

직업성 천식 유발물질 취급 근로자의 면역학적 특성에 관한 연구

1993



한국산업안전공단
산업보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 보고서를 “직업성 천식 유발물질 취급 근로자의 면역학적 특성에 관한 연구”의 연구보고서로 제출합니다.

1993년 12월 31일

제출자 : 산업보건연구원장 정 호 근

연구책임자 : 책임연구원 유 일 재

공동연구자 : 수석연구원 강 성 규

기술직 4급 맹 승 희

기술직 4급 정 용 현

목 차

abstract	1
I. 서론	3
II. 연구방법	13
1. 조사대상	13
2. 재료 및 방법	13
III. 결과	17
1. TDI-HAS와 MDI-HSA 항원의 합성	17
2. 정량적인 ELISA 분석법에 의한 면역항체의 정량	22
3. 천식 유발물질 취급 근로자의 혈청의 특이 IgE 측정	22
IV. 고찰	30
V. 결론	33
VI. 참고문헌	34

Immunological studies on workers exposed to occupational asthma associated
substances: TDI (toluene diisocyanate) and
MDI (diphenyl methane diisocyanate)

Il Je Yu, Seong Kyu Kang, and Yong Hyun Chung

Industrial Toxicology Laboratory
Industrial Health Research Institute
Korea Industrial Safety Corporation
34-4, Jusan-dong, Buk-ku, Incheon 403-120, Korea

- Abstract -

We prepared TDI-HSA (toluene diisocyanate-human serum albumin) and MDI-HSA (diphenyl methane diisocyanate-human serum albumin) to study isocyanate related occupational asthma. TDI-HSA and MDI-HSA were further purified by a column chromatography and dialysis, and characterized by UV spectrophotometer and electrophoresis. To analyze immunoglobulin subtypes (IgG, IgA, IgM) from isocyanate exposed workers, we developed a quantitative ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) method. Using these

antigens and method, 66 isocyanate exposed workers were screened for the presence of specific antibodies. No workers were found to have specific IgE and IgG in our studies.

직업성 천식 유발물질 취급 근로자의 면역학적 특성에 관한 연구

유일제, 강성규, 정용현, 맹승희

한국산업안전공단 산업보건연구원
산업독성연구실
인천직할시 북구 구산동 산34-4
403-120

I. 서론

최근에 들어 직업성 천식에 대한 관심도가 점점 높아지고 있다. 천식은 여러 가지 요인에 의해 생기는데, virus infection, 운동, 감정적 흥분, 비특이적 요인 (기압 변화와 온도 변화), 찬공기, irritants, allergen에 대한 폭로, 아스피린 등등이다. 정신적인 요인도 관여를 하는데 1차적인 원인은 아니다. Allergen에 의해 IgE mediated 되는 천식을 extrinsic asthma라하고 전체 환자의 10-20%를 구성하고 있다. Non-allergic 천식은 30-50% 정도인데, nonallergic factor들 (infection, irritants, emotional factors)에 의해 유발되고 intrinsic asthma라고 한다.

직업성 천식에 의해 생기는 손상은 직업적인 원인 때문이거나 또는 직업과 선제하고 있는 천식과의 상호작용에 의해 유발되기도 한다. 직업성천식의 유발율은 정확한 산출은 힘들지만 미국의 경우 2-4%, 일본의 경우는 15% 정도라고 보고하고 있다 (Salvaggio et al., 1986). 그러나 직업성 천식에 의한 손상의 진단

방법은 진폐의 진단 방법이 응용이 될수 없기 때문에 더욱 더 많은 문제점을 안고 있다. 그 이유로는 천식이 일반인들에게도 흔히 날수 있는 병이고 또 천식유발원인의 판정이 진폐보다는 어려운 점 때문이다. Harber (1992)는 천식의 판정에 있어서의 문제점을 이렇게 말하고 있다.

1. 천식은 변수가 많은 병이다

천식 판정에 있어서 특별한 날의 임상적인 판정은 전체적인 판정이 될수가 없다. 왜냐하면 천식에는 “심한날” “심하지 않는 날” 이 있기 때문에 만약 심하지 않는날의 판정은 과소 평가가 될 것이고 심한 날의 평가는 과대 평가가 될 것이다. 이런 변수에 대하여 천식의 평가로 세 가지의 방법이 추천되고 있는데

가. Spirometer

나. Airway hypereactivity : methacholine 유발시험

다. 치료의 정도에 따라 심각도를 판정

첫번째가 반복하여 spirometer로 재는 것이다. 이 방법의 장점은 spirometer의 비정상 값은 폐기능적인 손상과 단기간에 있어서 관련이 있는 점이다. 그러나 반복하여 spirometer로 측정하는 환자가 자주 방문하여야 하고, 어떤 spirometer의 값 즉 최대, 중간, 최소치, 또는 평균치 등 어떤 측정치를 판단의 기준으로 써야 하는지 뚜렷하지 않다. 두번째로는 airway hyperreactivity (AHR) 측정치를 이용하는 방법인데 AHR은 비특이적인 자극에 의해 airway가 좁아지는 현상을 말하는 것인데 천식에서 나타나는 현상이지만 이 현상이 없다고 천식이 없다고 말할

수도 없다. AHR의 시험방법으로 MCT (methacholine challenge test)가 일반적으로 가장 많이 쓰이고 있는 방법이다. 환자에게 다량의 단기간 작용하는 cholinergic 약품인 methacholine 을 흡입하게하고나서 spirometer로 재는 것인데 그 측정치는 PD20으로 표현하게 되는데 FEV1 (forced expiratory volume in 1 second) 이 20% 감소하는 methacholine량을 말한다. MCT의 안전성은 흡입량을 증가 시키면서 PD20 도달하기까지 측정하기 위하여 흡입을 멈추고 또 methacholine은 단기간 작용하는 약이고 이 약품에 의해 일어나는 bronchospasm은 brochodialator의 흡입에 의해 회복될 수 있기 때문이다. MCT의 장점은 일회 측정으로 객관적으로 천식에 관련된 병리생리학적인 정보 즉 비특이적인 반응에 대한 AHR을 얻어낼 수 있기 때문이다. 그러나 비특이적인 AHR의 측정의 단점으로는 AHR 측정치의 값이 사람마다 일정한 것이 아니고 또 많은 사람들이 양성 값을 보이다가 follow-up을 하면 음성값으로 전환한다는 점이다 (Redline et al., 1989). 그리고 측정치가 병 증세변화와의 관련성이 별로 없다는 보고도 있다 (Weiss et al., 1990; Josephs et al., 1989). 그리고 MCT는 천식과 기관지염 환자의 구별을 잘못하는 점도 있다 (Enarson, 1987). 그리고 흡연과 관련하여 비특 흡연이 천식을 유발하지 않는다는 것은 알려져 있지만 흡연자들은 증가된 AHR 측정치를 보여주고 있다. 낮은 폐기능 측정치를 보여주는 사람들은 흡연하지 않는 경향이 있는데 만약 그렇다면 AHR은 흡연자들을 완전히 대표하는 것은 아니기 때문이다. 그리고 MCT는 기술적으로 spirometry보다 어려운 것이기 때문에 상급의 MCT가 전체적으로 시행되기가 힘들 것이다. methacholine은 안정된 상태에서 준비되어야 하며 적절히 희석되어야 하고 일정하게 분무되어야 한다. 그리고 환자도 적절하게 흡입할 수 있도록 지도를 받아야 한다. 그래서 MCT측정치를 표준

화한다는 노력에도 불구하고 적절한 표준치가 없는 관계로 아직 쓰기 쉽고 또 표준화가 잘된 spirometry를 쓰고 있는 형편이다. 그리고 천식을 치료하기 위한 약들의 대부분이 airway reactivity를 줄이기 위한 약이므로 MCT의 오판을 가져올수 있다. 그래서 천식을 판정하기 위해 천식치료약의 복용을 멈추고 MCT를 할수도 없는 형편이기 때문이다. 그리고 세번째가 치료의 정도에 따라 천식의 심각도를 결정하는 것인데 많은 치료를 받은 사람은 더 심한 증상을 가지고 있을 것이라는 가정이다. 그러자 우리 실정에 얼마만큼 천식때문에 병원을 방문했나를 기록에 남기기 힘든 형편이고 또 천식때문에 병원을 방문하는 사람이 얼마나 있을지도 궁금하다. Corticosteroid약의 사용이 천식의 심각도를 말하다고는 하지만 이런 것이 과학적으로 증명된 경우가 없으며, 또 이런 약의 사용과 직업에 의해 유발되는 천식과의 상관관계는 매우 희박하다.

