

## 땅콩 알레르기 생쥐모델에서 항 알레르기 효과가 있는 *Lactobacillus* 균주의 선별

아주대학교 의과대학 소아과학교실, 서울대학교 생활과학대학 식품영양학과\*

이기선 · 오세조 · 지근억\* · 이수영

### =Abstract=

#### Selection of Anti-Allergic *Lactobacillus* in Murine Model of Peanut Allergy

Kisun Lee, M.D., Sejo Oh, M.S., Geun Eog Ji, Ph.D.\* and Soo-Young Lee, M.D.

Department of Pediatrics, Ajou University School of Medicine, Suwon,  
Department of Food and Nutrition\*, Seoul National University, Seoul, Korea

**Purpose :** To evaluate the anti-allergic effects of intragastric treatment with various strains of *lactobacillus*, we undertook this study in the murine model of peanut allergy.

**Methods :** Ten groups of mice were sensitized and boosted with 1 mg/dose of crude peanut intragastrically at day 1, 2, 3, 7 and 21. Also, each groups of mice was treated with various strains of *lactobacillus* or PBS starting on the 1st day of sensitization, for 3 weeks daily. During the experiment, peanut specific serum IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> were measured at weekly intervals, and compared at week four which is one week after the end of *lactobacillus* treatment.

**Results :** By treatment with various strains of *lactobacillus*, peanut specific IgE levels were decreased in all treated groups of mice compared to sham-treated mice. And at least six of the 10 groups of mice treated with various strains of *L. casei* or *L. acidophilus* showed remarkable down-regulatory effects on the production of peanut specific IgE antibodies, while the regulatory effects on specific IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2a</sub> antibodies were variable. Especially, *L. casei* IBS041 showed harmonized regulatory effect on the productions of peanut specific IgE, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>.

**Conclusion :** We selected and partly confirmed several strains of *lactobacillus* which showed anti-allergic effects in the production of antigen specific IgE in the murine model of peanut allergy. [Pediatr Allergy Respir Dis(Korea) 2007;17:260-270]

**Key Words :** *Lactobacillus*, Immunoglobulin E, Murine model, Peanut allergy

### 서 론

식품 알레르기는 특정식품에 감수성을 지닌 개

접수 : 2007년 9월 12일, 승인 : 2007년 9월 19일

본 연구는 보건복지부 바이오산업화기술개발사업(제품화/기능성식품) 연구비의 보조로 이루어진 연구임(과제번호 A060546).

책임저자 : 이수영, 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지

아주대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 031)219-5160 Fax : 031)219-5169

E-mail : jsjs87@ajou.ac.kr

인이 원인 식품을 섭취함으로써 식품단백에 대한 IgE 매개성 혹은 non-IgE 매개성 과민반응으로 소화기, 피부 및 호흡기 등의 표적장기에 다양한 증상을 나타내며 심한 경우에는 아나필락시스 반응을 초래할 수 있는 질환으로 서구의 경우 3세 미만 소아의 약 8%, 성인의 약 2%의 유병률을 보인다.<sup>1,2)</sup> 미국의 한 도시에서 아나필락시스의 유병률은 10만 명당 약 21명으로 보고하였고 그

중 약 58%는 식품알레르기에 의한다고 보고하였다.<sup>2)</sup> 한편 우리나라의 경우는 2000년 대한 소아 알레르기 호흡기학회에서 설문조사를 통하여 시행한 전국적 역학조사 결과 식품 알레르기를 한 번이라도 경험한 초등학생은 8.6%, 중학생은 11.3%였고, 의사로부터 식품 알레르기를 진단 받은 경우는 각각 4.1%와 3.8%로 조사되었다.<sup>3)</sup> 이처럼 식품 알레르기는 IgE 매개성 질환의 일환이며 매우 심한 증상을 나타낼 수 있으나 현재까지는 식이제한을 제외하고는 예방법이나 근본적인 치료법이 없는 실정이어서 임상에서 실질적인 어려움이 많은 질환이다.

최근 식품 알레르기의 알레르기 저감화 방법 모색의 일환으로 다양한 방법들이 연구되고 있는 가운데 건강한 사람의 소장과 대장에서 서식하는 주된 정상균총으로서 “생균제(probiotics)” 불리고 있는 ‘유산균(lactic acid bacteria, LAB)’의 항알레르기 효과에 대한 연구들이 주목받고 있다.<sup>4)</sup> 유산균의 항알레르기 효과는 항원 비특이적 면역조절효과에 의하며, 특히 수지상 세포, 조절 T 세포 등에 작용하여, 장점막 면역계의 초기 면역기능의 획득과 유지 및 변화에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>5)</sup> 전 세계적으로 주로 연구되고 있는 유산균은 *lactobacillus*이며, 만성 염증성 장염, 장점막 세포 유래 악성 종양 및 IgE-항체 매개성 식품 알레르기와 아토피피부염 등의 질환의 예방 및 치료에 관한 연구들이 보고되었다.<sup>6-10)</sup>

더욱이 임상적으로는 주산기와 생후 6개월까지 지속적으로 산모와 영아에게 *lactobacillus*를 경구 투여한 경우 2세경에 알레르기가 발생이 50% 이상 감소한다는 보고가 있고, 소아 및 성인 환자를 대상으로 분변을 조사한 결과 알레르기 환자의 경우 정상인에 비하여 유산균의 검출이 감소해 있다는 보고도 있어 아토피 질환의 1차 예방법으로서 유산균 생균제의 이용에 관심이 높아지고 있다.<sup>9, 10)</sup> 한편 우리나라에서도 최근 알레르기 질환과 유산균과의 관련성에 대한 관심이 높아지고 있으며, 식품 알레르기의 동물모델을 이용한 연구

와 아토피피부염 환자를 대상으로 한 소규모 연구들이 제한적으로나마 시행된 바 있다.<sup>11-13)</sup> 그러나 현재까지 보고된 국내외의 연구들은 유산균 제제의 경구투여가 식품 알레르기의 예방법 혹은 치료법의 하나로서 가능성을 제시한 정도이며, 일부의 유산균에만 국한되어 연구가 진행되었다는 제한점이 있어, 보다 다양한 균주를 이용한 연구와 실제로 예방효과 및 치료효과를 임상적으로 증명할 수 있는 보다 많은 연구들이 필요한 실정이다.

