

계란 알레르기 환아에서 오리알과 거위알에 대한 교차반응

연세대학교 의과대학 소아과학교실 및 알레르기연구소

김정훈 · 함태영 · 최성연 · 권병철 · 손명현 · 이경은 · 김규연

=Abstract=

Cross-reactivity between Hen's Egg from Goose, Duck and Domestic Birds in Children with Egg Allergy

Jeong Hoon Kim, M.D., Tai Young Ham, M.D., Sung Yeon Choi, M.D.
Kyung Eun Lee, M.D., Byeong Chul Kwon, M.D.
Myung Hyun Shon, M.D. and Kyu Earn Kim, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Purpose : Birds' eggs have been a major source of food for mankind since the time unknown. Among them, chicken eggs have been the most important food source. We examined the allergenic properties of eggs from varying birds on patients with known allergy to chicken eggs, to find out whether they can replace the chicken eggs for the source of nutrient.

Methods : Samples were selected from patients who visited the allergy clinic of the Department of Pediatrics at Yonsei University Medical Center. The serum specific IgE for eggs were measured and allergy skin tests were performed. The serum of the patients with proven egg allergy was then tested for reactivity with eggs from wild and domestic ducks, geese, seagulls, quails, yellow-shelled and white-shelled eggs employing SDS-PAGE and IgE immunoblotting.

Results : All the egg protein showed similar molecular sizes ranging from 24-100 kDa. Their expressions, however, were different, with white eggs, yellow eggs, and quail eggs showing strong reaction, while ducks, geese, and mallard eggs presented with weak reaction. Immunoblotting exhibited reactivity in 35-50 kDa and 25-35 kDa groups. Quail eggs and shells from chicken eggs showed a protein banding of 75-80 kDa. Geese, wild and domestic ducks, quail did not exhibit any cross-reactivity with chicken eggs.

Conclusion : Among patients with egg allergy, cross-reactivity between different chicken eggs was present, but no cross-reactivity was apparent between chicken eggs and other birds' eggs. Therefore, we suggest these eggs as alternative source of food in patients with egg allergy. However further study with larger patient population is still required.

Key Words : Egg allergy, Bird's egg, Chickens, Geeses, Ducks, Domestic animal

서 론

책임저자 : 김규연, 서울시 강남구 도곡동 146-92
연세의대 영동세브란스병원 소아과
Tel : 02)3497-3350 Fax : 02)3461-9473
E-mail : kekim@yumc.yonsei.ac.kr

식품의 섭취는 인간이 생명을 보존하기 위해

서는 필수 불가결한데 상당수의 환자에서 식품을 섭취한 후 이상반응이 유발된다. 그러나 식품 부작용에 관한 연구는 미진하여서 그 정의, 발병 기전, 예방 및 치료 등이 명확히 규명되지 않았고 최근에서야 많은 연구가 진행되고 있다. 식품과 관련된 질환들은 미국 알레르기 및 면역학회와 국립알레르기 및 감염 연구소에 의해서 1984년 정의되었다. 식품이나 식품 첨가물을 섭취한 후에 발생하는 이상반응을 모두 총칭하여 식품 부작용으로 정의하였는데 이중 면역학적 기전이 관련된 경우를 식품 알레르기라 하였다.¹⁾ 식품 부작용들의 20%를 차지하는 것으로 추정된 식품 알레르기는 일부 예민한 사람에서 발생되며, 소량의 식품을 섭취할 경우에도 발생할 수 있다. 이 중 계란 알레르기는 계란의 노른자보다는 흰자가 항원성이 강하며 ovomucoid, ovalbumin, ovomucoprotein 등에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다.²⁾ 계란 단백질에 의한 제 1형(즉시형) 과민반응은 소아의 약 0.5%, 소아 아토피 환자의 약 5%에서 나타난다고 알려져 있으며, 계란 알레르기에 관한 첫 보고는 Schloss 등이 계란을 먹은 즉시 두드러기와 얼굴부종을 보인 14개월의 남아를 기술한 것이다.^{3,4)} 또한 계란 알레르기가 있는 환자에게 MMR 백신을 투여하면 접종 부위의 팽진 및 발적, 급성 두드러기 등이 나타날 수 있으며 드물게는 전신적 과민반응까지 나타날 수 있다.^{5,6)}