2. 일반적으로 찬성할수 있는 천식의 기준 증상이 없다

진폐에서는 B-reader에 의해 표준화된 흉부 X-ray, 흉토내역 등을 기반으로 ILO에서 허가를 받은 일반적으로 받아들일 수 있는 진단방법이 있지만, 천식에서는 이런 증세에 대한 정의가 전혀 없는 형편이다. 역학적인 정의로는 “쌽쌽거리며 기침을 한다”든가 또는 “의사의 천식진단”이라는 정의가 있으며, 생리학적으로는 “역전할 수 있는 obstructive abnormalities”로 정의할 수도 있다. 더우기 chronic obstructive pulmonary disease (COPD)와 천식을 구별하기는 무척어렵다. 그래서 의사의 진단은 편견을 가질 위험이 많고 (Dodge et al., 1986), Burrows (1987) 는 장기간에 걸친 연구에서 COPD와 천식간에는 서로 증세가 겹치는 부분이 많다고 보고 했다.

3. 천식에는 일반적으로 받아드릴 수 있는 등급제가 없다.

호흡기 손상의 정도를 측정하여 보상을 한다면 먼저 생리해부학적인 측정 (폐기능 검사, X-ray)이 손상의 정도를 측정하고, 그 손상은 다시 추정되는 손상으로 환산할 수 있고, 그 손상은 hadicap으로 다시 환산하여 마지막으로 금전으로 환산할 수 있다. 진폐에서는 방사선과 폐기능 검사, 운동성 검사를 통해 잘 짜여진 등급제가 있다. 그러나 일반적으로 받아들일 수 있는 천식의 측정방법이 없기 때문에 천식의 등급을 매기기는 힘든 형편이다. spirometer나 질적인 MCT가 이루어졌다해도 측정이 "심할때" "좋을때" "평균치" 등에 달려 있기때문에 확신할 수 없는 단점이 있다. 그래서 AMA에서는 가장 심할때를 측정하여 impairment 측정을 권유하고 있다. MCT측정에 있어서도 methacholine 이 FEV1에 관련된 전체

의 dose-effect curve를 그려야 한다. 그리고 두사람이 같은 PD20값을 같은 농도의 methacholine에서 가질 수 있지만 methacholine의 계속적인 흡입에 의해 지속적으로 떨어지는 사람이 많은 methacholine에 의해 심해지지 않고 plateau에 다른 사람보다 증세가 심각할 것이다.

4. 치료의 효력을 결정하기가 힘들다

첫째 적절한 치료 방법이 아직 잘 개발이 되어있지 않다. 둘째 치료에 대한 적절한 반응을 예측하기가 힘들다. 얼마만큼 치료되었나를 결정하기가 힘들다.

5. 환자의 공포심도 문제가 된다.

정신학적인 여러가지 요인들이 손상 판정이나 환자들의 직장 환경에 대한 공포를 낳게 한다. 때로는 이런 정신학적인 요인들이 심하게 되는 자신의 질병에 대한 치료를하는 의사를 의심하게 한다.

6. 직업성 천식은 불구가 되지 않으면서 손상을 주는 병이다.

근로자는 어떤 특정한 천식유발 물질에 의해 손상을 입게 되지만, 그 작업장을 제외한 다른 작업장에서는 정상적으로 일할 수 있다.

7. 천식의 경로는 다른 폐질환과는 다른 경로를 가지고 있다.

천식은 치료에 대한 반응도 뿐만 아니라 병력에도 관계가 있다. 비록 비특이적인 알러르기 증상이 많은 환자에게 심하게 나타나지만 증세가 안정되거나 없어지기도 하는 예측불허의 면도 가지고 있다.

8. AHR이 타고난 형질 때문인지, 병 때문인지 규명이 힘들다.

9. 천식은 간헐적으로 또는 영구적인 손상을 가져올 수 있다.

그래서 천식에 관계 요인들을 나열해 보면

가. 한번이라도 천식이 있었는지

나. 천식 판정 당시 환자는 안정된 상태였는지

다. 심각도에 대한 객관적 자료가 있는지

- 라. 치료방법을 바꾸면 환자의 상태가 호전하는지
 - 마. 천식환자가 어떤 특이한 환경에서 일하지 않아야 하는지
 - 바. 천식환자가 지금 일할 수 있는지
 - 사. 이 직장 전에는 어떤 일을 하고 있었는지
 - 아. 직업이 어떻게 천식에 영향을 미쳤는지
 - 자. 천식에 영향을 주는 다른 의학적 요인이 있었는지
 - 차. 최상과 최악의 경우는 어떤 때인지
 - 카. 환자의 천식이 구직을 하는데 어떤 영향을 주는지
 - 타. 언제 다시 손상을 재 판정해야 하는지
- 등을 나열 할 수 있겠고

직업과 천식의 상호 요인들을 살펴보면

- 가. 전혀 상관이 없는 경우
 - 나. 천식이 지금 하는 일과는 그렇게 상관이 없지만 작업능률을 저하시키는 경우
 - 다. 천식이 지금 하는 일과는 그렇게 상관이 없지만 미래의 작업능률을 저하시키는 경우
- 라. 천식이 작업과 직접적으로 관련이 되어 작업장의 물질에 의해 천식 유발이 되는 경우
 - 마. 천식이 일회의 고농도의 독성물질에 의해 유발된 경우
 - 바. 무증세의 AHR이 작업환경요인 때문에 빨리 증세가 나타난 경우
 - 사. 무증세의 AHR이 증세가 나타나날 수도 있는데 작업환경요인 때문에 증세가

나타난 경우

아. 천식 증세가 직업환경요인 때문에 심하게 된 경우

자. 선제하고 있던 천식이 있는데 작업환경요인 때문에 심한 천식이 된 경우

차. 현재의 작업환경요인 때문에 나아진 경우

카. 현재의 작업환경요인 때문에 간접적으로 심하게 된 경우

타. 불확실한 경우

등을 들 수 있다 (Harber, 1992).

직업성 천식 환자의 면역적 특성

직업성 천식의 유발물질로는 대개 저분자 물질과 고분자 물질로 나눌 수 있는데, 저분자 물질은 니켈, platinum, palladium, toluene diisocyanate (TDI), trimellitic anhydride 등이 있다 (Pepys et al., 1972, McConnell et al., 1973; Zeiss et al., 1977). 고분자 물질로는 효소 (trypsin, 이자의 추출액, papain, 세제에 첨가되는 protease), 곡식, 동물의 분비물, 곰팡이 등을 들 수 있다 (Salvaggio et al., 1986). 저분자 물질들은 고분자 물질 (carrier)과 결합하여 hapten으로 작용을 하여 특이 항체를 만든다. 그리고 어떤 경우에는 항체가 이렇게 결합한 carrier를 인식하는 항체를 만들기도 한다. 그래서 흡입한 화학물질에 대한 면역체계의 반응은 여러종류 항원에 대한 특이성을 나타낸다. Mucosa에 화학물질이 폭로되고 나서는 처음의 면역반응은 lymph node나 기관지에서 일어난다. 그리고 이런 면역반응이 있는 다음 B cell은 특이 IgE를 생산하게 된다. Mucosa 조직에서와 lymph node에서의 IgE 생산은 혈관을 돌아다니는 basophil과 조직에서의 mast cell을 자극시킨다. 그래서 항원에 의한 IgE와 이

런 세포들과의 결합은 inflammatory mediator들을 분비하게하여 알레르기 증상이 일어나게 된다. 고분자의 알레르기성 항원에 대한 특이 IgE는 보통 발견이 잘 되지만, 저분자 유발물질에 대한 특이 항원은 잘 발견이 되지 않을때도 있다고 한다 (NRC, 1992). TDI가 유발물질이라고 진단이 경우에도 특이 IgE가 보이지 않을 때도 있다 (Salvaggio et al., 1986). 기관지 과민 증상을 유도하는 histamine 이나 methacholine에도 직업성 천식의 모든 환자가 반응을 보이는 것도 아니다. 그리고 cell mediated immunity도 천식에 중요한 역할을 한다고 한다 (Baur 1983; Patterson et al., 1982). 알레르기성 항원에 의해 직업성 천식이 유발될 수 있는 성향을 가진 것을 Atopy라고 하는데, TDI, trimellitic anhydride 같은 저분자 물질에 의해 유발되는 천식과 Atopy와는 상관이 크게 없다고 보고 되고 있다. 알레르기성 천식의 다른 요인으로는 부신흡르몬의 이상 (Szentivanyi, 1968), 호흡기의 바이러스 질환 (Empey et al., 1976), basement membrane의 tight J unction에의 이상 (McFadden, 1984) 등을 들 수 있다. 흡연이 천식유발 요인이라고는 생각되어 지지 않고 있다 (Chan-Yeung & Lam, 1986)

이상에서 보는 바와 같이 직업성 천식은 그렇게 간단한 직업병이 아니라, 근로자가 지니고 있는 유전적인 소양, 작업경력, 천식유발물질에 노출되는 작업환경, 정신적인 stress, 기후, 계절 등의 여러 가지 요인에 영향을 받는다고 하겠다. 그리고 천식의 진단에 있어서도 어떤 천식유발 물질이 천식을 일으킨다는 정확한 항원 규명도 어렵고, 또 천식의 심각도도 진폐와 같이 객관적으로 명확한 진단을 내릴 수 없는 형편이다.