한편 일부의 식품 알레르기는 연령이 증가함에 따라 면역 관용이 유도되어서 우유의 경우는 3-5세에 80-85%에서 면역 관용이 유도되는 반면,<sup>14-16)</sup> 땅콩 알레르거나 메밀 알레르기는 면역관용이 잘 생기지 않는 식품 알레르기로 알려져 있다.<sup>17)</sup> 이에 연구자들은 아토피피부염 혹은 식품알레르기의 예방을 위한 유산균 경구투여 임상 연구를 시행하기 전에 최소한의 효능을 지닌 *lactobacillus* 균주의 종류를 선별하기 위하여, 자연치유가 어렵고, 강력한 식품 알레르기의 하나인 땅콩알레르기의 생쥐모델을 이용하여 최근 소장에서 주요 역할을 하는 10종류의 다양한 *lactobacillus*를 대상으로 알레르기 조절능력을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 동물과 시약

생후 5주령의 암컷(female) C3H/HeJ 생쥐를 SLC-Japan (Hamamatsu, Japan)으로 부터 구입하여 연구에 이용하였다. 동물들은 이미 땅콩 단백질 없는 기본적인 chow 식이(Lab Diet, PMI Feed Co. St. Louis, MO)를 시행한 상태였고, 연구 시작 후에도 동일한 조성의 식이를 유지하였으며, 아주대학교 의과대학연구소 동물실에서 specific pathogen free (SPF) condition을 유지하며 NIH에서 제시한 바 있는 “standard guidelines for the care and use of animals” 기준에 의거

하여 사육 및 희생하였다.

경구 면역 보강제로는 cholera toxin (CT) (List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA, USA)로부터 구입하였고, 비장세포의 배양 시 사용된 concanavalin A (Con A) (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)로부터, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> 측정을 위한 항체 및 시약들은 BD PharMingen (San Diego, CA, USA) 으로부터 구입하였다.

## 2. 땅콩 조항원의 제조

땅콩의 조항원은 연구자들의 이전의 연구<sup>18)</sup>에서와 동일한 방법으로 제조하였는데, 간단히 살펴보면 다음과 같다. 한국에서 판매하는 땅콩을 얻어 이를 분쇄한 후 에테르로 탈지방화 한 후, 4°C에서 pH 7.0의 phosphate buffered saline (이하 PBS) 1:10 wt/v으로 24시간 동안 soaking 하였다. 이후 4°C에서 10,000 g로 1시간 원심 분리하여 침전물을 제거한 후, 상층액을 얻어 증류수에 한계치 3.5 kDa으로 48시간 투석하였다. 그 후 -70°C에서 동결 건조하여 항원가루를 얻었고, 얻어진 조항원액의 단백질 농도는 Bio-rad protein assay kit (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 이 때 표준항원으로는 bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

## 3. 생균제 균주의 선택과 배양

암컷 C3H/HeJ mice의 비장 세포로부터 단일 세포를 회수하여 24-well flat bottom에 분주한 후, 열처리 살균 후 동결 건조시킨 *L. casei* 7 strains와 *L. acidophilus* 14 strain을 자극제로 하여 각 well에 48시간 처리한 후 상층액을 얻어 ELISA를 시행한 결과 IL-4와 IL-5의 생성을 억제하고, IFN- $\gamma$ 의 생성 증가효능을 지닌 것으로 확인 선별된 10종의 생균제를 사용하였다. 이들은 de Man, Rogasa, and Shape broth (MRS broth; Difco, Detroit, MI, USA)에 37°C에서 혐기성 배양을 한 후, 4,000 g로 원심 분리하여 침

전된 균주를 0.01 M PBS로 두 번 세척한 후 동결 건조하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였으며 본 연구에서 사용한 유산균의 종류와 양은 Table 1과 같다.

## 4. 땅콩 항원의 감작 및 생균제 치료

땅콩의 감작 방법은 Li 등의 연구<sup>19)</sup>와 같이 위장관을 통하여 시행하였고, 실험 제 1일, 2일, 3일 및 7일에 시행하였고, 제 21일에 추가 감작을 시행하였다. 매번 감작항원 투여 전 2시간동안 사육 식이를 제거한 후 지정된 zonde를 이용하여 한 마리당 땅콩 1 mg와 CT 10  $\mu$ g을 동시에 위장 투여하였다. 알레르기 저감화 효과를 알기 위한 생균제 균주들은 Table 1과 같이 그룹별로 나누어, 연구자들이 *bifidobacteria*를 이용하여 수행한 이전의 연구<sup>11)</sup>에 따라 Fig. 1과 같이 시행하였고, 감작기간 21일 동안 생쥐 한 마리당  $7.5 \times 10^7$  수의 유산균을 위장관 투여하였다.

