

## 한국산 집먼지진드기 전충체 조항원에서 알레르겐의 표준화 : *In vitro* 방법에 의한 표준화

연세대학교 의과대학 내과학교실  
김철우 · 박중원 · 홍천수

### Allergen standardization of the whole body extracts of the Korean house dust mites by *in vitro* method

Cheol Woo Kim, Jung Won Park, and Chein-Soo Hong

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

**Background :** House dust mites have been known as the most important inhalant allergens in respiratory allergic diseases. By numerous *in vivo* and *in vitro* studies, *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) have been recognized as the most important species among family Pyroglyphidae in Korea. Since environmental factors may have influences on the pathogenesis of allergic diseases, studies using Korean house dust mites(HDM) for the immune and biologic reactions of HDM-sensitive allergic diseases are considered as significant.

**Materlals and Method :** Thus we made in-house two Korean HDM(*D. farinae* and *D. pteronyssinus*) allergenic extracts and preformed the allergen standardization by *in vitro* methods and evaluated the reliabilities of the clinical application.

**Result :** There was 560 $\mu$ g and 680 $\mu$ g of proteins in 1mg of each lyophilized whole body extracts of *D. farinae* and *D. pteronyssinus*. In major allergen quantification using HDM specific monoclonal antibodies, there were 34.6 $\mu$ g of *Der f I* and 17 $\mu$ g of *Der f II* allergens in 1mg of lyophilized *D. farinae* extract, and 21 $\mu$ g of *Der p I* and 18.6 $\mu$ g of *Der p II* allergens in 1mg of lyophilized *D. pteronyssinus* extracts respectively. Evenly distributed many allergenic components including major allergens were identified in in-house HDM extracts by SDS-PAGE and immunoblot analysis. Both *D. farinae* and *D. pteronyssinus* were seen as does-dependent inhibition pattern by ELISA inhibition test. The amounts of allergen for the fifty percent

\* 본 연구는 96년도 보건의료기술 연구개발사업의 연구개발비 (HMP-96-M-2-0013)로 이루어졌다.  
통신저자 : 연세의대 내과 홍천수

inhibition were 0.19 $\mu\text{g}$  of *D. farinae* and 0.08 $\mu\text{g}$  of *D. pteronyssinus*.

**Conclusion :** As there were relatively large amounts of major allergens in in-house made HDM whole body extracts, we could make a conclusion that they had good allergenic activities. Thus it is considered as clinically useful and reliable allergenic extracts.

**Key words :** *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, allergen, standardization

## 시 론

집먼지진드기를 포함한 알레르겐은 여러 단백 성분의 복합체이다. 이러한 알레르겐은 추출, 제조 및 취급하는 과정중 여러 요인에 의하여 그 최종 구성성분, 항원성의 정도 및 안정도가 영향을 받게된다. 그러므로 이러한 알레르겐을 알레르기 질환의 진단과 치료에 유용하게 사용하기 위해서는 표준화가 필수적이다. 그러나 현재 시판중인 검사용 알레르겐 시약과 치료용 알레르겐은 제조 회사마다 포함된 알레르겐의 함량이 매우 다양하여 정량화되어 있지 못한 실정이다<sup>1-3)</sup>. 그러므로 국제적으로 알레르겐을 표준화하려는 노력이 경주되고 있으며 알레르겐을 표준화하는 방법으로는 *in vitro* 및 *in vivo* 방법이 있다.

*In vitro* 방법에 의한 알레르겐의 표준화는 SDS-PAGE, IEF(Isoelectcic focussing), CRIE (Crossed radioimmuno eectro puocessis)를 이용하여 알레르겐의 구성 성분을 밝히며, 면역효소법, RAST로 항원성을 측정하며 ELISA inhibition, RAST inhibition 등으로 특이성 및 강도를 측정한다. 한편 *in vivo* 방법에 의한 알레르겐의 표준화는 피부 단자시험 또는 피내시험을 통하여 알레르겐성(allergenicity)을 측정한다<sup>4)</sup>.

현재까지 우리나라에서는 알레르겐의 표준화에 대한 연구가 충분하지 못한 상태이며 또한 국산 알레르겐의 제조 및 이용에 대한 체계적인 연구는 거의 전무한 상태이다. 이에 본 연구에서는 우리나라 집먼지에서 채집하여 순수 제대 번식

사육한 두종의 집먼지진드기(*D. farinae* 및 *D. pteronyssinus*)에서 제조한 전총체 조항원을 대상으로 *in vitro* 방법에 의한 알레르겐의 표준화를 시행하여 in-house reference로 삼으며 이의 임상 적용 즉, 알레르기 질환의 진단 및 치료에 있어서 국산 알레르겐의 이용에 대한 타당성을 알아보려 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에 이용한 집먼지진드기는 우리나라 집먼지 속에 서식하고 있는 진드기종 우점종인 *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*) 및 *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) 두종을 계대 배양하고 대량 사육하여 사용하였다<sup>5)</sup>.