이소시아네이트 (Isocyanates)는 우레탄, 페인트, 분무용제 등 산업용으로 널리 쓰여지고 있을 뿐만아니라, 제초제나 농약의 생산에도 널리 사용되어지고 있다. 이소시아네이트는 이에 폭로된 근로자에게 알레르기성 천식을 일으킨다고 알려져 있다. 특정 이소시아네이트의 민감성에 대해서는 잘알려져 있으나, 이런 민감성 유발에 대한 정확한 메카니즘은 아직도 잘모르고 있다. 이소시아네이트에 폭로된 직업성 천식 근로자에게서 특이 항체가 발견되어진다고 알려져 있고 또 특이 IgE 항체가 발견된다고 한다. 이소시아네이트의 항체 측정에는 hapten과 단백질의 결합체가 필요한데 이소사이네이트와 단백질 결합체의 합성은 직업성 천식의 진단과 연구에 매우 중요하다. 본 연구의 또 하나의 목적은 직업성 천식 근로자의 혈청의 특이 IgE와 특이 IgG등을 비교하고, 또 이런 면역항체와 다른 면역항체 즉 IgG, IgM, IgA, IgD를 비교분석하므로서 직업성 천식의 면역학적인 특성을 살피고자 하였다. 본 연구에서는 단백질과 이소시아네이트의 결합체를 합성하여, 천식 유발 물질취급 근로자의 모니터링에 이용하였고, 특이 항체와 항체의 양적인 분석을 위하여 효소부착항체 면역흡착반응 (Enzyme-linked immunosorbent assay:ELISA)을 이용한 방법을 수립하였다.

II. 연구 방법

1. 조사대상

조사대상은 TDI와 MDI를 취급하는 가구공장의 도장작업과 발포작업 근로자들을 대상으로 A사 35명, B사 20명, C사 11명을 대상으로 British Rubber manufactures Association의 보건 자문위원회의 이소시아네이트 소위원회에서 만든 TDI 취급 근로자에 대한 호흡기 증상 설문표를 NIOSH에서 약간 수정한 것 (NIOSH, 1978)을 우리말로 번역하여 만든 설문지 (정규철 등 1992)로 호흡기 증세를 파악한 후 의사의 면담과 진찰을 통해 다른 호흡기 질환을 배제하였다. 혈액은 주정맥에서 진공 채혈관으로 채혈하여 당일 원심분리한 후 냉장 보관하였다.

2. 재료 및 방법

가. TDI와 MDI가 부착된 알부민 (HSA) 합성

사람의 혈청 알부민 (human serum albumin: HSA, Sigma) 100 mg/ml을 phosphate buffered saline (PBS)에 녹여 Toluene 2,4-diisocyanate (TDI, Aldrich) 100 mg이나 4,4-diphenyl methane diisocyanate (MDI, 화광순약, 오사카)을 37°C에서 2 시간 반응시킨 후 TDI가 HSA에 부착되도록 한다. 그리고 부착된 TDI-HSA와 MDI-HSA는 G-25 column (Pharmacia)을 통과시킨후 정제한 다음, 정

제된 단백질들을 다시 PBS에 3번 바꾸면서 18시간 정도 투석하여 다시 정제하였다.

나. 자외선 분광법에 의한 TDI-HSA와 MDI-HSA의 분석

정제된 TDI-HSA와 MDI-HSA는 같은 양의 HSA와 자외선 230 - 260 nm상에서 흡광도로 분석하여 HSA에 이소시아네이트 물질의 부착성을 검정하였다 (Jin & Karol, 1988a; Jin & Karol 1988b).

다. 전기영동

합성된 TDI-HSA와 MDI-HSA는 10%의 poly acrylamide gel electrophoresis (PAGE) 100 V의 전압으로 전기영동 (Laemmli, 1970)을 하여 Comassie blue (Sigma)로 염색을 하고 또 탈색용액으로 탈색한 후 HSA와 이소시아네이트가 부착된 단백질과의 전기영동상의 이동을 비교하였다. 또 이렇게 전기영동한 HSA와 TDI-HSA와 MDI-HSA는 밀도계 (densitometer, Pharmacia)를 이용하여 이동성을 조사하였다.

라. 양적인 Ig subtype 측정 (Quantitative ELISA assay using competition)

그리고 혈청에 있는 Ig subtype의 양을 측정하기 위해서는 각각의 Ig subtype를 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 PBS에 녹인후 약 50 μl 정도를 96 well의 ELISA plate의 각 well에 더하여 4°C에서 하루밤 정도 놓아둔다. 각 plate의 well은 3번 PBS에 씻은 다음 200 μl 의 3% (wt/v) BSA in PBS를 각각의 well에 더하여 비특이적 반응을 막기 위한 blocking을 약 2 시간 하였다. 그리고 plate는 세번

정도 PBS로 씻은 다음 50 μ l 정도의 Ig subtype를 희석한 것 (10 mg에서 ng까지)과 일정량으로 희석한 각각의 Ig subtype에 대한 항체를 50 μ l씩 더한 후 상온에서 한시간 정도 놓아둔다. 한 시간 후 plate를 세번 정도 PBS로 씻은 후, alkaline phosphatase가 부착된 rabbit anti human IgG, IgA, IgM과 IgE (Sigma) 등의 항체 50 μ l를 각각의 well에 더해 다시 한 시간 반응 시킨후 assay plate를 3 번정도 PBS로 씻은후 두번정도 10% diethanolamine (DEA, pH 9.5) buffer로 씻어낸다. 그리고 50 μ l의 p-nitrophenyl phosphate (mg/ml in DEA)를 더하여 30 분 정도 반응이 진행되게 한다. 그리고 0.1 M의 EDTA로 반응을 중지시킨후 410 nm에 흡수되는 빛의 양을 ELISA plate reader로 읽는다. Standard curve를 얻어 내어 각각의 시료와 비교하여 대략의 Ig subtype의 농도를 혈청에서 구해낸다.

마. 특이 IgE 특정

천식 유발물질 취급 근로자에게서 특이 IgE를 측정하기 위해서 ELISA 법을 사용하였다. TDI-HSA와 MDI-HSA를 약 40 μ g/ml 정도로 만든후 각각의 96 well의 ELISA plate에 50 μ l 더하여 4°C에서 하루밤 정도 놓아둔다. 각 plate의 well은 3번 PBS에 씻은 다음 200 μ l의 3% (wt/v) BSA in PBS를 각각의 well에 더하여 비특이적 반응을 막기 위한 blocking을 약 2 시간 하였다. 그리고 plate는 세번 정도 PBS로 씻은 다음 일정량으로 희석한 근로자의 혈청 50 μ l 더한 후 상온에서 한 시간 정도 놓아둔다. 한 시간 후 plate를 세번 정도 PBS로 씻은 후, alkaline phosphatase가 부착된 rabbit anti human IgE (Sigma) 항체 50 μ l를 각각의 well에 더해 다시 한 시간 반응 시킨후 assay plate를 3 번정도 PBS로 씻은후 두번정도 10% diethanolamine (DEA, pH 9.5) buffer로 씻어낸다. 그리고

50 μ l의 p-nitrophenyl phosphate (mg/ml in DEA)를 더하여 30 분 정도 반응이 진행하게 한다. 그리고 0.1 M의 EDTA로 반응을 중지시킨후 410 nm에 흡수되는 빛의 양을 ELISA plate reader로 읽는다. Standard curve를 얻어내어 각각의 시료와 비교하여 대략의 Ig subtype의 농도를 혈청에서 구해낸다.

바. 단백질의 정량

단백질의 정량은 Biorad의 Protein Assay solution을 사용하였다. 그리고 Bovine serum albumin (BSA)을 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1 mg/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 100 μ g/ml로 희석하여 standard solution을 사용하였다. Protein Assay solution을 1:4로 물에 희석한후, 1 ml Protein Assay solution에 2 μ l의 BSA standard solution과 sample 2 μ l을 넣어 반응시킨후 자외선 분광계에서 595 nm에서 측정하였다.

