

알레르겐 표준화

박중원, 정경용

연세의료내과학교실 및 연세 알레르기 연구소

Allergen standardization

Jung-Won Park, Kyoung Yong Jeong

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

Allergen immunotherapy (AIT) and diagnostic tests are based on well qualified allergen extracts, which are derived from biologic organisms. The allergenicity of the extracts is markedly affected by the climate, soil, year of production, storage methods, and manufacturing processes. Thus, standardization is a crucial process to guarantee the clinical efficacy and safety of the treatment and diagnostic reagents in allergic diseases. There are 2 different standardization processes, one is *In vivo* and the other is *in vitro* standardization. *In vivo* standardization is done by skin prick or intradermal tests. For *in vitro* standardization, measurements of weight/volume and protein nitrogen units have been widely used since the early period of AIT. In the 1970s, immunological methods such as radial immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) inhibition test and basophil activation test were developed. Allergen potency measured by ELISA inhibition test reflects the potency measured by skin tests and has been widely used for quality control of batch-to-batch variation. Recently, standardizations focused on the major allergen content of extracts have developed. Standardization for major allergens requires reliable reference materials (RMs) made of recombinant allergens and 2-site ELISA kits. However, only a few reliable RM and 2-site ELISA kits are available. For the standardization process, allergen RMs are essential. The Center for Biologics Evaluation and Research of the U.S. Food and Drug Administration provides 19 allergen RMs, and our research team also proved 9 RMs which are important in Korea. In conclusion, allergen standardization is an essential process for the development of reliable treatment and diagnostic reagents, and allergy specialist should be familiar with the concept of allergen standardization. (*Allergy Asthma Respir Dis* 2018;6:191-196)

Keywords: Allergen standardization, Allergen immunotherapy, Reference material

서론

알레르겐 표준화는 Noon¹이 1911년 처음 알레르겐 특이 면역요법을 실시할 때부터 시작되었다. 알레르기질환을 유발하는 알레르겐은 생물학적 제제이며, 원료 물질의 알레르겐 함량 및 역가는 기후, 토양, 품종, 생산된 년도, 저장 방법, 그리고 알레르겐 추출방법, 제조 공정에 따라서 많은 차이가 있다.² 알레르기질환을 진단하는데 사용되는 시약과 환자의 면역조절에 널리 이용되는 면역요법 치료제의 임상 효과와 환자의 안전을 담보하기 위해서는 해당 제품의 알레르겐 항원 역가가 정확하게 규정되어야 한다. 최근의 알레르기

면역요법에 관한 임상연구 결과는 표준화된 알레르겐을 이용하여 면역요법을 진행하도록 강력하게 권고하고 있으며,³ 미국 U.S. Food and Drug Administration (FDA)에서는 표준화가 이루어지지 않은 제품들에 대해서 안전성과 치료 효과에 대해 입증하지 못한 제품의 판매를 조만간 금지할 예정이다.⁴ 이러한 점에서 볼 때 알레르겐 표준화에 대한 이해가 임상 의사에게도 필요하다.

알레르겐 표준화는 검사 대상이 되는 알레르겐 추출물의 알레르겐 역가를 어떻게 정확하게 측정할 것인가를 규정하는 것이다. 알레르겐 표준화는 크게 두 부분으로 구분된다. 먼저 알레르겐 역가 측정 시 기준이 되는 표준참조물질을 만들어야 하며, 두 번째는

Correspondence to: Jung-Won Park  <https://orcid.org/0000-0003-0249-8749>

Department of Internal Medicine and Allergy Institute, Yonsei University College of Medicine, 50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea

Tel: +82-2-2228-1961, Fax: +82-2-2227-7932, E-mail: parkjw@yuhs.ac

• This research was supported by a grant from the Korea Healthcare Technology R&D Project through Korean Health Industry Development Institute, which is funded by Republic of Korea's Ministry of Health, Welfare (HI14C1324).

Received: October 14, 2017 Revised: October 27, 2017 Accepted: November 8, 2017

© 2018 The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease
The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

알레르겐 역가를 측정하는 방법을 구체적으로 규정하는 것이다.⁵ 이번 종설에서는 표준화 과정의 현재와 미래에 대해서 기술하며, 이에 대한 이해를 돕고자 한다.