### 2. 방법

#### 가. 집먼지진드기 전총체 조항원 제조

사육한 두종의 집먼지진드기를 배지에서 순수 분리한 후 ethylether로 탈지방시키고 1:50w/v으로 phosphate buffered saline (PBS)과 혼합한 뒤 냉장실에서 추출하였다. 추출한 용액을 4°C에서 10,000g로 1시간동안 원심분리하고 상층액을 모아 투석막으로 충분한 양의 2차 중류수를 사용하여 투석하였다. 72시간 투석후 추출액을 다시 4°C에서 10,000g로 1시간동안 원심분리하고 그 상층액을 냉동 건조하여 조항원 분말

을 만든후 -20°C에서 냉동보관 하였으며 단백질 정량, 주알레르겐 정량, SDS-PAGE 및 집먼지진드기 특이항체의 측정 실험에 이용하였다. 조항원 제조 초기에는 PBS에 추출한 시간에 따른 항원성의 차이를 알아보기 위하여 각각 15분, 45분, 90분, 3시간, 8시간, 24시간, 48시간 및 72시간씩 추출하여 각각에 대하여 단백질 정량, ELISA 억제시험을 시행하여 조항원 제조에 가장 적절한 추출시간을 알아보았다.

#### 나. 집먼지진드기 전총체 조항원의 구성성분 분석

##### 1) 조항원내 단백질 함량분석

제조한 조항원내의 단백질을 Bio-Rad사(USA)의 protein assay kit를 이용하여 정량하였다. 조항원을 중류수에 녹여 각각 1mg/ml의 용액으로 만든 후 각각 다섯가지 농도로 회석하였으며 기준물질로 우혈청 알부민[bovine serum albumin(BSA)]을 여러 농도로 회석하여 사용하였다. Microtiter plate well당 회석된 조항원 및 BSA 용액을 각각 160 $\mu$ l씩 넣은 후 Bio-Rad Protein Assay reagent를 각각 40 $\mu$ l씩 넣어 혼합시키고 5분후 automated microplate reader로 570nM에서 흡광도를 측정하였으며 BSA의 양과 비교하여 조항원내의 단백질을 정량하였다.

##### 2) 조항원내 주알레르겐(major allergen) 정량

Sandwich ELISA법으로 전총체 조항원내의 주알레르겐인 group I (*Der f I* 및 *Der p I*) 알레르겐 및 group II 알레르겐의 양을 측정하였다. 약술하면 anti-*Der f I*(6A8), anti-*Der p I* (5H8) 및 anti-*Der II* (1D8) 단크론 항체를 0.1M carbonnate buffer (pH 9.6)에 적당량으로 회석하여 microtiter plate의 각 well당 50 $\mu$ l씩 넣고 냉장실에서 18시간 반응시킨 후 버리고 PBS-tween 20(PBS-T)으로 2회 세척 후, 1% BSA-PBS-T 용액 350 $\mu$ l씩을 각 well에 넣어 실온에서 1시간 반응시켜 well의 단백질 결합능력을 차단시켰다. 각각의 전총체 조항원을 중류수에 녹여 1mg/ml 농도의 용액으로 만든 후

여러 농도로 회석하여 well 당 50 $\mu$ l씩 넣었으며 기준물질로 농도를 알고 있는 *Der f I*(2,500ng/ml), *Der p I*(2,500ng/ml) 및 *Der II* (5,000ng/ml)를 적절히 회석시켜 사용하였다. 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS-T로 3회 세척하고, 500배 회석시킨 biotinylated anti-*Der I*(4C1), anti-*Der II* (7A1) antibody 50 $\mu$ l와 실온에서 1시간 반응시키고 PBS-T로 3회 세척하였다. 500배 회석시킨 streptavidin-peroxidase 50 $\mu$ l를 넣은 후 실온에서 30분간 반응하고 PBS-T로 5회 세척하였다. ABTS 발색용액[ABTS(2,2-azido-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) 28mg을 citrate butter(pH4.2) 50ml에 녹이고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 $\mu$ l를 혼합한 액] 100 $\mu$ l를 넣은 후 5분 후에 2mM NaN<sub>3</sub>용액 100 $\mu$ l으로 반응을 중단한 후 automated microplate reader로 405nM에서 흡광도를 측정하였다.

##### 3) Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)

Laemmli법(Hoefer Scientific Co., San Francisco, CA, USA)을 이용하여 집먼지진드기 조항원 200 $\mu$ l(1mg/ml)와 70 $\mu$ l의 sample buffer(10% SDS 2ml, 2-mercptoethanol 0.5ml, glycine 1.5ml, 0.25M Tris chloride 2.0ml, 0.16% bromophenol blue 1.5ml, 중류수 0.5ml)를 혼합하여 1분간 100°C에서 중탕한 후 전기영동을 시행하였다. 15% running gel과 5% stacking gel을 사용하며 stacking gel은 50V에서 30분간, running gel은 130V에서 2시간 동안 전기영동을 시행하였다. SDS-PAGE가 끝난 gel은 0.01% Coomassie Brilliant Blue R-250 용액으로 염색한 후 10% acetic acid와 30% methanol이 포함된 용액으로 24시간동안 탈색시킨 후 관찰하였다.

##### 4) Immunoblotting

전기영동한 gel을 nitrocellulose paper(Millipore HAHY 304 FO millipore Co.: 0.45um)

로 전이시키고 말린 후 폭 4mm 크기로 잘라서 1% BSA-PBS-T에 2시간 반응시켜 단백질이 결합하지 않은 부위의 단백질 흡착력을 차단시켰다. 환자 혈청 또는 1,000배 회석한 group I (*Der f I* 및 *Der p I*) 및 group II (*Der II*) 알레르겐에 대한 단크론 항체를 넣은 후 18시간 반응시키고 PBS-T로 세척하였다. Biotinylated anti-IgE antibody(1:500w/v) 또는 1,000배 회석한 biotinylated anti-group I 및 anti-group II antibody 용액을 넣어 3시간 동안 반응시킨 후 PBS-T 용액으로 세척하며, streptavidin-peroxidase(1:500w/v)를 넣은 후 1시간 동안 반응시키고 PBS-T 용액으로 5회 세척하였다. 발색용액 [PBS(pH 7.2) : DAB(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma Chemical Co., MO, USA) : 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=50ml: 25mg:5μl]으로 10분간 발색시킨 후 PBS-T로 씻어 말렸다.