III. 결 과

1. TDI-HSA와 MDI-HSA 항원의 합성

HSA 100 mg을 TDI와 MDI에 반응 시킨후 G-25 column을 통과시킨후 PBS에 투석 후 총 44 mg의 TDI-HSA와 6.1 mg의 MDI-HSA를 정제하였다. 정제된 이소시아네이트가 부착된 단백질, TDI-HSA, MDI-HSA는 40 $\mu\text{g/ml}$ 정도로 만들어 HSA 40 $\mu\text{g/ml}$ 과 함께 자외선 분광계에서 230 nm에서 260 nm 까지 흡광도를 조사하였다. Figure 1에서 보이는것 같이 TDI-HSA는 같은 양의 HSA와 비교할때 20 배 정도의 흡광도를 보여주었고 236 nm와 252 nm에서 최대의 흡광도를 보여 주었다 (Figure 1). MDI-HSA는 230 nm와 260 nm에서 최대의 흡광도를 보여주었다 (Figure 2). 이렇게 TDI-HSA와 MDI-HSA는 전기영동을 하여 이소시아네이트가 부착됨에 따른 분자량의 차이로 전기영동상의 이동에 따른 차이를 조사하였다 (Figure 3). 이렇게 이동한 TDI-HSA는 밀도계로 조사하여 전기영동에 따른 단백질이동의 차이를 검정하였다 (Figure 4). Figure 4는 전기영동한 단백질을 밀도계로 0에서 4분까지 scanning하면서 조사한 것인데 고분자의 단백질에서 저분자의 단백질로 (즉 0에서 4분으로 갈수록 저분자임) scanning한것이다. Figure 4에 보이는 것 같이 HSA는 대부분의 단백질이 2분 30초 에서 밀도의 최대를 보여주고 있으나, TDI-HSA는 HSA (분자량 66,000)에 TDI가 부착됨에 따라, 2분 30초 (분자량 66,000)에서 최대를 보여주는 단백질의 상당량이 고분자 상태 (20초에서 1분)로 이동한 것을 볼 수 있는데 특히 20초 (분자량 약 200,000)에서 최대를 보여주는 단백질은 이소시아네이트에 의해 단백질이 서로 cross linking (oligomer) 한 것

Figure 1. Ultraviolet difference spectrum of TDI
versus TDI-HbA.

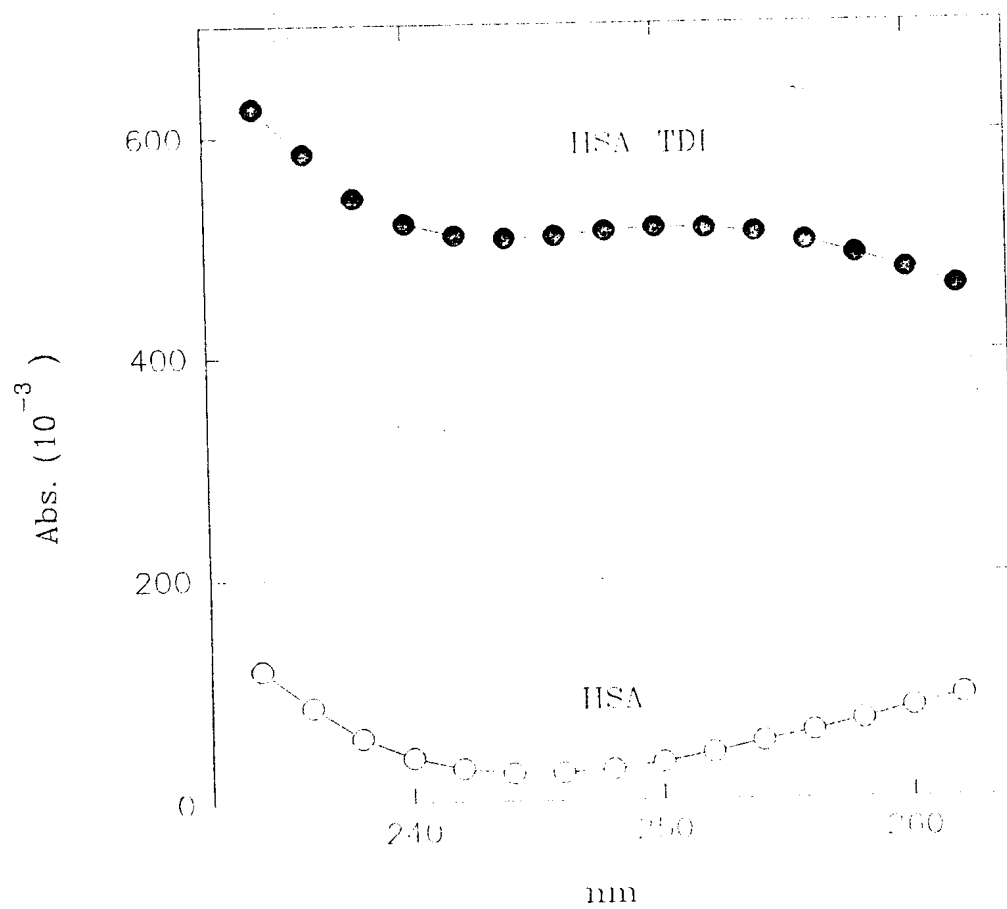


Figure 2. Ultraviolet difference spectrum of MDI versus MDI-HA.

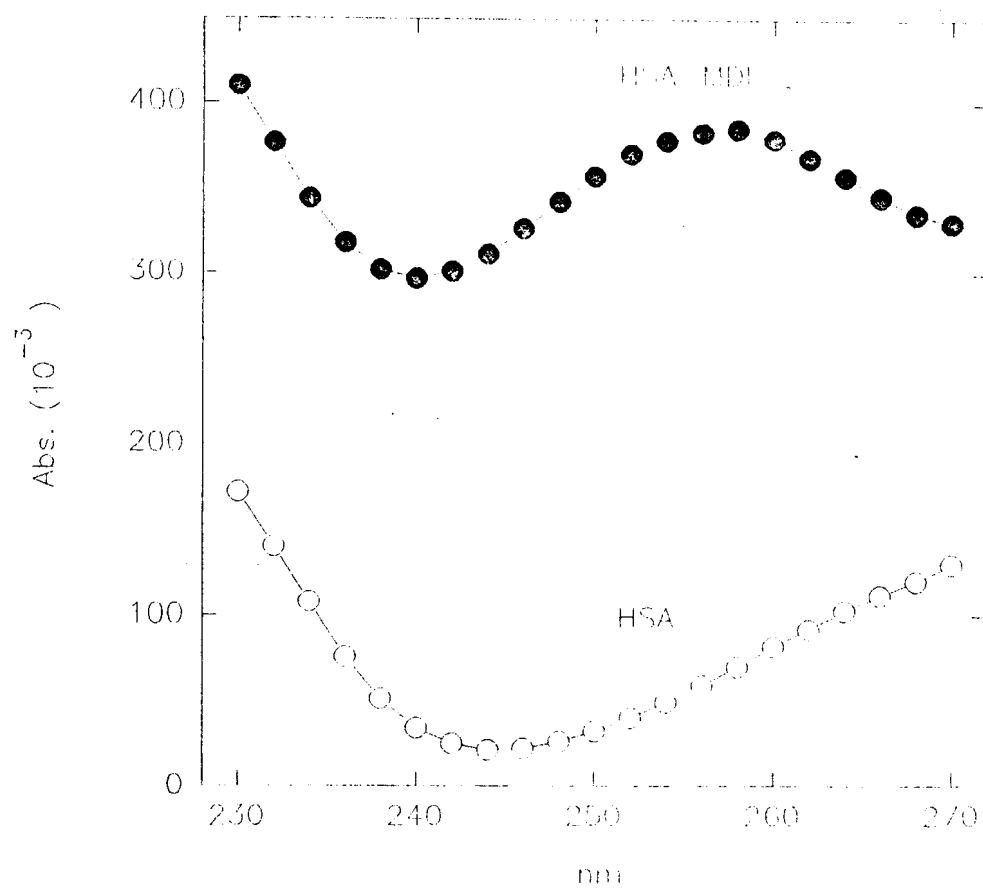
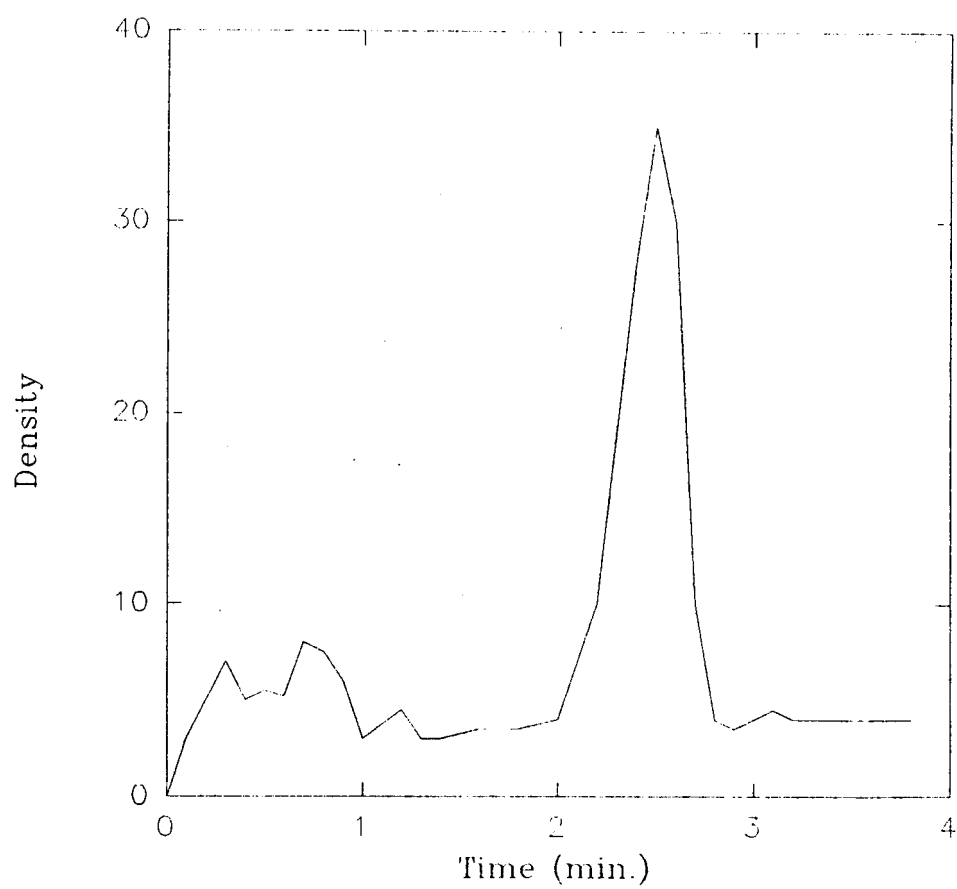


