nitrocellulose(NC) membrane에 70V로 1시간 30분 동안 이행시켰다¹⁵. 이 막을 10% methanol : PBS에 1시간 세척한 후 3% bovine serum albumin(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)이 함유된 10mM Tris buffer에 담근 후 2시간 동안 shaking하였다. 이를 0.1% Tween 20이 함유된 PBS로 3번 정도 세척한 후 30분 동안 담구었다. 다시 세척 후 PBST에 환자의 혈청을 1:10으로 희석한 용액에 NC membrane을 16시간 담근 후에 PBST로 30분씩 3회 세척하였다. 여기에 biotin이 부착된 항 IgE항체(1mg/mL, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA)를 0.01% BSA(bovine serum albumin)-PBS에 1:500(v/v)으로 희석하여 각 well당 10mL를 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후 PBST에 1:1000(v/v)으로 희석한 Streptavidin-alkalinephosphatase

(1mg/mL, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)를 섞은 후 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 PBST로 5회 세척하고 BCIP/NBT(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)를 증류수 10mL에 녹이고, 완전히 녹은 뒤 이 용액을 각 well에 넣고 5분간 발색시킨 후 증류수로 반응을 중단시켰다. 이것을 세척하여 건조시킨 후 표준단백에 의거하여 각 환아에서 IgE와 결합하는 항원의 띠를 관찰하였다¹³(Fig. 3).

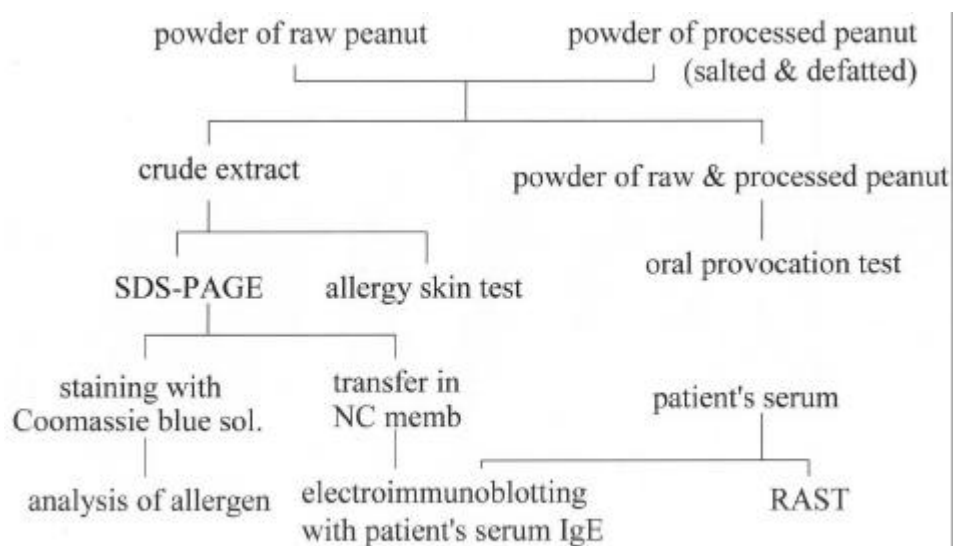


Fig. 3. Schematic diagram of study method

III. 결 과

1. 임상검사 결과

일반 땅콩과 salting 및 defatting 방법으로 처리한 땅콩 항원으로 경구 유발시험을 시행하였던 4명의 환자 중 일반 땅콩의 경우 4명의 환자에서 모두 양성 반응을 보였으며 콧물(4례), 기침(4례), 결막충혈(2례), 두드러기(2례), 호흡곤란과 천명(1례) 등이 유발되었다. 특수 처리한 땅콩의 경우, salting 방법으로 처리한 땅콩은 3명의 환자에서 양성반응을 보였으며, 콧물(3례), 기침(2례), 결막충혈(1례) 등이 나타났다. Defatting 방법으로 처리한 땅콩은 2명의 환자에서 양성반응을 보였으며, 콧물(2례), 기침(2례), 두드러기(1례) 등이 나타났으나 일반 땅콩의 경우에 비해 경한 임상 소견을 보였다. 대상 환자 4명 모두 혈중 총 호산구수가 높았으며 혈청 총 IgE치도 4명 모두 높게 나타났다. 각각의 조항원으로 알레르기 피부시험을 시행한 결과 일반 땅콩은 모두 양성을 나타냈고, salting 처리한 땅콩의 경우 1명이 음성으로 3명이 양성으로 나타났으며, defatting 처리한 땅콩의 경우 2명이 음성으로 2명이 양성으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Laboratory characteristics and oral provocation test in the patients with peanut allergy