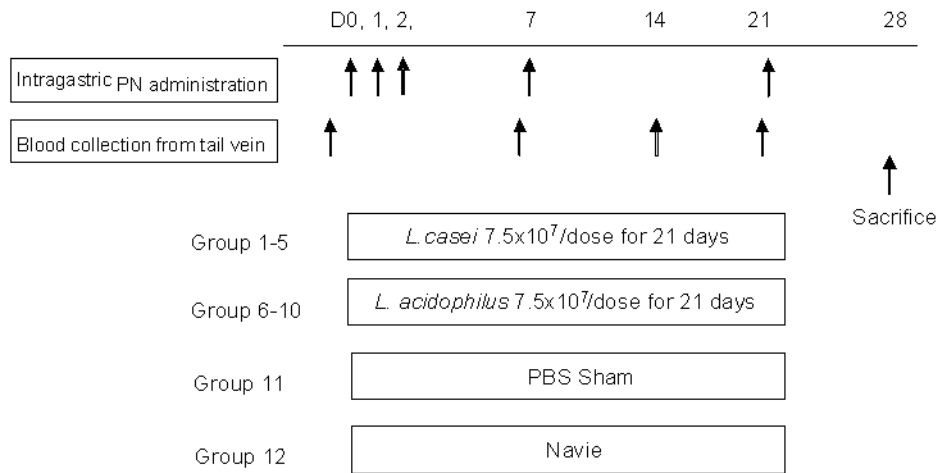
## 5. 혈청 내 땅콩 특이 IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> 항체의 측정

실험 진행 1주, 2주, 3주, 4주까지 마리당 200-500  $\mu$ L의 혈액을 채취하여 혈청 분리 후 -20°C에

**Table 1. *Lactobacillus* Strains Used This Experiment**

Group	Sensitization and treatment	Number of animal
1	PN+ <i>L. casei</i> IBS041	n=8
2	PN+ <i>L. casei</i> 129	n=8
3	PN+ <i>L. casei</i> 196	n=8
4	PN+ <i>L. casei</i> 346	n=8
5	PN+ <i>L. casei</i> 699	n=8
6	PN+ <i>L. acidophilus</i> 340	n=8
7	PN+ <i>L. acidophilus</i> 507	n=8
8	PN+ <i>L. acidophilus</i> 3142	n=8
9	PN+ <i>L. acidophilus</i> AD031	n=8
10	PN+ <i>L. acidophilus</i> 3154	n=8
11	PN+Sham treated with PBS	n=8
12	no sensitization, no treatment	n=8

Abbreviation : PN, sensitization with peanut extract plus cholera toxin



**Fig. 1. Protocol for *lactobacillus* treatment during peanut sensitization.** Peanut sensitization: 1 mg/dose/mouse with 10  $\mu$ g of cholera toxin, at 0, 1, 2, 7, and 21. Day 0–21: oral treatment of *lactobacillus* during peanut sensitization. Two separated experiments were done and analysed put together. Amount of treated colony of *lactobacillus* in this experiments was  $7.5 \times 10^7$ /dose/mouse.

보관하였다가 항체 측정 실험에 이용하였다. 땅콩 특이 IgE, IgG<sub>1</sub> 및 IgG<sub>2a</sub> 항체는 각각 ELISA를 이용하여 다음의 방법으로 측정하였다. Maxisorp<sup>®</sup> Immuno-ELISA Plate (Nunc, Denmark)에 2  $\mu$ g/mL의 땅콩의 조항원을 coating buffer (0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.6, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 녹여 4°C에서 하룻밤 반응시켜 부착시켰다. 다음날 plate를 washing solution (0.05% Tween-20 in phosphate buffered saline, pH 7.0)으로 3회 세척한 후, 불필요한 반응을 억제하기 위해 blocking solution (10% fetal bovine serum in PBS, pH 7.0)로 37°C에서 2시간 반응시킨 후 3회 세척하고, 그룹 당 pooled sera를 1:10 (IgE), 혹은 1:500 (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>)으로 희석하여 well 당 50  $\mu$ L 씩 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 plate를 세척액으로 5회 세척한 후 100  $\mu$ L의 biotin이 부착된 secondary antibody (anti-mouse IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>)를 0.25–0.5  $\mu$ g/mL의 농도로 하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 5회 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (BD PharMigen, San Diego, CA, USA)을 1:1,000으로 희석하여

실온에서 15분간 반응시킨 후 7회 세척하였다. 그 후 TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine; BD PharMigen)을 첨가하여 암실에서 20–30분간 반응시킨 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50  $\mu$ L을 넣어 반응을 중지한 후 microplate reader (Benchmark, Bio-rad, Hercules, CA, USA)에서 450 nm의 흡광도로 읽었다. IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> 값은 각각의 단일 클론 항체(BD PharMigen, San Diego, CA, USA)의 표준농도 곡선을 이용하여 산출하였다.

## 6. 통계 분석

통계의 처리가 필요한 경우에는 SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 시행하였으며 P값이 0.05미만일 때 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 혈청 땅콩 특이 IgE 항체의 측정

유산균을 투여하는 대신 PBS를 위장 투여한 땅콩 감작군인 group 11의 경우는 실험 2, 3, 4주

에 각각  $35.90 \pm 7.89$  ng/mL,  $22.91 \pm 0.18$  ng/mL,  $443.30 \pm 12.06$  ng/mL로 혈청 땅콩 특이 IgE가 실험기간 중 점차적으로 증가하였다. 반면, *L. casei* 와 *L. acidophilus* 균주를 투여한 군에서는 전반적으로 특이 IgE 생성이 감소하였다.(Fig. 2). 즉 유산균 투여를 종료한 시점인 실험 제 4주째 혈청 땅콩 특이 IgE 농도는 *L. casei* IBS041 투여군(group 1)에서  $90.38 \pm 1.23$  ng/mL, *L. casei* 129 투여군(group 2)에서  $328.37 \pm 9.15$  ng/mL, *L. casei* 196 투여군(group 3)에서  $273.49 \pm 3.99$  ng/mL, *L. casei* 346 투여군(group 4)에서  $124.32 \pm 2.76$  ng/mL, *L. casei* 699 투여군(group 5)에서  $85.49 \pm 4.28$  ng/mL로 감소하였으며, 4주째 각 군의 IgE 농도는 통계학적으로 유의한 차이가 있었다. ( $P=0.002$ , Fig. 2A)

