creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:48009-200000011290

이학박사 학위논문

국내 자생 소나무류(소나무, 곰솔, 리기다소나무)의 꽃가루 항원성 연구

A Study on allergenicity of pine trees(red pine, black pine, pitch pine) pollen in Korea

울산대학교 대학원
생 명 과 학 과
김 서 융

국내 자생 소나무류(소나무, 곰솔, 리기다소나무)의 꽃가루 항원성 연구

지도교수 최 기 룡

이 논문을 이학박사 학위 논문으로 제출함

2018년 02월

울산대학교 대학원
생 명 과 학 과
김 서 융

김서융의 이학박사학위 논문을 인준함

심사위원장 박정우 (인)

심사위원 정충수 (인)

심사위원 이병주 (인)

심사위원 최기룡 (인)

심사위원 김배기 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2018 년 02 월

국 문 요 약

소나무류 꽃가루는 화분의 입자가 크고, 소수성을 지니고 있어 기도를 통과하는 특성이 낮으며, 단백질 함량이 적어 일반적으로 비알레르기성이라고 알려져 왔으나, 최근 소나무류의 삼림 면적이 넓은 지역에서 노출정도가 심한 경우 사람의 호흡기에 알레르기를 유발하는 꽃가루라는 보고가 있다. 본 연구의 목적은 한반도에 분포하는 소나무류 중 소나무, 곰솔, 리기다소나무 꽃가루의 인체에 대한 항원성을 확인하는데 있으며, 최종적으로는 단백질에서 유발하는 알레르기성 항원 밴드를 기술하여 주항원을 결정하는 것이다. 이를 위하여 첫 번째로 SDS-PAGE를 실시하여 알레르겐으로 작용할 수 있는 꽃가루 단백질의 조성을 비교하였다. 그 결과 세 종류 소나무 꽃가루의 단백질 조성이 서로 다름을 확인 하였다. 두 번째로 실험동물(balb/c 생쥐)을 사용하여 항원성을 확인하였다. 피부 또는 흡입 감작 실험 결과, 처리기간이 길어질수록 세 종류 꽃가루 모두 IgE 생성이 증가함이 관찰되었으며, 흡입 감작의 경우 피부감작 실험보다 더 많은 IgE를 유도함을 확인하였다. 특히 소나무에서 추출한 꽃가루가 다른 두 종류의 꽃가루보다 더 많은 양의 IgE를 유발함을 확인하였다. 이 결과로부터 우리나라에 자생하는 세 종류의 소나무류 중 소나무 꽃가루가 다른 두 종(곰솔, 리기다)에 비하여 IgE 유도 특성이 더 높음을 확인하였다. 마지막으로 인체 항원성 확인을 위하여 소나무류 꽃가루 환자에 대한 ELISA 실험결과, 자생 소나무류 꽃가루의 알레르기 항원성을 확인하였으며, IgE 면역 블로팅 실험 결과, 국외 소나무류에서 일반적으로 보고되어지는 28,36,42,55,72,85kDa의 공통항원 외에 자생소나무류(소나무, 곰솔, 리기다 소나무) 꽃가루에서는 추가로 36~42kDa, 42~55kDa, 55~72kDa 사이에서 항원을 확인하였다.

목 차

1. 서론 ---------- 1
2. 재료 및 방법 ---------- 3
2-1. 재료 ---------- 3
2-1-1 꽃가루(소나무, 곰솔, 리기다소나무) 채집 및 조항원 제조 ---------- 3
2-1-2 실험동물 ---------- 4
2-1-3 연구대상 ---------- 4
2-2 방법 ---------- 6
2-2-1 소나무류 꽃가루 항원의 SDS-PAGE ---------- 6
2-2-2 소나무류 꽃가루 감작에 대한 생쥐 군의 IgE 변화량측정 ---------- 6
2-2-3 ELISA법에 의한 소나무류 꽃가루 결합 IgE의 정량분석 ---------- 8
2-2-4 소나무류 꽃가루 항원 특이 IgE Immunoblotting ---------- 9
3. 연구결과 및 논의 ---------- 11
3-1 소나무류 꽃가루 단백질 분석 ---------- 11
3-2 소나무류 꽃가루들의 IgE 유도 특성 비교 ---------- 14
3-3 소나무 꽃가루와 특이적으로 결합하는 IgE 분석 ---------- 15
3-4 곰솔 꽃가루와 특이적으로 결합하는 IgE 분석 ---------- 16
3-5 리기다 소나무 꽃가루와 특이적으로 결합하는 IgE 분석 ---------- 16
3-6 소나무류 꽃가루 항원 특이 IgE Immunoblotting ---------- 17
4. 결론 ---------- 23
참고문헌 ---------- 25
ABSTRACT ---------- 29