Case	TEC (/mm ³)	IgE (/ml)	Skin Reaction			RAST Class	Oral Provocation Test		
			Raw PN	Salted PN	Defatted PN		Raw PN	Salted PN	Defatted PN
1	920	407	SP	P	N	3+	P	N	N
2	670	896	SP	SP	P	3+	P	P	P
3	1620	140	SP	SP	SP	4+	P	P	P
4	252	183	P	N	N	2+	P	N	N

TEC : total eosinophil count, IgE : serum total IgE, PN : peanut, P : positive, SP : strong positive, N : negative

2. SDS-PAGE

PBS로 분리해낸 조항원으로 SDS-PAGE를 시행하였다. 분자량을 측정 한 결과 일반 땅콩 항원인 lane D는 30개 이상의 단백 항원이 관찰되었으며 이 중 64kDa, 36kDa, 30kDa, 17kDa, 15kDa의 항원이 강하게 관찰되었다. Salting 방법으로 처리한 땅콩 항원인 lane B는 20여개의 단백 항원이 관찰되었으며, 일반 땅콩에서 강하게 관찰되었던 64kDa 및 50kDa등의 항원이 관찰되지 않았고 30kDa, 17kDa의 항원은 약하게 관찰되었다. Defatting 방법으로 처리한 땅콩 항원인 lane C는 10여개 정도의 단백 항원이 관찰되었는데, 일반 땅콩에서 관찰되었던 30여개의 항원중 26kDa, 32kDa의 항원만이 그대로 관찰되었고 64kDa, 50kDa, 17kDa 항원은 약하게 관찰되었으며, 36kDa, 30kDa의 항원은 관찰되지 않았다(Fig. 4).

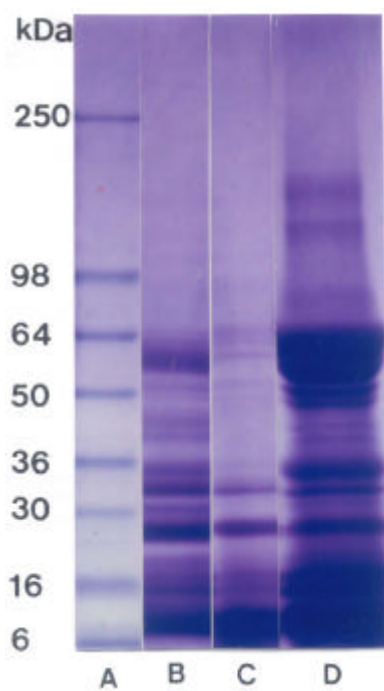


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of crude raw & processed peanut extract ; A, Mw markers: myosin(250kDa), bovine serum albumin(98kDa), glutamic dehydrogenase(64kDa), alcohol dehydrogenase(50kDa), carbonic anhydrase(36kDa), myoglobin(30kDa), lysozyme(16kDa), aprotinin(6kDa) ; B, crude salted peanut extract ; C, crude defatted peanut extract ; D, crude raw peanut extract

