

잔디(*Zoysia japonica*)화분의 알레르겐 검출에 관한 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실

이미경 · 홍천수

서 론

화분증은 식물의 화분에 감작되어 일어나는 알레르기질환으로서 산재되어 있는 식물의 분포에 따라 지역별로 중요시하는 원인이 다양하게 알려져 있다. 특히 구미 각국에서는 화분증이 매우 흔하여 유병율이 전 인구의 약 6.6%로 보고된 바 있으나¹⁾, 한국에서는 약 2%로 낮게 보고되어 있다²⁾. 그러나 국내의 호흡기 알레르기 환자를 대상으로 시행한 알레르기 피부단자시험에는 여러 가지 화분 알레르겐에 대하여 30-50%의 높은 양성율이 보고되었다³⁻⁶⁾. 국내 대기 중의 화분수를 측정 한 결과 수목 화분이 주종을 이루는 3월부터 6월 까지의 봄철 화분기와 잡초화분이 주종을 이루는 8월말 부터 9월까지의 가을철 화분기가 알려져 있으며, 이와 더불어 목초화분은 늦봄부터 초가을 까지 넓게 걸쳐져 있는 것으로 알려져 있다^{7,8)}. 각 화분기별 중요한 화분으로는, 수목화분기에 오리나무, 포플라, 참나무 등이 알려져 있으며 잡초화분기에 쑥, 두드러기 쑥, 환삼덩굴이 알려져 있다. 그러나 목초화분중에는 아직 알레르겐으로서의 역할이 규명되어 있는 화분이 없던 중, 우리 주위환경에서 흔히 볼 수 있는 잔디화분(*Zoysia japonica*)에 대해 국내 호흡기 알레르기 환자에서 실시한 알레르기 피부단자시험에서 양성율을 보고한 바 있으며⁹⁾ 또 잔디 화분추출액으로 기관지 천식유발 검사를 시행하여 조기 천식반응을 관찰한 바 있어¹⁰⁾, 이로 미루어 잔디화분은 중요한 흡입

성 알레르겐으로 관여하리라 사료된다. 이에 연구자는 잔디화분(*Zoysia japonica*)에 대한 피부반응도를 관찰하고 동시에 환자혈청내에서 잔디화분에 대한 특이 IgE를 측정하였으며 알레르겐 내의 주요 알레르겐 성분을 규명 하는 방법인 SDS-PAGE, immunoblotting 및 autoradiography를 이용하여 잔디 화분내 알레르겐 성분 및 주요 알레르겐 분획을 규명하고자 이 연구를 시도하였다.

연구재료 및 방법

가. 연구재료

1) 혈청

(1) 잔디화분에 대한 특이 IgE측정에 이용한 혈청

1987년 3월 1일부터 1988년 2월 28일까지 연세 의대부속 세브란스병원 내과 알레르기 클리닉을 방문하여 시행한 피부단자시험상 잔디화분에 양성 반응을 나타낸 알레르기성 비염, 기관지 천식환자, 담마진환자의 혈청을 영하 20°C 냉동실에서 보관 후 사용하였으며, 대조군으로는 잔디를 포함한 50여종의 알레르겐에 대한 피부단자시험상 전부 음성을 나타낸 환자의 혈청을 사용하였다.

(2) Autoradiography에 이용한 혈청

잔디화분 RIA결합 방사능이 비교적 높은 환자 9명과 목초화분 RAST상 class 2 이상을 나타낸

40명 환자의 혈청을 동량 섞은 혈청 pool, 대조군으로 잔디를 포함한 50여종의 알레르겐에 대한 피부단자시험상 모두 음성을 나타내었던 2명의 환자혈청을 사용하였다.

2) 피부단자시험용 잔디화분 추출액 제조

개화기에 채집한 잔디화분을 ethylether로 탈지 방화 시킨후 modified Coca(0.9% NaCl, 0.4% phenol, 0.25% NaHCO₃) 용액에 1:10w/v으로 72시간 추출시키고 원침시켜 그 상층액을 충분한 양의 0.4% phenol-0.9% NaCl용액으로 투석한 후 멸균소독시킨 glycerine을 동량 혼합하여 1:20w/v용액으로 만들어 피부단자시험에 이용하였다.

3) 잔디화분 조항원제조

개화기에 채집한 잔디화분을 ethylether로 탈지

방화시킨후 phosphate buffered saline(PBS)용액으로 1:50w/v되게하고 4°C에서 72시간 추출하였다. 이를 4°C에서 원심분리(10,000g에서 1시간)하여 그 상층액을 증류수로 투석시킨다음 동결 건조시켜 얻은 분말을 이용하였다. 상기방법에 의하여 얻어 낸 건조조항원 1mg을 1ml의 증류수에 녹인 용액내에는 Lowry법¹¹⁾으로 측정된 단백질 양이 547ug/ml이었다.

4) 우산잔디(Bermuda grass) 및 큰조아재비(timothy) 조항원제조

우산잔디와 큰조아재비 화분은 영국 Bencard 회사에서 공급받았으며 조항원 제조방법은 잔디화분과 동일하였다. 건조 조항원 1mg을 1ml의 증류수에 녹인 용액내에 Lowry법¹¹⁾에 의해 측정된 단백질이 우산잔디는 647ug/ml, 큰조아재비는 764ug/ml이었다.



Fig 1. Description of Zoysia japonica

★잔디 Zoysia japonica Steud.

陽地에서 자라는 多年草로서 줄기가 옆으로 길게 번고 마디에서 뿌리가 내린다. 잎은 길이 5~10cm, 나비 2~5mm로서 편평하거나 안으로 말리며 어릴때는 양면에 털이 있고 밑부분이 葉鞘로 되며 염초 가장자리에 털이 있다. 꽃은 5~6월에 피고 花莖은 높이 15~20cm로서 끝에 길이 3~5cm의 花穗가 달린다. 花序軸에는 마디가 없으며 각 小分枝끝에 1개의 꽃이 달리고 小穗는 卵形으로서 길이 3mm, 지름 1.2~4.5mm이다. 苞穎은 1개이며 길이 3~4mm로서 자줏빛이 도는 潤彩가 있고 護穎은 포형보다 짧으며 膜質로서 1脈이 있고 까락이 없다. 꽃밥은 길이 1.5mm정도이다. (이창복 대한식물도감, 벼목-벼과, 1sted 서울 향문사 p.751)

나. 연구방법

1) 알레르기 피부단자시험

조제된 잔디화분을 이용하여 피부단자시험을 시행하여 15분후에 각각에 대한 팽진 및 발적의 크기를 판독하였으며 평균 팽진크기를 히스타민(1mg/ml)용액에 대한 팽진크기에 대한 비율로 나타내었다.

2) 잔디 알레르겐 특이 IgE측정

(1) 잔디 Radioimmunoassay(RIA)의 최적조건 결정

Nitrocellulose filter paper(Millipore HAHY 304 FO millipore Co.; 0.45um)을 punch하여 만든 disc를, 상기방법으로 제조한 잔디조항원을 각 농도(1-10mg/ml)의 여러 pH(3.4-11.6)의 용액에, 48시간동안 담가두었다가 실온에서 건조시킨후 solid phase로 사용하였다.

(2) 잔디화분 RIA(Fig 2)

상기 방법으로 제조한 solid phase인 nitrocellulose disc(NC disc)를 PBS로 세척한 후 점적되지 않은 부분의 단백질 흡착력을 차단시키기 위하여 매 disc당 200ul의 blocking solution(PBS로 희석시킨 10% newborn calf serum)과 실온에서 60분간 반응시켰다. 이 blocking solution을

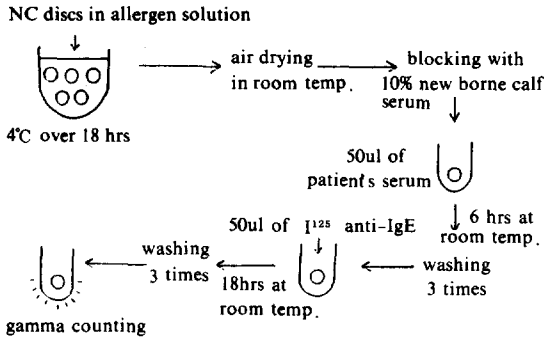


Fig. 2. Schematic drawing of Zoysia RIA.

