

## 위장관 감작을 통한 땅콩 알레르기의 생쥐모델 확립

아주대학교 의과대학 소아과학교실<sup>1</sup>, 포천중문의과대학교 소아과학교실<sup>2</sup>, 연세대학교 의과대학 소아과학교실 및 알레르기연구소<sup>3</sup>

이수영<sup>1</sup>·박석원<sup>1</sup>·오세조<sup>1</sup>·염혜영<sup>2</sup>·손명현<sup>3</sup>·김규언<sup>3</sup>

### Development of Murine Model of Peanut Allergy by Intragastric Sensitization of Peanut Extract

Soo-Young Lee<sup>1</sup>, Seok-Won Park<sup>1</sup>, Sejo Oh<sup>1</sup>, Hae-Young Yum<sup>2</sup>, Myung-Hyun Sohn<sup>3</sup> and Kyu-Earn Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Pochon Cha University College of Medicine, Pochon, Korea, <sup>3</sup>Department of Pediatrics and Allergy Research Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Peanut allergy has been increased in westernized countries and it is increasing now in Korea, and the peanut allergy is one of the most potent food allergies, even though the prevalence is not high compare to other food allergies. As like other food allergies, allergen avoidance is the only therapeutic option for peanut allergy. For the mechanistic or immunologic studies of food allergy is very limited in human, so we need a good quality of animal model of food allergy mimics human disease.

**Objective:** The purpose of this study was to develop a murine model of IgE mediated peanut allergy mimics human peanut allergy.

**Method:** C3H/HeJ mice were sensitized intragastrically, at day 1, 2, 3, 7, 21 with 1 mg (Group I) or 5 mg (Group II) of crude peanut extract mixed with cholera toxin, or sensitized by intraperitoneally (1 mg, Group III) at day 1, 7, 21 with alum solution, and the Group IV mice were served as naive control. Mice were challenged intragastrically at week 5. Serum peanut specific IgE, IgG1 were measured at

weekly interval, and the splenocyte proliferation assay and cytokine profiles were evaluated after challenge at week 5.

**Result:** Peanut specific IgE levels markedly increased at week 3, and the IgE responses increased till week 5 in intragastrically sensitized mice (Group I and II), while the initial profound IgE responses were abrogated after week 3 in intraperitoneally sensitized mice (Group III). The IgE levels were higher in Group II compared to Group I mice, and the IgE levels were consistent with fecal peanut specific IgA levels and anaphylaxis symptom score at week 5 challenge. Peanut stimulated productions of IL-4 and INF- $\gamma$  were higher in Group I and II compared to Group III.

**Conclusion:** In this experiment, we have established relatively good quality of murine model of food allergy by intragastric sensitization which showed proper peanut specific IgE responses and cytokine productions. We suggest that this model could provide a good animal model for future research in food allergy. (Korean J Asthma, Allergy Clin Immunol 2004;24:428-434)

**Key words:** Peanut allergy, Murine model, Intragastric sensitization

## 서 론

식품 알레르기(food allergy)는 식품 단백질에 대한 IgE 매개성 혹은 non-IgE 매개성 과민반응에 의하여 일어나며, 소화기나 피부 및 호흡기 등의 표적 장기에 다양한 증상을 나타내고 심한 경우에는 아나필락시스 반응을 초래할 수도 있는 흔한

알레르기 질환이다. 발생 빈도는 3세 이하의 소아에서 약 7%에 이르고 성인의 경우는 2% 내외로 특히 소아연령에서 빈발하고, 아토피 소인이 있는 환자에서는 그 유병률이 10% 까지 달하는 흔한 알레르기 질환이다.<sup>1-3)</sup> 한 사람이 평생동안 섭취하는 식품의 양은 약 2~3톤에 달하고 매우 다양한 종류의 식품에 노출되지만, 극히 제한된 종류의 식품만이 식품 알레르기의 원인이 되는데, 이는 대부분의 식이 단백질에 대해서 진화의 과정을 거치면서 자연 면역관용을 획득하기 때문이다.<sup>4)</sup> 이러한 알레르기 질환의 면역병인 규명과 면역관용의 유도를 위한 면역치료제, 약제 개발 등을 위한 연구를 시행하기 위해서는 필수적으로 침습적인 연구 방법들이 동원되며, 더 나아가 명확한 양성 및 음성 대조군의 설정이 요구되는 점을 고려하여 본다면, 인체를 대상으로 하는

본 연구는 한국과학재단 지역대학 연구비 R05-2004-000-12550-0의 보조로 이루어졌음.