또한 *L. acidophilus* 340 투여군(group 6)에서는  $218.83 \pm 4.56$  ng/mL, *L. acidophilus* 507 투여군(group 7)에서는  $47.35 \pm 2.50$  ng/mL, *L. acidophilus* 3142 투여군(group 8)에서는  $63.93 \pm 4.55$  ng/mL, *L. acidophilus* AD031 투여군(group 9)에

서는  $116.24 \pm 1.27$  ng/mL로, *L. acidophilus* 3154 투여군(group 10)에서는 각각  $289.17 \pm 5.20$  ng/mL로 관찰되었다. 한편 땅콩 감작 및 유산균 투여를 시행하지 않은 음성 대조군(group 12)에서는 땅콩 특이 IgE는 측정되지 않았다. 결과적으로 실험 4주에 땅콩 특이 IgE 농도가 PBS 투여군인 group 11의 50% 수준인 200 ng/mL 이하로 생성 감소를 보인 실험군은 group 1, 4, 5, 7, 8, 9임을 알 수 있었고, 각 군별 IgE 농도는 통계학적으로 유의한 차이가 있었다. ( $P<0.05$ , Fig. 2B)

## 2. 혈청 땅콩 특이 IgG<sub>1</sub> 항체의 측정

PBS를 위장 투여한 group 11의 경우는 땅콩 특이 IgG<sub>1</sub> 항체 생성은 IgE 생성 반응과 유사하여서 실험 1, 2, 3, 4주에 각각  $0.00 \pm 0.00$  ng/mL,  $239.35 \pm 5.22$  ng/mL,  $341.66 \pm 8.14$  ng/mL,  $1,860.39 \pm 15.35$  ng/mL로 점차 증가하였다. 반면 유산균 투여군의 실험 제 4주에 땅콩 특이 IgG<sub>1</sub> 농도는 증가와 감소가 다양하게 관찰되어 땅콩 특이 IgE 생성 반응과는 다소 차이가 있었으나 실험 제 4주째

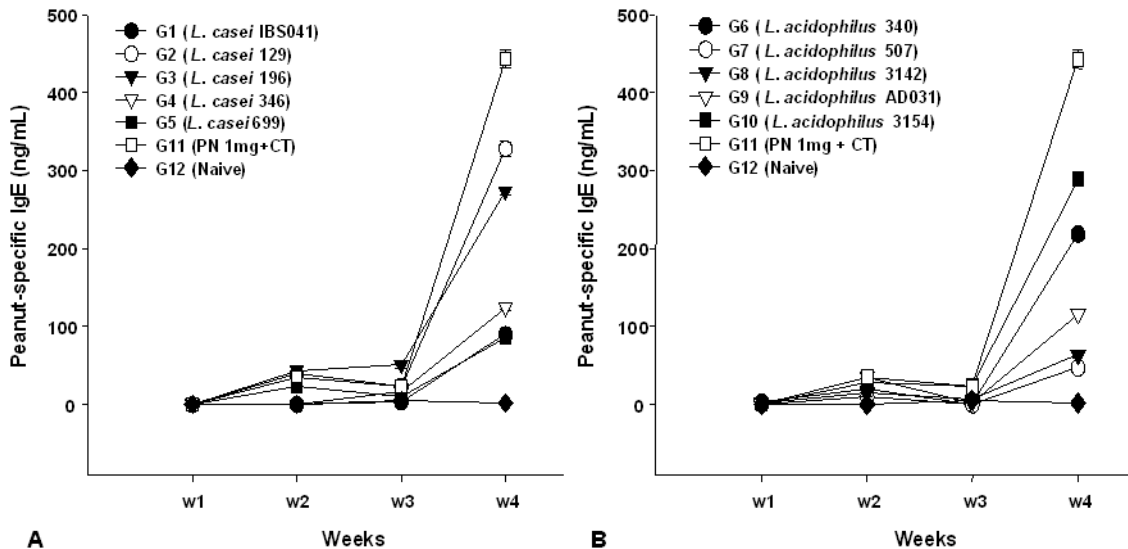
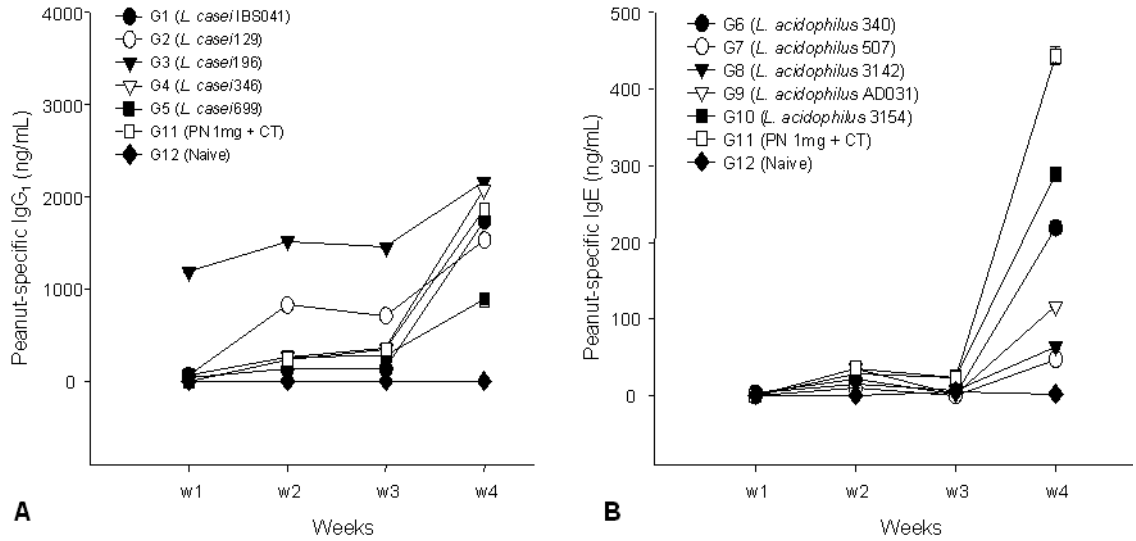


Fig. 2. Level of peanut-specific IgE. Individual sera from different groups of mice (A: *L. casei* groups, B: *L. acidophilus* groups; n=8 in each group) were obtained weekly following initial peanut (PN)-sensitization. IgE levels were determined by ELISA. Data are given as mean  $\pm$  SEM;  $P<0.05$  at week 4.