### 5) ELISA 및 ELISA 억제 시험

혈청내 알레르겐에 대한 특이 항체는 ELISA법으로 측정하였다. microtiter plate well당 집먼지진드기 전충체 조항원 2μg을 0.1M carbonate buffer(pH 9.6)50μl와 같이 넣어 냉장온도에서 18시간동안 반응시켰다. 1% BSA-PBS-T 350μl씩을 well에 넣어 1시간 동안 반응시켜 well의 단백질 결합력을 모두 차단시켰다. 환자의 혈청을 50μl씩 넣어 실온에서 1시간 이상 반응시키고 PBS-T로 3회 세척한 후 500배 회석된 biotinylated anti-IgE antibody 50μl를 넣은 후 실온에서 1시간 반응시킨 후 3회 세척하였다. 500배 회석된 streptavidin-peroxidase 50μl를 각 well에 넣은 후 30분뒤에 PBS-T로 5회 세척하고 ABTS 발색용액을 100μl씩 넣으며 5분뒤에 2mM NaN<sub>3</sub> 100μl을 넣어 반응을 중단시키고 autoreader로 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험을 정립하기 위해서 집먼지진드기 특이 IgE 항체를 대량(RAST class 4)으로

가지고 있는 환자 20명의 혈청을 함께 모아서 각각의 특이 항체 측정에 가장 적합한 조항원의 농도 및 혈청 회석 배수를 알아보았다.

또한 조항원의 특이성 및 항원성을 조사하기 위하여 ELISA 억제시험을 시행하였다. 집먼지진드기 ELISA에 강양성 반응을 보인 혈청 20개를 동량씩 혼합하여 pool을 만들어 억제시험에 이용하였으며 ELISA의 양성 대조혈청으로 이용하였다. 양성 대조혈청 50μl당 고양이 털, 사슴 털, 바퀴 및 집먼지진드기 항원을 10μg씩 넣어서 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 ELISA를 시행하고 항원 용해액만 넣은 대조혈청과 억제 정도를 비교하였다. 각각의 집먼지진드기 조항원을 양성 대조혈청 50μl당 0.02μg, 0.05μg, 0.1μg, 0.2μg, 0.5μg, 1μg, 2μg, 5μg 및 10μg씩 넣은 후 실온에서 1시간 반응시킨 후 이 억제혈청으로 ELISA를 시행하였다.

## 결 과

### 1. 집먼지진드기 전충체 조항원 제조

실험에 사용할 전충체 조항원 제조에 앞서 조항원 제조에 가장 적절한 전충체의 추출시간을 알아보고자 여러시간으로 나누어 전충체를 추출하여 각각에 대하여 단백질 정량 및 ELISA 억제시험을 시행하였다. *D. farinae* 전충체를 PBS에 1:50w/v으로 혼합하여 각각 15분, 45분, 90분, 3시간, 8시간, 24시간, 48시간 및 72시간 동안 추출하여 고속 원심분리 후 상층액을 단백질 정량한 결과 추출 15분부터 단백질이 검출되었으며 추출시간이 길수록 단백 함량이 증가하는 소견을 보였다. 즉 24시간 추출하였을 때의 단백질 양을 1로 하였을 때 15분 추출시의 단백질 양은 0.84이었으며 72시간 추출시에는 1.41이었다. 또한 양성 대조혈청을 이용하여 상층액 10μl로 ELISA 억제시험을 한 결과 억제되는 정도는 비슷하였으나 72시간 추출시에 가장 많이 억

제되는 소견을 관찰할 수 있었다(Table 1). 따라서 72시간동안 추출하는 것이 단백질 함량이 가장 많으며 항원성이 가장 높은 것으로 판단되어 조항원 제조시 집먼지진드기 전충체를 PBS에 72시간동안 추출하는 방법으로 제조하였다.

## 2. 집먼지진드기 전충체 조항원의 구성성분 분석

### 가. 조항원내 단백질 및 주알레르겐 정량

우혈청 알부민을 이용한 standard curve는  $R^2$  0.99인 정확한 농도-흡광도 관계를 얻을 수 있었으며 이를 이용하여 계산된 집먼지진드기 조항원내의 단백질 양은 냉동 건조 *D. farinae*와 *D. pteronyssinus* 각각 1mg의 조항원당 560 $\mu$ g 및 680 $\mu$ g으로 비교적 많은 양의 단백질을 포함하고 있었다.

단크론 항체를 이용하여 측정한 조항원내의 주 알레르겐 양은 냉동건조한 *D. farinae* 조항원 1mg당 *Der f I* 34.6 $\mu$ g 및 group II 알레르겐 17.0 $\mu$ g이 포함되어 있었으며 *D. pteronyssinus*는 냉동 건조 조항원 1mg에 *Der p I* 21.0 $\mu$ g, group II 알레르겐 18.6 $\mu$ g이 포함되어 있었다 (Table 2).