제거하고 환자의 혈청 50ul를 넣어 6시간 실온에서 반응시키고 PBS로 3회세척한후 anti-IgE RAST tracer(Phadebas, Uppsala, Sweden)를 50ul씩 넣고 18시간 반응시킨후 세척하고 r-counter를 이용하여 결합방사능을 측정하였다.

(3) 혈청희석에 따른 잔디화분 RIA

잔디화분에 대한 RIA상 결합 방사능이 높은 3예(Table 1)의 혈청을 1:4, 1:10, 1:100, 1:1000으로 희석하여 잔디화분 RIA를 시행하고 용량반응 곡선을 측정하였다.

(4) 잔디화분 RIA억제시험 (Fig 3)

a) 여러 농도 (0.1-10mg/ml)의 항원용액 50ul와 잔디화분 RIA상 높은 결합방사능 치를 나타내었던 3예(Table 1)의 혈청 50ul를 동량 섞어 1시간동안 반응시킨후 잔디화분 RIA를 시행하였다. RIA억제율(inhibition percent)은 대조군의 cpm (A cpm)과 알레르겐을 작용시킨후의 cpm(B cpm)을 이용하여 아래와 같이 산출하였다.

$$\text{RIA inhibition percent} = \frac{A \text{ cpm} - B \text{ cpm}}{A \text{ cpm}} \times 100$$

b) 목초화분간 교차 억제 시험

잔디, 우산잔디, 큰조아재비 화분간의 교차반응을 알아보기 위하여 여러농도의 (0.1-10mg/ml) 잔디 조항원, 우산잔디 조항원, 큰조아재비 조항원 용액 50ul와 잔디화분 RIA에서 높은 결합 방사능치를 보였던 혈청 (Table 1)을 먼저 1시간 동안 반응 시킨 후 잔디화분-NC disc, 우산잔디

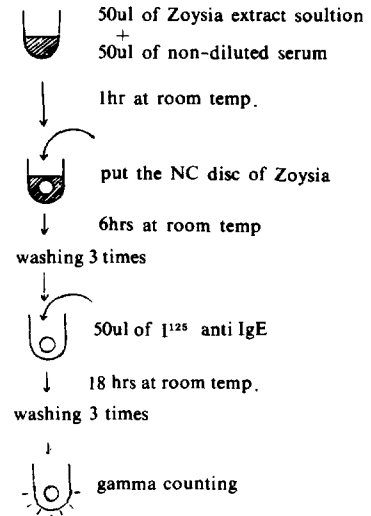


Fig. 3. Schematic drawing of Zoysia RIA inhibition test.

Table 1. Percent bound radioactivity of Zoysia-RIA, Bermuda RAST and Timothy-RAST in the sera studied

serum	A	B	C	pool
Zoysia-RIA	19.65*	8.73	5.77	9.01
Bermuda-RAST	20.88	10.88	8.21	19.18
Timothy-RAST	17.2	10.46	5.49	8.68

* : %

disc(Bermuda grass), 큰조아재비 disc(timothy)와 6시간동안 실온에서 반응시켰다. 3번 세척한 후에 anti-IgE RAST tracer((Phadebas, Uppsala, Sweden)을 50ul씩 넣고 18시간동안 반응 시킨 후 세척하고 r-counter를 이용하여 결합방사능을 측정하였으며 각각을 대조군의 결과와 비교하였다.

3) 목초화분 RAST 및 RAST억제시험

RAST는 Pharmacia Co.의 알레르겐 disc를 구매하여 측정법대로 실험하였으며 억제시험에 이용한 항원은 앞에 기술한 저자들이 조제한 화분의 조항원을 이용하였다.

4) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide

Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)

Laemmli법¹¹⁾에 의하여 discontinuous Tris-glycine system(Hoefer Scientific Co. CA)을 이용하였다. 한 well당 잔디조항원 500ug과 100ul의 sample buffer(10% SDS 2ml, 2-mercaptoethanol 0.5ml, glycine 1.5ml, 0.25M Tris-chloride 2.0ml, 0.16% bromophenol blue 1.5ml, 증류수 0.5ml)을 혼합하여 2분간 100°C에서 중탕 한후 투여하였고, 12% running gel(30% acrylamide-0.8% N.N methyl bis acrylamide 16ml, 1.5M Tris-chloride buffer 10ml, 10% SDS 400ul, 20% ammonium persulfate 40ul, tetramethyl ethylene diamine(TEMED) 80ul, 증류수 13ml)과 3% stacking gel(30% acrylamide-0.8% N.N methyl bis-acrylamide 2ml, 10% SDS 200ul, 0.5M Tris-chloride buffer 5ml, 20% ammonium persulfate 20ul, 증류수 12ml, TEMED 60ul)을 사용하였으며 30mA의 전류를 일정하게 유지하면서 3시간 동안 시행하였다. SDS-PAGE가 끝난 gel은 0.01% Coomassie Brilliant Blue R-250용액으로 염색한 후 10% acetic acid와 30% methanol이 포함된 용액으로 48시간 동안 탈색시킨후 관찰하였다.

5) Immunoblotting

전기영동한 겔을 Towbin등¹²⁾의 방법에 따라 nitrocellulose paper(Millipore HAHY 304 FO millipore Co.; 0.45um)로 전이시켰다. 먼저 겔과 nitrocellulose paper를 수포가 생기지 않도록 밀착시켜서 paper가 양극으로 향하도록 electrophoretic transfer apparatus(Hoefer Scientific Instruments, San francisco, CA)에 넣고 0.4mA로 18시간 동안 blotting시켰으며 이때 transfer apparatus내에 20% methanol, 25mM Tris-Glycine 완충액(pH 8.3)을 5L넣었다. 전이된 nitrocellulose paper를 3% bovine serum albumin이 포함된 10mM Tris-0.9% NaCl로 1시간 동안 점적되지않은 부분의 단백질 흡착력을 차단시킨후 공기중에 말려 4°C에서 보관한후 사용하였다.

6) Autoradiography

Ford 및 Baldo¹³⁾의 방법에 따라 전이된 nitrocellulose paper(NC paper)를 5mm의 넓이로 자르고 잔디화분 혹은 여러가지 목초화분에 대한 혈청 IgE치가 비교적 높은 환자의 혈청을 1:1로 희석한후 18시간 동안 반응시켰다. PBS로 3번 세척한 후에 각각 250ul(약 300,000cpm)의 anti-IgE RAST tracer를 넣고 18시간 동안 반응시킨 후에 대기중에 말려서 film을 끼워 -70°C에서 14일간 보관한 후에 현상하여 관찰하였다.

연구결과

1) 잔디화분에 대한 피부단자시험 결과

대상환자는 기관지천식환자 170예, 알레르기성 비염 동반 기관지천식 환자 127예, 알레르기성 비염환자 115예, 담마진 환자 78예, 그이외가 25예로서 총 515명이며 이중 잔디화분에 대한 피부반응도(allergen/histamine ratio)는 음성 63%, +는 15%, ++는 15%, +++는 6%, ++++는 1% 이었으며, ++이상의 의미있는 결과가 전체 대상환자의 23%, +++이상은 7%에 해당하였다. 질병에 따른 잔디화분의 피부반응도를 살펴보면, ++이상의 의미있는 양성반응결과는 알레르기성 비염을 동반한 기관지천식환자에서 29%로 높은 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다(Table 2).

2) 냉동건조 잔디 조항원을 이용한 잔디화분

Table 2. Result of skin prick test with *Zoysia japonica* extracts according to allergic disease

Disease	Patient No	A/H ratio					
		-	+	++	+++	++++	+++++
BA	170	119	19	25	6	1	
BA + AR	127	67	23	30	7	0	
AR	115	60	27	19	8	1	
Urticaria	78	56	10	3	8	1	
Others	25	20	1	3	1	0	
Total (%)	515	322 (63)	80 (16)	80 (16)	30 (6)	3 (1)	

RIA의 최적 조건 설정

(1) 잔디화분 알레르겐의 solid phase를 만드는데 가장 적절한 알레르겐 용액의 농도를 결정하기 위하여 여러가지 다른 농도(1-10mg)의 잔디 조항원 용액에 NC disc를 담갔다가 RIA를 시행한 결과 Fig4와 같이 2mg/ml의 용액에서 가장 좋은 결합방사능치를 나타내었다.

