

우리나라에서 섭취되는 새우의 알레르기 항원성에 관한 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 알레르기 연구소

연세대학교 의과대학 내과학교실*

정병주 · 박경화 · 이현희 · 김규언,

고시환* · 박종원* · 홍천수* · 이기영

서 론

대상 및 방법

새우는 종(species)에 따라 주 알레르겐이 각기 다를 수 있어서 그 분자량이 8.2 kD에서 43kD¹⁻⁴⁾까지 다양한데, 우리나라에서는 새우 알레르기를 진단하는데 외국산 새우로 제조된 알레르겐 추출액을 사용하여 알레르기 피부시험을 실시하고 있는 실정이다.

그러나 우리나라에서 주로 분포하고 섭취되는 새우에 관한 기초연구는 저자⁷⁾등이 실시한 독일바퀴와의 교차반응에 관한 보고가 있을 뿐이다.

새우 알레르겐을 밝혀내고 그 특성을 규명하는 일은 식품 알레르기를 예방하고 진단 및 치료대책을 수립하는 데 도움이 될 수 있다. 이에 저자 등은 우리나라에 분포하고 주로 섭취되는 새우의 알레르기 항원성을 알아보기 위하여 본 연구를 실시하였다.

1. 연구 대상

연세의대 알레르기 클리닉에 내원하여 알레르기 피부시험을 실시하여 양성반응을 보였던 5명의 소아와 5명의 성인 환자들을 대상으로 하였다. 5명의 소아들은 개방형 경구유발시험을 실시하였는데 이중 증상이 유발된 경우를 1군, 증상이 유발되지 않았던 경우를 2군, 병력상 의심이 되지 않거나 환자의 불협조로 경구유발시험을 실시하지 않았던 경우를 3군으로 분류하였고, 알레르기 피부시험에 음성을 보인 기관지천식 환자를 대조군으로 삼았다.

2. 우리나라에서 주로 섭취되는 새우의 채집과 조항원 제조

우리나라에서 채집되는 새우는 총 9개과 15속 23종인데(Table 1), 가장 많이 섭취되는 새우는 대하(*Penaeus chinensis*), 중하(*Metapenaeus joyneri*), 꽃새우(*Trachypenaeus curvirostris*) 및 돛대기새우(*Leptochela glaucilis*)⁸⁾등이다. 저자 등은 국립 서해 수산연구소

본 연구는 1996년도 연세의대 교수연구비 지원으로 이루어졌음

통신저자: 연세의대 소아과 정병주

Table 1. Shrimps distributed in Korea

Family Penaeidae	Family Alpheidae
Penaeus chinensis	Alpheus Japonicus
Penaeus Japonicus	Alpheus distinguendus
Trachypenaeus curvistris	
Trachypenaeus sp.	Family Ogyrididae
Metapenaeus Joyneri	Ogyrides orientalis
Parapenaeopsis tenellus	
Parapenaeopsis sp.	Family Hippolytidae
metapenaeopsis dalei	Heptacarpus rectirostris
Family Sergestisae	Heptacarpus fullirostris
Acetes Japonicus	Latretus mucronatus
Acetes chinensis	Latretus planirostris
Family Pasiphaeidae	
Leptochelia glacilis	Family Pandalidae
Family Palaemonidae	Pandalus sp.
Palaemon gravieri	
Exopaleemon carinicauda	Family Crangonidae
Palaemon sp.	Crangon affinis

의 도움을 받아 상기 4 종의 새우들을 형태학적인 방법을 이용하여 분류하였다(Fig. 1). 채집된 새우들을 약 15분간 끓인 후 육질을 취하여 Waring blender (Waring Products Div., New Hartford, Conn.)로 균등액을 만들어 4°C에서 1일간 보관한 후 24,000 g로 원심 분리하고, 상층 액을 24,000 g로 재차 원심 분리한 후 여과공 크기가 10,000 dalton의 투석막으로

1일간 증류수에 투석하였다. 이것을 냉동건조하여 새우의 조항원으로 사용하였다. 단백질 농도는 Pierce방법으로 측정하였는데 대하, 중하, 꽃새우 및 돛대기새우 조항원의 단백질 농도는 각기 230, 240, 243, 203 ug/ml이었다.

3. Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

새우 조항원을 시료완충액 (0.125 M Tris-HCL, pH 6.4, 4% SDS, 20% glycerol, 5% bromophenol blue)과 1:1 비율로 혼합한 후 95°C에서 5분간 가열한 뒤 4-20% gradient gel을 사용하여 Mini-Gel (Novex, San Diego, CA)로 125V 에서 1시간 30분 전기영동 하였다. 전기영동한 겔은 Coomassie blue 염색하거나 면역이적법 (immunoblotting)을 하였고 분자량은 표준단백을 이용하여 계산하였다.

Table 2. Patients profiles

Case	Age	Sex	Diagnosis	shrimp challenge test
Group 1				
1	16	M	BA	R
2	15	M	BA, AR, AC, EIA	U, GI, R
Group 2				
1	11	M	BA, AR	Negative
2	9	F	AR, AC, AD	Negative
3	8	M	BA	Negative
Group 3				
1	20	M	BA, AR	Not done
2	19	M	BA, FA	Not done
3	21	M	BA	Not done
4	36	M	AR	Not done
5	59	M	AR	Not done

Abbreviation used were: BA; bronchial asthma, AR; allergic rhinitis, AC; allergic conjunctivitis, EIA; exercise induced asthma, AD; atopic dermatitis, R; respiratory symptoms, U; urticaria. GI; gastrointestinal symptoms

4. Immunoblotting

전기영동한 젤의 단백질은 XCell 11 Blot Module(Novex, San Diego, CA)을 이용하여 전이 완충용액 (20mM Tris, 150mM glycine, 20% methanol, pH 8.0) 내에서 25V로 1시간 30분간 cyanogen bromide로 활성화시킨 nitrocellulose membrane(Milipore, 0.24 μ m, Bedford, Mess.)에 이행시켰다. 전이된 nitrocellulose membrane은 1% BSA가 첨가된 TBS/Tween (TBS+0.05% Tween 20) 용액으로 30분간 차단하였다. 여기에 환자의 혈청이나 Dr. Samuel B. Lehrer(Tulane univesity medical center)로 부터 기증받은 갈색새우(*Penaeus aztecus*) 특이 단백항체를 희석하여 실온에서 1일간 반응시켰다. Alkaline phosphatase가 부착된 goat-anti-human IgE 나 goat-anti-mouse IgG+IgM을 각각 실온에서 2시간 반응시킨 후 기질완충용액 (0.5M Tris/HCl, 0.5M NaCl, 50mM MgCl₂)으로 15

분간 세척한 뒤 BCIP/NBT(Sigma chemical Co. Saint Louis, MO)로 발색 시켰다. 한편 표준화 단백질을 옮긴 nitrocellulose membrane은 Amido black으로 염색하였다.

결 과

1. 대상환자들의 임상소견

개방형 새우 경구유발시험을 실시하여 증상이 유발되었던 1군은 2명, 경구유발시험에서 증상이 유발되지 않았던 2군은 3명, 알레르기 피부시험에서 양성반응을 보이거나 경구유발시험을 실시하지 않았던 3군은 5명이였다. 경구유발시험에서 1례는 두드러기, 다른 1례는 두드러기와 위장관 및 호흡기증상이 각각 새우 5 gm과 15 gm을 섭취하였을 때 발현되었다 (Table 2).