표 목차

표 1. 대상자의 성별, 나이, 피부반응검사 결과 ---------- 5

그림 목차

그림 1. 소나무류 (소나무, 곰솔, 리기다소나무) 꽃가루 채집 장소 ---------- 3
그림 2. 자생 소나무류 꽃가루 감작 실험절차 ---------- 7
그림 3. 생쥐군의 IgE 변화량 측정 실험 절차 ---------- 8
그림 4. 소나무류 꽃가루 알레르겐에 대한 특이 IgE 측정 실험 절차 ---------- 9
그림 5. 5% SDS-polyacylamid gel을 사용한 국내산 자생 소나무류의 꽃가루 단백질 전기영동 결과 ---------- 11
그림 6. 10% SDS-polyacylamid gel을 사용한 국내산 자생 소나무류의 꽃가루 단백질 전기영동 결과 ---------- 12
그림 7. 15% SDS-polyacylamid gel을 사용한 국내산 자생 소나무류의 꽃가루 단백질 전기영동 결과 ---------- 13
그림 8. 실험용 생쥐에 자생 소나무류 꽃가루를 피부 감작 및 흡입 감작 처리 후 생성되는 IgE 분석 ---------- 14
그림 9. 소나무 꽃가루 항원과 특이적으로 결합하는 IgE 측정값 ---------- 15
그림 10. 곰솔 꽃가루 항원과 특이적으로 결합하는 IgE 측정값 ---------- 16
그림 11. 리기다소나무 꽃가루 항원과 특이적으로 결합하는 IgE 측정값 ---------- 16
그림 12. 소나무류 꽃가루 항원과 특이적으로 결합하는 IgE 평균값 ---------- 17
그림 13. IgE Immunoblotting에 의한 자생 소나무류 꽃가루 항원의 결합 IgE 분석 ---------- 18
그림 14. 자생소나무류 꽃가루 항원의 결합 IgE (정상인) ---------- 18
그림 15. IgE Immunoblotting에 의한 소나무 꽃가루 항원의 결합 IgE ---------- 19
그림 16. 소나무 꽃가루 항원의 결합 IgE 분석표 ---------- 19
그림 17. IgE Immunoblotting에 의한 곰솔 꽃가루 항원의 결합 IgE ---------- 20
그림 18. 곰솔 꽃가루 항원의 결합 IgE 분석도 ---------- 20
그림 19. IgE Immunoblotting에 의한 리기다 소나무 꽃가루 항원의 결합 IgE ---------- 21
그림 20. 리기다소나무 꽃가루 항원의 결합 IgE 분석도 ---------- 21

1. 서론

공중에 입자로 부유하고 있는 물질들은 일반적으로 연무질(aerosol)이라고 부른다. 공중에 떠다니는 물질들 중에서 세균과 바이러스를 검출하는 것은 어려운 일이지만, 조류(algae), 엽모(leaf hairs), 종자(seeds), 식물편 (plant fragment) 그리고 화분(pollen) 등의 검출은 비교적 용이하다. 원래 짧은 거리밖에 날아가지 못하는 이들 연무질 입자들은 대기의 상태에 지배를 받고 있으며 때로는 상승기류를 타고 멀리까지 날아가는 경우도 있다. 연무질 입자들 중 화분과 같은 환경물질은 과민성인 사람에게는 알레르기 반응을 일으키기도 한다. 알레르기 체질인 사람은 항원(antigen)에 대한 반응이 정상인과 다르며 이런 것을 항원에 대해서 과민성이 있다고 말한다. 화분은 몇 가지의 알레르기병과 관계가 있으며 그 중에서 천식(asthma-allergenic lung disease), 알레르기성 비염(hay fever-allergic rhinitis), 눈과 피부의 알레르기 등이 포함되고 있다. 화분에 의한 알레르기(Falagiani, 1990)는 의학적으로는 화분증(pollinosis)이라고 부르며 구미에서는 고초열(hay fever)이라고도 부른다. 이 병의 특징은 발병에 계절성이 있는 것으로 매년 같은 계절에 증상이 나타나고 공중에 화분양이 많아지면 질수록 증상도 심하게 된다. 오늘날 화분증이라고 하는 것에 관한 연구는 유럽에서 1819년 Bostock(Bostock, 1819)에 의해 보고된 고초열의 연구로부터 시작되었으며, 일본에서는 1960년 荒木(荒木英齊, 1960)이 처음으로 계통적 연구에 의한 돼지풀(ragweed, *Ambrosia artemisiaefolia* var. *elatior*) 화분증을 보고하였다, 이후 구미 각국에서는 자생식물의 항원성을 규명하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Lewis et.al., 1975; Anderson, 1985; Nilsson et.al., 1992; Potter et.al., 1996). 한편 한국에서의 화분증 연구는 비교적 늦게 출발하였다 (Joo, 1965). 국내 일부 지역의 공중화분에 대한 공중화분상(airbone pollen flora)은 1997년 이후 모니터링 되고 있으나, 알레르기 질환과 연관된 공중화분 종의 항원성 규명에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다 (Park et. al. 1999, Yoon et. al. 2013, 2014).

한국에서 최장기간 최대량으로 비산하는 화분은 소나무류 화분으로 밝혀졌다(Oh et al. 2000; Choi et al. 2011; Jung and Choi 2013; Choi et al. 2014). 소나무류는 일반적으로 소나무속을 지칭하며, 국내에서 자생하는 소나무속에 해당하는 종으로는 대표적으로 소나무, 곰솔, 리기다 소나무가 있다. 소나무류(*pinus*) 꽃가루는 화분의 입자가 비교적 크고(크기: 45~65μm) 소수성(hydrophobic)을 지니고 있어서 기도를 통과하는 특성이 낮으며, 단백질 함량이 낮아서 일반적으로 알레르기를 일으키는 위험 요인으로 간주되지 않았다(Howlett et. al., 1981; Farnham, J. E., 1988;

Pettyjohn and Levetin, 1997). 심지어 소나무화분을 항원흡입 유발 검사 시 음성대조용으로 사용하였다(Frølund et. al., 1986). 이에 반해 소나무류 화분이 주요한 알레르겐이라는 견해가 보고되고 있으며(Walker, 1921; Rowe, 1939; Newmark and Itkin, 1976; Harris and German, 1985; Cornford et. al., 1988; Kalliel and Settipane, 1988; Cornford et. al., 1990), 특히 소나무류의 삼림 면적이 넓은 지역에서는 소나무 화분에 노출 정도가 심하기 때문에 심각한 알레르겐으로 작용하여 의미 있는 유병율이 보고된 바 있다(Farnham and Vaida 1982; Farnham, 1988; Fountain and Cornford, 1991; Freeman, 1993; Gastaminza et. al., 2009).