계란에 대한 알레르기가 일반인에게도 중요하게 여겨지고 있으나, 식용으로 사용되고 있는 조류의 다른 알들이 계란과 그 반응이 같은지, 대체사용이 가능한지에 대해서는 그리 많은 것이 알려져 있지 않다. 따라서 본 저자들은 국내에서 시판되는 조류의 다른 알들의 단백질 조성을 확인하여 보고, 계란 알레르기를 가진 환아가 시판되는 조류의 다른 알들에 대해서도 교차반응을 보이는지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대상자 선정

2002년 9월부터 2003년 6월까지 연세대학교 의과대학 소아 알레르기 클리닉에 내원하여 병력상 계란 알레르기가 의심되는 환아 9명을 대상으로 피부 시험 및 계란에 대한 특이 IgE를 측정하였다. 환자들의 평균 연령은 27개월이었으며, 평균 총호산구수 및 총 IgE값은 각각 1,441/mm³, 1,784 kU/L이었다.(Table 1)

2. 특이 IgE 측정

특이 IgE는 Pharmacia CAP system(Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden)을 이용하여 측정하였고, Sampson 등이 발표한 내용에 따라 2세 미만에서는 특이 IgE값이 2 kU/L 이상일 때, 2세 이상에서는 7 kU/L 이상인 경우에

Table 1. Characteristics of Study Subjects(n=9)

Patient	Age(mo)	Sex	TEC(mm ³)	Total IgE(kU/L)	Egg-specific IgE (kU/L)
Lee W.	2 9	M	5,200	5,000	>100
Lee M.	1 8	M	300	238	11.8
Kim Y.	2 8	M	570	1,648	25.1
Kim H.	8	M	1,000	241	43.3
Lee S.	4	M	360	188	22.8
Lee S.	4 6	M	770	2,160	18.4
Baik Y.	36	M	1,000	3,856	>100
Kim W.	3 6	F	2,570	2,370	15.5
Kang M.	1 4	M	1,200	358	73.9

*Total eosinophil count

경구 유발 검사 없이 계란 알레르기로 진단하였다.⁷⁾

3. 조항원 생성(Crude Extract)

노란 껍질 달걀, 흰 껍질 달걀, 메추리, 거위알, 오리, 청둥오리알의 흰자만을 4℃에서 90분 동안 10% PBS에서 추출하였다. 추출한 내용물은 원심분리한 후 그 상층 액을 0.22 μm의 여과지를 통해 걸러낸 후 동결 건조시켜 -20℃에서 보관하였다. 추출물들을 Bradford Assay⁸⁾로 정량하였을 때 각각의 단백질 농도는 흰 껍질 달걀은 478 μg/mL, 노란 껍질 달걀은 530 μg/mL이었고, 메추리알은 567 μg/mL, 거위알은 387 μg/mL를 보였고, 오리 및 청둥오리는 각각 310과 355 μg/mL이었다.

4. SDS-PAGE와 immunoblotting

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법에 따라 비환원성 상태에서 15% polyacrylamide running gel을 사용하여 시행하였다.⁹⁾ 난백추출단백(egg white extract proteins)들을 SDS-PAGE로 분리한후, Towbin 등¹⁰⁾이 서술한대로 nitrocellulose membrane으로 옮겼고, 이를 먼저 5% 탈지우유로 전 처치를 시행하였다. 달걀 알레르기가 있는 환자 9명의 혈청을 모아 1:5로 희석하였고 희석 혈청을 membrane에 결합시켰다. 다음 과정으로 1:1,000으로 희석한 anti-IgE Ab을 결합시켰고 상온 1시간 배양 후 발색하여 anti-IgE Ab와의 결합정도를 관찰하였다.