### 나. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)

항원의 구성 성분을 알아보고자 15% running gel과 5% stacking gel을 사용하여 SDS-PAGE를 시행한 결과 분자량 14,000에서 120,000 dalton사이에 고르게 단백분획이 있음이 관찰되었으며, 특히 주알레르겐인 group I (25,000 dalton) 및 group II (14,000 dalton) 알레르겐을 포함하는 분자량 14,000에서 30,000 dalton 사이에 높은 분획이 있음이 관찰되었다(Fig. 1).

### 다. Immunoblotting

각각의 집먼지진드기에 대하여 특이 IgE 항체를 대량(RAST class 4)으로 가지고 있는 환자 20명의 혈청을 pool로 만들어 시행한 immunoblotting상 특이 항체와 결합하는 분자량 14,000

**Table 2.** Amounts of group I(*Der f I* and *Der p I*) and Group II allergen in house dust mite allergenic extracts

	D. farinae ( $\mu$ g/mg extract)	D. pteronyssinus ( $\mu$ g/mg extract)
<i>Der f I</i>	34.6	(-)
<i>Der p I</i>	0.7	21.0
Group II	17.0	18.6
<i>Der f I/Der p I</i>	2.04/1	1.13/1

**Table 1.** Protein amounts and ELISA inhibition of *D. farinae* extracts according to extraction time

Extract Time	15min	45min	90min	3hr	8hr	24hr	48hr	72hr
Protein* amounts	6.6	6.9	7.2	7.2	8.0	7.9	9.0	11.2
% inhibition of ELISA <sup>+</sup>	55.7	58.7	58.4	63.5	70.2	71.1	83.4	85.1

\*  $\mu$ g/100 $\mu$ l of extract supernatants

+ :ELISA inhibition was done with 10 $\mu$ l of extract supernatants.

dalton 근처의 group II 알레르겐의 단백 분획을 포함하여 특이 IgE 항체와 결합하는 많은 결합분획이 관찰되었다. 그리고 group I 및 group II 단크론 항체를 이용한 immunoblotting상 분자량 14,000 dalton의 group II (*Der f* II 및 *Der p* II) 알레르겐이 확인되었으며 분자량 25,000 dalton의 group I 알레르겐에 대한 단백 분획은 관찰되지 않았으나 이는 group I 알레르겐이 열에 약하여 SDS와 혼합하여 끓이는 과정 중의 단백질 변성으로 인하여 group I 알레르겐에 대한 단크론 항체와의 특이 결합이 나타나지 않은 것으로 사료된다(Fig. 2). 또한 21명의 환자 혈청을 각각 이용하여 시행한 *D. farinae*에 대한 immunoblotting 결과를 살펴보면 환자마다 다양한 특이 IgE 항체결합 양상을 볼 수 있었다. 즉 *D. farinae*에 대한 immunoblotting에서 피부 단자시험상 강양성 반응을 보인 15예(Fig. 3, lane 4-18)중 11예(lane 4-10, lane 13, lane 16-18)에서 주알레르겐인 group II 알레르겐으로 사료되는 분자량 14,000 dalton 부근에서의 결합 분획을 포함하여 여러 특이 IgE 항체 결합

분획을 관찰할 수 있으며 특히 6예(lane 4-9)에서는 분자량 14,000 dalton에서 120,000 dalton 사이에 많은 결합 분획을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 특이 IgE 항체 결합의 양상은 *D. pteronyssinus*에서도 비슷하게 관찰되었는데 18명의 혈청을 이용한 immunoblotting에서 피부 단자시험상 양성반응을 보인 15예 (Fig. 4,

Fig. 2. Immunoblot of house dust mite allergenic extracts probed with: (a) pooled sera from 20 mite-allergic(RAST class 4) patients, (b) monoclonal antibody to group I allergen, (c) monoclonal antibody to group II allergen Lane 1, 3, 5: *D. farinae*, Lane 2, 4, 6: *D. pteronyssinus*.

Fig. 1. SDS-PAGE of house dust mite allergenic extracts. Lane 1: marker protein, Lane 2: *D. farinae*, Lane 3: *D. pteronyssinus*

Fig. 3. Immunoblot of *D. farinae* allergenic extracts probed with a serum of individual patient. Lane 1-3: sera from negative skin test, Lane 4-18: sera from strong *D. farinae* allergic patient (skin test 4+), Lane 19-21: sera from skin test 2+ patient.

lane 4-18) 중 11예 (lane 4-10, lane 12, 13, 17, 18)에서 group II 알레르겐에서의 IgE 항체 결합 단백 분획이 관찰되었으며 6예 (lane 4-9)에서는 분자량 14,000 dalton에서 120,000

dalton 사이의 많은 결합 분획이 관찰되었다 (Fig. 4).

#### 라. ELISA 및 ELISA 억제 시험

제조한 집먼지진드기 전총체 조항원으로 환자의 혈청에서 집먼지진드기 특이 항체를 측정하기에 앞서서 특이 항체 측정의 가장 좋은 조항원의 농도 및 혈청 회석배수를 알아보기 위하여 양성 대조혈청 pool로 전실험을 시행하였다. 그 결과 두종의 조항원 모두에서 well당 2 $\mu$ g의 조항원을 사용하는 것이 적합하였으며 특이 IgE 항체의 측정은 회석하지 않은 혈청을, 특이 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> 및 IgG<sub>3</sub> 항체의 측정시에는 10배 회석한 혈청을, 그리고 특이 IgG<sub>4</sub> 항체의 측정은 2배 회석한 혈청으로 ELISA를 시행하는 것이 좋은 것으로 나타났다. 이러한 전실험의 결과를 바탕으로 ELISA를 시행하여 환자 혈청내의 특이 항체를 측정하였다(결과 생략).