**Fig. 3.** Level of peanut-specific IgG<sub>1</sub>. Individual sera from different groups of mice (A: *L. casei* groups, B: *L. acidophilus* groups; n=8 in each group) were obtained weekly following initial peanut (PN)-sensitization. IgG<sub>1</sub> levels were determined by ELISA. Data are given as mean±SEM; P<0.05 at week 4.

IgG<sub>1</sub> 농도는 각 군 간에 통계학적으로 유의한 차이가 있었다.(P<0.05, Fig. 3A, B) 즉, *L. casei* IBS 041 투여군인 group 1에서는 1,740.64±9.53 ng/mL, *L. casei* 129 투여군인 group 2에서는 1,533.02±49.87 ng/mL, *L. casei* 196 투여군인 group 3에서는 2,162.05±12.68 ng/mL로, *L. casei* 346 투여군인 group 4에서는 2,078.18±16.92 ng/mL, *L. casei* 699 투여군인 group 5에서는 884.18±2.02 ng/mL로 관찰되었다. 또한 *L. acidophilus* 340 투여군인 group 6에서는 1,393.72±3.60 ng/mL, *L. acidophilus* 507 투여군인 group 7에서는 1,045.51±63.64 ng/mL, *L. acidophilus* 3142 투여군인 group 8에서는 758.41±21.79 ng/mL로, *L. acidophilus* AD031 투여군인 group 9에서는 2,693.49±4.69 ng/mL로, *L. acidophilus* 3154 투여군인 group 10에서는 3,688.71±27.98 ng/mL로 측정되었다.

### 3. 혈청 땅콩 특이 IgG<sub>2a</sub> 항체의 측정

PBS 위장 투여한 group 11에서의 IgG<sub>2a</sub> 생성은 IgE와 IgG<sub>1</sub>의 경우와는 달리 실험 1, 2, 3주에는 현

저한 증가가 없었으며, 실험 4주에 급격히 증가하는 양상을 보여서 2,136.79±63.49 ng/mL로 측정되었다. 또한 유산균 투여군에서도 특이 IgE 나 IgG<sub>1</sub> 과 일관성 있는 증가 감소를 보이지 않고 개별 유산균 투여에 의하여 다양한 정도의 생성 조절을 보임을 알 수 있었다.(Fig. 4)

즉, *L. casei* IBS041 투여군인 group 1에서는 실험 4주에서만 5,155.23±307.67 ng/mL로, *L. casei* 129 투여군인 group 2에서는 실험 2, 3, 4주에 512.14±23.10 ng/mL, 503.38±33.53 ng/mL, 2,995.05±109.30 ng/mL로, *L. casei* 196 투여군인 group 3에서는 실험 1, 2, 3, 4주에 456.42±41.41 ng/mL, 1,201.93±19.08 ng/mL, 976.66±32.22 ng/mL, 2,061.29±112.12 ng/mL로, *L. casei* 346 투여군인 group 4에서는 실험 4주에서만 779.60±88.88 ng/mL로 측정된 반면, *L. casei* 699 투여군인 group 5와 *L. acidophilus* 340 투여군인 group 6에서는 실험 4주 내내 땅콩 특이 IgG<sub>2a</sub> 항체가 측정되지 않았다. 또한 *L. acidophilus* 507 투여군인 group 7에서는 실험 4주에만 673.25±70.83 ng/mL로, *L. acidophilus* 3142 투여군인 group 8에서는

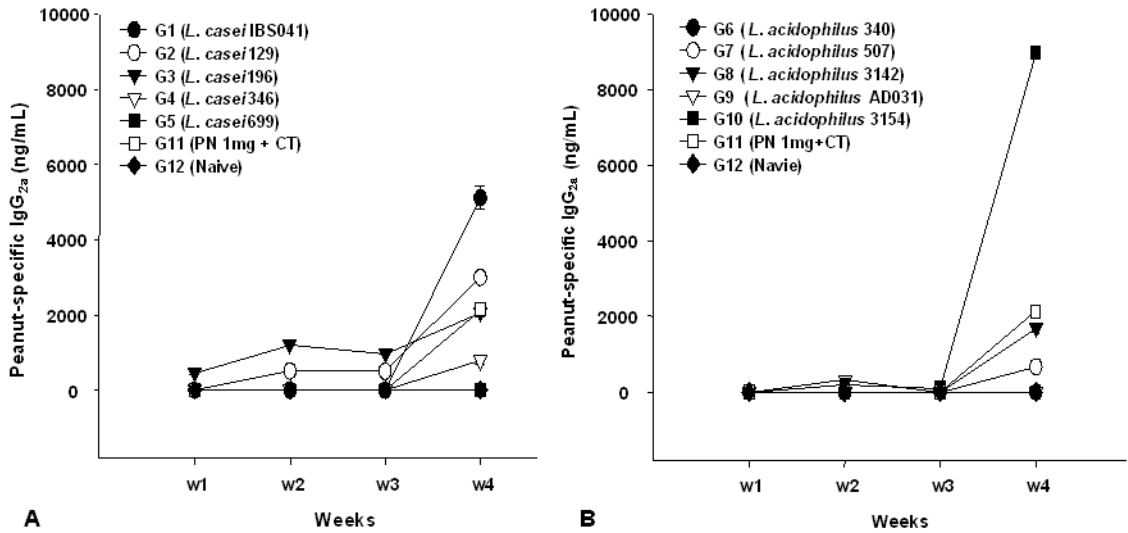


Fig. 4. Level of peanut-specific IgG<sub>2a</sub>. Individual sera from different groups of mice (A) *L. casei* groups, B) *L. acidophilus* groups; n=8 in each group) were obtained weekly following initial peanut (PN)-sensitization. IgG<sub>2a</sub> levels were determined by ELISA. Data are given as mean ± SEM; P<0.05 at week 4.