책임저자: 이수영, 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지  
아주대학교 의과대학 소아과학교실, 우: 443-721

Tel: 031) 219-5164, Fax: 031) 219-5169

E-mail : jsjs87@ajou.ac.kr

접수: 2004년 10월 29일, 통과: 2004년 11월 30일

실험은 실제적, 윤리적으로 절대적인 한계점이 있다. 이를 극복하기 위해서는 동물모델을 이용한 알레르기 질환에 대한 연구가 활발히 이루어져야 되나, 아직까지는 주로 천식 동물 모델이 주를 이루고 있으며, 식품 알레르기 동물 모델은 초기 단계에 불과하다. 그나마도 주로 난알부민과 우유 단백질에 의한 식품 알레르기 동물 모델정도만이 확립되어있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에서 생산되는 땅콩 조항원을 이용하여 감작 용량 및 감작 경로에 따른 땅콩 특이 항체 반응과 비장세포 증식 반응 및 비장세포 부유물로부터 생성되는 사이토카인을 측정함으로써 땅콩 알레르기 동물 모델을 확립하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 동물 및 땅콩 조항원 제조

연령 4주의 female C3H/HeJ mice를 각 군당 3~5 마리씩 이용하여 동일한 실험을 2회씩 반복하였다. 대두 단백을 주 재료로 하는 기본적인 사료식이를 시켰으며, specific pathogen-free (SPF) 환경에서 3일간 안정시킨 후 NIH에서 제시한 바 있는 “Standard guidelines for the care and use of animals”의 기준에<sup>5)</sup> 의거하여 동물 실험을 진행하였다.

감작을 위한 땅콩은 우리나라에서 시판되는 순수 구운 땅콩을 갈아서 조항원을 만들어 이용하였고, 동일 항원을 이용하여 땅콩 특이 항체들의 검출이나 세포배양 실험에 이용하였다. 조항원 제작 과정을 간단히 알아보면 다음과 같다. 땅콩 가루를 에테르로 탈지화한 후 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 1 : 10 w/v으로 4°C에서 24시간 stirring 하면서 보관한 후 10,000 rpm (4°C)에서 1시간 동안 원심 분리하였다. 여기서 상층액을 얻어 3차 증류수를 이용하여 24시간 동안 투석하였으며, pore의 cut off value는 분자량 3.5 kDa이었다. 이후 -70°C에서 냉동 건조하여 조항원을 얻었다.

### 2. 땅콩 항원의 감작과 유발 시험

땅콩의 경구 감작은 실험 제1일, 2일, 3일 및 1주에 시행

하였고, 제3주에 추가 감작을 시행하였다. 감작 항원의 양과 감작 경로에 따라서 4군으로 나누었으며, 동일한 실험을 2개월 간격으로 2회 반복하였다(Table 1).

경구 감작의 경우는 매번 경구 투여 전 2시간 동안 사료를 제거한 후, 지정된 존대를 이용하여 1 mg 혹은 5 mg의 땅콩 조항원을 0.5 ml PBS에 섞어 위장관을 통하여(intragastric, ig) 감작시켰다. 감작은 제1, 2, 3일, 1주 및 3주에 시행하였으며, cholera toxin 10µg을 항원액과 동시에 경구 투여하였다. 복강 내 감작의 경우는 0.2 ml의 PBS에 10 mg의 alum chloride와 0.1 mg의 땅콩 조항원을 섞어 복강 내로 주사하였고, 감작 시기는 경구 감작의 경우와 동일하였다. 실험 5주째 모든 실험동물은 5 mg의 땅콩 조항원을 0.5 ml PBS에 섞어 30분 간격으로 2회 위장관 내 투여함으로써 유발시험을 시행하였고, 아나필락시스 반응의 정도를 비교 관찰하였다(Table 2).

### 3. 혈청 내 땅콩 특이 IgE 및 IgG1 항체의 측정

실험 진행 1주, 2주, 3주, 4주에는 꼬리 정맥으로부터, 동물 희생 당일인 실험 5주에는 안동맥을 통하여 200~500µl의 혈액을 얻어 혈청 분리 후 보관하였다가 실험에 이용하였다. 혈청 땅콩 특이 IgE 및 IgG1 항체는 각각 ELISA를 이용하여 측정하였고 방법은 다음과 같다. Maxisorp Immuno plate

Table 2. Anaphylaxis symptom score

0: 무증상 혹은 pure naive와 동일한 정도의 일시적인 입주변 scratching
1: 콧등 뿐 아니라 귀 뒤 머리, 등, 어깨, 복부 등을 지속적으로 scratching 및 rubbing
2: 눈두덩, 입술 주변의 부종, 각막 혼탁, 설사, 모근의 수축, 활동의 감소, 호흡수의 증가
3: 천명, 호흡곤란(labored respiration), 입주위, 꼬리, 사지 및 항문의 cyanosis
4: 몸체를 건드려도 도망가지 못할 정도로 행동이 저하되거나, tremor/convulsion 동반
5: 사망

Table 1. Experimental groups according to peanut sensitization

Group	No. of mouse	Dose of peanut	Sensitization route	Adjuvant
I	9	1 mg/mouse	Intra-gastric	CT* 10 ug/dose
II	9	5 mg/mouse	Intra-gastric	CT 10 ug/dose
III	6	0.1 mg/mouse	Intra-peritoneal	Alum chloride 10 mg/dose
IV	8	No sensitization	No sensitization	None

\*CT = cholera toxin.