또한 제조한 조항원의 특이성 및 항원성의 정도를 알아보고자 ELISA 억제시험을 시행한 결과 두종의 조항원 모두에서 용량-의존형 억제반

**Fig. 4.** Immunoblot of *D. pteronyssinus* allergenic extracts probed with a serum of individual patient. Lane 1-3: sera from negative skin test, Lane 4-18: sera from patient with *D. pteronyssinus* allergy (+ skin test). Patient of each lane was same with patient of corresponding lane in Fig. 3.

**Table 3.** Inhibition results for *D. farinae*-ELISA with various allergenic materials

Inhibition material	Inhibition amount	% inhibition
Cat fur	10.0 $\mu$ g	1.4%
Deer hair	10.0 $\mu$ g	4.9%
Cockroach	10.0 $\mu$ g	1.0%
<i>D. pteronyssinus</i>	10.0 $\mu$ g	71.9%
<i>D. farinae</i>	0.02 $\mu$ g	7.1%
	0.05 $\mu$ g	19.5%
	0.1 $\mu$ g	31.9%
	0.2 $\mu$ g	50.8%
	0.5 $\mu$ g	75.6%
	1.0 $\mu$ g	91.4%
	2.0 $\mu$ g	94.4%
	5.0 $\mu$ g	95.3%
	10.0 $\mu$ g	96.6%

**Table 4.** Inhibition results for *D. pteronyssinus*-ELISA with various allergenic materials

Inhibition material	Inhibition amount	% inhibition
Cat fur	10.0 $\mu$ g	6.1%
Deer hair	10.0 $\mu$ g	17.7%
Cockroach	10.0 $\mu$ g	12.7%
<i>D. farinae</i>	10.0 $\mu$ g	81.0%
<i>D. pteronyssinus</i>	0.02 $\mu$ g	20.4%
	0.05 $\mu$ g	30.2%
	0.1 $\mu$ g	59.7%
	0.2 $\mu$ g	73.0%
	0.5 $\mu$ g	84.9%
	1.0 $\mu$ g	92.3%
	2.0 $\mu$ g	94.4%
	5.0 $\mu$ g	96.1%
	10.0 $\mu$ g	99.7%

용을 보여 조항원의 특이성을 관찰할 수 있었으며 *D. farinae*는 0.19 $\mu\text{g}$ 에서 *D. pteronyssinus*는 0.08 $\mu\text{g}$ 에서 50% 억제되는 것으로 나타났다. 또한 고양이 털, 사슴 털 및 바퀴 알레르겐으로 억제시험을 시행한 결과 *D. farinae*-ELISA의 경우 다른 알레르겐에 의해서는 억제되지 않으며 *D. pteronyssinus* 조항원에 의해 71.8% 억제되었고 *D. pteronyssinus*-ELISA 경우에도 *D. farinae* 조항원에 의하여 81% 억제되는 소견을 보여 두종의 진드기 사이에 강한 교차반응이 있는 것이 확인되었으며 부분적인 특이 알레르기성 (specific allergenicity)도 존재함이 인정되었다 (Table 3, 4).

## 고 안

기관지천식 등 호흡기 알레르기 질환과 집먼지 진드기와의 관계가 규명된 이후<sup>6)</sup> 알레르기 피부 반응검사, 집먼지진드기에 대한 특이 IgE의 검출, 백혈구에서 히스타민의 유리 및 특이 기관지 유발검사 등을 통하여 집먼지진드기가 호흡기 알레르기 질환의 중요한 원인으로 지목받게 되었다. 세계적으로 집먼지진드기는 가장 중요한 흡입성 알레르겐이며 어린이와 어른 모두에서 가장 흔히 감작되어 있는 알레르겐으로 밝혀져 있다<sup>7)</sup>.

우리나라에서도 최근 호흡기 알레르기 질환이 증가하고 있으며 호흡기 알레르기 환자의 50-80%가 집먼지진드기로 시행한 알레르기 피부반응 검사에 강양성 반응을 보이며<sup>8-11)</sup>, 이들의 2/3에서 특이 IgE 항체가 검출되며 특이 IgE 항체를 가진 기관지천식 환자에서 집먼지진드기 항원으로 기관지천식 유발시험을 시행하면 조기, 후기 또는 이중 천식반응이 나타나며 이 반응의 양상은 집먼지진드기에 대한 특이 IgE 항체의 양과 관련성이 많은 것으로 나타났다<sup>12, 13)</sup>. 한편 우리나라 환자는 *D. farinae*와 *D. pteronyssinus* 두종의 집먼지진드기 모두에 알레르기 반응을 보

이며 또 두 종류에 대하여 모두 특이 IgE 항체를 가지고 있으나 *D. farinae*에 대한 알레르기 반응이 더 크고 이것에 대한 특이 IgE 항체의 양이 더 많다고 한다<sup>14)</sup>. 그러나 집먼지진드기 두종 사이에는 강한 교차 항원성이 있어 환자에게 나타나는 이런 반응은 교차 항원성때문일 가능성도 있으며 또 각종에 대한 특이성도 주장되고 있으므로 진드기 각 종이 독자적으로 감작을 일으킬 가능성도 있다<sup>15, 16)</sup>.