실험 4주에만 1,700.06 ± 130.37 ng/mL로, *L. acidophilus* AD031 (group 9)은 실험 2주에서만 306.83 ± 25.40 ng/mL로, *L. acidophilus* 3154 투여군인 group 10에서는 실험 2, 3, 4주에 179.27 ± 48.15 ng/mL, 102.48 ± 3.07 ng/mL, 8989.27 ± 9.01 ng/mL로 측정되었다. 결과적으로 실험 4주에 땅콩 특이 IgG<sub>2a</sub> 농도가 PBS 투여군인 group 11보다 생성이 증가한 경우는 group 1, 2, 10 이었다.(P<0.05, Fig. 4A, B)

### 고찰

일부의 식품 알레르기는 자연소실이 어렵고 상대적으로 심각한 임상 증상을 유발하며 식생활로부터 완벽한 회피가 어렵거나 불의의 사고로 섭취하게 되는 경우 생명에 위협이 될 수 있으므로, 최근 면역치료가 근본적인 예방치료법 개발에 관심이 모아지고 있는데, 이중 하나가 유산균제의 경구투여에 의한 식품 알레르기 발생 예방 시도이다.<sup>1, 17)</sup> 이러한 관심의 일환으로 연구자들은 이전의 연구에서 동일한 동물 모델을 이용하여 *bifido-*

*bacterium*의 한 종류인 *B. bifidum*의 BGN4 strain을 이용하여 항원 특이 IgE 생성을 현저히 감소시킬 수 있는 효율적인 동물실험 프로토콜을 확립하였고,<sup>11)</sup> 본 연구에서는 세계적으로 가장 널리 섭취되고 있으며, 소장에서 주요 역할을 하는 것으로 알려진 2종류의 *lactobacillus*의 다양한 배양 strain을 이용하여 전 임상 군주 선별을 위한 연구를 시행하였다. 결과적으로 본 연구를 통하여 10종의 *lactobacillus* strain은 다양한 정도의 감작항원 특이 IgE 감소 효과를 지니고 있으며, 이 중 3종의 *L. casei* strain과 3종의 *L. acidophilus* strain이 현저한 IgE 생성 감소 효과를 보임을 확인할 수 있었다.

유산균의 생균제는 발효된 우유에 있는 *Streptococcus thermophilus*와 *lactobacillus bulgaricus* 형태로 수천 년간 섭취되어 왔으며, 20세기 초반 러시아의 면역학자인 Metchnikoff가 ‘lactic acid bacilli’가 건강에 이롭다는 것을 제시한 후, 면역학적인 기전은 밝혀지지 못한 채 건강에 좋을 것이라는 믿음이 널리 퍼져 있는 실정이며, 최근에 들어서 일부의 면역조절 기능이 연

구되고 있다.<sup>20)</sup> 생균제는 유산균을 비롯한 인체의 소장과 대장에 서식하는 장내 세균 총을 살아있는 형태로 외부에서 공급하는 형태를 총칭하며, 기능적으로는 장 점막 면역계의 초기 면역기능 획득과 유지 및 변화에 중요한 역할을 하고, 인체에 이로운 생균제의 만족할 만한 기준은 사람에서 기원한 종류로서, 사람에게 사용되기에 안전하고 산과 담즙에서 안정되며 장 점막에 흡착할 수 있어야 한다는 것이다.<sup>5)</sup> 이러한 이로움 중에서 관심이 가는 것은 아토피피부염을 비롯한 알레르기 질환의 예방 효과에 대한 가능성인데, 아토피피부염의 위험성을 감소시킨다는 임상연구로부터 식품 알레르기의 동물모델이나 꽃가루 알레르기의 동물모델을 이용한 연구에 이르기까지 다양한 연구들이 이루어졌다.<sup>11, 13, 20-23)</sup> 다소 논란의 여지는 있지만 장내세균은 조기 면역자극을 유도하는 가장 강력한 원천이며, 유아에서의 장내세균 집락화의 차이가 알레르기 질환의 발생과 연관이 있다는 보고도 있다.<sup>24, 25)</sup> 이러한 생균제를 아토피질환의 1차 예방에 사용하는 근거로 아토피피부염과 식품 알레르기를 가진 소아에서 생균제가 장내 투과능을 역전시키고, 장 특이 IgA 반응을 증가시키며, 알레르기를 지닌 사람에서 부적절한 정상 세균총을 회복시키는 역할을 한다는 점 등이 제시되었다.<sup>26-28)</sup> 그러나 아직은 임상적으로 유산균제 투여에 의하여 알레르기 질환이 근본적으로 예방될 수 있는지에 대하여는 확신을 가질 수 없는 실정인데, 아직은 소규모의 제한된 연구에서만 유산균제에 의한 알레르기 예방 효과가 관찰되었고, 더욱이 지속적인 예방효과보다는 일시적인 효과가 대부분이며, 일부의 보고에서는 유의한 치료 효과가 없으며, 유산균제에 따른 알레르기 반응 조절 효과가 상이한 결과를 보이기 때문이다.<sup>9, 20, 23-31)</sup>

상기에 기술한 바와 같이 유산균의 항알레르기 효과는 일정 부분에서 인정되고 있으나 식품알레르기의 예방 혹은 치료를 위해서는 임상에 적용할 수 있는 가장 적절한 효능을 지닌 유산균 종류를 선별하는 작업이 필수적이다. 또한 상기의 대