Figure 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of TDI-HAS,
MDI-HSA.

Lane 1, molecular markers; lane 2, TDI-HSA;
lane 3, MDI-HSA; lane 4, HSA.



Figure 4. Densitometer profiles of HSA



임을 나타내는 것이다.(Figure 5) 그리고 1분대 (분자량 약 130,000)에 있는 단백질은 dimer를 나타내는 것이다.(Figure 5)

2. 정량적인 ELISA 분석법에 의한 면역항체의 정량

본 연구에서는 우리실정에 맞는 유해한 동위원소를 사용하지 않는 ELISA 분석법을 이용하여 정량적으로 면역항체를 분석하였다. 이런 정량적인 분석법을 통해서 천식근로자의 면역항체가 대조군 근로자와 비교하여 어떤 특성을 가지고 있는지를 조사하고자 하였고, 또 직업성 천식진단의 지표로 삼고자 하였다. 본 연구에서 개발한 정량적인 ELISA 분석법은 다른 여러가지 분석방법과 비교하여 손쉽게 사용할 수 있는 면이 있고 또 이 방법을 이용하여 앞으로 면역항체의 정량뿐 아니라 다른 물질의 정량에도 이용할수 있어서 활용도가 아주 높다고 볼 수 있다.

Figure 6, Figure 7, Figure 8은 각각 IgG, IgM, IgA의 정량곡선을 나타낸것인데, 정량곡선의 전형적인 Sigmoid 모양을 하고 있다. 이 곡선의 직선 부분을 이용하여 정량을 하게된다.

3. 천식 유발물질 취급 근로자의 혈청의 특이 IgE 측정

천식 유발물질 취급 근로자에게서 TDI와 MDI에 의한 항체를 측정하기 위하여, 위에서 합성한 TDI-HSA, MDI-HSA를 항원으로 사용하였다. 이 방법에 의하여 근로자 A사의 근로자 35명과 B사의 근로자 20명 C사의 근로자 11명을 대상으로 조사를 하였다. 이들의 나이와 직업력 흡연유무는 Table I에 나타나 있다.

Figure 5. Densitometer profiles of TDI-HSA.