원재료 확보

알레르기를 유발하는 원재료(raw material)가 추출물의 품질 결정에 매우 중요하다. 돼지풀의 경우 같은 장소에서 채집한 꽃가루임에도 불구하고 1980년에서 1995년 사이에 Amb a 1 함량이 약 10배의 변화가 확인된 바 있다.² 진드기나 바퀴벌레 온도, 습도, 사료 등의 사육 조건에 따라 알레르겐 생산량이 달라질 수 있으므로 일정한 조건에서 사육할 수 있어야 한다. 약충, 유충, 성충의 구성비뿐 아니라 암수비율도 알레르겐 농도에 영향을 준다. 더욱이 꽃가루 알레르겐은 기후나 해충 등에 대항하여 생산되는 단백질인 경우가 많으므로 표준화가 쉽지 않다. 특히, 야외에서 채집한 꽃가루는 분류학적 문제 외에도 곰팡이 등에 오염될 수 있으므로 전문가의 도움이 필요하다.⁶

알레르겐 추출 과정

알레르겐 추출 과정은 일반적으로 원재료 확보, 지질제거, 동결 건조, 알레르겐 추출, 투석, 여과, 동결건조 등의 순서로 진행된다. 원재료 확보에서 정확한 품종 등에 대한 전문가의 자문이 필요하다. 지질제거 과정은 항원성이 낮으며 이후 단계에 영향을 줄 수 있는 지질을 제거하는 과정이다. 알레르겐 추출 단계는 주요 알레르겐을 특성을 이해하고 있어야 하며, 알레르겐 특성에 따른 적합한 완충용액을 이용해야 한다. 투석 과정은 항원성이 없는 hapten을 비롯한 염분을 제거한다. 이 논문 연구진이 알레르겐 추출물을 생산하고 표준화하는 전반적인 과정에 대해서는 최근 논문에서 비교적 자세히 설명한 바 있다.⁷

미국과 유럽의 알레르겐 표준화의 차이

미국과 유럽의 알레르겐 표준화에는 상당한 차이가 있다. 미국의 경우 FDA 산하의 Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)에서 주도적으로 미국에서 시판되는 알레르겐 추출물의 역가를 측정하고 있으며, 각 회사의 면역요법 치료제 batch가 시장에 풀리기 전에 CBER에서 batch의 알레르겐 역가를 측정하고 후 그 값이 허용 범위(신고 역가의 50%–200%) 내에 떨어지지 않아야 출시할 수 있다. 미국에서 판매되는 면역요법의 역가는 *in vivo* 표준화한 경우 Biologic Allergy Unit (BAU)로 표시되어 출시되며, *in vivo* 표준화한 참조물질과 비교하여 역가를 결정할 경우 allergy unit (AU) 단위를 사용하기 때문에 다른 회사의 제품 간의 알레르겐 역가를 쉽

Table 1. Allergen potency units of available immunotherapy reagents in Korea

Company	Allergen unit	Standardization
Stallergenes	Index of reactivity (IR)	Skin prick test
Lofarma	Diagnostic biological units	Skin prick test
Hollister-Stier	Bioequivalent allergen unit (BAU)	Intradermal skin test
Allergy therapeutics	Therapeutic unit (TU) Diagnostic unit (DU)	Skin prick test
Alk-Albero	Standardized quality units tablet (SQ) Standard treatment unit (STU)	Skin prick test
Allergopharma	Standard biological unit (SBE) Therapeutic unit (TU)	Skin prick test

게 비교할 수 있다. 유럽에서는 알레르겐 표준화의 주체가 제조회사이며 각 회사마다 *in house* 알레르겐 표준참조물질을 가지고 표준화가 진행된다. 또한 각 회사마다 알레르겐의 역가 단위가 서로 달라 출시된 여러 회사 제품의 역가를 직접적으로 비교할 수 없다.⁸ Table 1에는 미국과 유럽회사의 알레르기 면역요법 치료제에 표시된 역가 단위를 정리하였다. 또한 미국의 면역요법제는 aqueous extract이며 FDA에서는 adjuvant나 allergoid 제품의 장기간 안전성 및 효과를 인정하지 않고 있다. 반면에 유럽의 면역요법 치료제의 제형은 다양하다. Aluminum hydroxide과 같은 adjuvant를 첨가하거나, 알레르겐에 tyrosine이나 monophosphoryl lipid를 알레르겐과 결합시킨 allergoid를 사용하는 경우, 그리고 glutaldehyde를 이용하여 polymerized allergen을 사용하고 있으며, 이로 인해 알레르겐의 mast cell 및 basophil에 대한 allergenicity가 약화되어 면역요법제의 부작용을 줄인 반면에 T-cell 및 B-cell lymphocyte에 대한 immunogenicity는 강화시켰다고 주장하고 있다. 그렇지만 일부 연구에서는 aqueous extract 제품에 비해 allergoid 제품의 allergenicity 뿐만 아니라 immunogenicity도 낮다는 보고도 있다.^{9,10} 이러한 변형된 알레르겐 추출물은 IgE 결합을 기반으로 한 알레르겐 역가 측정이나 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 분석이 불가능하다.¹¹ 추후 allergoid 제품의 표준화에 대해서 일치된 지침서가 만들어지기를 기대한다.