3. Electroimmunoblotting

땅콩 알레르기 대상 환자 4명의 혈청으로 항원 결합 특이 IgE 면역검출을 시행하였다. Lane A는 molecular weight marker이고, lane B, D, F는 RAST class 2+, 3+, 4+를 보인 환자의 pooled serum으로 면역검출을 시행한 것이고, lane C, E, G는 RAST class가 0인 control group 환자의 혈청을 이용하였다. Lane B, C는 일반 땅콩, lane D, E는 salting 방법으로 처리한 땅콩으로, lane F, G는 defatting 방법으로 처리한 땅콩으로 면역검출한 것으로 일반 땅콩의 경우 땅콩 항원 중 10개 이상의 항원이 환자 혈청의 땅콩 특이 IgE에 결합하였으며 그중 98kDa, 26kDa, 15kDa, 6kDa의 항원을 비교적 강하게 관찰할 수 있었다. Salting 방법으로 처리한 땅콩의 경우 항원 결합 특이 IgE 면역검출을 시행한 결과 98kDa, 64kDa, 17kDa의 항원이 강하게 관찰되었으며, 26kDa, 30kDa의 항원은 관찰되지 않았다. Defatting 방법으로 처리한 땅콩의 경우 항원 결합 특이 IgE 면역검출을 시행한 결과 98kDa, 17kDa의 항원이 약하게 관찰되었으나 64kDa, 36kDa, 30kDa의 항원은 관찰되지 않았다(Fig. 5).

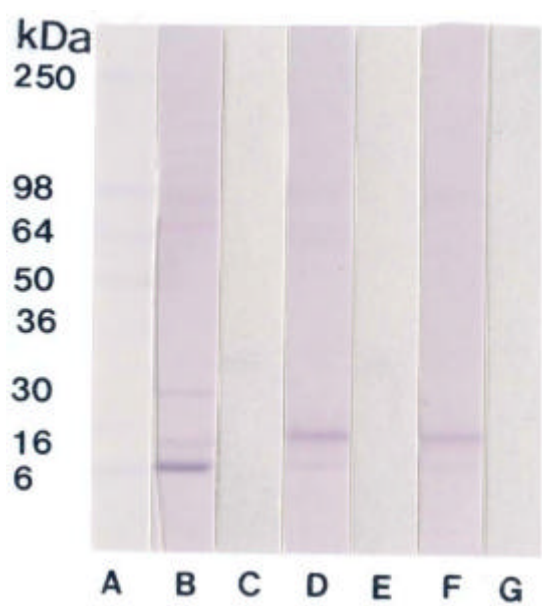


Fig. 5. Autographs of SDS-PAGE-separated components of crude raw & processed peanut extract after electroblotting on NC membranes and followed by immunodetection with human IgE antibodies; A, Mw markers; B, pooled serum of case(raw peanut) ; C, pooled serum of control(raw peanut); D, pooled serum of case(salted peanut); E, pooled serum of control(salted peanut); F, pooled serum of case(defatted peanut); G, pooled serum of control(defatted peanut)

IV. 고 찰

식품알레르기 중 땅콩에 의한 알레르기는 1916년 Johns²가 처음으로 보고한 이후 여러 증례들이 보고되었으며^{14~19} 보고자에 따라 다르지만 김등³이 보고한 바에 의하면 식품알레르기 중 2.4%를 차지하는 중요한 식품 항원이며, 식품항원 중 10위를 차지한다고 보고하였다. 땅콩 알레르기는 호흡기 및 피부증상, 위장증상, 아나필락시 등의 다양한 증상이 나타날 수 있으며^{20,21} 가장 흔하게 나타나는 임상 증상은 천식, 질식 등의 호흡기 증상과 두드러기, 혈관부종, 소양증 등의 피부 증상, 알레르기 비염 등이며 그 외에 설사, 구토, 구강 궤양, 습진, 뇌증, 심정지 및 사망 등이 보고되고 있다. 이러한 임상 증상 중 호흡기 및 피부 증상이 가장 심하게 나타나며 경우에 따라 전신적 쇼크를 일으키기도 한다^{22~25}.