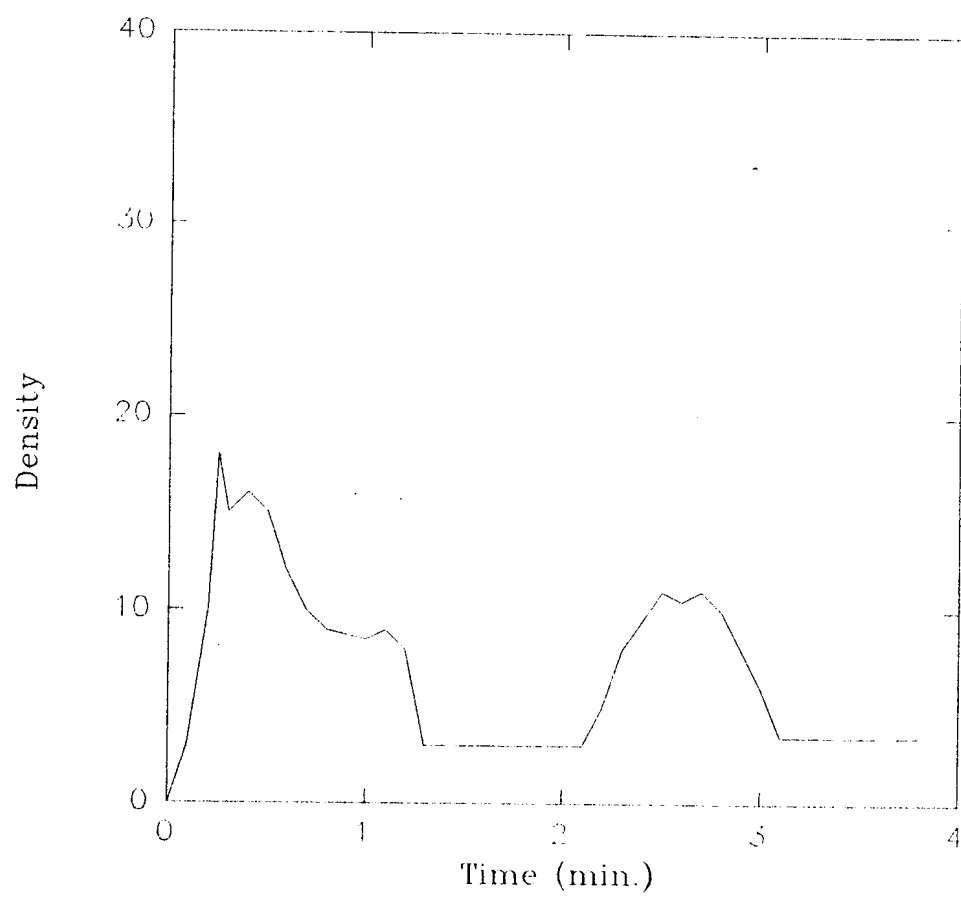


Figure 6. Standard curve for IgG

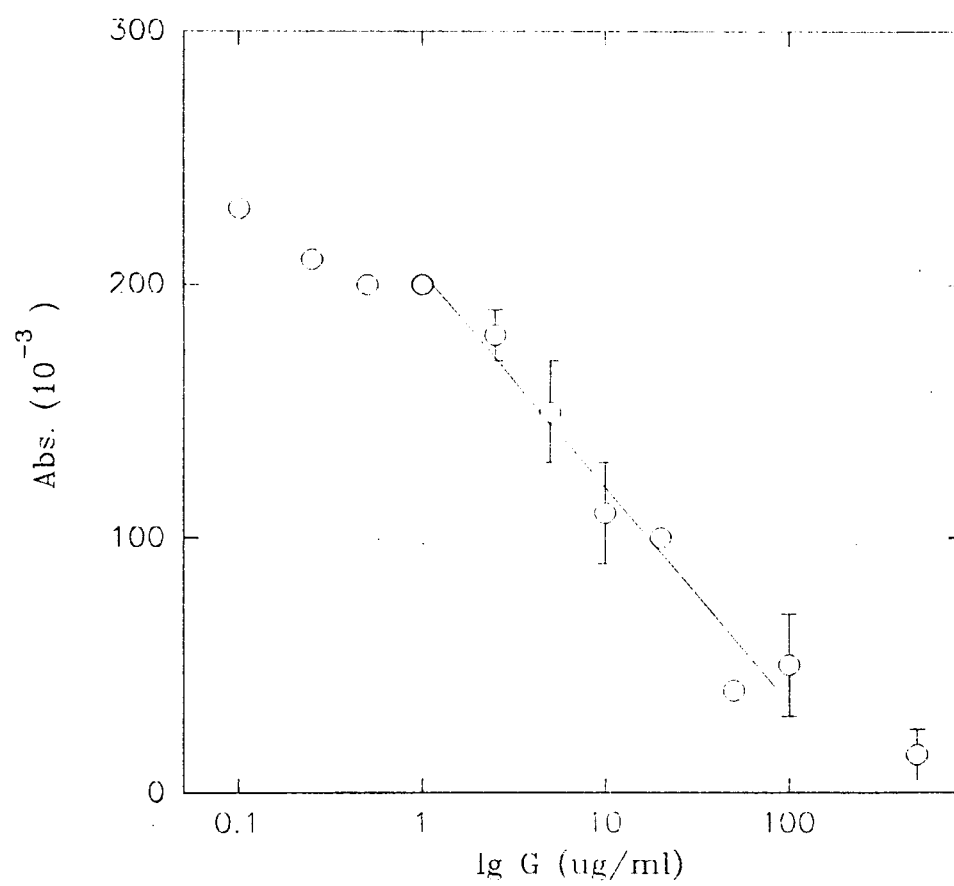


Figure 7. Standard curve for IgM

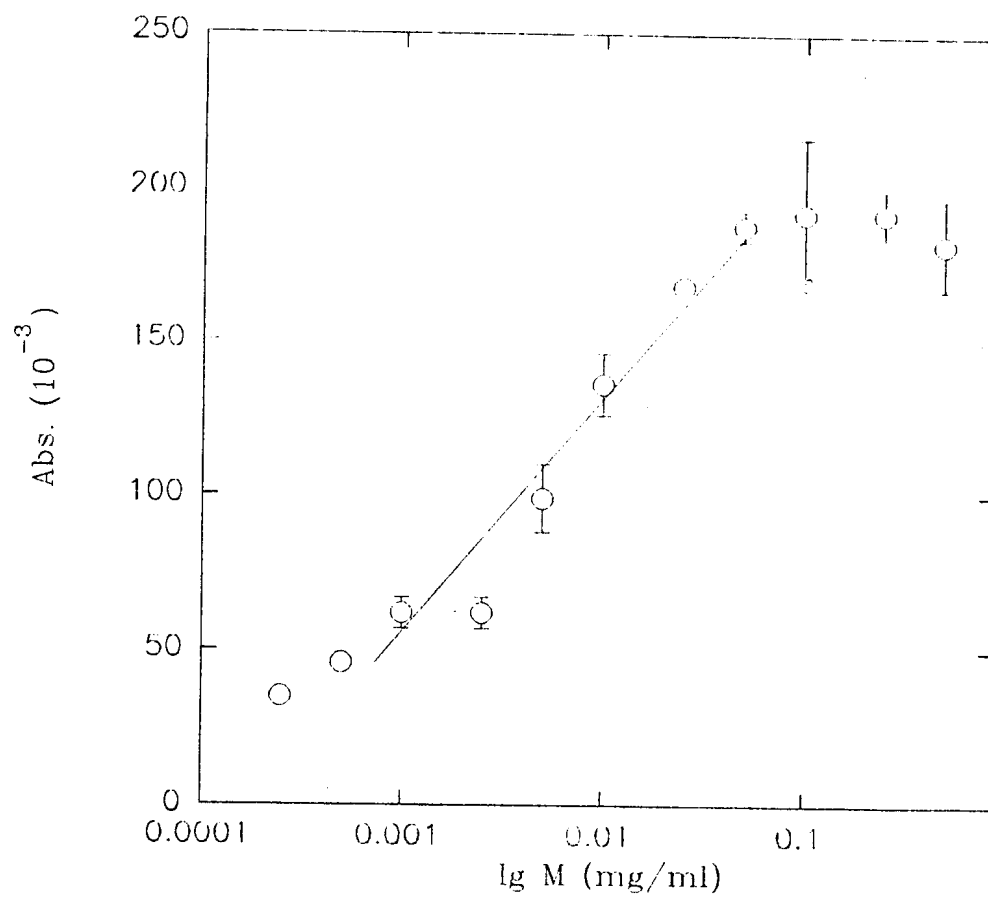


Figure 8. Standard curve for IgA

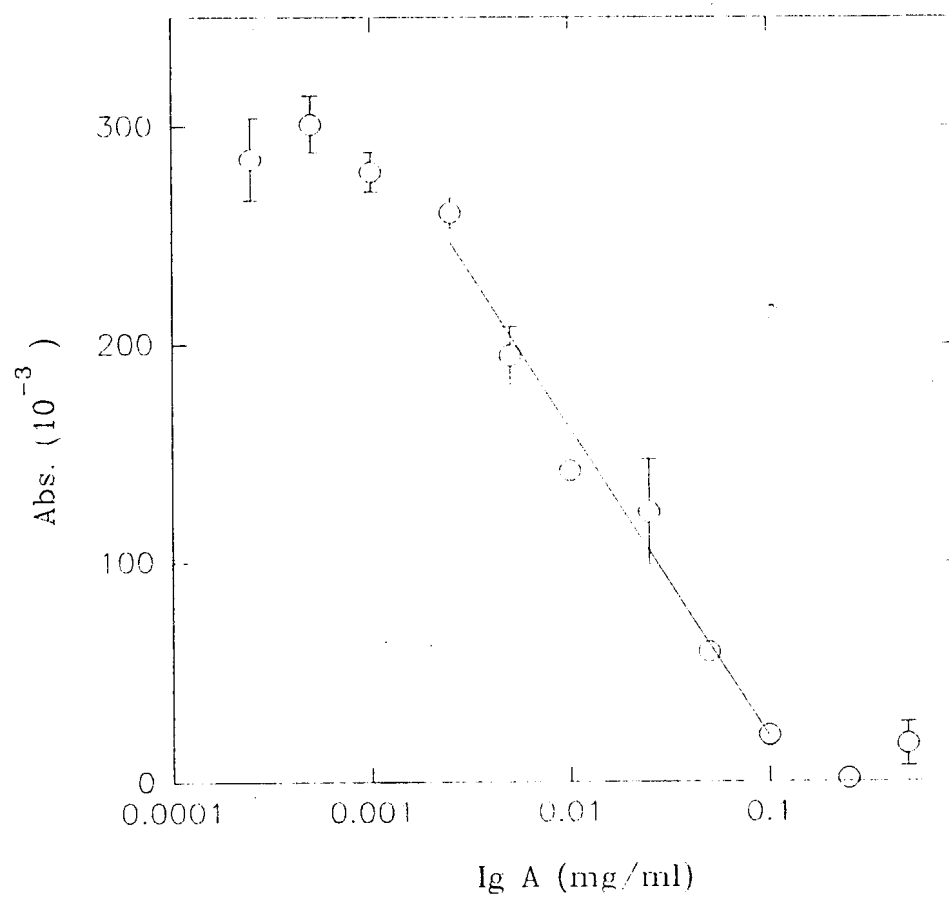


Table I. Demographics and exposure characteristics of
TDI and MDI workers

Name of company	Number of workers	Age (year)	Employment (month)	Number of smokers
A	35	22-51 (34.4±8.5) ^a	1-122 (37.1±35.7)	15
B	20	18-52 (35.8±11.8)	4-180 (55.2±51.0)	9
C	11	20-45 (27.5±8.4)	3-93 (35.3±32.8)	5

a= Mean ± standard deviation

이들을 대상으로 TDI와 MDI에 대한 특이 IgE 항체를 조사하였는데, A사와 C사의 근로자를 대상으로 특이 항체를 조사한 결과 뚜렷한 TDI, MDI에 대한 양성 반응을 보인 근로자를 찾아낼수 없었다 (Figure 9). B사의 근로자들을 대상으로 특이 항체를 조사한 결과 뚜렷한 TDI, MDI에 대한 양성반응을 보인 근로자를 찾아 낼 수 없었다 (Figure 9). 특히 B사의 근로자중 B6 (여, 47세, 15년 경력) 피부 알레르기와 분무 작업후 호흡곤란을 호소하고 또 메타콜린 유발시험에서도 양성 반응을 보였으나 특이 IgE나 IgG 항체는 음성반응을 보여주었다.

Figure 9. Specific IgE levels against TDI-HSA and MDI-HSA for workers of A and C factories.