2. SDS-PAGE

대하, 중하, 꽃새우 및 돛대기새우 조항원을 SDS-PAGE 후 commassie 염색을 실시한 결과 10개 이상의 단백질로 분리할 수 있었다. 새우의 종에 따라 SDS-PAGE로 분리되는 단백질의 양상이 다를수 있어 대하는 70, 72kD, 중하와 꽃새우는 25, 31kD의 단백질이 관찰되고, 돛대기새우는 저분자량 단백질이 관찰되지 않는 특징이 있으나 4종 모두에서 36kD이 가장 강하게 관찰되었다(Fig. 2).

고 찰

식품 알레르기의 유병율은 전인구의 0.3-7.5%로 비교적 흔히 임상에서 경험하는 질환이며 새우는 중요한 원인 식품 중 하나이다.⁹⁻¹⁴⁾ 새우 알레르기의 임상증상은 두드러기와 같은 피부증상, 위장관증상 및 호흡기증상 등 다양하게 관찰되는데, 소량을 섭취 혹은 흡입하여도 아나필락시스속을 일으킬 정도로 위중한 경우가 적지 않고, 운동유발성 아나필락시스를 유발할 수 있고, 드물게는 사망한 예도 보고되었다.¹⁵⁻¹⁷⁾

알레르겐을 분리하고 그 특성을 규명하는 일은 식품 알레르기의 발병기전을 밝히고 이 질환을 예방하고 진단 및 치료하는데 큰 도움이 될 수 있다. 새우 알레르겐의 분리 및 그 특성을 규명하는 연구는 외국에서는 활발히 진행되어져 있다. Hoffman등⁹⁾은 열에 불내성인 새우의 주 알레르겐을 최초로 분리 하였으며, Antigen-II로 명명하였는데, 이는 341개의 아미노산으로 구성되었고 분자량은 38 kD, pI치는 5.1에서 5.6사이가 된다고 보고하였다. Nagpal등²⁾은 새우의 일종인 *Penaeus indicus* 에서 분자량이 8.2kD인 Sa-1과 312개의 아미노산

3. Immunoblotting

꽃새우 조항원은 1군(lane 1, 2)에서는 71, 67, 36, 31, 21 및 10 kD의 단백질이 알레르기 환자의 항원특이 IgE와 결합하며 그중에서도 36kD의 단백질이 강하게 관찰되었고, 2군(lane 3-5)에서는 IgE와 결합하는 단백질을 관찰할 수 없었다. 3군(lane 6-10)에서는 lane 6과 7에서 71, 67, 36, 34kD 등 다양한 분자량의 단백질과 결합하는 것을 관찰할 수 있으나 1군과 동일하게 36kD 단백질이 강하게 관찰되었다. 또한 미국에서 주로 서식하는 갈색새우-특이 단클론항체(lane 11)도 36kD 단백질과 강하게 결합하는 소견을 보였다(Fig. 3).

으로 구성되고, 분자량이 34 kD, pI치가 5.4-5.8인 Sa-Ⅱ를 분리하였는데 Sa-1은 Sa-Ⅱ의 분절로 추정되어 Sa-Ⅱ가 주 알레르겐이라고 보고하였다. Lehrer등¹³⁾은 멕시코만에서 주로 서식하는 갈색새우인 *Penaeus aztecus*의 주 알레르겐 (Pen a 1)은 312개의 아미노산으로 구성되고, 분자량이 36 kD, pI치가 5.2가 된다고 보고하였고, Crespo등¹⁴⁾은 대서양 연안에 주로 서식하는 *Parapalus borealis*의 주 알레르겐은 36-43 kD 사이일 것으로 보고하였고, Lin등¹⁵⁾은 대만 연안에 주로 분포하는 *Parapenaeus fissurus*의 주알레르겐 (Par f 1)은 353개의 아미노산으로 구성된 분자량이 39 kD, pI치가 5.1-5.4라고 보고하였으며, Leung등¹⁶⁾은 홍콩 등지에서 서식하는 *Metapenaeus enesis*의 주알레르겐 (Met e 1)은 281개의 아미노산으로 구성된 분자량이 34kD 인 단백질이라 보고 하였다. Daul등¹⁶⁾은 갈색새우의 주 알레르겐의 아미노산을 분석하여 protein data bank로 조사한 결과 새우의 주 알레르겐은 근단백의 일종인 tropomyosin으로 보고하였다. 따라서 새우의 종에 따라서 주 알레르겐은 34-43kD으로 다양하지만 이들은 모두 tropomyosin isoform으로 추정된다.