‘식품알레르기’라는 용어는 식품이나 식품첨가물을 섭취한 뒤에 나타나는 불리한 반응인 이상반응 중에서 면역작용에 의해 일어나는 반응만을 정의하며²⁶, 그 빈도는 나이가 들어감에 따라 점차 감소하는 것으로 알려져 있는데 이것은 성장에 따라 분비성 면역계와 장점막이 성숙되어 식품항원의 흡수가 감소하고 항원항체반응에 대한 표적장기의 내성이 증가하기 때문인 것으로 생각되고 있다^{27,28}. 식품알레르기의 진단은 자세한 병력조사, 혈청 특이 IgE 항체검사 또는 알레르기 피부시험으로 의심되는 원인 식품을 찾아낸 뒤에 식품제거 및 유발시험을 실시하여 확진하게 된다²⁹. 식품알레르기의 확진은 쉽지 않으나 환자가 어떤 음식에 의해 알레르기 질환이 발생된다고 하여 그런 음식들을 무조건 먹이지 않는 경우, 소아의 성장발달에 악영향을 주게 되는 오류를 범하게 되므로 반드시 경구유발시험을 실시하

여 그 음식의 원인 여부를 확진하는 것이 중요하다³⁰. 식품알레르기의 진단에 있어서 RAST와 알레르기 피부시험의 문제점은 이들 검사에 양성이라 하여 원인식품으로 단정하지 못하고 음성이라 하여 원인식품이 아니라고 못하는데 있으므로³¹ 식품알레르기의 진단에는 자세한 병력청취와 식품일기, 식품제거시험 및 유발시험 등이 중요하다 하겠다. 본 연구에서도 대상환아 들에게 이와 같은 방법으로 땅콩 알레르기를 진단하였다.

땅콩 알레르기의 발생기전은 현재 전형적인 I형 알레르기 반응이라고 보고 있다⁸. 땅콩 항원에 대한 최초의 면역학적 연구로는 1916년 Johns등²에 의한 보고가 있는데 땅콩 단백을 albumin과 globulin으로 나누고 globulin을 다시 arachin 과 conarachin fraction으로 나누는데 성공하였다. 이후 Johnson등^{32,33}이 600kDa의 native arachin을 330kDa, 170kDa으로 분리하였으며, 1969년에 Neucere등³⁴이 arachin을 SDS-PAGE 하여 10kDa과 71kDa 사이의 다양한 subunits로 분리하였다. 이후 지속적인 연구 결과 땅콩 항원이 분석되었고, 현재까지 알려진 땅콩의 알레르기 항원은 16개의 단백질 분획으로 구성된 것으로 보고되고 있으며, 병력 및 피부시험과 ELISA 방법에 의하여 진단된 땅콩 알레르기 환자의 혈청을 이용하여 면역검출을 시행한 결과 분자량 63.5kDa에서 17kDa의 항원이 환자의 혈청 특이 IgE와 결합한다고 하였다. 현재 알려진 주요한 땅콩 알레르겐은 20-30kDa의 Peanut I³⁵과 65kDa의 ConA-reactive glycoprotein³⁶ 및 Burks등^{37,38}의 연구에서 보고된 63.5kDa의 Ara hI, 17kDa의 Ara hII로 알려져 있으며 땅콩 알레르기를 가진 환자의 혈청에서 90% 이상 이러한 주요 항원에 대한 specific IgE가 발견되고 있다^{39,40}. 땅콩의 단백질 항원은 열에 안정하며, 몇몇 연구자들이 땅콩의 단백질을 항원을 변성시키는 실험을 하였으나 단지 부분적인 변성만을 일으켰다고 보고된다. 연구에 의하면 증류된 땅콩기름