알레르기 유발 식물의 꽃가루는 종 사이에서도 항원성의 차이가 나타난다고 보고하고 있으나 (Shahali et. al., 2007), 현재 감작률 조사를 위한 피부반응 검사에는 국외제약회사에서 시판하는 외래종 꽃가루에 의존하고 있는 실정이다 (Choi et. al., 2014; Kwon et. al., 2015). 국내 자생식물을 이용한 감작율 조사에서도 해당 화분종(species)에 대한 연구가 아니라 해당 화분이 속한 과 (family) 또는 속(genus) 수준의 조사가 수행되고 있다(Kim et. al., 1987, Park et al., 2014; Hong, 2015). 이는 감작율 파악에 있어 불확실한 결과를 가져올 수도 있다. 그러므로 종 각각의 정확한 항원성 정보가 우선적으로 요구되고 있다(Calenoff et. al., 1990; Park et. al., 1999; Shahali et. al., 2007; Cox and Jacobsen, 2009; Cox et. al., 2011).

본 연구는 한반도에 분포하는 소나무류 중 소나무, 곰솔, 리기다소나무 꽃가루에 대한 동물 및 인체에서의 항원성 조사를 목적으로 하였다. 세 종 꽃가루에 대한 각각의 단백질을 SDS-PAGE 기법에 의해 비교하였다. 동물실험에서는 소나무류 꽃가루의 흡입노출 실험과 꽃가루 단백질의 피부노출실험을 통하여 IgE 변화량을 관찰하였다 (Tamura et. al., 1986; Tordesillas et. al., 2015). 세 종 꽃가루의 단백질의 인체 항원성을 조사하기 위해, 피부반응 검사에 활용되는 진단용 외래 소나무 꽃가루에 감작된 환자의 혈청을 이용하여, 혈청 내에 존재하는 IgE와 세 종 꽃가루 단백질이 특이적으로 결합하는 분자량을 확인하여 주알레르겐을 결정하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1 재료

2-1-1 꽃가루(소나무, 곰솔, 리기다소나무) 채집 및 조항원 제조

실험에 사용한 소나무류 꽃가루는 울산에 분포하고 있는 소나무, 곰솔, 리기다소나무 3종이며 2014년 4~5월에 채집하였다. 리기다소나무는 울산대학교 내(St. A), 소나무꽃가루는 문수산(St. B), 곰솔은 북구(St. C, D)에서 각각 채집하였다(그림 1).

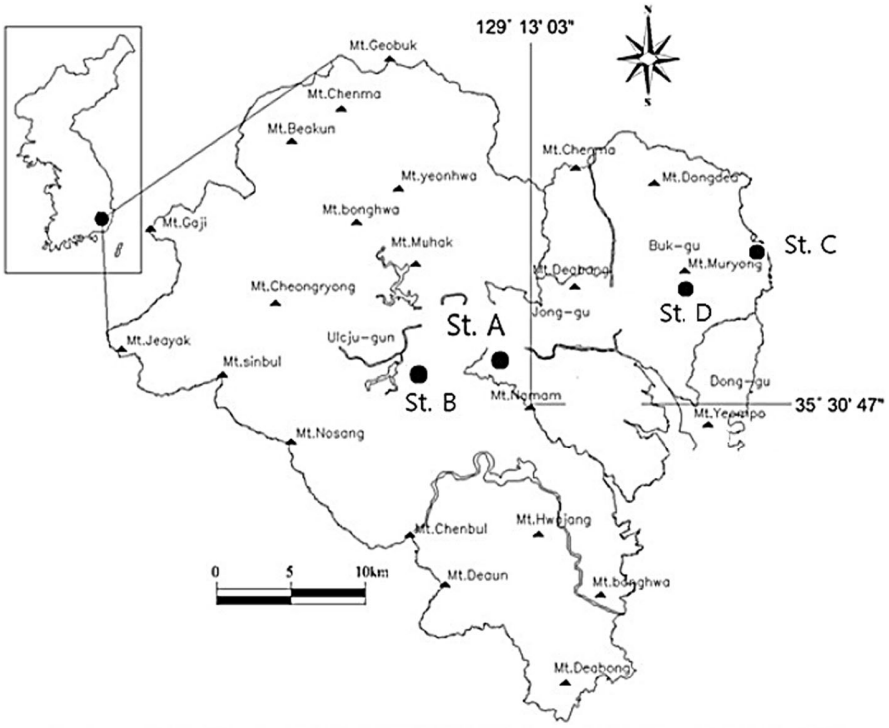

그림 1. 소나무류 (소나무, 곰솔, 리기다소나무) 꽃가루 채집 장소

채집한 소나무류(Three pine trees) 수꽃을 음지에서 7일 동안 자연 건조시킨 후 세망(pore size 150μm)을 사용하여 꽃가루를 걸러내었다. 소나무류 꽃가루 각각 5g에 대해 5배의 ethylether(W/V 1:5)를 첨가하는 작업을 반복하였으며, 4℃에서 12시