(Nuck, Denmark)에 2 $\mu$ g/ml의 조항원을 coating buffer (pH 9.6, Sigma, St. Louis, MO)에 녹여 coating하고 4°C에서 16시간 반응시킨다. 다음날 plate를 1% BSA-PBS로 37°C에서 2시간 반응시킨 후 세척하고, 개별 혈청을 IgE 항체의 경우 1 : 10으로, IgG<sub>1</sub> 항체의 경우 1 : 500으로 희석하여 well 당 50 $\mu$ l씩 넣고 4°C에서 overnight시킨다. 다음날 plate를 세척한 후 100  $\mu$ l의 biotin이 부착된 secondary antibody (anti-mouse IgE, IgG<sub>1</sub>)를 0.5 $\mu$ g/ml의 농도로 하여 실온에서 1시간 반응시킨다. 이를 세척 후 avidin peroxidase (PharMingen, San Diego, CA)를 실온에서 30분간 반응시킨 후 6회 세척한다. Plate를 6회 세척한 후 TMB substrate (PharMingen, San Diego, CA)를 첨가하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 2N의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 읽는다. 이때 항체의 반정량 분석은 정제된 total IgE, IgG<sub>1</sub>을 이용한 표준 곡선에 의거하여 corresponding concentration을 산출하였다.

#### 4. 분변 추출액에서의 땅콩 특이 IgA 항체 측정

실험 5주째 유발시험을 시행하면서 배출되는 신선 분변을 실험군 별로 모아서 fecal extract를 얻었다. 즉 fecal pellet 0.1 g 당 1 ml의 0.1% of NaN<sub>3</sub>-PBS 용액을 넣어 4°C에서 20~30분간 보관 한 후 high speed에서 5분간 vortex를 시행하였고, 이를 다시 5,000 rpm으로 15분간 4°C에서 원심 분리하여 상층액을 얻어 냉동 보관하였다가 땅콩 항원 특이 IgA 측정을 위한 ELISA에 이용하였다. 분변 추출액에서의 땅콩 특이 IgA의 측정은 ELISA법으로 시행하였으며, fecal extract는 원액을 사용하였고, 흡광도를 측정하여 상대적 농도를 비교하였다.

#### 5. 항원 및 concanavalin A (Con A) 자극에 의한 비장세포 사이토카인 생성능 비교

실험 제 5주에 생쥐를 희생하여 비장을 얻어 멸균된 2장의 슬라이드를 이용하여 조직을 갈아 단일세포 부유액을 얻었다. 이를 완전세포배양액(10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 1% glutamine이 포함된 RPMI 1640)에 부유시켜 2회 세척한 후 세포수를 세고, 24 well flat bottom 배양 plate에 1 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml 농도의 비장세포를 0.4 ml/well씩 분주하였다. 일부의 well은 땅콩항원(50 $\mu$ g/ml) 혹은 정상식이단백(50 $\mu$ g/ml), 혹은 Con A (2 $\mu$ g/ml)를 첨가하였고, 일부의 well은 배양액만을 첨가하여 72시간 배양하였다. 그 후 각 well로부터 상층액을 얻어 -204°C에서 보관하였다가 실험에 사용하였다. PharMingen (San Diego, CA)의 OptEIA™ set를 사용하여 IFN- $\gamma$ , IL-4를 ELISA법으로 측정하였다. 모든 사이토카인은 상층액의 원액을 사용하였으며, 한 항목에 대하여 각각 2회씩 측정하였다. 각각의 사이토카인 생성 정도를 표준농도 곡선에

의거하여 정량 분석하였다.