5. ELISA Inhibition test

먼저, 각 조류의 알들은 일정 농도로 희석하였는데, 흰 껍질 달걀의 경우 40 μg/mL부터 10 μg/mL, 1 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.01 μg/mL로 하였고, 노란 껍질 달걀과 메추리알은 50 μg/mL부터 10 μg/mL, 1 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.01 μg/mL까지 희석하였으며, 거위알과 오리알, 청둥오리알은 30 μg/mL부터 10 μg/mL, 1 μg/mL,

0.1 μg/mL, 0.01 μg/mL로 희석하였다. 각각에 1:5로 희석한 환자의 혈청을 결합시켜 2시간 상온에 둔 후, 다시 4℃에서 12시간 반응시켰다. 흰 껍질 달걀과 노란 껍질 달걀은 10 μg/mL 농도로 50 μL/well씩 미리 coating 시켜 4℃에서 12시간 이상 배양하였으며, 여기에 1% BSA(bovine serum albumin) 200 μL/well씩 넣어 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 여기에 앞에서 농도별로 결합시킨 혈청을 50 μL/well씩 넣고 1시간을 배양하였고, 배양 후 1:1,000으로 희석한 anti-IgE와 1/1,000으로 희석한 streptavidin-peroxidase를 넣은 후 발색하여 450 nm에서 판독하였다.

결 과

1. SDS-PAGE와 IgE immunoblotting

실험에 사용한 모든 조류 알들의 단백질은 24-100kDa의 분자량 사이에서 나타나고 있다. 모든 종류에서 25-35kDa사이에 ovomucoid로 생각되어지는 단백질 띠가 관찰되고 있으며, 35-50 kDa에서는 ovalbumin으로 생각되는 단백질 띠를 볼 수 있었다. 모든 검사한 알의 난백추출 항원들 사이에는 단백질 분포상의 유사성을 볼 수 있었으나, 각각의 표현정도는 달라 노란 껍질 달걀, 흰 껍질 달걀, 메추리알에서는 강하게 관찰되었으나 거위, 오리, 청둥오리의 경우에는 약하게 관찰되었다.(Fig. 1)

계란 알레르기가 있는 환자의 혈청과 각각의 알들의 난백추출항원으로 시행한 immunoblotting을 보면 35-50 kDa과 25-35 kDa에서 관찰되는 단백질은 모든 종류에서 관찰되었으나 그 표현정도의 차이가 있어 노란 껍질 달걀, 흰 껍질 달걀, 메추리알에서 좀더 강하게 관찰되었다. 75-80 kDa에서 노란 껍질 달걀, 흰 껍질 달걀, 메추리알에서 단백질이 관찰되었으나, 거위알, 오리알, 청둥오리알의 경우에는 보이지 않아 그들 간의 차이를 볼 수 있었다.(Fig. 2) 그림으로

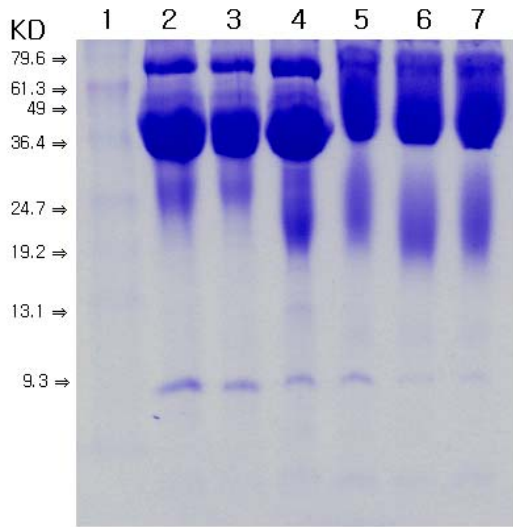


Fig. 1. SDS-PAGE gel of egg white proteins from hen (lanes 2 and 3), quail (lane 4), goose (lane 5), duck (lane 6), mallard (lane 7), molecular weight marker (lane 1). SDS-PAGE was carried out according to Laemmli, with use of nonreducing conditions and 15% polyacrylamide running gel. The Extract proteins separated by SDS-PAGE and were transferred onto nitrocellulose membrane as described by Towbin et al.