간 씩 두 번의 교반(stir) 과정을 거친 후 후드 내에서 air dry 12시간 과정을 통하여 ethylether를 제거하였다. Ethylether가 완전히 제거된 탈지방화 소나무 꽃가루에 phosphate buffer saline(pH 7.8)을 W/V 1:5 비율로 첨가하여 4℃에서 24시간 동안 교반(stir) 과정을 거친 후 30분 동안 원심분리 (14,000rpm, 4℃)한 뒤 상층액을 분리하여 추출된 단백질을 얻었다. 분리한 상층액을 투석막에 넣어 4℃에서 48시간 동안 2~3번의 증류수 교체 과정을 거쳐 증류수로 투석하였다. 그 뒤 0.45 μm Millipore filter를 사용하여 filter 후 -20℃에서 보관하였다. 단백질 정량을 위하여 BCA 방법을 사용하여 발색 반응으로 단백질의 추출을 확인하고 흡광도 측정으로 정량하였다.

2-1-2 실험동물

대한 바이오 링크(주)로부터 구입한 7주령의 암컷 Balb/c 생쥐를 울산대학교 동물실험실에서 특정 병원균이 없는 상태(SPF)로 15일에 걸쳐 실험하였다.

2-1-3 연구대상

자생 소나무류 꽃가루 항원성 조사를 위해, 2011년~2013년 기간 동안 울산대학교 병원 환경보건센터가 구축한 초등학생 코호트 조사 대상자 중 24개 표준항원 피부반응검사에서 진드기류와 소나무에서만 팽진 반응을 보인 20명의 알레르기 환자 검체(혈청)를 이용하였다. 표 1은 선택된 20명에 대한 성별, 나이, 집먼지진드기와 소나무 항원에 대한 반응 정도에 대한 정보를 제시하고 있다. 환자들은 여자가 10명, 남자가 10명이었으며 평균연령은 여자가 9.1±3.0세, 남자가 10.5±3.2세였다. 피부반응검사에 이용된 표준항원은 음성대조군(Saline), 양성대조군(Histamin), 아메리카진드기, 유럽진드기, 긴털진드기, 바퀴벌레, 돼지풀, 질경이, 버드나무, 쑥, 한삼덩굴, 오리나무, 개, 고양이, 옥내곰팡이, 옥외곰팡이, 누룩곰팡이, 자작나무, 참나무, 소나무, 명아주, 단풍나무, 새우, 밀가루, 우유, 계란이다. 대조군으로 피부반응 검사에서 소나무에 팽진 반응을 보이지 않는 5명의 검체(혈청)를 이용하였다.

표 1. 대상자의 성별, 나이, 피부반응검사 결과

Patient No.	성별	나이	피부반응검사 (평균 wheal 크기 : mm)			
			아메리카진드기	유럽진드기	긴털진드기	소나무
1	남	12	음성	양성(3.29*3.00)	음성	양성(10.84*5.85)
2	여	12	음성	양성(3.09*3.06)	양성(3.43*3.09)	양성(3.54*3.11)
3	남	9	양성(9.85*7.93)	양성(13.32*9.43)	양성(3.18*3.02)	양성(3.00*3.50)
4	여	9	양성(8.04*9.71)	양성(12.49*10.8)	양성(3.37*4.14)	양성(3.91*2.95)
5	남	12	양성(7.67*6.90)	양성(7.86*10.84)	음성	양성(5.23*5.82)
6	여	10	양성(5.52*5.04)	양성(6.84*5.23)	음성	양성(3.46*3.00)
7	여	10	양성(6.86*4.55)	양성(10.70*7.00)	양성(5.38*4.41)	양성(3.00*3.00)
8	여	9	양성(8.87*6.88)	양성(13.59*7.91)	음성	양성(3.00*3.00)
9	남	12	양성(13.58*18.4)	양성(13.70*18.07)	양성(3.00*3.00)	양성(3.00*3.00)
10	남	12	음성	양성(15.50*10.00)	양성(3.00*3.00)	양성(3.00*3.00)
11	남	12	양성(5.98*4.12)	양성(4.50*4.15)	음성	양성(3.00*3.00)
12	남	11	양성(5.45*5.34)	양성(9.30*5.45)	양성(3.00*3.00)	양성(3.52*3.00)
13	남	8	음성	양성(26.60*14.20)	음성	양성(4.44*3.18)
14	여	8	양성(6.51*4.64)	양성(3.00*3.00)	음성	양성(3.00*3.00)
15	남	9	양성(7.65*6.80)	양성(26.00*17.00)	음성	양성(10.96*8.72)
16	여	9	양성(15.51*9.41)	양성(16.80*8.76)	음성	양성(3.00*3.00)
17	여	8	양성(13.81*10.90)	양성(11.81*8.37)	음성	양성(4.03*3.00)
18	남	8	양성(8.70*6.56)	양성(6.36*4.77)	음성	양성(3.00*3.00)
19	여	8	양성(9.24*7.15)	양성(20.71*11.20)	양성(3.00*3.00)	양성(3.00*3.00)
20	여	8	양성(6.34*7.93)	양성(8.51*6.16)	음성	양성(4.06*4.53)