#### 6. 항원 및 Con A 자극에 의한 비장세포의 증식 반응

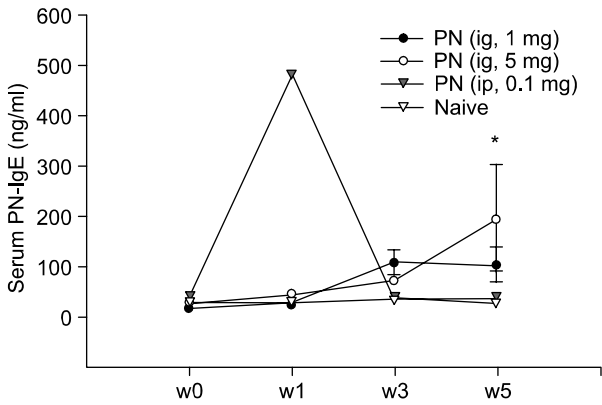
실험 제5주에 생쥐를 희생하여 비장을 얻어 멸균된 2장의 슬라이드를 이용하여 조직을 갈아 단일세포 부유액을 얻었고, 동일한 방법으로 세척 후 세포수를 세어, 96 well flat bottom 배양 plate에 1 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml 농도의 spleen cell을 0.2 ml/well씩 분주하여 땅콩의 조항원, 사료추출물, Con A로 자극하여 세포 증식반응을 비교하였으며, 각각의 실험은 3 well씩 반복하였다. 예비실험에 의하여 비장세포를 24시간, 48시간 및 72시간 배양 후 18시간 동안 1 $\mu$ Ci/well의 <sup>3</sup>H-thymidine pulse를 준 후 세포를 건어 scintillation counter에 방사능을 측정하여 본 결과 48시간 배양 후 <sup>3</sup>H-thymidine pulse를 준 경우가 항원 자극에 의한 증식이 최고에 도달함을 알 수 있었으므로, 본 연구에서는 이를 이용하여 결과를 분석하였다. 감작 항원 및 Con A 자극에 의한 증식의 정도는 배양액만을 처리한 증식 정도를 기준으로 비교하였으며, 증식반응의 정도는 cycle per minute (cpm)으로 표시하였다.

#### 7. 통계 분석

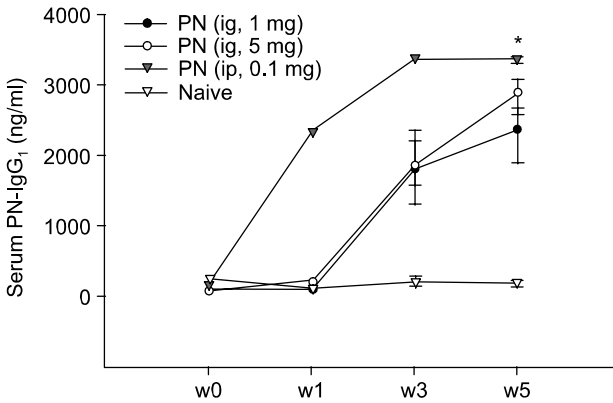
통계의 처리가 필요한 경우에는 개인용 컴퓨터를 이용한 SPSS 4.0 프로그램의 t-test와 one-way ANOVA 분석을 시행하였으며, P 값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유용하다고 판단하였다.

## 결 과

위장관을 통한 땅콩 감작군의 경우 실험 제3주에 의미 있게 높은 혈청 땅콩 특이 IgE 항체가 검출되었고, 이러한 특이 IgE 반응은 5주까지 꾸준히 증가되었다. 또한 1 mg 감작군에 비하여 5 mg 감작군에서 제5주째 특이 IgE 반응이 높음을 알 수 있었다. 복강 내 감작군의 경우는 1주에 급격한 땅콩 특이 IgE의 증가가 관찰되었으나 3주 이후 급격히 감소하였으며 naive의 경우는 전 실험기간 동안 땅콩 특이 IgE가 검출되지 않았다(Fig. 1). 반면 땅콩 특이 IgG<sub>1</sub> (Fig. 2)의 경우는 group I, II, III 모두에서 실험이 진행됨에 따라 급격히 증가되었다. 실험 5주에 시행한 위장관을 통한 유발시험 결과 group I, II, III의 경우 2~4 점의 알레르기 증상점수를 나타낸 반면 naive의 경우는 아무 증상도 유발되지 않았다(Fig. 3). 이러한 유발시험의 증상 점수는 제 5주째의 혈청 특이 IgE 농도가 높을수록 심함을 알 수 있었다. 한편 분변 내 IgA 농도는 모든 군에서 naive군에 비해 높았으며, 특히 땅콩 5 mg을 경구 투여한 군에서 가장 높게 나타났다(Fig. 4). 또한 분변 추출액의 땅콩 특이 IgA의 상대적 농도는 특