그러나 우리나라에서 시행된 집먼지진드기 알레르기에 대한 여러가지 연구는 외국에서 들여온 집먼지진드기 항원과 외국산 집먼지진드기 전충체 추출물로 시행한 연구결과이기 때문에 엄밀한 의미로는 우리나라 항원에 대한 알레르기 반응의 상태라고 할 수 없는 실정이다. 집먼지진드기가 사람의 탈락 표피와 곰팡이를 먹이로 주로 번식하는데 사육조건에 따른 식이의 차이때문에 집먼지진드기의 알레르겐 성분에 차이가 있는지에 대하여는 아직 검토된 바 없다. 스웨덴에서 자라는 자작나무와 오스트레일리아에서 자라는 자작나무 꽃가루의 알레르겐 성분을 분석한 결과 주알레르겐 성분에서는 특별한 차이를 관찰할 수 없었다<sup>17)</sup>. 집먼지진드기의 알레르겐 성분도 사육 환경에 따른 주알레르겐의 큰 변화는 예상되지 않으나 집먼지진드기가 원인으로 관여하는 알레르기성 질환의 발병에 환경요소가 매우 중요한 인자로 작용하기 때문에 우리나라 알레르기 질환의 원인으로 가장 긴밀하게 관여하는 집먼지진드기에 대한 한국산 알레르겐을 제조하고 그것에 대한 면역반응을 연구하는 것은 매우 의미가 있다고 생각된다<sup>18)</sup>.

집먼지진드기를 포함한 알레르겐은 여러 단백성분 및 당단백질의 복합체이다. 이러한 알레르겐은 추출, 제조, 취급 및 보관하는 과정중의 여러 요인에 의하여 최종 구성성분, 항원성 및 안정성이 달라질 수 있다. 따라서 알레르기 질환의 진단 및 치료에 이용되는 알레르겐이 각 제조회

사마다 항원성이 다르며 같은 회사에서도 제조시기에 따라 항원성이 달라 동일한 결과를 나타낼 수 없다<sup>1-3)</sup>. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 각 알레르겐에 대한 표준화의 필요성이 제안되었으며 국제적으로 알레르겐의 표준화에 대한 노력이 경주되고 있다.

이러한 알레르겐 표준화의 필요성 및 표준화하는 방법의 발달로 집먼지진드기 알레르겐에 대한 표준화도 많이 시행되어 왔다. 현재는 11개 나라 19개 기관의 공동연구로 *D. pteronyssinus*에 대한 국제 표준화 추출물이 나와있는 상태로 개별 추출물에 대한 연구시 참고물질로 이용되기도 한다<sup>19)</sup>. 상기의 국제 표준화와 같이 시행된 연구에 따르면 표준화 대상인 10개의 *D. pteronyssinus* 추출물에 대한 현미경적 검안을 시행한 결과 각각의 추출물에서 집먼지진드기의 성충체, 유충, 애벌레, 알 및 분변의 조성이 다르며 특히 사육배지를 소 또는 말의 성분을 사용하면 동물 단백 성분이 오염되는 결과를 보였다고 한다. 또한 방사면역법으로 측정한 각 추출물의 *Der p I* 알레르겐의 함량은 0.5μg/mg/ml에서 38μg/mg/ml까지 다양한 결과를 보여 진드기의 사육에서 추출까지의 전 과정의 중요성이 확인되었으며 좋은 추출물 검체의 선정이 선행되어야 함을 보였다<sup>20)</sup>. 본 연구에서는 진드기의 사육시, 각 사육조건에 따른 중식 결과를 비교한 결과 포유동물 사료보다 어류 사료를 사용시에 더 좋은 결과를 보여 효소 및 어류 사료를 이용하여 사육하였으며 전충체 추출물내의 다른 동물 물질의 오염에 대한 면역학적 및 현미경적 검사는 시행하지 않았다<sup>5)</sup>.

한편 *D. pteronyssinus*에 민감한 환자의 혈청에서 주알레르겐인 group I 및 group II 알레르겐에 대한 특이 IgE 항체를 제거한 후 *D. pteronyssinus* 추출물에 반응시킨 결과 IgE 반응이 거의 나타나지 않아 항원 추출물에서 주알레르겐 이외의 다른 알레르겐은 그 역할이 미미

하다고 하며 이런 이유로 주알레르겐 함량의 정도가 알레르겐성을 나타낸다<sup>21)</sup>. 8개의 *D. pteronyssinus* 국제표준 추출물에 대하여 주알레르겐을 ELISA 법으로 정량한 결과 *Der p I*은 12-30μg/ml, *Der p II*는 3-15μg/ml이며 *Der p I*과 *Der p II*의 비는 1.1/1에서 6/1로 다양한 결과를 보였다<sup>22)</sup>. 즉 group I 알레르겐은 진드기 배설 분변 성분이며 group II 알레르겐은 진드기 충체 성분이기 때문에 진드기의 사육 및 채집 조건에 따라 group I 및 group II 알레르겐의 함량이 영향을 받을 수 있다<sup>23)</sup>. 또한 외국에서는 group II 알레르겐에 비하여 group I 알레르겐의 중요성이 계속 주장되고 있는데 반하여 우리나라 환자는 group II 알레르겐에 더 강한 면역반응을 보이는 등 개별 환자마다 각 알레르겐에 나타나는 반응이 다양하기 때문에 group I 및 group II 알레르겐이 고르게 포함된 추출물이 보다 우수한 추출물이라고 생각할 수 있다<sup>24)</sup>. 그러한 의미에서 본 연구에서 제조한 조항원내 주알레르겐의 양을 살펴보면 *D. pteronyssinus*에서 *Der p I* 21.0μg/mg/ml, *Der p II* 18.6μg/mg/ml, *Der p I/Der p II* 비 1.13/1로서 위의 국제 표준 추출물내의 함량과 비교할 때 비교적 우수한 추출물임을 알 수 있다.