(distilled peanut oil)은 땅콩의 단백질 항원이 포함되지 않은 것으로 알려져 땅콩 알레르기 환자에게 안전한 것으로 알려져 있었으나 일부 회사에서 제조된 땅콩 오일에서 주요 땅콩 알레르겐이 발견되고 있다. 따라서 땅콩 알레르기 환자는 아나필락시 등을 일으킬 수 있으므로 이러한 땅콩 오일이 포함된 식품의 섭취시에도 주의를 요할 필요가 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구에 이용된 salting 방법으로 처리한 저항원성 땅콩의 제조는 시판 중인 국내산 땅콩을 구입하여 Ikezawa¹⁰이 저항원성 쌀 및 밀을 제조했던 방법을 준용하여 0.5M NaCl을 이용하는 salting방법으로 저항원성 땅콩을 제조하였다. 이러한 salting방법은 Ikezawa¹⁰에 의하면 대개 salt soluble fraction인 globulin fraction이 추출되는 것으로 보고되고 있으며 이때 땅콩의 주 항원인 15kDa, 17kDa의 항원 및 다른 고분자 단백질(high molecular protein)인 63kDa, 65kDa의 항원이 추출된 것으로 생각된다. 본 연구에 이용된 defatting 방법은 Spies¹¹이 땅콩의 주 단백질 항원을 분리 하였던 방법으로 저항원성 땅콩을 제조하였으며, 제조과정 중 땅콩의 주 항원인 64kDa, 36kDa, 30kDa의 항원이 추출된 것으로 생각된다. 본 연구에서는 SDS-PAGE를 시행하였을 때 일반 땅콩에서는 30개 이상의 단백질 항원이 관찰되었으나 salting 처리한 땅콩의 경우는 20여개의 단백질 항원이 관찰되었으며 이 중 일반 땅콩에서 강하게 관찰되었던 64kDa, 50kDa, 36kDa등의 항원이 관찰되지 않았고 30kDa, 17kDa의 항원은 약하게 관찰되었다. Defatting 처리한 땅콩의 경우는 10여개의 단백질 항원이 관찰되었으며 일반 땅콩에서 관찰되었던 항원 중 36kDa, 30kDa의 항원은 관찰되지 않았고 64kDa, 50kDa, 17kDa의 항원은 약하게 관찰되었다. 환자 혈청으로 항원 결합 특이 IgE 면역검출을 시행한 결과 일반 땅콩에서는 이들 항원 중 10개 이상의 항원이 환자 혈청의 땅콩 특이 IgE와 결합하였으며 그 중

98kDa, 64kDa, 26kDa, 15kDa, 6kDa의 항원이 비교적 강하게 결합하였으나, 특수 처리한 땅콩에서는 salting 방법으로 처리한 땅콩의 경우 98kDa, 64kDa, 17kDa의 항원만이 결합되었다. Defatting 방법으로 처리한 땅콩의 경우 98kDa, 17kDa의 항원이 약하게 결합되었다. 이상의 결과로 우리나라 땅콩 알레르기 환아에서 일반 땅콩 항원 중 땅콩 특이 IgE와 결합하는 주 알레르기 항원은 64kDa, 36kDa, 17kDa, 15kDa의 항원으로 나타났으며, 이것은 다른 연구결과와도 일치하는 소견이다^{36~40}. 반면에 salting 및 defatting 방법으로 처리한 저항원성 땅콩에서는 이러한 땅콩의 주 알레르기 항원이 항원 결합 특이 IgE 면역검출시 약하게 관찰되거나, 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 본 연구에서 의도한 바대로 salting 및 defatting 방법으로 처리한 저항원성 땅콩의 제조과정 중 땅콩의 주 단백질 항원이 추출되어 알레르기 항원성이 변화된 것으로 생각되며, 식품알레르기의 예방 및 치료 방법 중 가장 좋은 방법인 원인 식품을 제거한 식사(elimination diet) 및 대체식품으로서 그 유용성을 나타냈다⁴¹.

이러한 연구 결과를 토대로 땅콩 알레르기 환아 뿐만아니라 다른 종류의 식품알레르기 환아에서도 대체식품을 제조하여 이용할 수 있는 가능성이 제시되었고 이의 보다 광범위하고 발전된 연구가 이루어질 것으로 기대된다.