In vivo total allergen 역가 표준화

현재의 핵심적인 알레르겐 표준화는 IgE와의 결합능 평가를 기반으로 하고 있다. *In vivo* 표준화는 기본적으로 피부시험을 통해서 시행한다. *In vivo* 방법으로 측정할 역가 단위에는 Scandinavia에서 개발된 시스템에는 histamine equivalent in prick testing (HEP)과 biologic unit (BU)가 있고, 미국에서 개발된 시스템으로는 BAU가 있다. Scandinavia 시스템은 주로 유럽의 회사에서 *in vivo* 표준화에 주로 사용되는데, 알레르기가 예민하게 감작된 20명의 환자에서 피부단자시험으로 표준화를 한다. 먼저 10 HEP를 설명하면, 이

는 피부단자시험상 histamine dihydrochloride 10 mg/mL과 같은 크기의 팽진을 유발하는 알레르겐 농도를 말한다.¹² BU는 1/1,000 HEP를 말한다. Stallergenes에서는 index of reactivity (IR) 단위를 사용하는데, 100 IR은 피부단자시험에서 평균 팽진의 크기가 37.5 mm²를 유발하는 알레르겐 농도를 말한다. 미국의 시스템인 BAU는 알레르겐에 예민하게 감작된 알레르기 환자 15명을 대상으로 피내반응검사를 시행하여 표준화한다. 단계적으로 3배씩 희석한 알레르겐 추출액 중 14번째 희석액으로 시행한 피내반응검사에서 홍반의(flare) 장단축의 합이 50 mm일 경우에 단계별로 희석하기 전 알레르겐 추출액을 100,000 BAU/mL라고 정하였다.¹³

In vivo total allergen 역가 표준화

처음에는 단백질의 농도를 기반으로 *in vitro* 표준화를 시작하였다. 면역요법을 처음 시도한 Noon이 Noon unit를 도입하였다. Noon unit는 당초 티모시 꽃가루 1 µg을 1 mL 식염수로 추출할 수 있는 양을 말한다.¹ 따라서 1 gm의 꽃가루에서 10 mL의 buffer로 추출할 경우에는 이를 10,000 Noon unit/mL로 표시한다. Noon 시스템은 기본적으로 weight by volume (w/v)을 기반으로 하고 있는데, 현재 Noon unit는 사용되지 않지만 w/v 방식은 아직도 protein nitrogen unit (PNU)과 더불어 표준화되지 않은 다양한 꽃가루 알레르겐 추출액의 역가를 표시하는데 널리 이용되고 있다. Noon 단위는 모든 꽃가루에서 추출되는 알레르겐 양이 거의 같다는 것을 전제 조건으로 하고 있는데, 사실 꽃가루마다 추출되는 단백질 양에 많은 차이가 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 1930년대에 Cooks는 PNU 단위를 사용하여 면역요법 시 투여되는 알레르겐 양을 정하였다. 일반적으로 1 PNU는 phosphotungstic acid에 침전이 되는 10 ng의 protein nitrogen 양을 말하며, 대략 0.06 µg의 단백질을 말한다.^{14,15} PNU는 현재에도 알레르기 항원성을 일부러 약화시킨 allergoid extract를 정량하는 데 널리 이용된다.

면역학적 방법을 기반으로 한 *in vitro* 표준화는 추출물의 전체 알레르겐 역가를 특이 항체를 이용하여 측정한다. 가장 중요한 것이 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) inhibition이다. 이 방법은 알레르기 환자의 혼합 혈청을 이용하는데 신뢰성이 높으며, *in vivo* 피부시험에 의한 알레르겐 역가 측정치를 잘 반영한다고 알려져 있다. 측정하고자 하는 알레르겐 추출물의 역가는 표준 참조물질과 비교하여 결정한다. 일반적으로 특이 IgE를 50% 억제하는 알레르겐 농도를 가지고 역가를 비교하며, 낮은 농도에서 억제될수록 알레르겐 역가가 높다. ELISA inhibition 곡선 모양을 보면 추출물의 알레르겐 구성 요소도 일부 알 수 있다. 표준참조물질과 비교하여 inhibition 곡선이 평행할 경우에는 표준참조물질과 검사 대상이 되는 알레르겐 추출물을 구성하는 알레르겐의 성상이 유사하며, 만약 평행하지 않을 경우에는 추출물 내의 알레르겐