그러나 Morgan등¹⁹⁾은 새우 알레르기의 병력이 있는 31명의 환자들을 대상으로 흰 새우와 갈색새우의 조항원을 만들어서 RAST 검사를 실시하였는데, 1례에서는 흰새우에서만, 2례에서는 갈색새우에서만 RAST 검사에서 양성으로 나왔고, RAST 억제시험 결과 두 종류의 새우들 간에 알레르겐의 정량적인 차이가 있었다. 또한 저자들²⁰⁾이 갈색새우 주 알레르겐의 gene cloning을 실시한 후 peptide library를 제조하여 선별하여본 결과 갈색새우 주 알레르겐에는 혈청 IgE와 결합하는 epitope이 4개 존재하는데 이들 중 1개만이 흰 새우의 epitope과 교차된다. 상기 결과들은 새우의 종류에 따

라 종 특이 epitope이 존재함을 시사해 준다.

알레르기 질환을 진단하고 치료하는데에는 상품화되어 있는 알레르겐 추출액이 널리 이용되고 있다. 제조 회사들은 알레르겐의 강도를 일정하게 하려고 노력하고 있으나, 자연에 존재하는 알레르기를 유발하는 물질은 다수의 단백질로 구성된 복합체로 그중 일부 단백질만이 알레르겐이 되고, 알레르겐의 근본물질 (새우의 경우 새우의 종류)이나 알레르겐을 추출하고 가공하는 방법이 제조회사에 따라 각기 다르기 때문에 알레르겐의 강도는 제조 회사 혹은 batch에 따라서 다를 수 있다²¹⁾. 최근 단클론항체를 이용하여 시판되는 알레르겐 추출액들 간 알레르겐 양을 비교한 바에 의하면 독일 바퀴 추출액 중 Bla g 1은 최고 200배²²⁾, 고양이 털 추출액 중 Fel d 1은 최고 50배 차이가 있었다²³⁾. 또한 저자들이 갈색새우 특이 단클론항체를 이용하여 개발한 새우항원 정량법으로 시판되는 새우 알레르기 피부시험 시약에서 알레르겐 강도를 비교한 결과 제조회사에 따라 최고 8배까지 차이가 있었다²⁴⁾.

현재 우리나라에서 알레르기 피부시험에 사용되는 새우 알레르겐들은 외국에서 제조된 것들 이어서 우리나라에서 주로 섭취되는 새우의 알레르겐을 밝히고 외국산 새우와 비교하는 것은 흥미로운 과제로 생각된다. 다행히 우리나라에 주로 서식하는 새우의 주 알레르겐은 외국산 새우와 유사한 tropomyosin으로 추정되거나 보다 다수의 환자를 대상으로 한 실험을 실시하여 확인하고 epitope level에서의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

식품 알레르기의 근본적인 치료는 원인 식품을 장기간 금식시키는 것이나 현재의 식생활은 대부분 여러 종류의 식품들을 함께 조리한 가공 식품을 섭취하게 되므로 회피요법이 효과적으로 시행되지 못하는 경우가 흔하다.