V. 결 론

이상의 결과로 땅콩 알레르기의 항원성을 살펴본 결과 아무런 조작을 하지 않은 일반 땅콩은 salting 및 defatting 방법으로 처리한 땅콩과 항원성에서 의미있는 차이를 나타냈다. 특히 일반 땅콩 항원중 주 항원인 64kDa, 50kDa, 36kDa의 단백 항원은 salting 방법 과정 중 추출된 것으로 생각되며, defatting 방법 과정 중에서는 64kDa, 36kDa, 30kDa의 단백 항원이 추출된 것으로 보인다. 따라서 본 연구 결과 알레르기 항원성의 변화를 나타낸 특수 처리한 저항원성 땅콩을 이용하여 땅콩 알레르기 환아의 식이 요법에의 유용성 등이 기대되며 그 면역학적 특성 및 임상적 응용에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Farrell MK : Food Allergy. In Lawlor GJ Jr., Fischer TJ: Manual of Allergy and Immunology. Boston, Little Brown Co.; 1981. p.257-66.
2. Johns CO, Jones DB. The proteins of the peanut, *Arachis Hypogaea* I. The globulins Arachin and Conarachin. *J Biol Chem* 1916; 28:77-87.
3. 김규연, 정병주, 이기영 : 소아 천식환자에서 식품알레르기의 빈도 및 원인식품. *소아알레르기 및 호흡기* 1995;5(2):96-106.
4. Speer F : Biological classification : In food allergy. Littleton, PSG Pub. Co. Inc.; 1979. p.40-8.
5. Schery RW. Plants in man. Edition 8. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall 1965.
6. Sampson HA. McCaskill CC. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J Pediatr* 1985;107:669-75.
7. Sampson HA. Immediate hypersensitivity reactions to foods: blinded food challenges in children with atopic dermatitis. *Ann Allergy* 1986; 57:209.
8. Metcalfe DD. Food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73:749-62.
9. Northern Society of Allergology : Proceedings Communications Gesellschafts ver handlungen : Standardization of diagnostic work in allergy. *Acta Allergologica* 1973;28:219-20.

10. Ikezawa Z, Lkebe T, Ogura H, Odajima O, Kurosaka F, Komatu H, et al. (HRS-1 research group) : Mass trial of hypoallergenic rice(HRS-1) produced by enzymatic digestion in atopic dermatitis with suspected rice allergy. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1992; 71:108-12.
11. Spies JR, Coulson EJ, Chambers DC et al. The chemistry of allergens. XI. Properties and composition of natural proteoses isolated from oilseeds and nuts by the CS-1A procedure. *J Am Chem Soc* 1951;73:3995-4001.
12. Bernton HS, Brown H : Insect allergy : Preliminary studies of the cockroach. *J All Clin Immunol* 1964;35:506-10.
13. 남동호, 박중원, 홍천수, 이기영, 이수영 : 소아에서 연령군에 따른 집 먼지진드기 주항원(Der f I와 Der f II)에 대한 특이 IgE 항체의 변화. *소아알레르기 및 호흡기* 1995;5(2):117-24.
14. Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;277:680-5.
15. Towbin H, Staehelin T, Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Pro Nath Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4.
16. Eggleston PA. Prospective studies in the natural history of food allergy. *Ann Allergy* 1987;59:179-82.
17. Gallagher JS, Riehm JG, Valanis B, Bernstein IL. Cross sectional survey of the incidence of adverse food symptoms in adults. *J*

- Allergy Clin Immunol 1983;71(Abstr):113.
18. Asperen PP, Kemp AS, Mellis CM. A prospective study of the clinical manifestations of atopic disease in infancy. *Acta Paediatr Scand* 1984;73:80-5.
 19. Sampson HA, Metcalfe DD. Immediate reactions to foods. In: Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA eds. *Food allergy. Adverse reactions to foods and food additives*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991;99-112.
 20. May CD : Food Allergy-A Commentary. *Pediat Clin N Amer* 1975; 22:217-9.
 21. Crook WG : Food Allergy. The Great masquerader. *Pediat Clin N Amer* 1975;22:227-36.
 22. Kemp AS, Mellis CM, Barnett D, Sharota E, Simpson J. Skin test, RAST and clinical reactions to peanut allergens in children. *Clin Allergy* 1985;15:73-8.
 23. Bock SA, Lee WY, Remigo LK, May CD. Studies of hypersensitivity reactions to foods in infants and children. *J Allergy Clin Immunol* 1978;62:327-34.
 24. Van Ketel WG. Dermatitis from octyl gallate in peanut butter. *Cont Derm* 1978;4:60.
 25. Mathias CGT. Contact urticaria from peanut butter. *Cont Derm* 1983;9:66-9.
 26. Anderson J, Sogn D(ed.) : *Adverse Reactions to Foods*, AAAI Committee on Adverse Reactions to Foods and NIAID. NIH