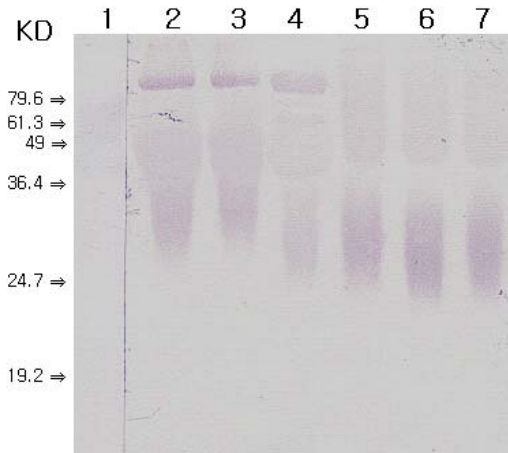


Fig. 2. IgE immunoblotting from the SDS-PAGE gel of egg white proteins from hen (lanes 2, 3), quail (lane 4), goose (lane 5), duck (lane 6), mallard (lane 7), molecular weight marker (lane 1). Immunoblotting of IgE-binding protein was carried out from plasma of 9 egg allergy patients after being diluted by one fifth.

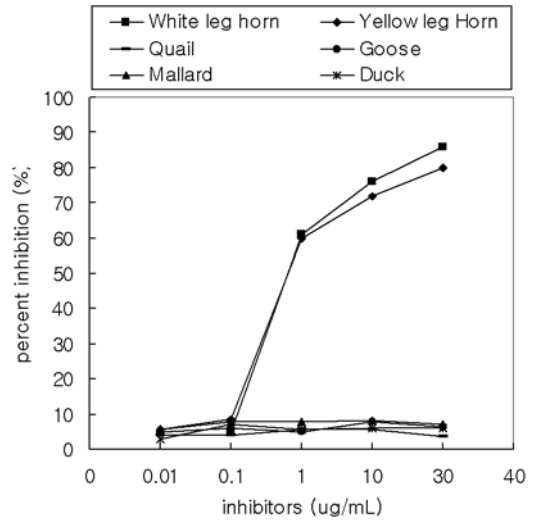


Fig. 3. Inhibition ELISA test of white leg horn, yellow leg horn, quail, goose, duck, mallard by white leg horn egg white.

보여주지 않았으나 buffer 용액으로 시행한 대조 실험에서는 어떤 단백질도 관찰되지 않음을 볼 수 있었다.

2. ELISA inhibition test

흰 껍질 달걀과 노란 껍질 달걀을 coating 한 well에, 미리 계란 알레르기 혈청과 결합한 서로 다른 농도의 알의 난백추출항원(흰 껍질 달걀, 노란 껍질 달걀, 메추리알, 거위, 오리, 청둥오리)과의 교차반응 여부를 살펴보았을 때, 흰 껍질 달걀과 노란 껍질 달걀에서는 서로 교차반응이 있었고 50% inhibition 농도는 각각 0.83 $\mu\text{g/mL}$ 과 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 메추리알, 거위알, 오리알, 청둥오리알들에서는 양쪽 모두에 교차반응을 볼 수 없었다.(Fig. 3, 4)

고 찰

식품 알레르기 질환의 흔한 원인 식품으로는 소아에서는 우유, 계란, 대두, 밀 및 콩 등이 있고 성인에서는 갑각류와 콩이 거론되며, 그 외에도 닭고기, 돼지고기, 옥수수, 키위, 오렌지 및

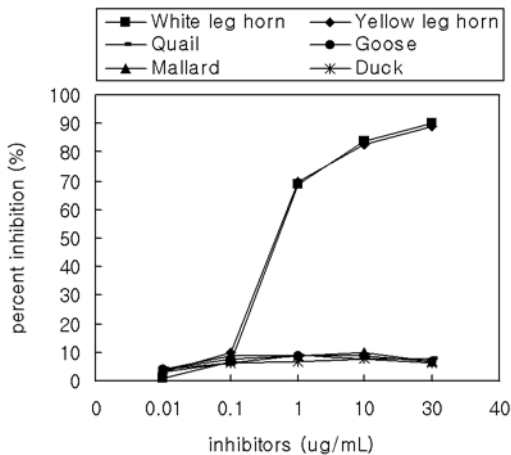


Fig. 4. Inhibition ELISA test of white leg horn, yellow leg horn, quail, goose, duck, mallard by yellow leg horn egg white.