CRIE에 의하면 집먼지진드기 *D. farinae*의 충체 추출물에는 52개의 항원이 있으며 진드기 배설 분변 추출물에서는 20개의 항원이 있음이 밝혀져 있다. 또한 충체 추출물에는 14개의 특이 IgE 항체 결합 분획이, 분변 추출물에는 7개의 특이 IgE 항체 결합 분획이 있으며 이들 충체 및 분변 추출물 사이에는 서로 다른 분획이 있어 임상 이용시에 집먼지진드기 알레르겐은 충체 및 분변물질을 포함하는 전충체 추출물을 사용하여야 한다고 하였다<sup>25)</sup>. 또한 세밀하게 시행한 immunoblotting 법으로 조사된 집먼지진드기내 알레르겐의 수효는 32개이며 집먼지진드기에 알레르기가 있는 환자 혈청의 50% 이상이 반응하는

알레르겐은 분자량이 32, 30, 25, 16, 14kD인 단백분획이며 이중 분자량 25kD 및 14kD인 group I 및 group II 알레르겐이 환자 혈청의 80% 이상과 반응하는 주알레르겐이라 하였다<sup>16)</sup>. 본 연구에서 제조 조항원의 SDS-PAGE 및 immunoblotting에 의하면 분자량 14,000 dalton에서 120,000 dalton 사이에 고른 특이 IgE 항체결합 분획이 관찰되었으며 anti-Der f II 및 anti-Der p II 단크론 항체를 이용한 immunoblotting상 분자량 14,000 dalton 근처의 group II 알레르겐 분획이 뚜렷하게 나타나고 있다. 분자량 25,000 dalton의 group I 알레르겐의 분획은 뚜렷이 나타나지 않는데 이는 group I 알레르겐이 열에 약한 성질이 있어 전기영동 과정 중 SDS를 포함한 완충제로 끓이는 과정중에 항원의 변성이 일어난 결과일 것으로 사료되며 이는 기존의 다른 연구에서도 동일하게 나타나는 사항이다<sup>22)</sup>. 그러나 본 연구에서 분자량 50,000 dalton 이상에서 많이 나타나는 특이 IgE 항체 결합 분획에 대해서는 자세히 조사되지 못했으며 추후 이런 알레르겐의 성상 및 역할에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약하면 제조한 두종의 한국산 집먼지진드기 전충체 조항원에는 주알레르겐을 포함하여 비교적 많고 고른 분포의 알레르겐이 포함되어 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 in vivo 방법에 의한 알레르겐의 표준화가 필요하다고 생각된다.

## 결 론

집먼지진드기는 알레르기 피부 반응시험, 특이 IgE 항체의 검출 및 특이 기관지 유발시험을 통하여 기관지천식을 비롯한 알레르기 질환의 가장 중요한 원인으로 알려져 있다. 알레르기성 질환의 발병에 환경요소가 매우 중요한 인자로 작용하기 때문에 우리나라 알레르기 질환의 원인으로

가장 긴밀하게 관여하는 집먼지진드기에 대한 한 국산 알레르겐을 제조하고 그것에 대한 면역반응을 연구하는 것은 매우 의미가 있다고 생각된다. 본 연구는 우리나라 집먼지에서 채집하여 순수 계대 번식 사용한 두종의 집먼지진드기 (*Dermatophagoides farinae* 및 *Dermatophagoides pteronyssinus*)의 전충체 조항원에 대한 알레르겐의 함량을 측정하고 구성성분을 분석하는 in vitro 방법에 의한 알레르겐의 표준화를 시행하여 in-house reference로 삼으며 이의 임상적 용, 즉 알레르기 질환의 진단 및 치료에 있어서 국산 알레르겐의 이용에 대한 타당성을 알아보고자 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 우리나라 집먼지속에 서식하고 있는 진드기 종 우점종인 *D. farinae* 및 *D. pteronyssinus* 두종을 계대배양하고 대량사육한 후 알레르겐 추출과정을 거쳐 냉동건조 분말을 얻었다. 각 전충체 조항원 단위무게당 단백질 함량을 측정한 결과 냉동 건조 *D. farinae* 1mg당 560μg, *D. pteronyssinus* 1mg당 680μg의 단백질이 포함되어 있었다.

2. 단크론 항체를 이용하여 조항원내의 주알레르겐을 정량한 결과 냉동건조 *D. farinae* 조항원 1mg당 Der f I 34.6μg, Der f II 17μg이 포함되어 있었으며, 냉동건조 *D. pteronyssinus* 조항원 1mg당 Der p I 21μg, Der p II 18.6μg이 포함되어 있었다.

3. 항원의 구성성분을 알아보기 위해 시행한 SDS-PAGE상 분자량 14-120kD 사이에 고르게 단백분획이 있음이 관찰되었으며 immunoblotting상 특이 IgE 항체와 결합하는 group II 알레르겐을 포함하여 특이 IgE 항체와 결합하는 많은 단백분획이 관찰되었다.