성상이 비교하고자 하는 표준참조물질과 상당한 차이가 있음을 의미한다.⁵ 대부분의 제약회사에서는 알레르겐 추출물 batch의 역가를 표준참조물질과 ELISA inhibition법으로 비교하여 batch to batch variation을 관리한다. 그러나 기본적으로 ELISA 억제실험은 추출 내의 모든 알레르겐과 IgE 결합능을 전체적으로 평가하는 것이지 알레르기 증상을 유발하는 능력, 혹은 면역관용을 유도하는 immunogenicity를 직접적으로 반영한다고 볼 수는 없다. 특히 유럽에서는 allergoid 제품을 많이 시판하는데, 이러한 제품의 효과를 평가할 때 전체 알레르겐의 IgE 결합능을 기반으로 하는 표준화는 적절하지 않다. 또한 ELISA inhibition 검사의 경우 알레르기 환자의 혼합혈청을 이용하는데, 나라마다 감작되는 major allergen에 상당한 차이가 있을 수 있다.¹⁶ 따라서 ELISA 억제 실험은 사용되는 환자의 혈청에 따라라도 검사 결과에 상당한 차이가 있을 수 있다.¹¹ 또한 ELISA 측정법은 근본적으로 알레르겐과 IgE와의 결합능을 가지고 알레르겐 항원성을 평가하고 있다. 이러한 항체와의 결합능이 알레르겐 항원성을 그대로 반영하는지는 아직까지 명확하게 이야기할 수 없다. 이러한 단점을 보완하기 위해서 최근에는 basophil activation test (BAT)를 알레르겐 항원성을 평가하는 데 활용되고 있다. BAT는 환자의 말초혈액에 있는 basophil, 아니면 basophil leukemia cell line 등을 이용하며, 알레르겐에 노출되었을 때 활성화된 basophil 표면의 CD63 혹은 CD203c 발현을 flow cytometry를 이용하여 측정한다.¹⁷

Major allergen 함량을 이용한 in vitro 표준화

총 알레르겐의 IgE 결합능을 평가하는 표준화 방법의 여러 가지 단점을 고려하여 최근에는 major allergen을 측정하여 표준화하는 방안이 대해서 많은 연구가 이루어지고 있다. 생화학적 기법으로 알레르겐 총 추출물 내의 어떤 단백질이 알레르겐으로 작용하는지 밝히는 과정에서 major allergen의 개념이 만들어졌다. 돼지풀 꽃가루 추출물에서 처음으로 Amb a 1이 추출되어 major allergen으로 밝혀진 이후로¹⁸ 중요 알레르기 유발물질에서 major allergen이 속속 확인되고 명명되었다. 일반적으로 피하면역요법에서 유지 용량으로 major allergen의 함량이 5–20 µg 내로(연간 투여량으로 환산하면 50–200 µg) 투여하는 것을 권장하고 있으며,^{19,20} 이러한 사실은 알레르겐 추출액 내의 major allergen 양이 면역요법의 효과를 결정하는 데 매우 중요함을 시사한다. 그러나 알레르겐 추출물의 경우에는 major allergen의 성분에 상당한 차이가 있으며, 알레르겐 이외에 endotoxin, chitin, protease 등, 면역학적으로 adjuvant로 작용할 수 있는 생화학적 제제가 포함되어 있어서 표준화를 시행하기 상당한 어려움이 있다. 또한 자작나무나 돼지풀 꽃가루, 그리고 고양이 털 알레르겐의 경우에는 group 1 major allergen이 알레르기 항원성의 대부분을 차지하기 때문에 이들 major al-

lergen으로 표준화를 한다 하더라도 문제가 되지 않는다. 그러나 집 먼지진드기, 바퀴, 개털 알레르기와 같은 경우에는 여러 major allergen이 알레르기 증상을 유발하는 데 관여하므로 특정 major allergen으로 표준화하는 방식에 대한 임상적인 효용성을 증명하는데 어려움이 있다. 또한 minor allergen도 major allergen보다 그 역할이 훨씬 작지만 알레르기 증상을 유발하는 데 관여한다. 이러한 여러 문제점이 있기 때문에 현재의 알레르겐 표준화 규정을 보면 돼지풀과 고양이 털 알레르겐을 제외하고는 총 알레르겐 역가를 중심으로 표준화를 진행하고 있다. 그러나 major allergen을 이용하여 표준화를 진행하려는 여러 움직임이 있으며, 앞으로는 두 가지 측면, 총 알레르겐 및 major allergen을 병행해서 표준화가 이루어질 것으로 생각한다.