2-2 방법

2-2-1 소나무류 꽃가루 항원의 SDS-PAGE

한반도에 분포하는 소나무, 곰솔, 리기다소나무 꽃가루에서 분리 추출한 꽃가루 단백질의 조성을 SDS-PAGE를 실시하여 비교하였다. 단백질 분리를 위해 polyacrylamide gel 10%와 15% (separating gel), 5% (stacking gel)를 준비하고 각각의 단백질들은 SDS gel-loading buffer (50mM Tris·Cl, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, 1% b-mercaptoethanol)에 넣어서 100℃에서 3분간 boiling하여 sample을 준비하였다. 각각의 sample과 standard size marker를 gel의 각 well에 loading하고 Tris-glycine electrophoresis buffer (25mM Tris, 250mM glycine, 0.1% SDS)system에서 80V로 2시간 30분~3시간 정도 running 하였다. Electrophoresis가 끝난 후 gel을 staining solution (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250, 10% glacial acetic acid in methanol:H2O 1:1 V/V)으로 staining한 후 destaining solution (methanol: glacial acetic acid: H2O 3:1:6)을 3~4번 바꿔주면서 destaining하였다. SDS-PAGE를 사용하여 소나무, 곰솔, 리기다 소나무 꽃가루의 단백질을 비교 분석 하였다. 분석할 수 있는 단백질의 크기 범위를 넓히기 위해 다른 농도의 젤 (5 %, 10 % 및 15 %)을 사용했다.

2-2-2 소나무류 꽃가루 감작에 대한 생쥐 군의 IgE 변화량측정

꽃가루와 꽃가루에서 추출한 단백질을 각각 balb/c 생쥐에 흡입 및 피부 감작을 통하여 처리한 후 혈액의 IgE의 변화량을 분석하였다.

소나무류 꽃가루가 실험용 생쥐에서 IgE 생성 유도 정도를 확인하기 위하여 그림 2와 같은 절차를 따랐다.

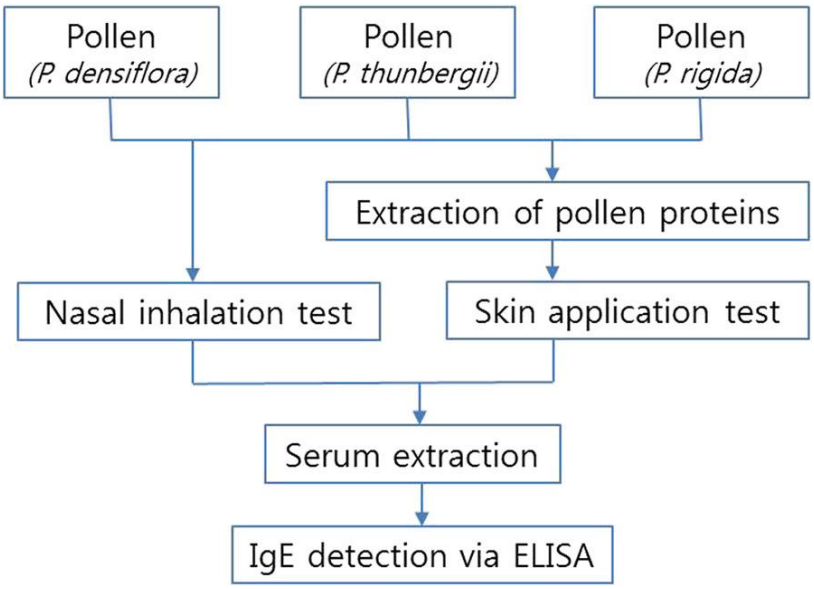

그림 2. 자생 소나무류 꽃가루 감작 실험절차

즉, 흡입 감작 알레르기 유발실험을 위하여 소나무, 곰솔, 리기다소나무 각각의 꽃가루 0.05g에 멸균된 DW 1ml을 넣고 vortex (0.05g/ml)로 양을 균등하게 조정한 용액을 각 그룹별 5마리의 생쥐에 마리당 25ul 씩(1.25mg/mouse) 15일 동안 비강을 통해 직접 주입했다. 또 다른 하나의 경로로 피부감작 알레르기 유발실험을 위하여 생쥐를 마취한 후 Clipper로 등의 털을 제거한 후, 등 표면에 소나무, 곰솔, 리기다소나무 각각의 꽃가루 단백질을 그룹별로 생쥐당 100μl 씩 15일 동안 매일 도포하였다. 대조군은 매일 1회 멸균된 DW를 마리당 25ul씩 15일동안 비강을 통해 직접 주입하였다. 대조군과 각각의 흡입, 피부 감작 실험을 진행한 생쥐 그룹에서 5일, 10일, 15일에 Capillary tube를 사용하여 눈의 모세혈관에서 혈액을 채취하였다. 혈청 분리를 위하여 3000rpm에서 15분간 원심분리 한 뒤 상층액을 분리하여 -20℃에서 보관하였다. 각 그룹의 혈청 IgE의 변화량을 측정하기 위해 mouse IgE ELISA kit(ebioscience mouse IgE ELISA Ready-SET-Go)를 사용하여 측정하였다.