(2) 잔디화분 조항원 solid phase조제에 가장 적당한 알레르겐 용액의 pH를 결정하기 위하여 9가지 다른 pH의 용액에 NC disc를 담구었다가 RIA를 시행한 결과 Fig 5와 같이 pH 10.8(0.1 M carbonate buffer)의 용액에서 가장 높은 결합 방사능치를 보였다.

3) 잔디화분 RIA

대조군 혈청 25예에서 시행한 잔디화분 RIA상 결합 방사능은 $0.8145 \pm 0.085\%$ 의 결과를 보여 음성반응에 대한 한계 결합방사능을 2%미만으로 정하였으며 피부단자점사상 잔디화분에 양성반응을 보였던 99예의 환자 혈청 중 22예(22%)에서 양성 결합 반응을 보였다. 잔디화분에 대한 피부 반응도와 혈청내 특이 IgE결과 사이에는 통계적으로 유의한 관계를

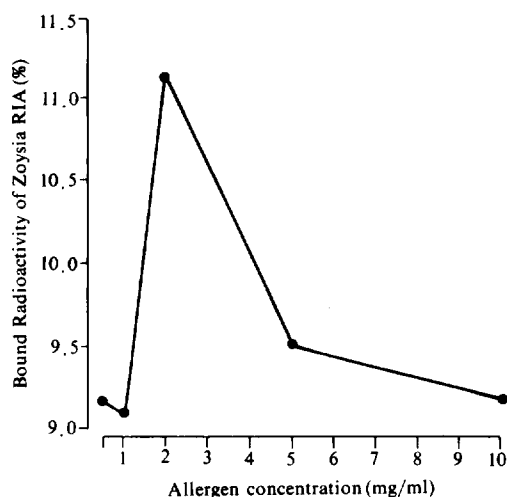


Fig. 4. Results of bound radioactivity of Zoysia RIA in solution (pH 10.8) with different allergen concentrations.

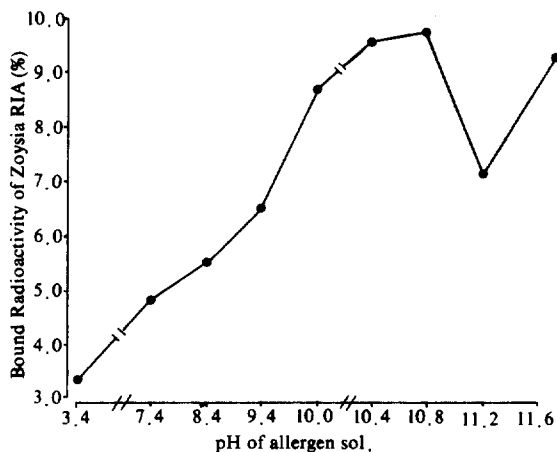


Fig 5. Results of bound radioactivity of Zoysia RIA in allergen solution (1mg/ml) with different pH.

발견할 수 없었다(Fig 6, 7).

4) 혈청회석에 따른 잔디화분 RIA의 용량 반응 곡선

잔디화분 RIA상 결합방사능이 높은 3예(A, B, C: Table 1)의 혈청을 사용하여 실험한 바, 각 혈청의 회석정도와 잔디화분 RIA결과 사이에는 적절한 용량반응곡선(dose-response curve)의 양상을 나타내었다. (Fig 8)

5) 잔디화분 RIA억제시험

여러농도의 잔디화분 첨가량에 따른 잔디

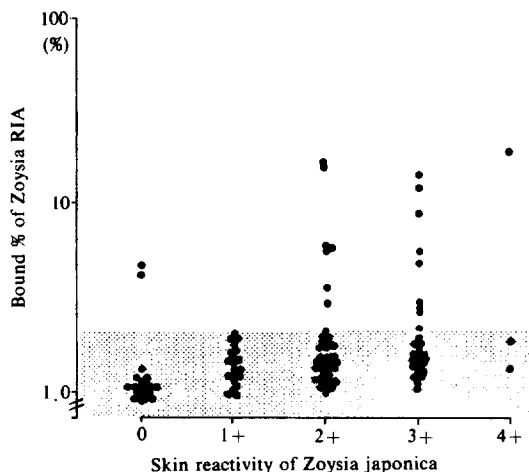


Fig 6. Relationship between skin reactivity and bound percent of Zoysia RIA.

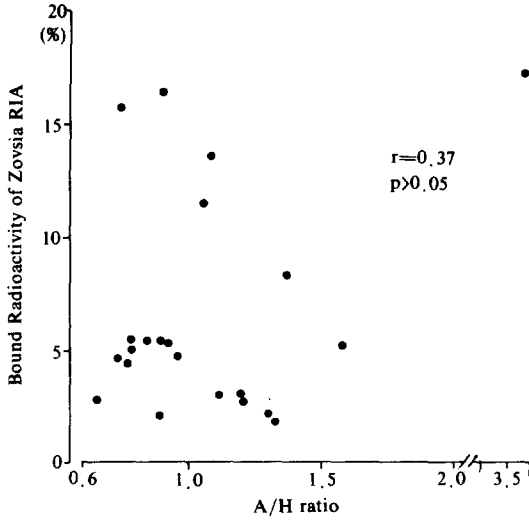


Fig. 7. Relationship between A/H ratio on skin prick test and Bound percent of Zoysia RIA.

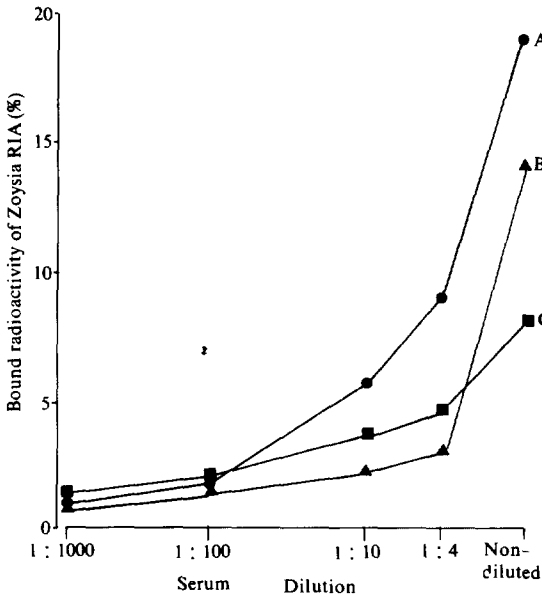


Fig. 8. Bound radioactivity of Zoysia RIA with dilution of 3 different patients' sera.

화분 RIA억제시험을 시행한 결과 Fig 9와 같이 단백질 첨가량이 증가함에 따라 억제율 또한 증가함을 관찰할 수 있었다.

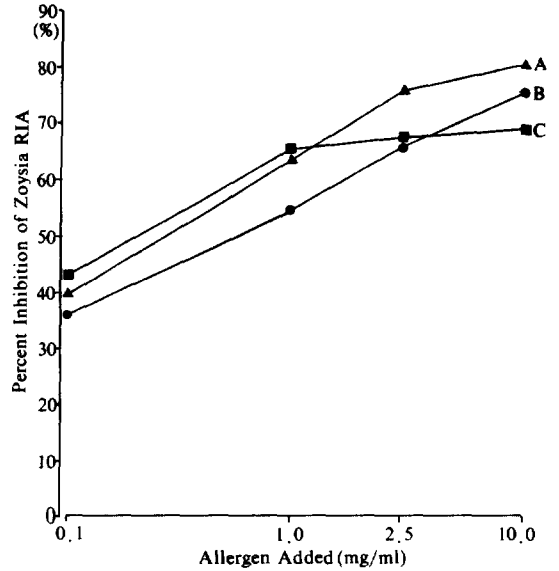


Fig. 9. Percent inhibition of Zoysia RIA with addition of allergen in 3 different sera.
(Initial bound% of Zoysia RIA : A ; 19.2%, B ; 11.1%, C ; 6.9%)

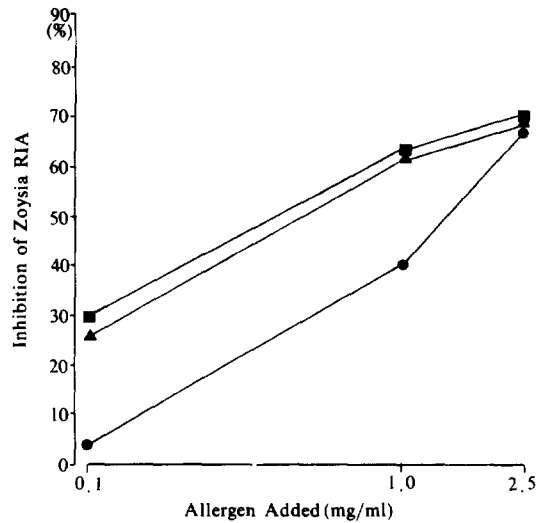


Fig 10-A. Percent inhibition of Zoysia RIA with addition of allergen (● Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in grass pool sera.