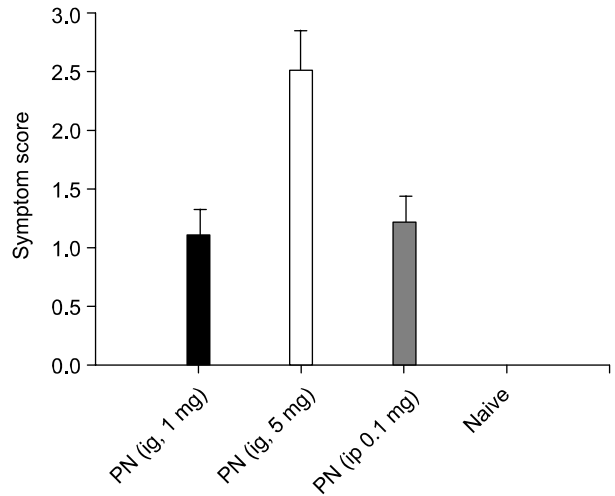
**Fig. 1.** Levels of peanut-specific IgE antibodies during experiment. Individual sera from different groups of mice (n=6-9 in each group) were obtained weekly following initial peanut-sensitization. IgE levels were determined by ELISA. Data are given as mean±SEM of 6-9 individual sera. \*Statistically different among experimental groups,  $P < 0.05$ . ig = intragastric; ip = intraperitoneal.



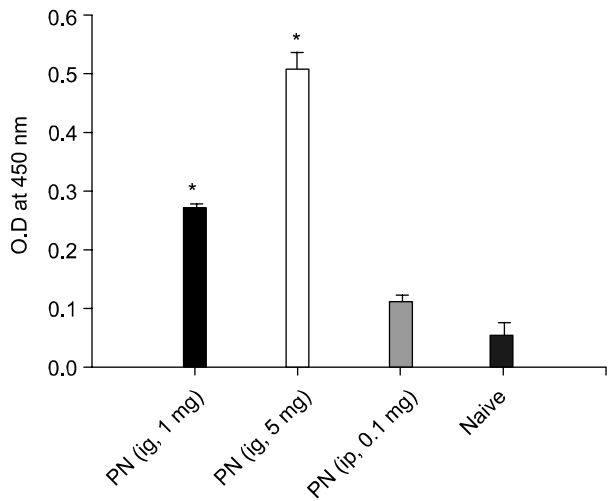
**Fig. 2.** Levels of peanut-specific IgG<sub>1</sub> antibodies during experiment. Individual sera from different groups of mice (n=6-9 in each group) were obtained weekly following initial peanut-sensitization. IgG<sub>1</sub> levels were determined by ELISA. Data are given as mean±SEM of 6-9 individual sera. \*Statistically different among experimental groups,  $P < 0.05$ . ig = intragastric; ip = intraperitoneal.

이 IgE의 농도와 비례하여 증가되었다.

위장관 유발시험 후 group I, II, III의 경우 유사한 정도의 땅콩 자극에 의한 비장세포 증식반응을 관찰할 수 있었으며, naive의 경우는 기저치와 동일하였다(Fig. 5). 72시간 동안 땅콩 자극을 주며 배양한 비장세포의 사이토카인 생성능을 관찰한 결과 위장관 감작군에서 유의하게 높은 IL-4와 INF- $\gamma$ 의 생성을 관찰할 수 있었으며, naive의 경우는 기저치에 해당하였다. 반면 Con A 자극에 의해서는 모든 실험군에서 유사한 정도의 IL-4, INF- $\gamma$ 의 생성이 관찰되었다(Fig. 6, 7).

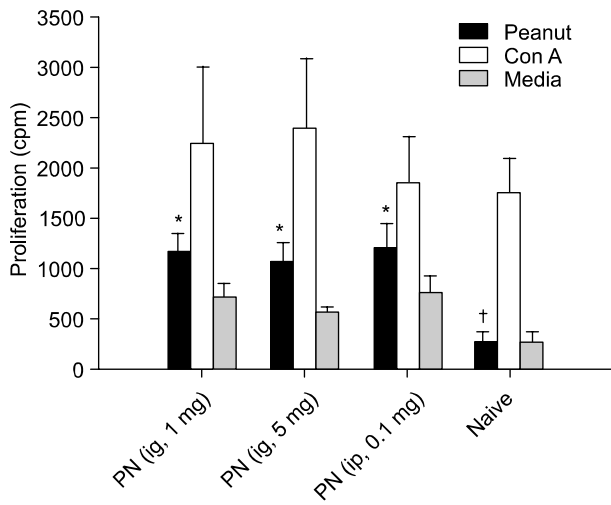


**Fig. 3.** Symptom score at week 5 challenge. 0: no symptom, intermittent questionable scratch, 1: severe scratch, 2: edema, decreased activity, 3: respiratory difficulty, cyanosis, 4: decreased activity after prodding, tremor, 5: death. ig = intragastric, ip = intraperitoneal.