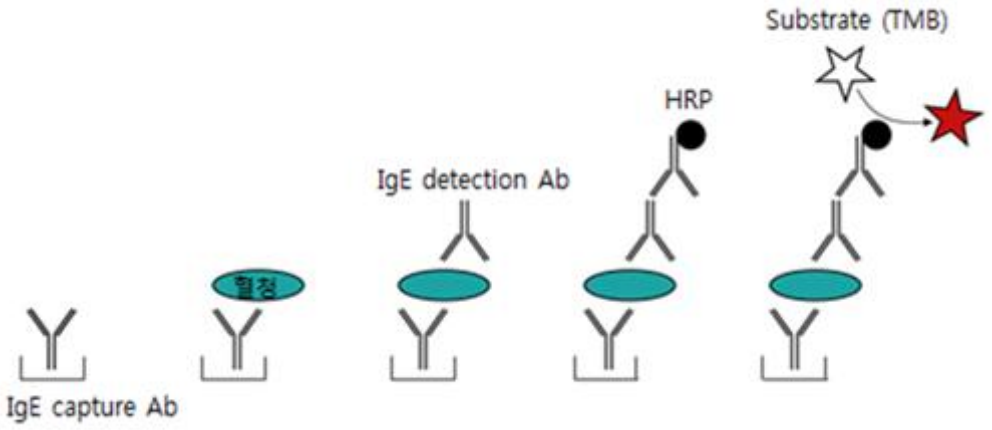

그림 3. 생쥐군의 IgE 변화량 측정 실험 절차

그림 3과 같이 먼저 96well microplate의 well당 IgE capture Ab를 coating하여 4℃에서 18시간동안 반응시켰다. PBS-T(Tween 20, 0.05%)로 well 당 200μl로 3회 세척한 후, 2% bovine serum albumin(BSA)을 well당 100μl 처리 후 상온에서 2시간동안 반응시켜 비특이적인 단백질 결합을 차단시켰다. PBS-T(Tween 20, 0.05%)로 well 당 200μl로 3회 세척한 후, 일정비율로 희석된 생쥐의 혈청을 well 당 50μl 첨가한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. PBS-T(Tween 20, 0.05%)로 well 당 200μl로 3회 세척한 후, IgE detection Ab를 일정량 가한 후 상온에서 1시간 반응시켰다. PBS-T(Tween 20, 0.05%)로 well 당 200μl로 3회 세척한 후, horseradish peroxidase가 부착된 secondary antibody를 첨가한 후 상온에서 30분 반응시켰다. PBS-T(Tween 20, 0.05%)로 well 당 200μl로 3회 세척한 후, horseradish peroxidase 기질인 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 well당 100ul 처리하여 발색시켰다. 0.16M sulfuric acid stop solution을 well당 100ul씩 분주하여 반응을 중단시킨 후, 흡광도 450nm에서 Microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

2-2-3 인체 혈청 내 소나무류 꽃가루의 알레르겐에 대한 특이 IgE 측정

피부반응 검사에 활용되는 진단용 외래 소나무 꽃가루에 감작된 검체(혈청)와 소나무류(소나무, 곰솔, 리기다소나무) 꽃가루에서 추출 분리한 단백질의 면역반응을 통해 자생 소나무류(소나무, 곰솔, 리기다소나무) 꽃가루의 항원성을 확인하기 위해 그림 4과 같은 효소면역측정법(enzyme-linked immunospecific assay : ELISA) 실험을 수행하였다.

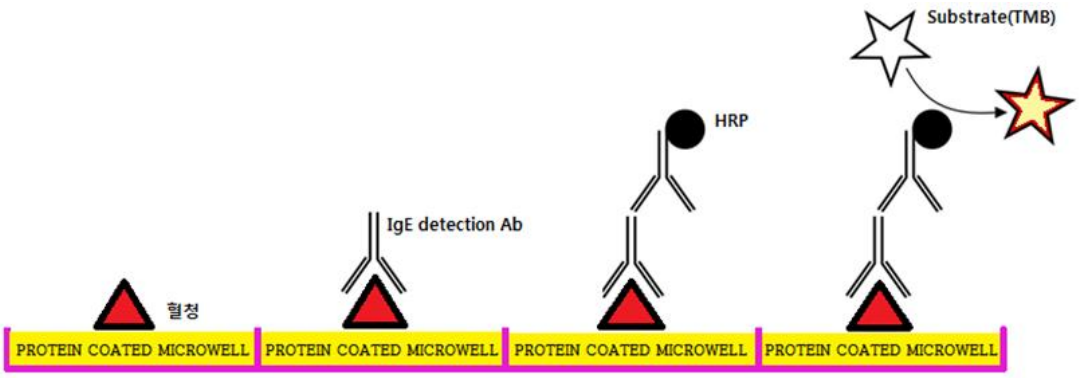

그림 4. 소나무류 꽃가루 알레르겐에 대한 특이 IgE 측정 실험 절차

울산대병원 환경보건센터에서 선별한 실험군의 혈청(진단용 외래 소나무꽃가루에 팽진반응을 보이는 20인의 혈청) 및 대조군의 혈청(진단용 항원에 대하여 반응을 보이지 않는 3~5인의 혈청) 각각의 검체(표 1)와 자생소나무류(소나무, 곰솔, 리기다소나무) 꽃가루의 면역 반응 정도를 확인하기 위해 효소면역측정법(enzyme-linked immunospecific assay : ELISA) 실험을 수행하였다. 각 그룹의 혈청 내 IgE의 반응성을 측정하기 위해 96well microplate의 well당 소나무, 곰솔, 리기다 소나무의 꽃가루에서 추출한 단백질 50μl와 buffer를 동량 Coating 처리하였다(4℃, O/N). PBS-T(Tween 20, 0.05%)로 well 당 200μl로 3회 세척한 후, 2% bovine serum albumin을 well당 100μl 처리 후 상온에서 1시간동안 반응시켜 비특이적인 단백질 결합을 차단시켰다. PBS-T(Tween 20, 0.05%)로 well 당 200μl로 3회 세척한 후, 일정비율로 희석된 혈청을 well 당 100μl 첨가한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. PBS-T(Tween 20, 0.05%)로 well 당 200μl로 3회 세척한 후, IgE detection Ab를 일정량 가한 후 상온에서 30분 반응시켰다. PBS-T(Tween 20, 0.05%)로 well 당 200μl로 3회 세척한 후, horseradish peroxidase 기질인 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 well당 100ul 처리하여 발색시켰다. 0.16M sulfuric acid stop solution을 well당 100ul씩 분주하여 반응을 중단시킨 후, 흡광도 450nm에서 Microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