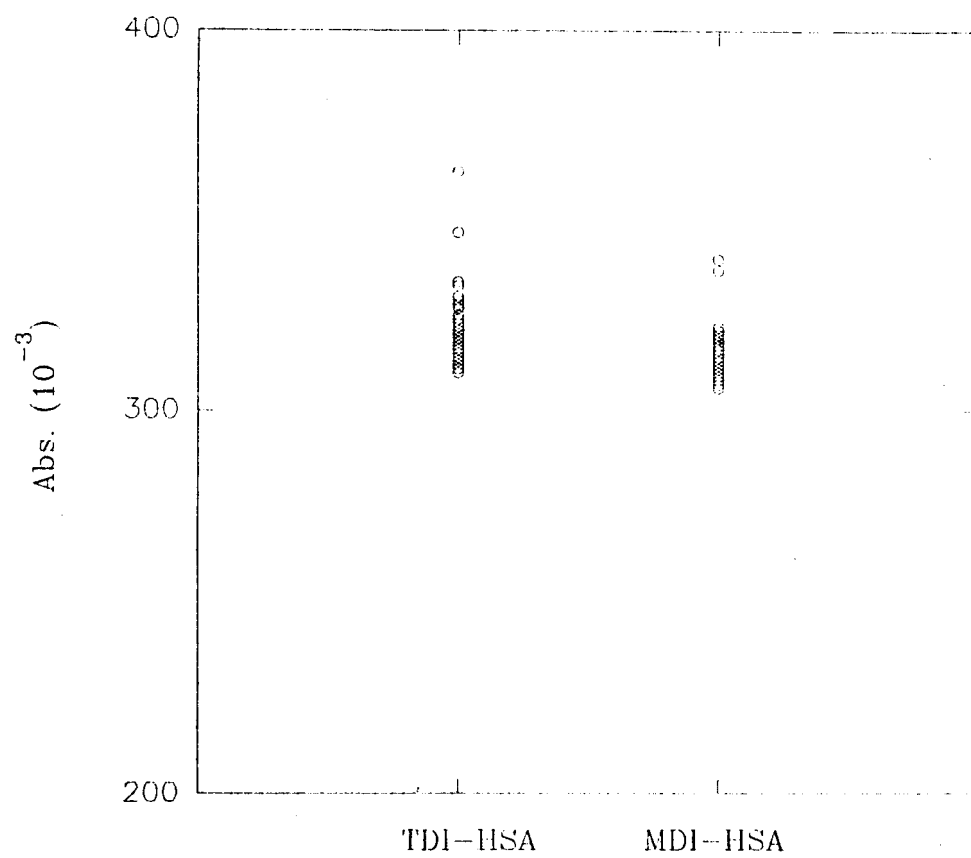
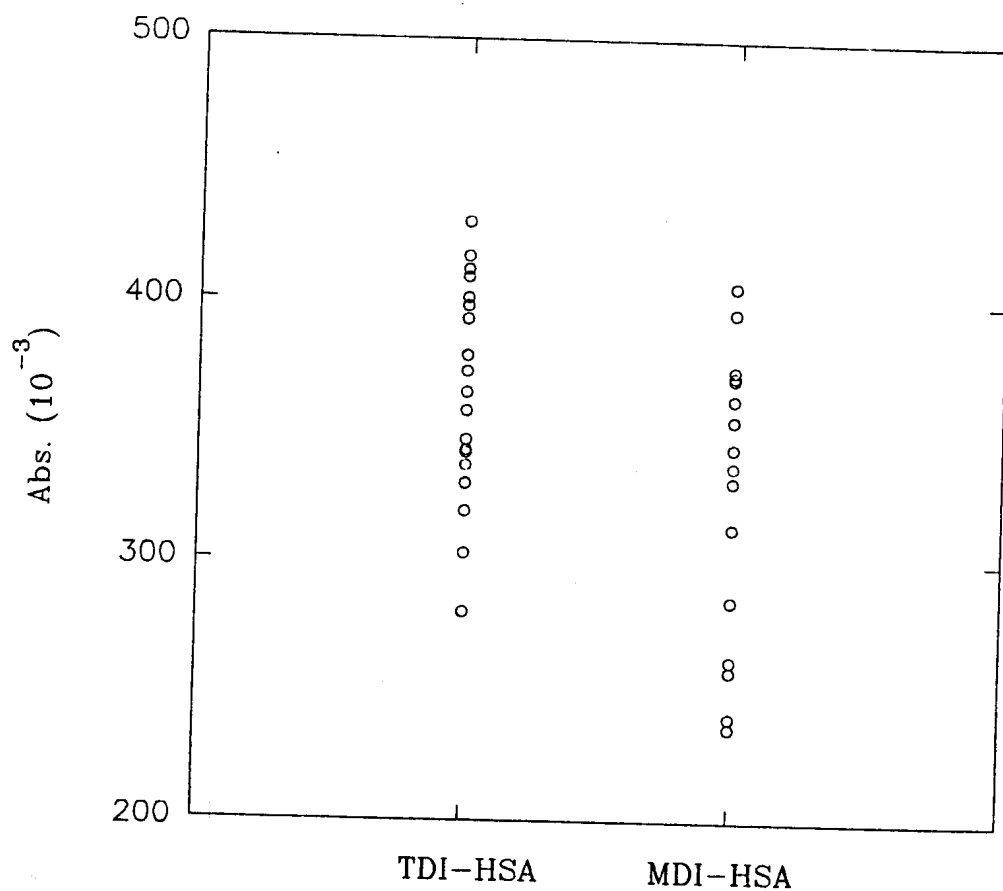


Figure 10. Specific IgE levels against TDI-HSA and MDI-HSA for workers of B factory.



IV. 고 찰

이소시아네이트 화학물의 천식유발시 특이 항체의 유무가 논란이 되어지고 있는데 Butcher et al.(1980), Baur et al. (1983, 1984), Patterson et al. (1987), 김유영 등 (1992)은 천식근로자들에게서 특이 IgE를 발견할 수 있었다고 보고했으나, Danks et al. (1981)과 Pezini et al. (1984)등은 특이 IgE를 전혀 발견할 수 없었다고 보고하였다. 그리고 Paggiaro등은 IgG 항체도 발견할 수 없었다고 보고하였다. Cartier et al. (1989)는 천식환자에게서는 특이 IgE 보다 특이 IgG가 더 관계가 있고, IgG의 수준이 최근의 이소시아네이트 유형 (MDI, HDI)등과 관련이 많다고 보고하였다. 그러나 이런 특이항체의 수준은 그 특이 항체를 평가할 수 있는 항원을 만들기가 어렵기 때문일 수도 있을 것이다.

본 연구에서는 이런 특이 항체의 논란을 밝혀 좀더 나은 직업병진단을 하기 위해 이런 특이항체를 측정할 수 있는 항원을 직접 합성하여 특이항체의 종류와 특성을 밝히고자 하였다. 특히 이소시아네이트 직업성 천식의 면역학적인 연구에 있어서는 hapten 물질 즉 TDI, MDI에 대한 항체가 발견되는 것이 아니라, hapten이 carrier (즉 HSA, BSA)에 부착된 항체가 발견되기 때문이다. 본 연구의 결과가 나타내고 있는 특이항체의 진단을 위한 TDI-HSA, MDI-HSA등의 항원 합성은 실험실에서 대량으로 합성할 수 있어서 저렴한 가격으로 특이항체를 진단할 수 있는 장점이 있고, 또 종래의 규제가 많고 환경오염이 문제가 되는 방사성 동위원소를 이용한 RAST법을 대신할 손쉬운 ELISA 법을 사용하였다. 그리고 본 연구에서 합성한 TDI-HSA와 MDI-HSA는 column chromatography 법과 투석을 통하여 정제가 되었고, 또 자외선 분광법, 전기영동법으로 이들의 특성화가 이루어 졌다

는 점이다. 앞으로 이 항원을 이용하여 천식유발물질 취급근로자들이나 또는 천식소견 근로자들을 모니터링하고 진단할 수 있을 것이다.

또 본 연구에서 사용한 항체의 양을 종래의 실험실에서 항원을 ^{125}I 동위원소를 항원에 부착하여야 하거나 아니면 한 항원에 2가지 이상의 epitope를 인식할수 있는 항체가 필요한 정량적인 평가 방법보다 훨씬 손쉽게 빨리 이용할 수 있는 ELISA 법을 이용한 항원과 항체의 competition을 적용한 정량적인 방법을 수립하였다. 이런 방법으로 IgG, IgM, IgA등을 측정하였을때, 10 ng/ml 까지 측정할 수 있는 방법을 개발하여 앞으로의 직업성 천식 진단에 응용할 수 있을 뿐만 아니라, 다른 연구에도 이용할 수 있을 것이다.