파인애플 등이 비교적 알레르기성이 강한 식품으로 알려져 있다.¹¹⁾ 1995년 김 등¹²⁾이 시행한 식품 알레르기원인 식품의 빈도 검사상 10세 미만에서는 계란이 가장 많았고 10세 이상에서는 복숭아가 가장 많았다. 이런 식품 알레르겐의 특징을 살펴보면 분자량이 10-80 kDa 사이이고 당화단백(glycoprotein)이며, 일반적으로 열이나 압력을 가하거나 효소로 처리하면 항원성이 감소될 수 있는 특징이 있어, 일반적으로 익히지 않은 식품이 요리하여 익힌 식품보다 알레르기성이 더 강한 것으로 알려져 있다.^{13, 14)}

계란 알레르기는 그 원인 항원이 난백으로 6개의 주요 단백질 ovalbumin, ovomucoid(trypsin inhibitor), conalbumin(ovotransferrin), ovomacroglobulin, ovomucin, lysozyme으로 구성된다. 먼저 ovomucoid는 Gal d 1으로 많은 연구에서 이름 지워진 단백질로 egg white protein의 10%를 차지한다. 이는 28 kDa의 분자량을 가진 당화단백으로 4.1의 isoelectric point (pI)를 가지고 있다. Ovomucoid는 가장 중요한 원인 항원으로, 특히 pepsin에 내성이 있고 열에 강한 epitope이 임상적으로 의미 있다고 알려져 있다. 따라서 가열 처리된 난백 혹은 ovomucoid

가 제거된 난백이 알레르기 항원성이 낮다고 알려져 있다.¹⁵⁾ 둘째로, 난백 알부민(Ovalbumin) (Gal d 2)으로 불려지는 것은 난백 중 가장 풍부한 단백질이며 monomeric phosphoglycoprotein으로 분자량은 42.6 kDa이고 4.5의 pI를 가지고 있다. Ovotransferrin은 80 kDa과 6.0의 pI를 가지고 있으며, lysozyme은 14.3 kDa이며 10.7의 pI를 가진다. 본 연구에서도 가장 강하게 관찰된 부분은 ovalbumin으로 생각되는 부분으로 모든 검체의 35-50 kDa에서 관찰되었으며, 이외에 75-80 kDa 사이에서는 노란껍질 계란과 흰껍질 계란, 메추리알에서 ovotransferrin으로 생각되는 부분이 보였다. 25-35 kDa 사이에 ovomucoid로 생각되는 부분이 관찰되었고, 일부 논문에서 달걀과 다른 조류 알의 ovoalbumin과 conalbumin 사이에 유사성이 있으며, 이는 칠면조, 오리알, 거위, 갈매기 순으로 감소하게 된다고 발표한 바 있다.¹⁶⁾ 이번 결과에서도 ovalbumin으로 생각되는 부분의 단백질은 모두에서 보였지만 개체에 따라서 약간씩 다른 정도를 보이고 있었는데, 이는 같은 단백질이라도 개체 간에 단백질의 표현정도에 따라 차이가 있을 수 있기 때문이다.

생물학적으로 같은 과(family)에 속하는 식품들 사이에는 교차반응을 보일 수가 있음이 알려져 온 바, 일부 연구에서 조류의 여러 종류 알 간의 교차반응에 대한 보고가 있어 왔다. Langeland는 다양한 종류의 조류의 ovalbumin, ovomucoid, ovotransferrin 등은 정도에 따라 차이가 있지만 인간의 IgE와 결합할 수 있다고 주장하였다. 또한 칠면조알, 오리알, 거위알, 갈매기알 등에는 계란의 난백과 교차 반응하는 단백질이 있으며 일반적으로 교차반응의 정도가 조류의 종류에 따라 다른 것으로 주장하였다.¹⁶⁾ 그러나 본 연구에서는 메추리알 및 거위와 청둥오리, 오리알 모두에서 계란과의 교차반응은 관찰되지 않았다. 이것은 아마도 종에 따라서 단백질의 분포는 유사하지만 표현정도에 차이가 있어

inhibition이 되지 않는 것으로 추측되나 보다 자세한 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

결론적으로 이번 연구에서는 각 조류 알들 사이에 단백질의 유사성은 있었으나, 그 표현정도에 다소의 차이를 보이고 있었으며, immunoblotting상에서 살펴보면 흰 껍질 달걀, 노란 껍질 달걀, 메추리알에서 거위, 오리, 청둥오리에서 보다 좀 더 강한 결합을 관찰할 수 있었다. 또, 계란 알레르기 환아의 혈청으로 시행한 계란과 계란 이외의 다른 조류 알간의 교차 반응은 관찰할 수 없었다.