Publication no. 84-2442, July 1984

27. Dannaeus A : Food allergy in infancy and children : state of the art. Ann Allergy 1987;59:124-6.
28. Farrell MK : Food allergens and asthma. In Weiss EB, Segal MS, Stein M (Ed.) : Bronchial asthma : Mechanism and Therapeutics. 2nd ed. Boston, Little Brown Co.; 1985. p.430-5.
29. Berman BA, McDonnell KF : Differential diagnosis and treatment of pediatric allergy. Boston, Little Brown Co.; 1981. p.467-75.
30. 강석영, 민경업 : 메밀알레르기 3례. 대한의학협회지 1984;27:765-8.
31. Hamburger RN : Diagnosis of food allergies and intolerances in the study of prophylaxis and control groups in infants. Ann Allergy 1984;53:673-7.
32. Johnson P. The proteins of the ground-nut (*Arachis Hipogaea*) I. The isolation and properties of the proteins. Trans Faraday Soc 1946;42:28-36.
33. Johnson P, Shooter EM. The globulins of the ground-nut (*Arachis Hypogaea*) I. Investigation of Arachin as a dissociation system. Biochim Biophys Acta 1950;5:361-75.
34. Neucere NJ. Isolation of alpha-arachin, the major peanut globulin. Anal Biochem 1969;27:15.
35. Sachs MI, Jones RT, Yunginger JW. Isolation and partial purification of a major peanut allergen. J Allergy Clin Immunol 1981;67:27-34.
36. Barnet D, Howden MEH. Partial characterization of an allergenic glycoprotein from peanut (*Arachis Hypogaea* L.). Biochim Biophys

Acta 1986;882:97-105.

37. Burks AW, Williams LW, Helm RM et al. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:172-9.
38. Burks AW, Williams LW, Connaughton C et al. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with the use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:962-9.
39. Barnett D, Howden MEH, Bonham B, Burley RW. Aspects of legume allergy research. *Proc Sydney Allergy Group* 1985;4:104-18.
40. Meier-Davis S, Taylor SL, Nordlee J, Bush R. Identification of peanut allergens by immunoblotting (Abstract). *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:218.
41. Crawford LV, Herrod HG : Allergy diets for infants and children. In Gluck LG, Cone TE, Dodge PR, Falkner FF, Green M : Current problems in pediatrics, Chicago, Year Book Med Publ Inc.; 1981. p.24-35.

Abstract

A Comparative Study on Allergenicity of Raw and Processed
Peanuts

Hyun Hee Lee

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Ki Young Lee)

Allergy to peanuts is one of the most frequent allergy with severe symptoms. Peanuts represent an inexpensive source of high quality protein, frequently included in children's diet. Although not as frequent, allergic reaction to peanuts in Korea is increasing due to diversification and westernization of diet among Korean population. The present study examines the immunologic nature of peanut allergy, and compares allergenicity between raw unprocessed and specially processed peanuts. Peanuts marketed in Korea processed by salting with 0.5M NaCl and a crude extract was made from it. Another crude extract was also prepared by defatting with 99.9% ethyl alcohol. SDS-PAGE with the crude extracts was carried out. The results are as follows; Unprocessed raw peanuts revealed more than 30 protein bands, with pronounced proteins at 64kDa, 36kDa, 30kDa, 17kDa and 15kDa. Salted peanuts revealed approximately 20 protein bands with no evidence of 64kDa or 50kDa allergens and weakly expressed 30kDa and 17kDa allergens. Defatted peanuts showed approximately 10 protein bands with 34kDa and 26kDa, weakly expressed 50kDa and 17kDa allergens and no evidence of 36kDa and 30kDa allergens.

In conclusion, raw and processed peanuts had significant difference in allergenicity. The processed hypoallergenic peanuts were found to be useful as the elimination diet for many atopic children with peanut allergy.

Key Words : peanut allergy, allergenicity, hypoallergenic peanut