6) 목초화분간 교차 RAST억제 시험
잔디화분 RIA뿐 아니라 우산잔디 RAST, 큰조아재비 RAST에도 높은 결합방사능치를

보인 3예의 혈청과 목초화분 RAST상 class2 이상을 나타낸 혈청 pool을 사용하여 잔디화분 RIA억제 시험, 우산잔디 RAST억제 시험, 큰조아재비 RAST억제 시험을 시행한 결과 상

호간에 많은량의 억제정도가 관찰되었다. (Fig 10-A, Fig 10-B, Fig 10-C, Fig 11-A, Fig 11-B, Fig 11-C, Fig 12-A, Fig 12-B, Fig 12-C, Fig 13-A, Fig 13-B, Fig 13-C)

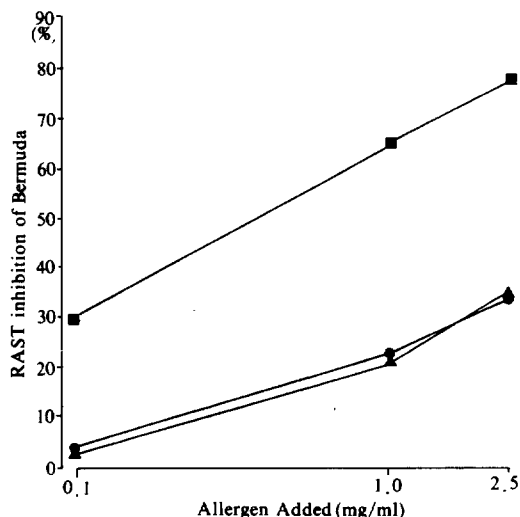


Fig 10-B. Percent inhibition of Bermuda RAST with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in grass pool sera.

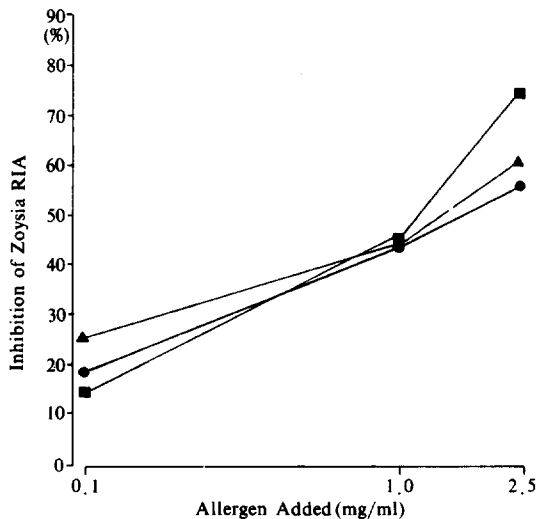


Fig 11-A. Percent inhibition of Zoysia RIA with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in serum A.

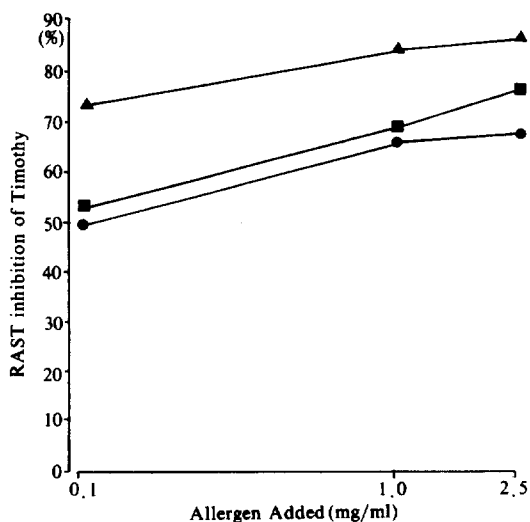


Fig 10-C. Percent inhibition of Timothy RAST with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in grass pool sera.

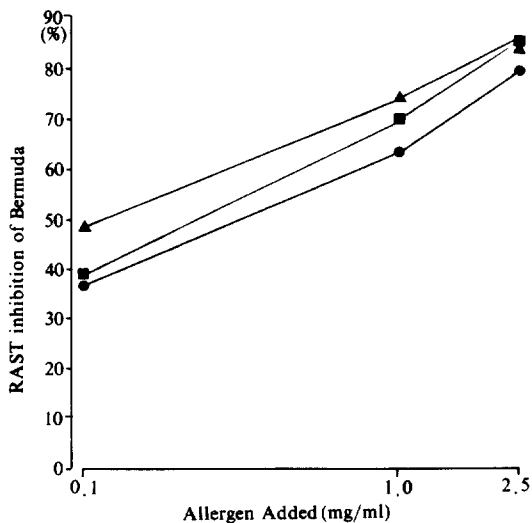


Fig 11-B. Percent inhibition of Bermuda RAST with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in serum A.

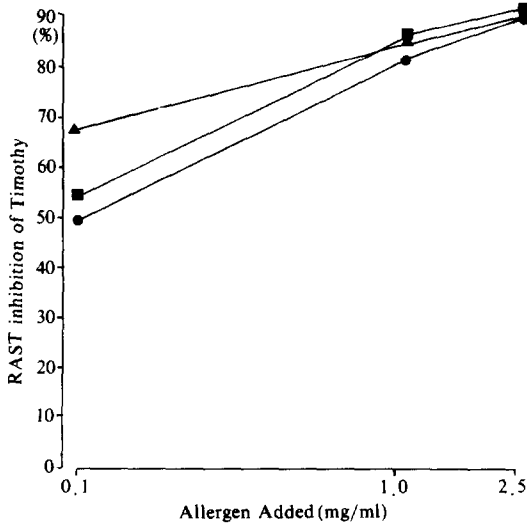


Fig 11-C. Percent inhibition of Timothy RAST with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in serum A.

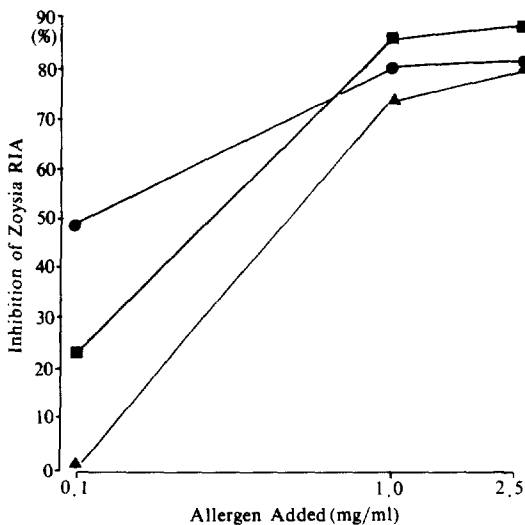


Fig 12-A. Percent inhibition of Zoysia RIA with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in serum B.