요 약

목적 : 계란은 어린아이들에게서 흔히 알레르기를 유발하는 식품으로 알려져 왔다. 이에 계란 알레르기를 가지고 있는 환아에게서 조류의 다른 알들(거위, 오리, 메추라기)에 대한 알레르기 반응 여부를 조사하여 종간의 차이를 확인하고 대체 여부를 가늠하고자 한다.

방법 : 2002년 9월부터 2003년 6월까지 연세대학교 의과대학 소아 알레르기 클리닉에 내원하여 병력상 계란 알레르기가 의심되는 환아를 대상으로 피부 시험 및 계란에 대한 특이 IgE를 측정하여, 계란 알레르기로 확인된 환아들의 혈청으로 거위알, 오리알, 청둥오리알, 메추리알, 노란 껍질 달걀, 흰 껍질 달걀의 환자 추출물에 대한 SDS-PAGE와 IgE immunoblotting을 시행하였다.

결과 : 사용한 모든 알의 단백질은 24-100 kDa의 분자량 사이에서 비슷한 양상으로 나타났으나 각각의 표현정도는 달라 노란 껍질 달걀, 흰 껍질 달걀, 메추리알에서는 강한 반응을 보였으며 거위, 오리, 청둥오리의 경우에는 약한 반응을 보였다. Immunoblotting에서는 25-35 kDa 사이와 35-50 kDa 사이의 단백질이 관찰되었고, 흰 껍질 달걀과 노란 껍질 달걀, 메추리알에서는 75-80 kDa의 단백질 띠가 관찰되었다. 교차반

응 실험에서는 거위알, 청둥오리알, 오리알 및 메추리알과 달걀사이에 교차반응은 보이지 않았다.

결론 : 계란 알레르기가 있는 환아에서 계란 종간의 교차반응은 있었으나 계란과 다른 조류 알과의 교차반응은 관찰할 수 없었다. 이에 본 연구로써 계란 알레르기 환아들의 대체식이로의 가능성을 제시하는바 향후 더 많은 환아들을 대상으로 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) National Institute of Allergy and Infectious Disease. Adverse reactions to foods. NIH Publication 1984.
- 2) Jeong BJ. Food allergy. *Pediatr Allergy Respir Dis* 1997;7:8-12.
- 3) Ford RP, Taylor B. Natural history of egg hypersensitivity. *Arch Dis Child* 1982;57:649-52.
- 4) Lee KS, Lee SY. Two Children with Egg Allergy who developed Systemic side Reaction with MMR Vaccine. *Pediatr Allergy Respir Dis* 1998;8:280-5.
- 5) Herman JJ, Radin R, Schneiderman R. Allergic reactions to measles(rubeola) vaccine in patients hypersensitive to egg protein. *J Pediatr* 1983;102:196-9.
- 6) Virant FS. Systemic reactions. *Immunol Allergy Clin North Am* 1995;15:553-66.
- 7) Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S540-7.
- 8) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- 9) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- 10) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
- 11) Charmdra RK, Gill B, Kumari S. Food allergy

- and atopic disease: Introduction and overview. *Clin Allergy* 1995;13:293-314.
- 12) Kim KE, Jeong BJ, Lee KY. The incidence and principal foods of food allergy in children with asthma. *Pediatr Allergy Respir Dis* 1995;5:96-106.
- 13) Lemanske RF Jr, T aylor SL. Standardized extracts, foods. *Clin Rev Allergy* 1987;5:23-36.
- 14) Sly R. Pediatric allergy. *Medical Examination* Publication. 1985.
- 15) Jeong EH. Food allergen. *Pediatr Allergy Respir Dis* 2003;13:13-9.
- 16) Langeland T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white, VI: occurrence of protein cross-matching with allergen in hen's egg white as studied in egg white from turkey, duck, goose, seagull and hen egg yolk, and hen and chicken sera and flesh. *Allergy* 1983;38:399-412.