4. ELISA 억제시험상 두종의 전충체 모두에서 용량-의존형 억제반응을 보여 항원의 특이성을 관찰 수 있었으며 *D. farinae*는 0.19μg에서, *D. pteronyssinus*는 0.08μg에서 50% 억제되

었다.

이상의 결과로 제조 집먼지진드기 전충체 조합 원에는 비교적 많은 양의 주알레르겐이 포함되어 있음을 확인할 수 있었으며 알레르기 질환의 진단 및 치료와 같은 임상에 이용이 가능할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 67, 1983
- 9) 조현숙, 이관호, 최연주, 조동규, 김능수: 제 1형 과민반응 질환에서의 피부시험 성적. 알레르기 5:14-22, 1985
  - 10) 윤여운, 이미경, 박해심, 박성삼, 홍천수: 알레르기 환자에서 시행한 피부 단자시험과 혈청 IgE 검사성적. 알레르기 9:385-98, 1989
  - 11) 김철우, 남동호, 홍천수: 기관지천식 환자에서 시행한 피부 단자시험: 연령 및 시대별 비교. 알레르기 14:380, 1994(초록)
  - 12) 이은직, 김준명, 이수곤, 박해심, 오승현, 홍천수: 알레르기 질환에서의 피부단자시험과 RAST성적에 관한 연구. 대한내과학회잡지 32:448-60, 1987
  - 13) 한승희, 이미경, 박해심, 홍천수: 기관지 천식 환자에서 집먼지 천식 유발검사의 결과 예측에 영향을 미치는 인자에 관한 연구. 알레르기 9:255-68, 1989
  - 14) 홍천수: 집먼지진드기에 대한 환자의 감작 상태와 환자 집먼지내 집먼지진드기의 상태에 관한 조사. 알레르기 11:457-65, 1991
  - 15) 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 *Dermatophagoides pteronyssinus*. J Allergy Clin Immunol 79:467-76, 1987
  - 16) Baldo BA, Ford SA, Tovey ER: Toward a definition of the 'complete' spectrum and rank of importance of the allergens from the house dust mite: *Dermatophagoides pteronyssinus*. Adv Biosci 74:13-31, 1989
  - 17) Hemmens VJ, Baldo BA, Bass D, Vik H, Florvaag E, Elsayed S: A Comparison of the antigenic and allergenic components of birch and alder pollens in Scandinavia and Australia. Int Arch Allergy Appl Immunol 85:27-37, 1988
- 1) Eichler I, Gotz M, Jarisch HG, Moss R: Reproducibility of skin prick testing with allergen extracts from different manufacturers. *Allergy* 43:458-63, 1988
- 2) Nelson HS: Effect of preservatives and conditions of storage on the potency of allergy extracts. *J Allergy Clin Immunol* 67:64-9, 1981
- 3) 박해심, 남동호, 채보원: 표준화 방법을 이용한 국내에서 사용되는 여러 가지 아메리카 카 집먼지진드기 알레르겐의 비교. 알레르기 16:19-25, 1996
- 4) Dreborg S: Standardization of allergenic preparations by in vitro methods. *Allergy* 48(S14):63-70, 1993
- 5) 이한일, 홍천수: 한국산 집먼지진드기의 대량 계대 사육. 알레르기 14:378, 1994(초록)
- 6) Voorhost R, Spieksma-Boezeman MIA, Spieksma FThM: Is a mite (*Dermatophagoides sp.*) the producer of the house dust allergen? *Allergie and Asthma* 10:329-34, 1964
- 7) Platt-Mills TAE, de Weck AL: Chapmen: Report of an International Workshop: Dust mite Allergens and Asthma-A worldwide problem. *J Allergy Clin Immunol* 83:416-27, 1989
- 8) 강석영, 최병희, 문희범, 민경업, 김유영: 한 국민 호흡기 알레르기 환자에 있어서의 피부 시험성적에 대한 연구. 알레르기 3:159-

- 18) Evans III R: *Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis.* In Middleton E Jr. Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr. Yunginger JW, Busse WW, eds: *Allergy. Principles and practice*, 4th Ed. St. Louis, Bosby pp 1109-35, 1993
- 19) Ford AW, Seagroatt V, Platts-Mills TAE, Lowenstein H: A collaborative study on the first international standard of Dermatophagoides pteronyssinus(house dust mite) extract. *J Allergy Clin Immunol* 75:676-86, 1985
- 20) Ford AW, Rawle FC, Lind P, Spieksma FTM, Lowenstein H, Platts-Mills TAE: Standardization of Dermatophagoides pteronyssinus: Assessment of potency and allergen content in ten coded extracts. *In Arch Allergy Appl Immunol* 76:58-67, 1985
- 21) Dreborg S, Einarsson R: The major allergen content of allergenic preparations reflects their biological activity. *Allergy* 47:418-23, 1992
- 22) Meyer CH, Bond JF, Chen MS, Kasaian MT: Comparison of the levels of the major allergens Der pI and Der pII in standardized extracts of the house dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus. *Clin Exp Allergy* 24:1041-48, 1994
- 23) Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW, Platts-Mills TAE: Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mite(Dermatophagoides spp). *J Allergy Clin Immunol* 83:1055-67, 1989
- 24) 박중원, 남동호, 홍천수: 성인 호흡기 알레르기 환자에서 집먼지진드기(*D. farinae*)의 주 알레르겐 두종(Der f I 과 Der f II)에 대한 특이 IgE의 측정. *알레르기* 13:476-86, 1993
- 25) Arlian LG, Bernstein IL, Geis DP, Vyzanski-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* 79:457-66, 1987