알레르겐 추출물의 major allergen의 성상을 알아보기 위해서 SDS-PAGE, Western blotting, 2-site ELISA, mass spectrometer, circular dichroism spectrum analysis 등 다양한 방법이 이용되고 있다. 일반적으로 SDS-PAGE는 batch to batch variation을 평가하는데 유용하게 사용된다. 특히 polyclonal 혹은 monoclonal antibodies를 사용한 2-site ELISA system이나 mass spectrometer 법의 경우에는 환자 개인별로 상당한 차이가 있을 수 밖에 없는 혼합혈청 사용을 피할 수 있어서 좀 더 객관적으로 major allergen을 정량화할 수 있다는 장점이 있다.

알레르기 추출물 내의 major allergen의 아미노산 sequence를 보면 일부 차이가 있는 isoallergen이나 isoform을 확인할 수 있다. Isoallergen에 따라 monoclonal antibody 및 알레르기 환자의 특이 IgE와의 결합력이 상당한 차이가 있으며, 중요한 여러 isoallergen을 모두 유효하게 인식하는 monoclonal antibody를 확보하는 것은 매우 어려운 일이다. 이는 monoclonal antibody를 이용한 2-site ELISA kit의 측정 능력에 상당한 차이가 있을 수 있음을 시사한다.^{21,22} 지금까지의 여러 환경역학 조사 결과를 보면 2-site ELISA kit를 이용하여 major allergen을 측정하였는데, 사용하는 monoclonal antibody에 따라서 측정치가 실제보다 적게 측정되었을 개연성을 시사한다. 심지어 동일한 2-site kit를 이용한다고 하더라도 사용하는 buffer, microplate, 반응 시간과 같은 측정 방법의 작은 차이에 따라서도 측정치에 5배까지 차이가 있다.²³ 또한 recombinant major allergen이 원래의 알레르겐과 유사한 구조를 갖기 위해서는 아미노산 서열의 folding이 잘 이루어져야 하고, 쉽게 단백질이 뭉쳐지지 않아야 하며, solubility가 있어야 하는데, 이러한 양질의 recombinant allergen을 확보하기가 쉽지 않다. CBER에서는 이러한 단점을 감안하여 아직까지 주요 major allergen 농도를 측정하는 방법으로 2-site ELISA 방법을 이용하지 않고, polyclonal antibodies를 사용한 radial immunodiffusion 방법을 이용하고 있다.

이러한 어려운 점에도 불구하고 추출물 내의 major allergen을 측정함으로써 표준화를 하고자 하는 시도가 있다.²⁴ 대표적인 시도

가 EU에서 주도한 CREATE project (Development of Certified Reference Materials for Allergenic Products and Validation of Methods for their Quantification)이다. 이 project는 크게 2부분으로 구분되는데, 첫째는 표준참조물질로 삼을 수 있는 recombinant major allergen을 찾는 것이고, 두 번째는 major allergen을 측정할 수 있는 2-site ELISA kit의 임상적 유용성을 확인하는 것이다.²⁵ 이 Project는 먼저 전세계적으로 중요한 4가지 알레르겐(집먼지진드기, 자작나무, 잔디, 그리고 올리브 꽃가루)에서 recombinant major allergen을 표준참조물질로 사용할 수 있는지 조사하였는데, 후속 과제인 BSP090 project를 통해서 rBet v 1과 rPhl p 5a를 major allergen을 측정하는데 유용한 표준참조물질로 인정하였고, 두 가지 rBet v 1 측정용 2-site ELISA kits가 임상적으로 유용함을 확인하였다.²⁶ rPhl p 5 ELISA kit의 임상적 효용성에 대해서는 현재에도 검증 중에 있다. 점차적으로 알레르겐 추출액 내의 major allergen을 정량 측정하는데 2-site ELISA kit의 활용이 증가하는 추세이다.