Table 3. Result of Zoysia RIA according to skin reactivity of Zoysia and other grass

Skin Rectivity	Zoysia-RIA	
	No. of sera tested	No. of positivity(%)
Zoysia(-), other grass(-)	25	2 (1)
Zoysia(-), other grass(+)	15	5 (33)
Zoysia(+), other grass(-)	10	1 (10)
Zoysia(+), other grass(+)	64	16(25)

Table 4. Correlation of bound radioactivity between Zoysia-RIA and RASTs of other grasses

RAST	Zoysia RIA		
	n	r	p value
Bermuda(Cynodon dactylon)	61	0.52023	0.000
Cocksfoot(Dactylis glomerata)	16	0.62340	0.009
Meadow fescue(Festuca pratensis)	25	0.82020	0.000
Rye grass(Lorium perenne)	34	0.72282	0.000
Timothy(Phleum pratense)	20	0.72282	0.000
Meadow grass(Poa pratensis)	9	0.50203	0.165

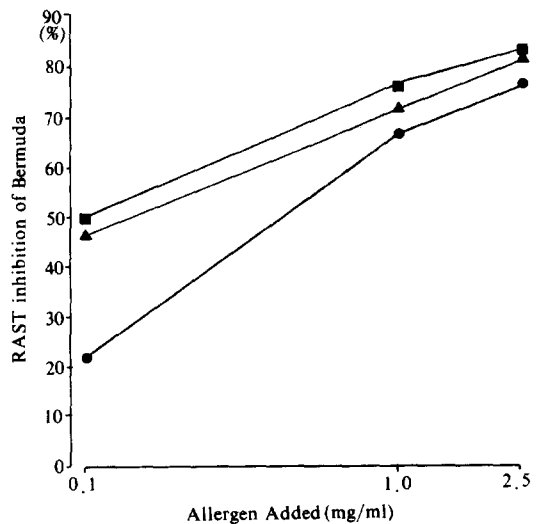


Fig 12-B. Percent inhibition of Bermuda RAST with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in serum B.

7) 잔디 RIA와 목초화분 RAST의 결합방사의 비교

연구대상자들에게 6개의 목초화분으로 알레르기 피부반응검사도 시행하였다. 잔디와 목초화분에

대한 피부반응결과와 잔디 RIA의 결과 비교는 table 3에 기술하였다. 목초화분에 의의있는 양성

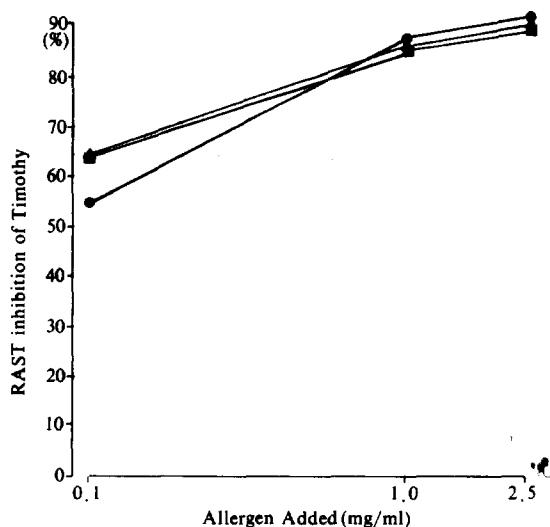


Fig 12-C. Percent inhibition of Timothy RAST with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in serum B.

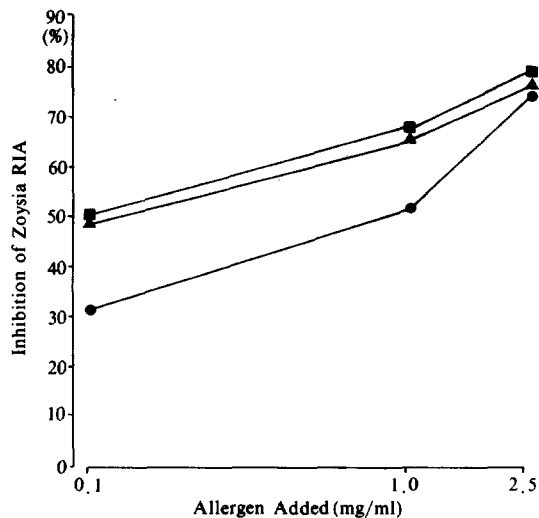


Fig 13-A. Percent inhibition of Zoysia RIA with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in serum C.

Table 5. Distribution of IgE-binding components in 10 *Zoysia*-sensitive patients and 2 negative controls

Allergenic Fractions (MW)	Zoysia-sensitive patients									Pool*	Control**		Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	(%)
1. (92-93KD)	O	O	O	O									4/10(40)
2. (89-90KD)													0/10(0)
3. (85-86KD)													0/10(0)
4. (79-80KD)	O	O	O	O						O			5/10(50)
5. (68-69KD)													0/10(0)
6. (65-66KD)	O												1/10(10)
7. (57-58KD)	O	O								O			3/10(30)
8. (53-54KD)	O	O											2/10(20)
9. (47-48KD)	O		O	O						O			4/10(40)
10. (45-46KD)													0/10(0)
11. (41-42KD)													0/10(0)
12. (38-39KD)													0/10(0)
13. (34-35KD)													0/10(0)
14. (31-32KD)	O												1/10(10)
15. (28-29KD)	O												1/10(10)
16. (27-28KD)													0/10(0)
17. (26-27KD)	O		O										2/10(20)
18. (19-20KD)	O												1/10(10)
19. (17-18KD)	O	O	O						O	O			5/10(50)
20. (16-17KD)	O		O										2/10(20)
21. (12-13KD)	O									O			2/10(20)

Pool* : Mixture of 40 grass sensitive patients' sera

Control* : Patients' sera who showed negative results on skin prick test

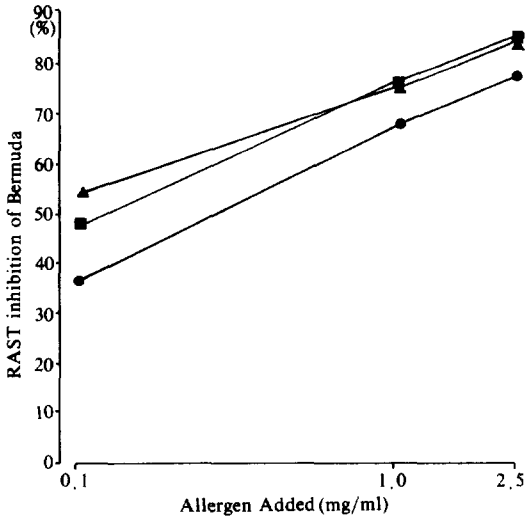


Fig 13-B. Percent inhibition of Bermuda RAST with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in serum C.

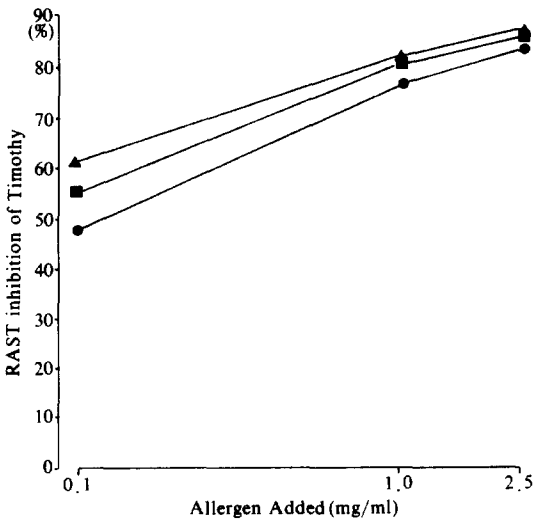


Fig 13-C. Percent inhibition of Timothy RAST with addition of allergen (● : Zoysia, ■ : Bermuda grass, ▲ : Timothy) in serum C.

반응을 보인환자는 그 화분에 대하여 RAST를 시행하였다. 이들중 동시에 잔디 RIA를 시행한 혈청을 조사하여 그 결과를 SPSS로 통계처리하여 상관성을 조사한 결과를 Table 4에 표시하였다.

Meadow grass를 제외하고는 모두 상관관계가 있었으며 특히 Meadow fescue가 상관성이 높게 ($r=0.82$) 나타났다.