최근 Ikezawa등²⁵⁾은 쌀을 특수 효소 처리하

여, Makasa 등²⁶⁾은 antisense RNA 방법을 이용하여 영양가나 미각에는 손상이 없고 알레르기성만 현저히 감소시킨 저 알레르기 쌀을 개발하였다. 분자생물학적인 방법을 이용한 저 알레르기 식품의 개발은 식품 알레르기의 근본적인 예방 및 치료 대책의 일환이 되리라 사료되며, 우리나라에 주로 분포하는 새우의 주 알레르겐을 규명하는 연구는 향후 저 알레르기 새우를 개발하는데 기초자료가 될 것으로 사료된다.

결 론

새우는 종에 따라 주 알레르겐의 면역화학적 성상 및 그 epitope이 다를 수 있다. 그런데 우리나라에서 주로 분포하고 섭취되는 새우에 관한 연구는 미진한 상태이다. 이에 저자들은 우리나라에서 섭취되는 대하, 중하, 꽃새우 및 돛대기새우의 조항원을 제조하여 SDS-PAGE와 꽃새우로 IgE immunoblotting을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

대하, 중하, 꽃새우 및 돛대기새우는 SDS-PAGE 상 각기 특이한 단백띠를 보이나 36kD이 가장 강하게 관찰되고 꽃새우 immunoblotting에서도 36kD 단백띠가 IgE와 강하게 결합되어 이 단백질이 주 알레르겐으로 추정되었다.

상기 단백질은 갈색새우 특이 단백질항체와도 반응되는 것으로 보아 꽃새우의 36kD 단백질은 갈색새우와 교차반응하였다.

- Abstract -

Identification and characterization of shrimp allergens in Korea

BJ Jeoung M.D, KH Park M.D, HH Lee M.D, KE Kim M.D, SW Koe S.D*, JW Park M.D*, CS Hong M.D*, and KY LEE M.D

Department of Pediatrics, Department of Internal Medicine*, Institute of Allergy, Yonsei University College of Medicine Seoul, Korea

Shrimp is considered one of the major food allergen in Korea. Physicochemical characteristics of major allergen in shrimp are varying between species of shrimp. We purified shrimp allergens which distributed in Korea by use of SDS-PAGE and IgE immunoblotting. The results were as follows: Although the four major shrimps which distributed in Korea, *Penaeus chinensis*, *Metapenaeus joyneri*, *Trachypenaeus curvirostris* and *Leptochela glacilis* showed species specific protein band, 36kD protein band revealed the most prominent one in all four shrimps. Thirty six kD protein band in *Trachypenaeus* reacted with monoclonal antibody specific for *Penaeus aztecus* suggested that *Trachypenaeus curvirostris* cross reacted with *Penaeus aztecus*.