최근에는 mass spectrometer법을 이용하여 major allergen을 정량하여 표준화를 하려는 움직임이 있다.^{25,27} 이 방법은 isoallergen의 아미노산 염기서열을 모두 알고 있다면 추출물 내의 major allergen 총량을 정확하게 측정할 수 있으며, 나라마다 알레르기 환자에서 중요한 major allergen에 상당한 차이가 있을 수 있는 혼합혈청을 이용하지 않고 생화학적으로 표준화를 할 수 있다는 장점이 있다. 현재는 알레르겐의 특성을 연구하거나 규명하는 연구 목적으로 주로 사용되고 있는데, 이를 알레르겐 추출물의 표준화 및 allergoid 면역치료제의 표준화에 사용하고자 하는 시도가 보고되고 있어,²⁸ 향후 이에 대한 관심이 필요하다. 또한 최근에는 비교적 표준화가 용이한 재조합 단백질을 이용한 진단과 면역요법 제품을 생산하려는 시도가 지속되고 있으며,²⁹ 이러한 관점에서 보면 major allergen을 중심으로 하는 표준화의 중요성이 지속적으로 커지고 있다.

표준 알레르겐 참조물질

알레르겐 표준화를 위해서는 비교 기준이 되는 알레르겐 표준참조물질이 가장 중요하다. 전 세계적으로 여러 연구 기관에서 표준참조물질을 만들어서 필요로 하는 기관, 연구자에게 공급하고 있다. 여러 기관에서 만들어진 표준참조물질을 보면 알레르기 면역요법의 대상이 되는 알레르겐을 중심으로 되어 있음을 알 수 있으며, 이는 표준화의 근본적인 목적을 고려해보면 어쩌면 당연하다고 하겠다. 미국 CBER에서는 19개의 알레르겐에 대한 알레르겐 표준참조물질을 만들어서 공급하고 있다.³⁰ 미국에서 승인된 표준화 알레르겐 항목은 다음과 같다: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, cat pelt, cat hair, short ragweed pollen, 8개의 grass pollen, 그리고 6개의 벌독 알레르겐. 이들 알레르

Table 2. List of standardized allergen extracts in United States

Allergen	Tests for allergen potency	Unit
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	ELISA inhibition	AU/mL
<i>Dermatophagoides farinae</i>		
Cat pelt (<i>Felis domesticus</i>)	RID for Fel d 1 IEF	BAU/mL (equivalent to AU/mL)
Cat hair (<i>Felis domesticus</i>)		
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	RID for Amb a 1	Amb a 1 units
Bermuda grass	ELISA inhibition IEF	BAU/mL
Red top grass		
Kentucky blue grass		
Perennial rye grass		
Orchard grass		
Timothy grass		
Meadow fescue grass		
Sweet vernal grass		
Yellow hornet (<i>Vespa</i> species)	Hyaluronidase and phospholipase activity	µg protein
Polistes species		
Honey bee		
White faced hornet (<i>Vespa</i> species)		
Yellow jacket (<i>Vespula</i> species)		
Mixed vespid (<i>Vespa</i> + <i>Vespula</i>)		

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; AU, allergy unit; RID, radial immunodiffusion; IEF, isoelectric focusing; BAU, biologic allergy unit.

젠과 알레르겐 역가 측정 방법은 Table 2에 기술하였다. 한국에서는 이번 연구팀이 질병관리본부의 지원을 받아 중요 알레르겐(*D. farinae*, *D. pteronyssinus*,³¹ *Blattella germanica*,³² Cat hair, 꽃가루로는 *Quercus acutissima*, *Humulus japonica*, *Artemisia vulgaris*, *Ambrosia artemisiifolia* var *elator*,⁷ 식품으로는 buckwheat, 그리고 왕침개미의 group 3 major allergen인 recombinant Pac c 3에³³ 대한 표준물질 제조하였으며, 현재 필요로 하는 연구자에게 공급하고 있다. 저자의 연구팀에서 만들고 있는 표준물질은 한국에서 중요한 알레르겐을 중심으로 표준화를 하였으며, 공급 가능한 알레르겐은 Table 3에 정리되어 있으며,³⁴ 추가 알레르겐에 대해서도 표준화 작업을 계속하고 있다. 그 이외에도 World Health Organization (WHO)/International Union of Immunological Societies (IUIS)의 감독을 받는 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)에서 *Dermatophagoides pteronyssinus*, Dog (*Canis familiaris*), 꽃가루로는 돼지풀과(*Ambrosia artemisiifolia*), 티모시(*Phleum pratense*), 자작나무(*Betula verrucosa*)에 대한 표준화된 알레르겐 참조물질을 공급하고 있다.^{35,36} 그러나 WHO/IUIS 표준 알레르겐 참조물질을 미국 FDA에서 채택하지 않았고, 현재 제한적으로 이용, 공급되고 있는 실정이다.