8) 잔디화분 항원의 SDS-PAGE 소견

잔디화분 조항원의 단백질 성분을 분석하기 위하여 Laemmli법¹⁴⁾에 의하여 12% SDS-PAGE를 시행한 후 Coomassie brilliant blue용액으로 염색 한 결과, 분자량 12-93KD사이에서 21개의 단백질 띠가 관찰되었다. (Fig 14)

9) Autoradiography상 관찰된 알레르겐 분획의 분포

잔디화분 RIA에서 높은 결합 결합방사능치를 보였던 9예의 혈청과 다른 목초화분 RAST상 class 2이상을 나타낸 혈청으로 만든 pool과 반응시켰을때 IgE와 결합하는 알레르겐 분획은 11개가 관찰되었으며 (Fig 15), 2명의 대조혈청에는 반응이 관찰되지 않았다. 알레르겐 분획의 분자량은 표지단백질 (marker protein)의 상대적 이동에 따

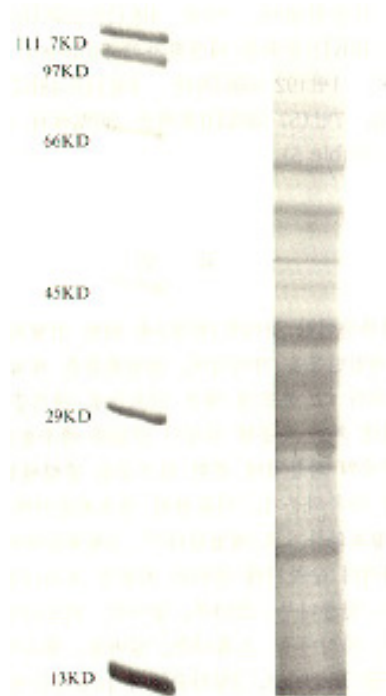


Fig 14. Separation of Zoysia japonica pollen extracts by 12% SDS-PAGE

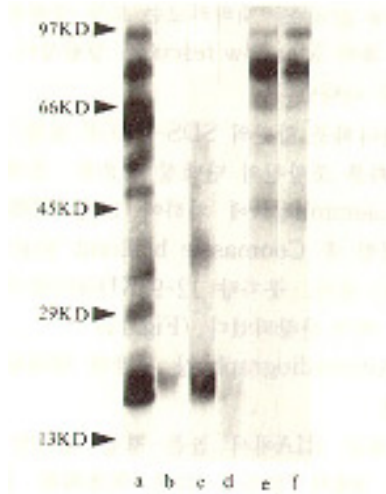


Fig 15. Identification by autoradiography of IgE-binding components transferred to NFP after SDS-PAGE of *Zoysia japonica* extracts in *Zoysia*-sensitive patient (a-f)

라 산출하였다. 이중 4번(79-80KD)과 19번(17-18KD)분획은 대상환자의 50%에서 관찰되었으며 1번(92-93KD)과 9번(47-48KD)분획은 40%, 7번(57-58KD)분획은 30%에서 관찰되었다. (Table 5)

고 안

화분중이란 꽃가루(화분)에 의한 전형적인 제 1형 과민반응을 가리키며, 원인화분은 계절과 지역에 따라 그 분포가 매우 다르므로 대기중 화분수 측정에 의한 화분력 작성이 진단에 매우중요하다.

국내의 화분력에 관한 연구들을 종합해보면, 봄철의 수목화분기, 여름철의 목초화분기와 가을철의 잡초화분기로 대별된다^{7,8)}. 3월중순부터 6월하순까지의 수목기에 속하는 화분은 오리나무, 개암나무, 단풍나무, 소나무, 참나무, 버드나무, 은행나무, 자작나무, 느릅나무, 양버들, 뽕나무, 가래나무등 13종이고, 3월하순부터 10월하순까지 장기간에 걸쳐서 분포하는 목초화분기에 속하는 화분은 주로 화분과 화분(Graminaceae)이 속하며, 8

월중순에서 10월초순까지의 잡초화분기에 속하는 화분은 쭉, 두드러기쭉, 질경이, 수영, 명아주-비름, 토끼풀, 싸리, 물매화풀등 10종에 이른다. 그러나 목초화분은 포집량이 매우 미미하고 질경기도 관찰되지 않았으며 수목기나 잡초기와는 달리 화분기의 경계도 명확하지 않아 아직 본격적으로 연구된 바 없다.

특히 국내에서는 구미등지에서 보다 목초화분에 의한 화분증의 빈도가 매우 낮게 보고되어 있는데 그 원인으로 우선 인종적 차이에 의한 가능성을 들 수 있겠으나, 우리나라 사람들이 외국에 가서 발병하는 예가 있으므로 이는 주로 대기중에 분포하는 화분의 종류, 수량 및 항원성의 차이때문이라 사료된다. 오늘날 우리나라 자연환경등은 조림 사업과, 잔디밭 조성등으로 대기중 화분성분이 변화될 소지가 많을 것으로 생각되어 목초화분에 대한 중요성도 인식되어야 할것으로 생각된다. 한편 국내 보고에 따르면 우리 주위에서 흔히 접촉하는 잔디(*Zoysia japonica*)에 대해서 5%의 호흡기 알레르기 환자가 그 화분에 감작되어 있다⁹⁾고 하였고, 잔디화분 추출액을 이용하여 실시한 기관지수축 유발검사상 조기반응을 보인 예도 보고되어 있어¹⁰⁾, 이 화분이 화분증을 일으킬 가능성이 있음을 시사하는 것이라 생각되나, 아직 국내 호흡기 알레르기환자들에 있어 기인성 알레르겐으로서의 중요성에 대하여 본격적인 연구가 이루어진 바 없다.

잔디(*Zoysia japonica*)는 벼과에 속하는 다년초로서 개화시기는 5월이며 우리나라 전역에 매우 넓게 분포되어 있다.

국내 대기중에 비산되는 목초화분수는 다른 화분에 비해 매우 적으나 4월부터 10월에 걸쳐서 관찰된다⁸⁾고 보고되어 있으나 잔디화분 자체에 대한 연구는 아니다.

우선 기인성 항원을 찾는에 가장 손쉽고 안전하며 예민도가 높은 피부반응검사상 잔디화분에 대한 반응도는 최근 5-13%로 보고된바 있어^{6,9)}, 점점 증가추세에 있는 것으로 생각되며 본 연구에서는 37%의 높은 양성율을 얻었으나 이는 모두 잔디에 대한 반응이라기보다는 이미 알려진바대로

다른 목초화분간에 존재하는 상호 교차항원에 대한 반응을 함께 포함하고 있기 때문이라고 생각되며 또한 반응도에 따라서는 2+ 이상의 의미있는 반응이 23%밖에 되지 않으며 3+ 이상의 강양성반응은 7%에 그쳐 잔디화분 자체의 항원성은 약한 것으로 생각되었다.

혈청내 알레르겐 특이 IgE를 검출해내는 방법으로서 1967년 Wide등이 개발한 RAST(radio-allergo-sorbent test)가 현재까지 널리 사용되고 있지만 아직 잔디화분에 대한 특이 IgE의 측정 방법이 확립되지 않은 실정이며, 본 연구에서는 홍천수등¹⁵⁾이 보고한 바 있는 radioimmunoassay(RIA)방법을 응용하여 시행하였다. 이 방법은 nitrocellulose filter paper의 뛰어난 단백질 흡착력을 이용하는데, 알레르겐의 결합량을 최대로 유지하기 위하여, 우선 흡착력에 영향을 미칠수 있는 알레르겐 용액의 농도 및 pH에 대하여 2 mg/ml, 0.1M carbonate buffer(pH 10.8)로 최적조건을 결정한 후 RIA의 solid phase로 사용하였다.

본 연구에서는 양성반응의 기준을 음성대조군의 평균 결합방사능치에 표준편차를 더한값의 2배인 2%이상으로 정하였을때 22명(22%)의 환자혈청에서 잔디화분 특이 IgE가 검출되었으며, 이중 동시에 시행한 잔디화분에 대한 피부 반응도와는 유의한 상관성을 찾아 볼 수 없었다(Fig 6, 7). 알레르겐 특이성(allergenic specificity)을 알아보는 방법으로 RAST억제 시험¹⁶⁾을 시행한 결과, 알레르겐 첨가량이 증가함에 따라 비례하여 결합방사능이 감소하는 결과를 얻었으며 동시에 혈청의 희석정도에 따라서도 dose-response curve를 얻어, 관찰된 IgE결과가 잔디화분에 대한 특이 IgE임을 증명하였다. 그러나 앞서 서술한 바와 같이 잔디화분에 대한 피부반응 정도와 혈청특이 IgE결합방사능치 사이에 유의한 상관관계가 관찰되지 않은 소견과 다른 목초화분에 대한 혈청 IgE치가 잔디화분 특이 IgE치와 유의한 상관관계를 보여(Table 4) 상호간의 교차반응을 강력히 시사하는 것으로 생각되었다.