2-2-4 인체 혈청 내 소나무류 꽃가루 항원 특이 IgE Immunoblotting

진단용 외래 소나무 꽃가루에 감작된 환자의 혈청(표 1) 내에 존재하는 IgE와 세 종 꽃가루 단백질 항원이 특이적으로 결합하는 지 여부를 밝히기 위한 실험을 수행하였다. 소나무류 꽃가루 항원으로 SDS-PAGE를 시행한 후 IgE Immunoblotting을 실시하여 자생 소나무류 꽃가루 단백질의 주 알레르겐을 결정하고자 하였다. 전기영동

후, 단백질이 젤로부터 막으로 옮겨졌다. 막은 PBS상에서 1시간 동안 실온에서 0.05 % Tween20과 3% Bovine Serum Albumin (BSA)에 의해 block 되어졌다. 막은 PBS - Tween20에서 10분동안 세차례 씻겨졌고, 1:15로 희석된 알레르기 subject serum 과 함께 밤새 incubate 했다. incubation 후, 막은 씻겨졌다. 그리고 PBS 하에서 anti-human IgE가 표지된 horse radish peroxidase를 1: 20000 희석한 후 1 시간동안 incubate 했다. 막은 다시 씻겨진 후 ECL chemiluminescence method (Amersham Kit) 에 의해 처리되었다. 항원은 X-OMAT Kodak film에 1분 접촉한 후 현상되었다.

3. 연구결과 및 논의

3-1 소나무류 꽃가루 단백질 분석

5% polyacrylamid gel 전기영동을 실시하여 70kDa 이상의 단백질 밴드를 확인한 결과, 국내 자생소나무류(소나무, 곰솔, 리기다소나무) 사이에 약 80 kDa 및 120 kDa 부근에서 서로 다른 밴드들을 지님을 확인할 수 있었다(그림 5).

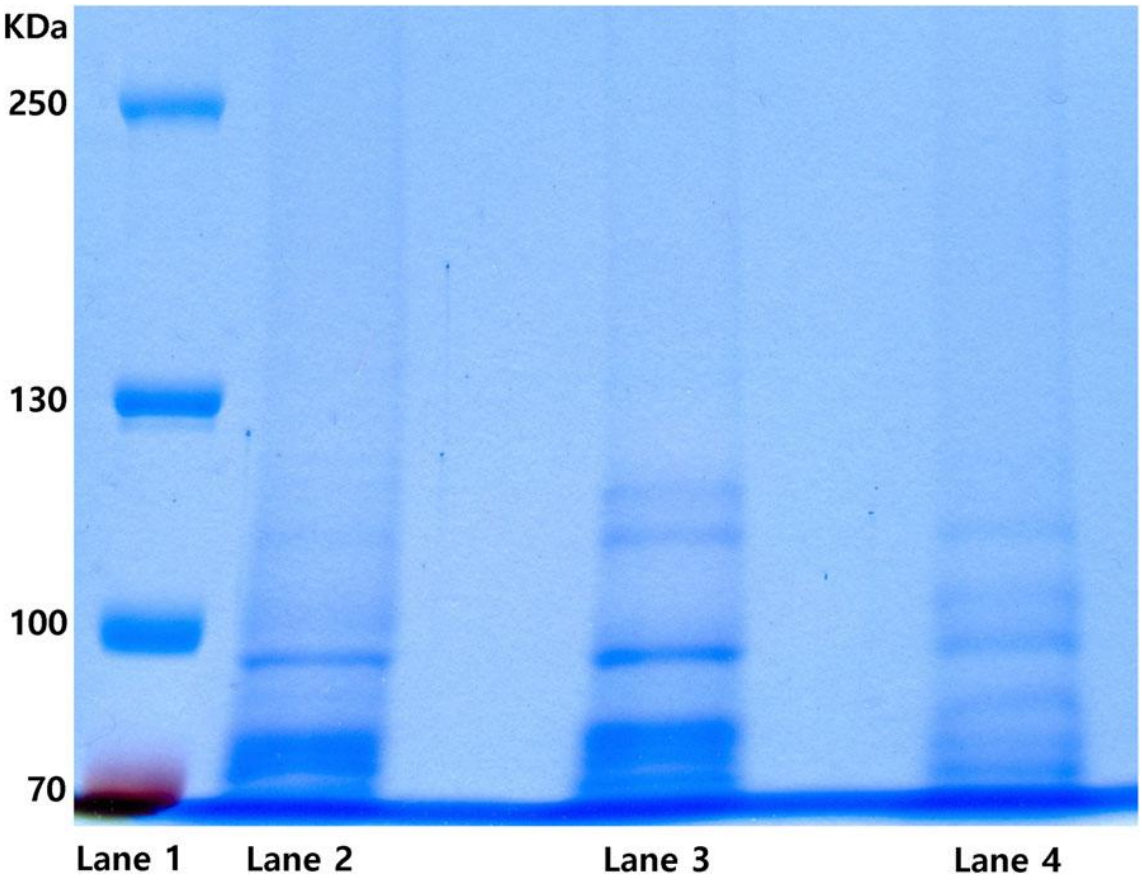

그림 5. 5% SDS-polyacylamid gel을 사용한 국내산 자생 소나무류의 꽃가루 단백질 전기영동 결과

Lane 1, SDS-PAGE marker ; Lane 2, P. densiflora extract

Lane 3, P. thunbergii extract ; Lane 4, P. rigida extract

35kDa~70kDa 크기의 단백질들을 분석하기 위하여 10% polyarylamid gel을 사용한 전기영동을 수행하였다. 그 결과 이 범위 안에 들어가는 크기의 단백질 종류들이