Key word: shrimp, allergen purification

참 고 문 헌

- 1) Hoffman DR, Day ED, Miller JS: The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy* 47: 17-22, 1981
- 2) Nagpal S, Rajappa K, Metcalfe DD: Isolation and characterization of heat stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*). *J Allergy Clin Immunol* 83: 26-36, 1989
- 3) Lehrer SB, Ibanez MD, McCunt ML, Daul CB, Morgan JE: Characterization of water-soluble shrimp allergens released during boiling. *J Allergy Clin Immunol* 85: 1005-13, 1990
- 4) Crespo JF, Pascuala C, Helm R, Sanchez-Pastor S, Ojeda I, Romualdo L, Martin-Esteban M, Ojeda JA: Cross-reactivity of IgE-binding components between boiled Atlantic shrimp and German cockroach. *Allergy* 50: 918-24, 1995
- 5) Lin RY, Shen HD, Han SH: Identification and characterization of major allergen from *Parapenaeus fissurus*. *J Allergy Clin Immunol* 92: 837-45, 1993
- 6) Leung PSC, Chu KH, Chow WK, Ansari A, Babdea CI, Kwan HS, Nagy SM, Gershwin ME: Cloning, expression and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat stable shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 94: 882-92, 1994
- 7) 이기영, 정병주, 이수영, 김규언, 김동수: 한국에 서식하고있는 독일바퀴, 새우, 게 항원의 교차반응에 관한 면역학적 연구. *알레르기* 12: 35-45, 1992
- 8) 차형기, 박영철, 연인자, 김성태, 홍승현, 황선도: 황해새우종 자원조사. 서수연사업 보고서 113-27, 1996
- 9) Sampson HA: Adverse reactions to foods; Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson F Jr, Yunginger JW, Busse WW (eds): in *Allergy principle and practice* 4th ed. Mosby Co. St. Louis, pp 1661-86, 1993
- 10) Lehrer SB: Seafood allergy. *Clin Rev in Allergy* 11: 155-7, 1993
- 11) 이기영, 김규언: 면역요법용 백신을 처방할 때 불필요한 항원을 배제하는 방법에 관한 연구. *알레르기* 8:150-64, 1988
- 12) 홍천수: 알레르기 피부반응검사와 판독방법. *알레르기* 13:(23-32), 1993
- 13) 민경업: 식품 알레르기에서의 피부반응검사, RAST 및 유발반응검사에 관한 연구. *알레르기* 11: 576-84, 1991
- 14) 이기영, 김규언, 정병주: 식품알레르기. 소아 알레르기 및 호흡기 in press
- 15) Waring NP, Daul CB, deShazo RD, McCants ML, Lehrer SB: Hypersensitivity reactions to ingested crustacea: Clinical evaluation and diagnostic studies in shrimp-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol* 76: 440-5, 1985
- 16) Maulitz RM, Pratt DS, Schocket AL: Exercise-induced anaphylactic reaction to shellfish. *J Allergy Clin Immunol* 63: 433-4, 1979
- 17) Yunginger JW, Sweeney KG, Sturmer WQ: Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA* 260: 1450-52, 1988
- 18) Daul CB, Slattery M, Morgan JE, Lehrer SB: Common crustacea allergen: Identification of B cell epitopes with shrimp specific monoclonal antibodies; in Kraft D, Sehon A (eds): *Molecular biology and im-*

- munology of allergens. Boca Raton, CRC, pp 291-94, 1993
- 19) Morgan JE, O'Neil CE, Daul CB, Lehrer SB: Species-specific shrimp allergen: RAST and RAST-inhibition studies. *J Allergy Clin Immunol* 83: 2-1117, 1989
- 20) Reese G, Jeoung BJ, Daul CB, Lehrer SB: Characterization of recombinant-shrimp allergen Pen a 1(tropomyosin). *Int Arch Allergy Immunol* (in press)
- 21) Platts-Mills TAE, Chapman MD: Allergen standardization. *J Allergy Clin Immunol* 87:621-5, 1991
- 22) Pollart SM, Mullins DE, Vailes LD, Hayden ML, Platt-Mills TAE, Sutherland WM, Chapman MD: Identification, quantitation, and purification of cockroach allergens using monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 87: 511-21, 1991
- 23) Chapman MD: Allergen specific monoclonal antibodies: new tools for the management of allergic disease. *Allergy* 43:(7-14), 1988
- 24) Jeoung BJ, Reese G, Daul CB, Lehrer SB: A monoclonal antibody(mAb) based sandwich ELISA to quantify the major brown shrimp allergen, Pen a 1 (tropomyosin). *J Allergy Clin Immunol* 1997 (in press)
- 25) Ikezawa Z, Ikebe T, Ogura H, Odajima H, Kurosaka F, Sase K, Sugiuchi M, Sagiyama A, Suguro H, Suzuki S: Clinical effect of hypoallergenic rice(HRS-1) in atopic dermatitis. *Arerugi* 40: 633-42, 1991
- 26) Matsuda T, Alvarez AM, Tada Y, Adachi T, Nakamura R: Gene Engineering for Hypo-allergenic Rice: Repression of allergenic protein synthesis in seeds of transgenic rice plants by antisense RNA. *Proceedings of international workshop on life science in production and food-consumption of agricultural products, Tsukuba, Japan*