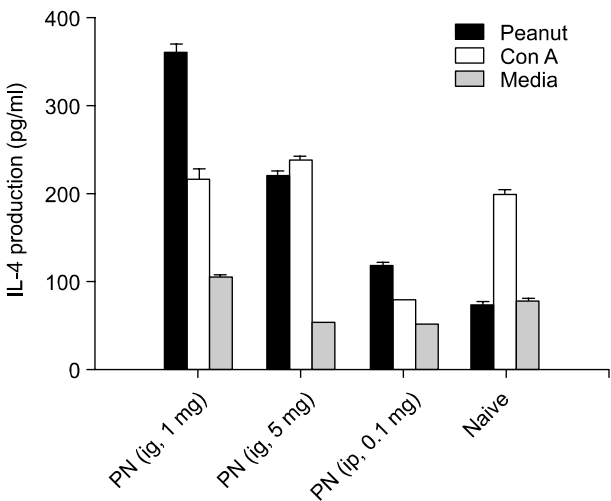


**Fig. 4.** Peanut-specific IgA levels in stool at 5th week after peanut sensitization. Individual stool from different groups of mice (n=6-9 in each group) were obtained weekly following initial peanut-sensitization. IgA levels were determined by ELISA. Data are given as mean±SEM of 6-9 individual sera. \*Statistically different among experimental groups,  $P < 0.05$ . ig = intragastric; ip = intraperitoneal.

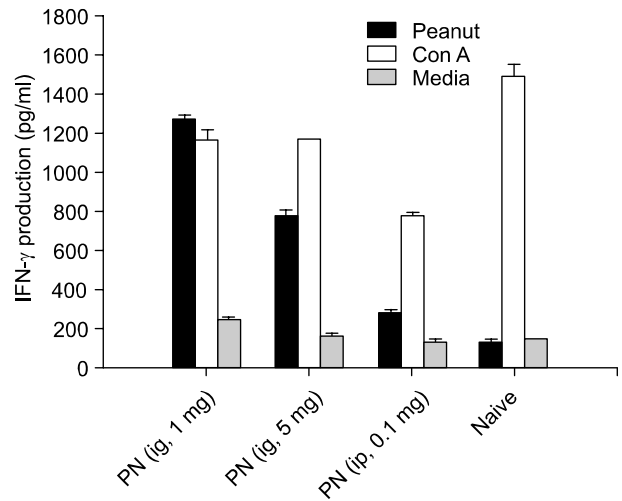
그러나 비장 세포의 IL-4 생성능은 제5주째 혈청 특이 IgE 농도의 절대치와는 일치하지 않았으며, 위장관 감작군인 제 I군과 II군에서 복강 내 감작군인 III군에 비하여 항원 자극에 의한 비장세포 사이토카인 생성능이 증가하였다.



**Fig. 5.** Splenocyte proliferative responses to crude peanut extract stimulation. Spleen cells from peanut allergic mice (n=4) and cholera toxin control mice (n=5) were stimulated with 50 ug/ml of crude peanut extracts, or with Con A. The cells cultured in medium only served as a negative control. Three days later, the cultures received an 18-hr pulse of 1 Ci per well of <sup>3</sup>H-thymidine. The cells were harvested and the incorporated radioactivity was counted. The results are expressed as counts per minute (cpm). \*P < 0.05 vs. † ig = intragastric; ip = intraperitoneal.



**Fig. 6.** Splenocyte IL-4 production at 5th week in experiment. Spleen cells from peanut allergic mice (n=4) and cholera toxin control mice (n=5) were stimulated with 50 ug/ml of crude peanut extracts, or with Con A. The cells cultured in medium only served as a negative control. Levels of IL-4 were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data are given as mean±SEM. ig = intragastric; ip = intraperitoneal.



**Fig. 7.** Splenocyte IFN- $\gamma$  production at 5th week in experiment. Spleen cells from peanut allergic mice (n=4) and cholera toxin control mice (n=5) were stimulated with 50 ug/ml of crude peanut extracts, or with Con A. The cells cultured in medium only served as a negative control. Levels of IFN- $\gamma$  were determined by in 3 day-culture supernatant by ELISA. Data are given as mean±SEM. ig = intragastric; ip = intraperitoneal.

## 고찰

식품 알레르기의 면역병인을 규명하고, 면역 관용의 유도를 위한 면역치료제 개발 및 사용 방법, 약제 개발 등에 필요한 연구를 시행하기 위해서는 침습적인 연구 방법들이 필수적이다. 그러나 병인 규명과 치료제의 개발을 위한 연구를 시작할 때 인체를 이용한 연구를 직접 시행한다는 것은 윤리적으로 문제를 야기할 수 있다. 따라서 적절한 동물 모델을 확립하고 이를 이용하여 초기 연구를 진행하는 방법은 이러한 윤리적 한계를 극복할 수 있고, 다양한 대조군과 다양한 프로토콜을 이용한 연구를 가능하게 한다는 장점이 있다.