화분, 집먼지, 진드기, 동물의 털 등의 다양한

종류의 흡인성 알레르겐으로 부터 알레르겐 성분 분리에 관한연구는 이 성분들이 다른 단백질 성분보다 훨씬 손쉽게 IgE-항체형성을 유도하는 이유를 밝히는데 필수적인 구조적 혹은 면역학적 근거가 되며, 특히 알레르겐에 대한 B cell과 T cell 반응은 유전적 소인이 관여한다고 알려져 있는데, 환자마다 나타나는 각 구조성분에 대한 반응의 양식 및 정도차이와 관련이 있을 것으로 사료된다. 이러한 이유로 원인이 되는 알레르겐의 단백질 성분중에서 대부분의 환자가 IgE면역반응을 보이는 주요 알레르겐을 밝혀내는 연구는 더욱 필요할 것으로 생각된다. 특히 여러 목초화분간에는 상호 밀접한 교차반응이 있어 면역치료시에도 단일 목초화분 성분만으로도 탈감작에 효과를 볼수 있다고 하였다. 이는 최근 목초화분 알레르겐 성분들에 대한 연구가 활발히 이루어져 부분적으로 그 성상이 알려지게 되었으며 각 알레르겐 성분내에 공통항원과 유일항원이 존재하고 있음이 밝혀져, 이러한 상관성에 대한 설명의 근거를 제공하고 있다^{17,18,19)}. 목초화분은 모두 화분과(Graminae)과에 속하며 5개의 아과로 나누어져 식물분류학적으로는 매우 밀접한 관계를 갖고 있다. 본 연구에서는 잔디화분의 알레르겐 성분중 다른 목초화분과의 상호관계를 연구하기 위해 비교적 다른 종류에 비하여 유일항원이 존재한다고 알려져 있는 우산잔디와 큰조아재비화분 조항원을 이용하여 널리 시행되고 있는 RAST억제시험을 시행하였으나 잔디화분, 우산잔디화분, 큰조아재비의 화분에 대하여 높은 IgE 결합방사능치를 나타내는 3환자에서, 혈청내 존재하는 각 화분 특이 IgE의 결합방사능의 다소에 별 관계없이 상호간에 강한 RAST억제 정도를 관찰하여 잔디화분 알레르겐 성분중 많은 부분이 우산잔디나 큰조아재비화분과 공통항원으로 이루어져 있음을 알수 있었으나, 각 화분의 알레르겐 성분간의 상호관계를 분명히 하기 위해서는 같은 조건하에서 다른 목초화분 알레르겐 성분에 대한 동시연구가 더 필요할 것으로 생각되었다.

최근에 여러 알레르겐내의 알레르겐 성분을 밝혀내는 방법으로 SDS-PAGE, autoradiogra-

phy, 단크론항체를 이용한 면역효소법(ELISA) 등이 행해지고 있으며 특히 Tovey 및 Baldo²⁰⁾은 집먼지 진드기 항원으로 SDS-PAGE 및 immunoblotting을 시행한후 단크론항체 혹은 감작된 환자혈청과 반응시켜 반응양상을 조사하는 것이 알레르겐 추출물을 정량적, 정성적으로 분석하여 표준화하는데 매우 적당한 방법이라고 보고한 바 있다. 이미 이 방법들을 통하여 집먼지 진드기 항원²¹⁾, 고양이털 항원, 두드러기 쑥등^{22,23)}에서는 주요 알레르겐 성분들이 밝혀져 있고²⁴⁾, 목초화분에 있어서도 현재 알레르겐 성분에 대한 여러 연구들이 진행되어 있다^{13,25)}.

국내에서도 Park등²⁶⁾이 늦여름부터 가을철에 걸쳐 호흡기 알레르기 증상을 일으키는 주요 화분으로 알려져 있는 쑥항원(*Artemisia princeps*)으로 SDS-PAGE 및 immunoblotting을 시행하고 감작된 환자혈청과 반응시킨 결과 환자의 50% 이상에서 반응을 보인 2개의 분획을 발견하였는데 각각 분자량이 37,000과 23,000 dalton에 해당하였으며 이들을 따로 분리해낸후 각 성분으로 직접 환자에게 피부단자시험을 시행한 결과 양성반응을 관찰해내어 알레르겐 성분에 관한 연구의 필요성 및 당위성을 증명해낸 바 있다. 이는 특별히 유전적인 소인에 의해 알레르겐에 대한 반응이 결정된다는 보고에 근거하면 민족마다 각 알레르겐에 대한 반응이 차이가 있을 수 있을 것으로 추측되며 각 알레르겐에 대한 국내환자들의 반응양상을 확인하는것은 매우 중요하다고 생각된다.

본 연구에 따르면 잔디화분 조항원으로 12% SDS-PAGE를 사용하여 21개의 단백질대를 관찰하였는데 이는 orchard grass내에서 18개¹³⁾, 우산잔디(*Bermuda grass*)내에서 17개¹³⁾를 보고한 목초화분에 관한 다른 외국보고와 유사한 결과로 생각되었다. 또 Ford 및 Baldo²⁵⁾은 우산잔디화분에서 대상환자 혈청의 IgE를 결합하는 단백질대를 11개 관찰하였으며 분자량은 28-94KD에 해당하였으며 이중 34KD에 해당하는 알레르겐 성분이 대상환자 모두의 혈청과 결합하는 것이 관찰되었다고 보고하여 그 중요성을 강조하였으며 Matthiesen등²⁷⁾은 역시 우산잔디화분에서 분자량이 20

KD, 32KD, 33KD, 65KD에 해당하는 성분을 주요 알레르겐으로 보고한 바있다.

본 연구에서는 NCF에 전이된 21개의 단백질대를 각 환자의 혈청내에 존재하는 IgE와 결합하는 알레르겐 성분의 분획수는 11개였으며 환자 개개인에 따라 그 결합 단백질대의 양상이 달랐다. 이중 환자의 50% 이상에서 반응한 것은 분자량이 79-80KD와 17-18KD에 해당하는 2개의 성분으로 나타났다. 그러나 이 성분을 주요 알레르겐으로 정의하기에는 대상환자수가 적고 또 각 성분을 추출해내어 생물학적 효과를 피부반응검사등을 통하여 확인하는등의 좀더 많은 연구단제가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과로서 잔디화분은 우리 나라에서 원인 흡인성 알레르겐의 하나로서 간주되어야 할 것이며 이에 대한 더 많은 연구가 추가되어야 할것으로 생각된다.

결 론

호흡기 알레르기 질환에서의 기인 항원으로서 잔디 화분의 중요성을 검토하기 위해서, 잔디 화분추출액으로 피부단자검사를 시행하고 잔디화분 조항원을 사용하여 잔디화분 RIA를 시행하여 혈청내 특이 IgE를 측정하였으며 잔디화분 첨가량과 혈청 희석 정도에 따른 잔디화분 RIA억제 정도를 측정하였고, SDS-PAGE를 이용하여 잔디화분 항원을 분리하고, 잔디화분에 감작된 환자의 혈청과 반응시켜 잔디화분내의 알레르겐 성분 및 주요 알레르겐 성분 규명을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 잔디화분 추출액에 대한 피부 반응 양성율은(피부 반응 2+이상) 23%였고, 질병별 양성율은 기관지천식 19%, 알레르기성 비염 동반 기관지천식 29%, 알레르기성 비염 24%, 담마진 15%, 그의 알레르기 질환 16%로, 알레르기성 비염을 동반한 기관지천식환자에서 높은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

2. 혈청내 잔디화분 특이 IgE를 측정 하기 위해

면역 방사능법을 이용하였는데 잔디화분 조항원 solid phase는, 잔디화분 농도 2mg/ml, 0.1M carbonate buffer(pH 10.8)에서 가장 높은 결합 방사능 치를 보였다.

3. 대조군 혈청에서 시행한 잔디화분 결합 방사능치의 평균(0.8145%)과 표준 편차(0.085%)를 더한 값을 더해 2배한 2%이상을 양성반응의 기준으로 정하였을때 대상 환자 99명 중 22예(22%)에서 양성반응을 관찰하였다. 잔디화분 RIA상 결합 방사능치가 19.2%, 11.1%, 6.9%로 높은 3환자에서 억제시험을 시행한 결과, 잔디화분 알레르겐 첨가량과 혈청 희석 정도에 따라 적절한 dose response curve를 보여, 환자혈청에서 관찰되었던 IgE의 잔디화분에 대한 특이도를 시사하였다.