결론

표준화된 알레르겐을 이용한 진단 및 치료제를 사용해야 임상 효과와 환자의 안전을 보장할 수 있다. 알레르겐 추출물은 생물학

Table 3. Available standardized allergen reference materials in Korea

Allergen	Standardization method	Unit
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	ID skin test, ELISA inhibition	AU/mL
<i>Dermatophagoides farinae</i>	ID skin test, ELISA inhibition	AU/mL
Cat hair (<i>Felis domesticus</i>)	ID skin test, ELISA inhibition	AU/mL
<i>Blattella germanica</i>	ID skin test, ELISA inhibition	AU/mL
Mugwort (<i>Artemisia vulgaris</i>)	ID skin test, ELISA inhibition	AU/mL
<i>Humulus japonicus</i>	ID skin test, ELISA inhibition	AU/mL
Oak pollen (<i>Quercus acutissima</i>)	ID skin test, ELISA inhibition	AU/mL
Buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	Protein, ELISA inhibition	µg protein
Recombinant Pac c 3 (<i>Pachycondyla chinensis</i>)	Protein	µg protein

ID, intradermal; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; AU, allergy unit.

적 제제이며, 동일한 품종에서 언더라도 환경, 기후, 생산년도, 저장, 알레르겐 추출방법 등에 따라 알레르겐 역가에 많은 차이가 있으며, 알레르겐 진단 및 치료제로 제품화하기 위해서는 알레르겐 표준화가 반드시 필요하다. 표준화는 Noon이 면역요법을 처음 소개할 때부터 시작하였으며, 현재의 품질관리 규정은 주로 알레르겐 추출액의 전체 역가를 면역학적 방법으로 표준화하는 것을 권장하고 있다. 알레르겐의 전체 역가 측정은 피부시험과 ELISA 억제 시험을 중심으로 이루어지고 있다. 최근 들어 알레르겐 추출물 내의 major allergen이 면역요법의 효과를 결정하는 데 중요하다고 알려졌고, 이를 반영하여 추출물 내 major allergen의 함량을 측정하여 표준화를 하려는 움직임이 있으며, 이에 대한 방법론적인 합의를 만들어가고 있는 추세이다. 또한 mass spectrometer 법은 환자마다 상당한 차이가 있는 혈청의 영향을 받지 않고 생화학적으로 major allergen을 정량측정이 가능하므로 이를 활용하여 표준화에 이용하려는 움직임이 활발하다.

REFERENCES

- Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. Lancet 1911;177: 1572-3.
- Esch RE. Allergen source materials and quality control of allergenic extracts. Methods 1997;13:2-13.
- Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, et al. International consensus on allergy immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 2015;136:556-68.
- Slater JE, Menzies SL, Bridgewater J, Mosquera A, Zinderman CE, Ou AC, et al. The US Food and Drug Administration review of the safety and effectiveness of nonstandardized allergen extracts. J Allergy Clin Immunol 2012;129:1014-9.
- Slater JE, Esch RE. Preparation and standardization of allergen extracts. In: Adkinson NF, Bochner BS, Burks W, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, et al., editor. Middleton's allergy: principle and practice. 8th ed. Philadelphia (PA): Elsevier/Saunders, 2014. p. 470-81.
- Codina R, Crenshaw RC, Lockey RE. Considerations about pollen used for the production of allergen extracts. J Allergy Clin Immunol Pract 2015;3:676-82.