위에 언급한 항원과 분석방법을 사용하여 직업성 천식 유발물질 취급근로자들을 모니터링 하였는데 본 연구에서는 특이 IgE나 특이 IgG를 가진 천식 소견 근로자를 찾을 수 없었다. 이는 첫째로 대상 근로자에게서는 앞에서 언급한 것 같이 특이 항체가 발견되지 않은 경우이거나 두번째로 전혀 천식 소견 근로자가 없는 경우도 생각할 수 있다. 아니면 본 연구에서 사용한 항원에 반응할 수 있는 항체가 없는 경우도 생각할 수 있다. 그러나 본 연구에서 만들어진 항원은 Jin & Karol (1988a & 1988b)등과 비교해 볼 때 거의 같은 특성을 가지고 있어서 항원 합성에는 문제가 없으리라 본다. 또 하나의 가능성은 본 연구가 사용한 ELISA 분석법인데 종래의 RAST 법에 비교하여 약간 민감성이 떨어지는 방법 때문인 경우가 있으나, ELISA 분석법이 그렇게 민감성이 부족한 방법은 아니고 최근에는 많은 연구자들이 동위원소를 사용한 RAST 법에서 안전하고 손쉬운 ELISA 법으로 바꾸고 있는 추세이다.

근로자 일인이 메타콜린 유발시험에서 양성 반응을 보였으나 근로자에게서는 특이 IgE나 특이 IgG가 발견되지 않았다. 이 근로자도 아마 특이 항체가 발견되지 않는 근로자 이거나 아니면 직업성 천식이 아닌 intrinsic 천식 소견자 일수도 있을 것이다. 이런 근로자에게는 전문의사의 입회하에 특이항원 유발시험 (Specific inhalation challenge)을 통해서 밝혀져야 할 것이다.

V. 결 론

이소시아네이트 직업성 천식의 면역학적인 연구를 위해 TDI, MDI가 알부민(human serum albumin, HSA)에 부착된 TDI-HSA, MDI-HSA를 합성하여 정제하고 자외선 분광분석법이나 전기영동을 이용하여 그 특성을 조사하였다. 또 천식유발물질 취급근로자의 항체의 종류에 따른 양을 특정하기 위해 정량적인 ELISA 법을 개발하여 항체에 종류(IgG, IgM, IgA)에 따른 항체의 양을 정량적으로 잴 수 있게 하였다. 그리고 특이 항체를 측정하기 위하여서는 ELISA 분석법을 이용하였다. 이렇게 합성된 항원과 방법을 이용하여 직업성 천식물질 취급 근로자 66명을 대상으로 특이 항체의 유무를 조사하고 직업성 천식의 유무를 조사하였다. 대상 근로자 66명에게서는 특이 IgG나 특이 IgE를 가진 양성인 근로자가 발견되지 않았다.

Ⅶ. 참 고 문 헌

- 김 유영, 민 경업, 조상헌, 윤호주, 백도명, 정 규철, 1992. 직업병 예방을 위한
연구 용역 보고서. 대한민국 노동부
- Baur, X., 1983. J. Allergy Clin. Immunol. 71:197-205
- Baur, X., Dewaur, M., Fruhmman, G., 1984. Detection of immunologically
sensitized isocyanate workers by RAST and intracutaneous skin test.
J. Allergy Clin. Immunol. 73:610-18
- Burrows, B., Bloom, J. W., Traver, G. A., Cline, M. G., 1987. N. Eng. J.
Med. 317:1309-1314
- Butcher, B. T., O'Neil C. E., Reed, M. A., Salvaggio, J. E.,
Radioallertoserbent testing of toluene diisocyanate-reactive
individuals using p-toyl isocyanate antigen, J. Allegy Clin.
Immunol. 1980:213-6
- Cartier A., Grammer, L., Malo, J., lagier, F., Ghezze, H., Harris, K., and
Patterson, R., 1989. Specific serum antibodies against isictabate:
Association with occupational asthma, J. Allergy Clin. Immunol. 84:507.
- Chan-Yeung, M., and Lam, S., 1986. Am. Rev. Respit. Dis. 133:686-703.
- Cotes, J. E., and Steel, J., 1987. Occupational asthma. pp 345-372.
Blackwell Scientific Publications

- Danks J. M., Cromwell, O., Buckningham, J. A., Newman Taylor, A. J., and Davis, R. J., 1981. Toluene diisocyanate induced asthma: evaluation of antibodies in the serum of affected workers against a tolyl monoisocyanate protein conjugate, Clin Allergy 11:161-8
- Dodge R., Cline M. G., Burrows, B., 1986. Am. Rev. Resp. Dis. 133:981-986
- Empey, D. W. , Laitinen, L. A., Jacobs, L., Gold, W. M., and Nadel, J. A., 1976. Am. Rev. Respor. Dis. 113:131-139
- Enarson, D. A., Vedal, S., Schulzer, M., Dybuncio, A. and Chan-Yeung, M., 1987. Am. Rev. Resp. Dis. 136:613-617
- Harber, P. 1992. J. Occumed. Feb. 120-128
- Hendrick, D. J., Fabbri, L. M., Hughs, J. M., 1986. Am. Rev. Resp. Dis. 133:600-604
- Jones, R. N., Rando, R. J., Glindmeyer, H. W., Foster, T. A., Hughes, J. M., O'Neil, C. E., and Weill, H., 1992. Am Re. Resp. Dis. 871-877
- Josephs, L. K., Gregg, I., Mullee, M. A., and Holgate, S. T., 1989. Am. Rev. Resp. Dis. 140:350-357
- Jin, R., and M. H. Karol, 1988a., Intra-and Intermolecular reactions of 4,4'-diisocyanatodiphenylmethane with human serum albumin, Chem. Res. Toxicol., 1(8):283
- Jin, R., and M. H. Karol, 1988b., Diisocyanate antigens that detect specific antibodies in exposed workers and guinea pigs, Chem. Res. Toxicol., 1(8):288

- Laemmli, E. K., 1970. Nature 227:680-685
- McConnell, L. H., Fink, J. N., Schluter, D. P., and Schmidt Jr., M. G.,
1973. Ann. Intern. Med. 78:888-890
- McFadden, E. R., Jr., 1984. J. Allergy Clin. Immunol. 73:413-428
- National Research Council, 1992. Biological Marker in immunotoxicology, pp.
34-36
- Paggiaro, P. L., Filieri M., Loi, A. M. 1983. Absence of IgG antibodies to
TDI-HSA in a radioimmunological study, Clin Allergy, 13:75-9
- Patterson, R., Harris, K. E., Pruzansky, J. J., and Zeiss, R., 1982. J.
Lab. Clin. Med. 99:615-623
- Patterson, R., Hargreave, F. E., Grammer, L. C., Harris, K. E., and
Dolovich, J., 1987. Toluene diisocyanate respiratory reactions. Int.
Arch. Allergy Appl. Immunol. 84:93-100
- Pepys, J., Pickering, C. A., and Hughes, E. G., 1972. Clin. Allergy 2:391-
396
- Pezzini, A., Riviera A., Paggiari, P., et al. 1984. Specific IgE antibodies
in twenty-eight workers with diisocyanate-induced bronchial asthma,
Clin. Allergy 14:543-61
- Redline S., Tager, I. B., Speizer, F. E., Rosner, B., and Weiss S. T.,
1989. Am. Rev. Respir. Dis. 140:172-178
- Salvaggio, J. E., Gutcher, R. T., and O'Neil, C. E., 1986. J. Allergy Clin.
Immunol. 78:1053-1058.

Szentivanyi, A., 1968. J. Allergy Clin. Immunol. 42:203-232. Weiss S., 1990
Chest 98:225-231

Zeiss, C. R., Patterson, R., Pruzansky, J. J., Miller, M. M., Rosenberg,
M., and Levitz, D., 1977. J. Allergy Clin. Immunol. 60:96-103

Zeiss, C. R., Wolkonsky, P., Chacon, R., Phyllis, A., Tuntland, A., Levitz,
E., Prunzansky, J. and Patterson, R., 1983. Ann. Internal Med.
98:8-12

직업성 천식 유발물질 취급 근로자의
면역학적 특성에 관한 연구

(93-1-13)

발행일 : 1993. 12

발행인 : 정 호 근

발행처 : 한국산업안전공단 산업보건연구원

인천직할시 북구 구산동 34-3

전화 : (032)518-0861

인쇄인 : 송 완 택

인쇄처 : 성일문화사

<비매품>