4. 잔디화분 추출액으로 시행한 피부 반응도와 결합 방사능 법에서 측정된 잔디화분 특이 IgE결합 방사능 사이에는 유의한 관계를 관찰할 수 없었다. ($r=0.37$, $p>0.05$)

5. 잔디화분 결합 방사능치가 높은 환자혈청을 대상으로 잔디화분 조항원, 우산잔디 조항원 및 큰조아재비 조항원으로 각각 잔디화분 면역방사능 억제시험, 우산잔디 RAST 억제시험, 큰조아재비 RAST 억제시험을 시행한 결과 상호간에 상당량의 억제 정도를 관찰 하여, 밀접한 교차 항원성이 존재함을 시사하였다.

6. 잔디화분 조항원으로 12% SDS-PAGE를 시행한 결과, 분자량이 12-93KD에 해당하는 21개의 단백질 띠가 관찰되었으며, 잔디화분에 감작된 9명의 환자혈청과 다른 목초화분 RAST상 class 2 이상을 나타낸 pool혈청을 반응시킨 결과, 환자혈청내 IgE와 결합하는 알레르겐 분획은 11개였으며 그 중 4번(79-80KD)과 19번(17-18KD)분획은 대상환자의 50%에서, 1번(92-93KD)과 9번(47-48KD)분획은 40%에서 관찰되었다.

이상의 결과로 잔디화분도 국내의 알레르기 질환을 일으키는 원인 화분의 하나로 간주되어야 할 것으로 생각되며 면역 방사능법을 이용하여 혈청내 특이 IgE를 증명하였으며 잔디화분내 존재하는 알레르겐 성분은 11개로서, 이중 대상환자에서 가장 많이 반응을 보였던 알레르겐 분획은 분자량이

79-80KD와 17-18KD에 해당하였다.

-Abstract-

Characterization of allergen in Zoysia japonica pollen

Mi Kyung Lee, M.D. and
Chein-Soo Hong, M.D.

Department of Internal Medicine,
Yonsei University College of Medicine

To evaluate the clinical importance of Zoysia japonica pollen as a causative allergen in respiratory allergy, skin prick tests were performed in 515 patients with allergic diseases and Zoysia specific IgE was determined in 99 Zoysia-sensitive patients and 25 negative controls by radioimmunoassay(RIA). Out of 515 patients 113(23%) showed more than ++ results on skin prick test. But there were no significant differences in the rates of positive results according to the allergic diseases. Twenty two (22%) out of 99 Zoysia sensitive patients showed positive results in Zoysia RIA when the cut-off value for positive specific IgE antibody for Zoysia was determined as 2% of bound radioactivity by the mean value and standard deviation of

those of 25 negative controls. To specify the IgE detected in the *Zoysia* RIA, we performed the *Zoysia* RIA inhibition test with addition of *Zoysia* allergen and serum dilution. Dose responsive curves were revealed in the degree of inhibition according to the added amount of allergen and the dilution of serum. The RAST inhibition test revealed the close cross reactivity among *Zoysia japonica*, Bermuda grass and timothy.

Moreover, to characterize the allergenic components, *Zoysia japonica* extracts were fractionated by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS PAGE), and 21 protein bands were detected. After they were transferred onto anitrocellulose membrane, and probed with sera of 9 *Zoysia*-sensitive patients, a sera pool of patients with RAST class 2 or more to several grass pollens and 2 negative controls and ^{125}I -anti human IgE(Pharmacia), 11 IgE binding components in the molecular range between 12 kilodalton(KD) and 93 KD were detected. Of 11 IgE binding components, number 4(79-80 KD) and number 19(17-18KD) fractions appeared with the highest frequency.

It is suggested that *Zoysia japonica* pollen which is very prevalent in Korea, can be regarded as an important respiratory allergenic pollen and needs further study to characterize its allergenic components.

REFERENCES

- 1) Booth HB: Diagnosis of immediate hypersensitivity. In Patterson R. eds. Allergic diseases. Diagnosis and management. 3rd ed. Philadelphia, Lippincott 1985, pp.102.
- 2) 주양자: 화분증에 관한 연구 제 1 편, 서울에서의 공중화분. 대한이비인후과학회지 8: 11, 1965.
- 3) 강석영: 한국에 있어서의 알레르기성 호흡기 질환의 기인성 항원에 관한 연구. 대한 내과 학회 잡지 16: 37, 1973.
- 4) 황영남, 허갑범, 이상용: 기관지 천식 환자에 대한 임상 및 피내 반응에 관한 고찰, 대한 내과 학회잡지 17: 426, 1974.
- 5) 김은우: 비알레르기에 있어서 항원의 피내반응에 관한 고찰. 한이인지 18: 208, 1975.
- 6) 윤여운, 이미경, 박해심, 박성삼, 홍천수: 알레르기 환자에서 피부단자시험 성적 및 혈청 IgE에 관한 연구. 알레르기 9: 385, 1989.
- 7) 민경업: 서울에서의 공중화분 분포에 관한 대기 생물학적 알레르기학적 연구. 알레르기 4: 1, 1984.
- 8) Hong CS, Hwang Y, Oh SH, Kim KB, Lee SY: Survey of the air-borne pollens in Seoul, Korea. Yonsei Med J 27: 147, 1986.
- 9) Kim YL, Lee SK, Oh SH Moon BS, Park HS, Hong CS: A study of allergy skin tests with Korean pollen extracts. Yonsei Med J 28: 112, 1987.
- 10) Hong CS, Park HS: Bronchial asthma induced by Korean pollen extracts. J Kor Soc Allergology 8: 193, 1988.
- 11) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265, 1951.
- 12) Towbin H, Staenelin T, Gordon J:

- Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some application. *Proc Natl Acad USA* 76 : 4350, 1979.
- 13) Ford SA, Tovey ER, Baldo BA : Identification of orchard grass(*Dactylis glomerata*) pollen allergens following electrophoretic transfer to nitrocellulose. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 78 : 15, 1985.
 - 14) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680, 1970.
 - 15) 홍천수, 이상용, 최홍재 Wälti M, Stadler B, de Week AL : Dot-immunobinding assay에 의한 알레르겐 특이 IgE의 정량적 측정에 관한 연구. 연세의대 논문집 18 : 355, 1985.
 - 16) Gleich GJ, Larson JB, Jones RT : Measurement of the potency of allergen extracts by their inhibitory capacities in radioallergosorbent test. *J Allergy Clin Immunol* 53 : 158, 1974.
 - 17) Weber RW : Cross-reactivity among pollens. *Ann Allergy* 46 : 208, 1981.
 - 18) Weber RW, Nelson HS : Pollen Allergens and their interrelationships. *Clin Rev Allergy* 3 : 291, 1985.
 - 19) Singh MB, Knox RB : Grass pollen allergens : Antigenic relationships detected using monoclonal antibodies and dot blotting immunoassay. *Int Archs Allergy appl Immun* 78 : 300, 1985.
 - 20) Tovey ER, Baldo BA : Standardization of allergens : Qualitative definition of house dust mite extracts following electroblotting and detection of components with antibody and lectin probes. *Int Archs Allergy appl Immun* 75 : 322, 1984.
 - 21) Baldo BA, Ford SA, Tovey ER : Toward a definition the 'complete spectrum and rank order of importance of the allergens from the house dust mite : *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Advances in the Biosciences* 17 : 13, 1989.
 - 22) Platts-Mills TAE, Chapman MD : Dust mites : Immunology, allergic disease, and environmental control. *J Allergy Clin Immunol* 80 : 755, 1989.
 - 23) Chapman MD : Monoclonal antibodies as structural probes for mite, cat and cockroach allergens. *Advances in the Bioscience* 74 : 281, 1989.
 - 24) Chapman MD : Purification of allergens. *Current Opinion in Immunology* 1 : 647, 1989.
 - 25) Ford SA, Baldo BA : Identification of Bermuda grass(*Cynodon dactylon*) pollen allergens by electroblotting. *J Allergy Clin Immunol* 79 : 711, 1987.
 - 26) Park HS, Hong CS, Choi HJ, Hahm KS : Identification and partial purification of pollen allergens from *Artemisia princeps*. *Yonsei Med J* 30 : 346, 1989.
 - 27) Matthiesen F, Schumacher MJ, Löwenstein H : An immunoelectrophoretic analysis of the allergens of *Cynodon dactylon*(Bermuda grass) pollen. *J Allergy Clin Immunol* 83 : 1124, 1989.