위장관 과민증(gut hypersensitivity)에 대한 연구는 이미 1980년대 초부터 활발하였는데, 능동감작(active sensitization)과 수동감작(passive sensitization)에 대한 *in vivo* 및 *in vitro* 연구가 진행되었고, 주로 이용된 항원은 우유의 유청단백과 난알부민 항원이었다. 초기의 동물 실험에서는 항원 특이 IgG 항체(사람의 IgG4, rat의 IgG2a, guinea pig의 IgG1)도 비만세포 표면에 부착되어 활성화시킬 수 있으므로 식품 알레르기 모델에서 IgE의 생성 유도가 필수적으로 요구되지 않았으나, 난알부민을 이용한 rat 모델에서 passive cutaneous anaphylaxis (이하 PCA) 반응과 생리반응이 항원 특이 IgE의 생성 정도와 비례한다는 연구가 있는 후 IgE 생성을 유도하는

동물모델을 확립하려는 시도가 활발해졌다.<sup>6)</sup> 1990년대 초반 이전의 연구들은 주로 rat, guinea pig에서 식품항원 특이-IgE, IgG 및 IgA 항체의 생성 유도에 관한 연구와 항원유발 시험에 의한 생체반응, 항원 운반, 장점막의 분비능 및 투과성, 장운동, 조직학적 변화 등에 초점을 둔 연구들이며, 1990년대 후반부터는 주로 rat과 mouse 모델을 이용한 본격적인 면역병리에 대한 연구가 시작되었다.

식품 알레르기의 연구에 있어서 생쥐 모델의 개발이 활성화된 이유는 생쥐의 조직이나 세포 및 이와 관련한 면역물질의 개발이 급속히 발전하고 있어 시약이나 kit의 구입이 용이하고, 사육과 희생 시 조작이 쉬워 다량의 동물을 여러 군으로 나누어 실험하기에 적절하기 때문이다. 더욱이 다양한 transgenic mice (cytokine knockout mice, IgE deficient mice, enzyme deficient mice 등)의 생산에 힘입어 면역 및 분자생물학적 연구에 박차를 가하고 있다. 그러나 사람의 식품 알레르기와 유사한 만족할 만한 mouse 모델의 확립에는 아직도 많은 어려움이 있는데, 가장 중요한 방해 요소는 경구 투여된 항원에 대한 타고난 면역관용 경향이 있다는 것이다.<sup>7-11)</sup> 동물모델에서 경구 면역관용의 가장 흔한 T세포 관련 기전으로는 clonal anergy, clonal deletion, 조절 T세포(regulatory T cell)의 유도가 있으며, 특히 조절 T세포는 다양한 사이토카인의 영향을 받는다.<sup>12)</sup> 물론 이러한 기전이 경구 면역관용에서 모두 다 나타나는 것은 아니며, 생쥐의 strain,<sup>13,14)</sup> 식이 단백질에 처음 노출된 시기,<sup>15-17)</sup> 투여되는 항원의 종류와 양,<sup>18,19)</sup> 그리고 항원과 함께 사용된 면역보강제<sup>20,21)</sup> 의하여 강력히 영향을 받으므로, 이러한 요인들을 적절히 선택하여 감작 방법, 유발시험 방법, 생체반응, 항체 면역 반응, 세포 면역반응, 조직 반응 등이 사람의 식품 알레르기와 유사한 동물 모델을 만들려는 노력들이 이루어지고 있다.

현재까지 가장 확고히 확립된 식품 알레르기 동물 모델은 Brown Norway rat을 이용한 모델이며,<sup>22)</sup> 생쥐 모델의 경우는 시작 단계에 있으며, 국내에서는 본 연구가 처음이다. 또한 현재까지 보고된 식품 알레르기의 생쥐 모델의 경우도 대개는 경구 감작과 경구 유발시험을 시행하지 못하고 복강 내 감작 혹은 복강 내 유발시험을 이용한 연구들이 많은데, 사람의 경우 식품 알레르기는 경구 감작 및 경구 유발에 의하여 증상이 나타나므로 엄밀히 말하면 이러한 복강내 감작 및 유발을 통한 동물 모델의 경우는 자연적인 식품 알레르기의 모델이라고 생각할 수 없다. 반면 본 연구에서는 상기한 여러 가지 이유로, 사용에 편리한 생쥐를 이용하여 다양한 양의 땅콩 항원을 경구 투여한 결과, 복강 내 감작 및 유발시험에서와 비슷한 정도의 땅콩 특이 항체(IgE, IgG<sub>1</sub>)의 생성을 유발하고, 항원 특이 IL-4 생성을 유도하면서 경구 면역관용이 일어나지 않은, 위장관을 통한 감작

이 이루어진 땅콩 알레르기 모델을 확인할 수 있었다. 아울러 본 연구에서는 1 mg과 5 mg의 땅콩 조항원을 cholera toxin과 함께 실험 제1, 2, 3일, 1주에 초기감작을 시키고, 제3주에 재감작 시키는 프로토콜이 모두 만족할 만한 알레르기 임상 증상과 효과적인 혈청 내 땅콩 특이적 IgE 반응 및 비장세포 사이토카인 생성을 유도할 수 있음을 알 수 있었고, 복강 내 감작에 의한 경우는 항체생성 반응이 너무 즉각적이며 오래 유지되지 못하고, 5주째 비장세포 자극 효과가 떨어져 식품 알레르기의 연구에 사용되기에는 부족함이 있음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과는 추후 식품 알레르기와 관련해 추가적인 연구를 위한 기초 자료로 중요한 역할을 할 수 있으리라 기대한다.