부분의 연구들은 유산균 섭취에 의하여 주로 아토피피부염의 발생 여부를 관찰한 현상학적 서술이어서, 실제로 IgE 매개성 식품 알레르기에서 치료제 개발을 위한 중요 요소 중 하나인 항원 특이 IgE 생성 조절에 직접적으로 관련된 임상 연구 결과는 부족한 실정이다. 이러한 필요에 힘입어 연구자들은 본 연구를 통하여 다양한 strain의 *lactobacillus*를 사용하여 개별 균주별 감작 항원 특이 항체 생성 반응 조절 효과를 중점적으로 비교 관찰하고자 하였다. 이를 위하여 연구자들은 총 10종의 배양 *lactobacillus* strain을 사용하여 기존의 감작 프로토콜에 따라 땅콩 감작을 시킴과 동시에 항원 감작 시작일로부터 연속 21일 동안 각각의 균주를 동일한 생균수를 계산하여 위장관 투여하였다. 결과에 서술된 바와 같이 정도의 차이는 있었지만, 10종류의 *lactobacillus* strain 투여군 모두에서 땅콩 특이 IgE 생성은 치료하지 않은 대조군에 비하여 감소함을 알 수 있었다. 실험 기간 동안 각 주별로 IgE 항체 생성의 kinetics는 각 균별로 다소의 차이가 있었으며, 유산균 투여가 끝난 직후인 실험 제 4주의 최종 IgE 농도를 기준으로 항체 생성 조절효과를 비교하였다. 결과적으로 유산균 투여를 하지 않은 대조군에서는 혈청내 땅콩 특이 IgE 농도가  $443.30 \pm 12.06$  ng/mL로 측정된 반면 유산균 투여를 받은 10개의 모든 군에서는 정도의 차이는 있으나 땅콩 특이 IgE 생성이 감소함을 알 수 있었다. 특히 *L. casei*의 경우는 strain IBS041, 346, 699 투여군에서는 대조군에 비하여 50% 이상 현저히 감소하였고 *L. acidophilus*의 경우는 strain 507, 3142, AD031 투여군에서 현저하게 감소됨을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 생쥐에서 IgE 항체생성과 동일하게 Th2 면역 반응에 의하여 생성이 조절되는 IgG<sub>1</sub> 항체의 생성은 IgE 생성 감소와 완전히 일치하여 조절되지는 않았으며, IgE 생성은 현저히 감소시켰던 *L. casei* strain 346과 *L. acidophilus* strain AD031의 경우는 대조군에 비하여 오히려 특이 IgG<sub>1</sub> 생성을 증가시켰고, *L.*



casei strain 699와 *L. acidophilus* strain 3142의 경우는 IgE 생성과 일관성 있게 IgG<sub>1</sub>의 생성도 현저히 감소시키는 효과가 있음이 관찰되었다. 또한 IgE 항체와 길항적인 생성 조절을 기전을 가지는 것으로 알려진 IgG<sub>2a</sub>의 경우 *L. casei*의 경우는 strain IBS041과 *L. acidophilus* strain 3154투여에 의하여 대조군에 비하여 현저히 증가함이 관찰되었고, *L. casei* strain 346과 *L. acidophilus* strain AD031은 현저한 IgE 생성 감소를 유도하기는 하지만, 방어 항체로 여겨지는 IgG<sub>2a</sub> 반응은 대조군에 비하여 증가시키는 못함을 알 수 있었다. 특히 본 연구에서는 *L. casei* strain IBS041 생균체는 땅콩 특이 IgE와 IgG<sub>1</sub> 생성의 감소와 함께 IgG<sub>2a</sub> 생성 증가를 유도하여 가장 완전한 항체 조절 능력을 보였다. 앞서 논의한 바와 같이 본 연구에서는 감작항원에 대한 특이 IgE 항체의 조절은 *lactobacillus* 투여에 의하여 일관성 있게 감소함을 알 수 있었으나, IgG 항체 생성 조절의 경우는 strain 마다 상반된 결과를 보이는 경우가 많았다.

본 연구에서 관찰된 IgE 생성 감소 유도는 사람에게 있어서 IgE 매개성 식품 알레르기 예방을 위하여 긍정적인 연구 결과로 해석될 수 있겠으나, 본 연구에서는 아직 세포면역 조절기능과 유발시험을 통한 연구가 진행되지 못하였으므로, 본 연구에서 선별된 6종류의 *lactobacillus* strain을 이용하여 추가적인 *in vivo* 실험을 시행할 필요가 있겠다. 또한 본 연구의 제한점 중 가장 중요한 것은 연구에 사용된 유산균들이 사람의 장 혹은 소의 장에서 서식하는 유산균을 얻어 실험실에서 배양한 것이므로, 생쥐에게 섭취시킨 후 효능을 검증한 본 연구의 결과가 사람에서는 다소 상이하게 나타날 수 있다는 점이다. 또한 국내외에 본 연구와 유사한 연구들이 진행된 바 없어 결과를 비교하기 어려운 실정이다. 그러나 사람을 이용하여 식품 알레르기 관련 연구를 시행하기는 거의 불가능한 실정이므로 이러한 제한점이 있음에도 불구하고 유효한 균주를 선별하기 위하여 동물모

델을 이용한 본 연구를 시행하였다. 결과적으로 10종의 *lactobacillus* 배양 strain 중에서 성공적으로 IgE 생성을 감소시키는 6종의 *lactobacillus* strain을 선별할 수 있었으며 이러한 결과는 추후 시행될 임상 연구에 사용될 균주를 선택하는 기본 자료로 사용될 수 있으리라 기대된다.

## 요 약

**배 경:** 유산균(lactic acid bacteria, LAB)은 건강한 사람의 소장과 대장에서 서식하는 주된 정상균총으로서 최근 유산균의 면역조절 및 면역강화 효과에 대한 연구들이 보고되었다. 유산균의 면역 조절 효과는 아토피피부염이나 식품 알레르기의 예방 혹은 치료와 관련하여 관심을 모으고 있으며 주로 연구되는 유산균은 *lactobacillus*이다.