7. Jeong KY, Son M, Choi SY, Park KH, Park HJ, Hong CS, et al. Standardization of weed pollen extracts, Japanese hop and mugwort, in Korea. *Yonsei Med J* 2016;57:399-406.
8. Zimmer J, Vieths S, Kaul S. Standardization and regulation of allergen products in the European Union. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016;16:21.
9. Park KH, Lee SC, Son YW, Jeong KY, Shin YS, Shin JU, et al. Different responses in induction of allergen specific immunoglobulin G4 and IgE-blocking factors for three mite subcutaneous immunotherapy products. *Yonsei Med J* 2016;57:1427-34.
10. Henmar H, Lund G, Lund L, Petersen A, Würtzen PA. Allergenicity, immunogenicity and dose-relationship of three intact allergen vaccines and four allergoid vaccines for subcutaneous grass pollen immunotherapy. *Clin Exp Immunol* 2008;153:316-23.
11. Reuter A, Lüttkopf D, Vieths S. New frontiers in allergen standardization. *Clin Exp Allergy* 2009;39:307-9.
12. Dreborg S. Precision of biological standardization of allergenic preparations. *Allergy* 1992;47(4 Pt 1):291-4.
13. Turkeltaub PC. Biological standardization of allergenic extracts. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1989;17:53-65.
14. May JC, Sih JT, Miller JR, Seligmann EB Jr. Optimization of parameters in protein nitrogen unit precipitation procedure for allergenic extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1979;63:87-97.
15. Cooks RA, Stull A. The preparation and standardization of pollen extracts for the treatment of hay fever. *J Allergy Clin Immunol* 1933;4:87-91.
16. Vereda A, van Hage M, Ahlstedt S, Ibañez MD, Cuesta-Herranz J, van Odijk J, et al. Peanut allergy: clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:603-7.
17. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy* 2015;70:1393-405.
18. King TP, Norman PS, Connell JT. Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen. II. *Biochemistry* 1964;3:458-68.
19. Cox L, Li JT, Nelson H, Lockey R. Allergen immunotherapy: a practice parameter second update. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(3 Suppl): S25-85.
20. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102(4 Pt 1):558-62.
21. Park JW, Kim KS, Jin HS, Kim CW, Kang DB, Choi SY, et al. Der p 2 isoallergens have different allergenicity, and quantification with 2-site ELISA using monoclonal antibodies is influenced by the isoallergens. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1042-7.
22. Jeong KY, Jin HS, Oh SH, Hong CS, Lee IY, Ree HI, et al. Monoclonal antibodies to recombinant Der f 2 and development of a two-site ELISA sensitive to major Der f 2 isoallergen in Korea. *Allergy* 2002;57:29-34.
23. Grier TJ, Hazelhurst DM, Duncan EA, West TK, Esch RE. Major allergen measurements: sources of variability, validation, quality assurance, and utility for laboratories, manufacturers, and clinics. *Allergy Asthma Proc* 2002;23:125-31.
24. Ferreira F, Wolf M, Wallner M. Molecular approach to allergy diagnosis and therapy. *Yonsei Med J* 2014;55:839-52.
25. van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy* 2008;63:310-26.
26. Kaul S, Zimmer J, Dehus O, Costanzo A, Daas A, Buchheit KH, et al. Standardization of allergen products: 3. Validation of candidate European Pharmacopoeia standard methods for quantification of major birch allergen Bet v 1. *Allergy* 2016;71:1414-24.
27. Spiric J, Schulenburg T, Schwaben L, Engin AM, Karas M, Reuter A. Model for quality control of allergen products with mass spectrometry. *J Proteome Res* 2017;16:3852-62.
28. Carnés J, Himly M, Gallego M, Iraola V, Robinson DS, Fernández-Caldas E, et al. Detection of allergen composition and in vivo immunogenicity of depigmented allergoids of *Betula alba*. *Clin Exp Allergy* 2009;39:426-34.
29. Tscheppe A, Breiteneder H. Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2017;172:187-202.
30. Morrow KS, Slater JE. Regulatory aspects of allergen vaccines in the US. *Clin Rev Allergy Immunol* 2001;21:141-52.
31. Jeong KY, Choi SY, Lee JH, Lee IY, Yong TS, Lee JS, et al. Standardization of house dust mite extracts in Korea. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012;4:346-50.
32. Jeong KY, Choi SY, Lee JH, Lee JS, Yong TS, Hong CS, et al. Preparation and characterization of an extract of german cockroach from a Korean source. *Allergy Asthma Immunol Res* 2013;5:102-5.
33. Jeong KY, Yi MH, Son M, Lyu D, Lee JH, Yong TS, et al. IgE reactivity of recombinant Pac c 3 from the Asian needle ant (*Pachycondyla chinensis*). *Int Arch Allergy Immunol* 2016;169:93-100.
34. Jeong KY, Lee JH, Kim EJ, Lee JS, Cho SH, Hong SJ, et al. Current status of standardization of inhalant allergen extracts in Korea. *Allergy Asthma Immunol Res* 2014;6:196-200.
35. Helm RM, Gauerke MB, Baer H, Löwenstein H, Ford A, Levy DA, et al. Production and testing of an international reference standard of short ragweed pollen extract. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:790-800.
36. Ford A, Seagroatt V, Platts-Mills TA, Löwenstein H. A collaborative study on the first international standard of *Dermatophagoides pteronyssinus* (house dust mite) extract. *J Allergy Clin Immunol* 1985;75:676-86.