## 결 론

본 연구를 통하여 연구자들이 제조한 땅콩 조항원으로 생쥐에게 경구 및 복강내 감작을 시행해 봄으로써 적절한 땅콩 특이 IgE 항체 반응이 유도되고, 항원 특이 IL-4 생성이 유도되는 땅콩 알레르기의 동물 모델을 확립할 수 있었다. 즉, 1회에 1 mg 혹은 5 mg의 땅콩 조항원을 10 $\mu$ g의 cholera toxin과 함께 위장관 내로 실험 제1, 2, 3일 및 1주에 초기 감작시키고, 제3주에 재감작시키는 프로토콜이 적절한 식품 항원 특이 IgE 반응과 비장세포 사이토카인 생성을 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구에 사용된 땅콩 항원 제조에 도움을 주신 연세대학교 의과대학 알레르기 연구소의 이경은 연구원에게 깊은 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

- 1) Kajossari M. Food allergy in Finnish children aged 1 to 6 years. Acta Paediatr Scand 1982;71:815-9
- 2) Crespo JF, Pascual C, Burks AW, Helm RM, Martin EM. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. Pediatr Allergy Immunol 1995;6:39-43
- 3) Crespo JF, Pascual C, Dominguez C, Ojeda I, Martin MF, Martin EM. Allergic reactions associated with airborne fish particles in IgE mediated fish hypersensitivity patients. Allergy 1995;50:257-61
- 4) Sampson HA. Food allergy. JAMA 1997;278:1888-94
- 5) Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, National Research Council: Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington (DC), 1996
- 6) Crowe SE, Perdue MH. Gastrointestinal food hypersensitivity: ba-

- sic mechanisms of pathology. *Gastroenterology* 1992;103:1075-95
- 7) Ngan J, Kind LS. Suppressor T cells for IgE in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J Immunol* 1978;120:861-5
  - 8) Mowat AM. The regulation of the immune responses to dietary protein antigens. *Immunol Today* 1987;8:93-8
  - 9) Stokes CR, Newby TL, Bourne FJ. The influence of oral immunization on local and systemic immune responses to heterologous antigens. *Clin Experimental Immunol* 1987;52:399-406
  - 10) Melamad D, Friedman A. In vivo tolerization of Th<sub>1</sub> lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *Eur J Immunol* 1994;24:1974-81
  - 11) Friedman A, al-Sabbagh A, Santos LM, Fishman-Lobell J, Polanski M, Das MP et al. Oral tolerance: a biologically relevant pathway to generate peripheral tolerance against external and self antigens. *Chem Immunol* 1994;58:259-90
  - 12) Smith KM, Eaton AD, Finlayson LM, Garside P. Oral tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:S175-8
  - 13) Strobel S. Neonatal oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1996;778:88-102
  - 14) Mowat AM. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunology Today* 1987;8:93-8
  - 15) Lamont AG, Mowat AM, Parrott DM. Priming of systemic and local delayed-type hypersensitivity responses by feeding low doses of ovalbumin to mice. *Immunology* 1999;66:595-9
  - 16) Pierce NF, Cray WCJ. Determinants of the localization magnitude, and duration of a specific mucosal IgA plasma cell response in enterically immunized rats. *J Immunol* 1982;128:1311-15
  - 17) Lycke N, Severinson E, Strober W. Cholera toxin acts synergistically with IL-4 to promote IgG1 switch differentiation. *J Immunol* 1990;145:3316-24
  - 18) Lycke N, Holmgren H. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology* 1986;59:301-8
  - 19) McCaskill AC, Hosking CS, Hill DJ. Anaphylaxis following intranasal challenge of mice sensitized with ovalbumin. *Immunology* 1984;51:669-77
  - 20) Saloga J, Renz H, Lack G, Bradley KL, Greestein JL, Larsen G, et al. Development and transfer of immediate cutaneous hypersensitivity in mice exposed to aerosolized antigen. *J Clin Invest* 1993;91:133-40
  - 21) Sampson HA, Bernhisel-Broadbent J, Yang E, Scanlon SM. Safety of casein hydrolysate formula in children with cow milk allergy. *J Pediatr* 1991;118:520-5
  - 22) Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995;376:177-80
-