**목 적:** 이에 연구자들은 전 임상 단계에서 땅콩 알레르기 생쥐 모델을 이용하여 감작항원 특이 IgE 항체 생성 감소를 유도하는 알레르기 면역 조절 효과가 현저한 *lactobacillus* 균주를 선별하는 것을 목적으로 본 연구를 시행하였다.

**방 법:** 5 주령의 암컷 C3H/HeJ 생쥐에 땅콩 단백질 1 mg을 실험 제 0, 1, 2, 7, 21에 위장관 투여에 의하여 감작시켰으며, 감작 기간 3주 동안 매일 10의 *lactobacillus* 단클론 배양 균주를 각 군별로 위장관내 투여하였다. 실험기간 동안 매주 생쥐의 혈청을 얻어 땅콩 특이 IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>를 측정하였고 최종 효과 판정을 위하여 실험 4주째 결과를 각 군별로 비교하였다.

**결 과:** 10종류의 *lactobacillus* strain 투여에 의하여 정도의 차이는 있으나 땅콩 특이 IgE 생성이 모두 감소하였고, 이 중 6종(*L. casei* IBS041, *L. casei* 346, *L. casei* 699, *L. acidophilus* 507, *L. acidophilus* 3142, *L. acidophilus* AD031)에 의해서는 대조군에 비하여 IgE 항체 생성이 50% 이상 감소함을 알 수 있었다. 반면 땅콩 특이 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>의 조절효과는 strain 마다 다양하였

고 IgG와 IgE 항체 생성 조절의 일관성은 *L. casei strain* IBS041에서만 관찰되었다.

**결론** : 항체 생산에 초점을 두었다는 제한점은 있지만, 본 연구를 통하여 10종의 *lactobacillus* 배양 strain 중에서 성공적으로 IgE 생성을 감소시키는 6종의 strain을 선별할 수 있었고 이러한 결과는 추후 임상 연구를 시행하기 위한 기본 자료로 사용될 수 있으리라 기대된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Sampson HA. Food Allergy Part I: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:717-28.
- 2) Yocum MW, Butterfield JH, Klein JS, Volcheck GW, Schroeder DR, Silverstein MD. Epidemiology of anaphylaxis in Olmsted County: a population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:452-6.
- 3) Oh JW, Pyun BY, Choung JT, Ahn KM, Kim CH, Song SW et al. Epidemiological change of atopic dermatitis and food allergy in school-aged children in Korea between 1995 and 2000. *J Korean Med Sci* 2004;19:716-23.
- 4) Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, et al. Gastrointestinal physiology and function-targets for functional food development. *Br J Nutr* 1999;69:s1046-s51.
- 5) Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, et al. Gastrointestinal physiology and function-Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80:s147-s71.
- 6) Floch MH. Probiotics, Irritable bowel syndrome, and inflammatory bowel disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2003;6:283-8.
- 7) Rafter J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br J Nutr* 2002;88:S89-94.
- 8) Isolauri E. Probiotics in the prevention and treatment of allergic disease. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12(Suppl 14):56S-9S.
- 9) Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357:1076-9.
- 10) Kirjavainen PV, Apostolou E, Arvola T, Salminen SJ, Gibson GR, Isolauri E. Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;32:1-7.
- 11) Lee SY, Oh S, Park SW, Jeon GR, Kim JY, Yoon SY, et al. Evaluation of anti-allergic effect of Bifidobacteria in murine model of peanut allergy. *Pediatr Allergy Respir Dis (Korea)* 2006;16:131-41.
- 12) Kim DY, Shin YS, Kong DY, Pyun BY. Comparison of *lactobacillus casei* in stool between children with atopic dermatitis and normal controls. *Pediatr Allergy Respir Dis (Korea)* 2004;14:160-6.
- 13) Kim H, Kwack K, Kim DY, Ji GE. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;45:259-67.
- 14) Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first three years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* 1990;45:587-96.
- 15) Sampson HA and McCaskill C. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J Pediatr* 1985;107:669-75.
- 16) Sampson HA and Scanlon SM. Natural history of food hypersensitivity in children with atopic dermatitis. *J Pediatr* 1989;115:23-7.
- 17) Yunginger JW, Sweeney KG, Sturmer WQ, Giannandrea LA, Teigland JD, Bray M et al. Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA* 1988; 260:1450-2.
- 18) Lee SY, Oh S, Lee K, Jang YJ, Sohn MH, Lee KE, et al. Development of murine model of buckwheat allergy by intragastric sensitization of crude buckwheat extract in C3H/HeJ mice. *J Korean Med Sci* 2005;20:566-72.

- 19) Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:150-8.
- 20) Boyle RJ, Tang MLK. The role of probiotics in the management of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2006;36:568-76.
- 21) Forsythe P, Inman M, Bienenstock J. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:561-9.
- 22) Ogawa T, Hashikawa S, Asai Y, Sakamoto H, Yasuda K, Makimura Y. A new synbiotic, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* together with dextran, reduces murine and human allergic reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 46:400-9.
- 23) epa A, Grangette C, Daniel C, Hochreiter R, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, et al. Mucosal co-application of lactic acid bacteria and allergen induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy. *Vaccine* 2003;22:87-95.
- 24) Taylor A, Hale J, Wiltschut J, Lehmann H, Dunstan JA, Prescott SL. Evaluation of the effects of probiotic supplementation from the neonatal period on innate immune development in infancy. *Clin Exp Allergy* 2006;36: 1218-26.
- 25) Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:516-20.
- 26) Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 1993;105:1643-50.
- 27) Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992;32:141-4.
- 28) Isolauri E, Kaila M, Mykkanen H, Ling WH, Salminen S. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig Dis Sci* 1994;39:2595-600.
- 29) Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869-71.
- 30) Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Isolauri E. Probiotics during the first 7 years of life: A cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1019-21.
- 31) Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1604-10.