너무 많아서 정확한 비교는 어려웠지만, 국내 자생소나무류(소나무, 곰솔, 리기다소나무)의 꽃가루들 사이에 비슷한 크기의 밴드들이 관찰되었다(그림 6).

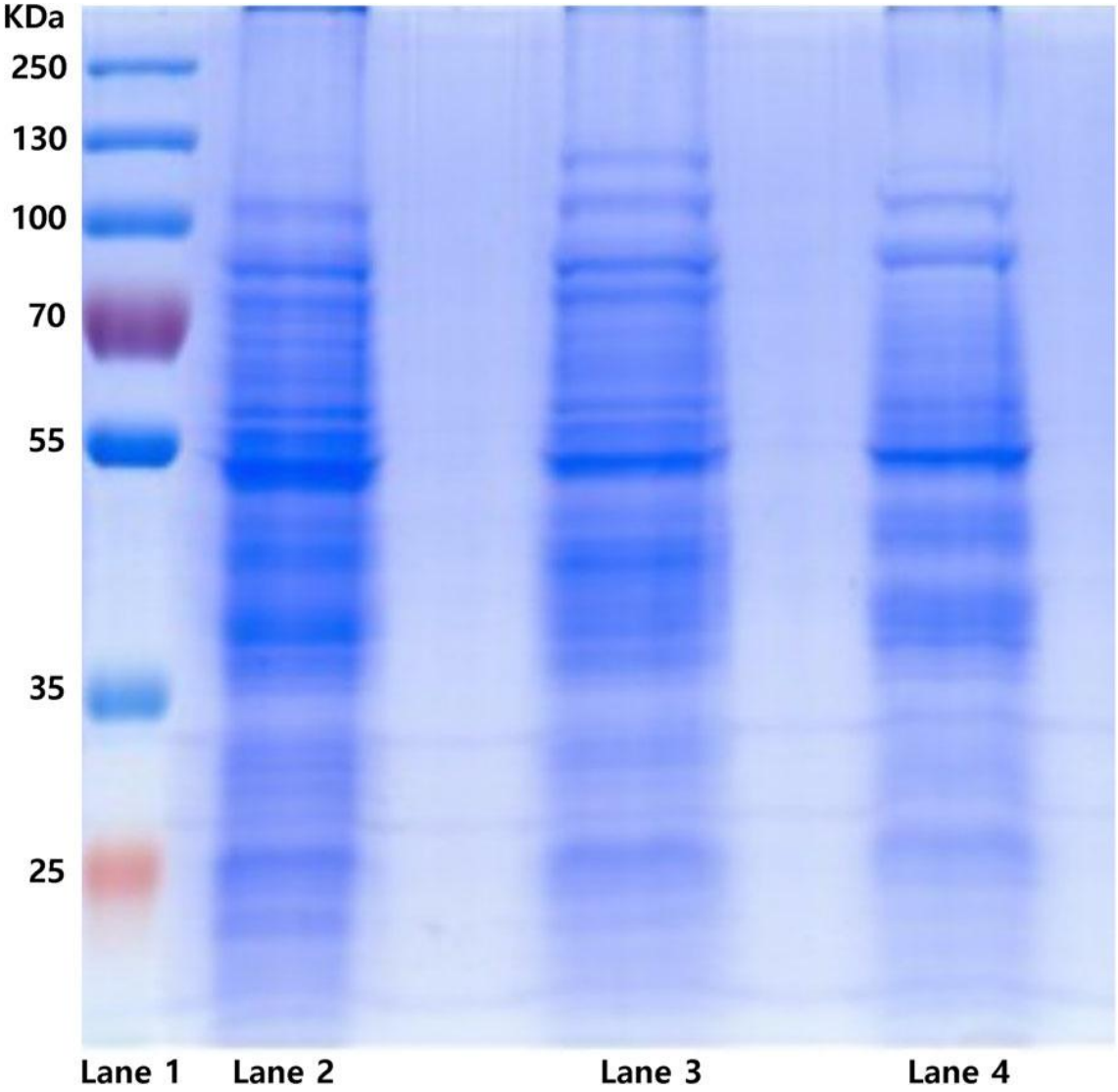

그림 6. 10% SDS-polyacylamid gel을 사용한 국내산 자생 소나무류의 꽃가루 단백질 전기영동 결과

Lane 1, SDS-PAGE marker ; Lane 2, P. densiflora extract

Lane 3, P. thunbergii extract ; Lane 4, P. rigida extract

마지막으로, 분자량 35kDa이하의 작은 크기를 지니는 단백질들을 비교하기 위하여 15% polyarylamide gel 전기영동을 실시하였다. 그 결과 세종류의 소나무 꽃가루들 사이에 약 30 kDa과 17 kDa 부분의 밴드에서 차이가 있음을 확인 하였다(그림 7).

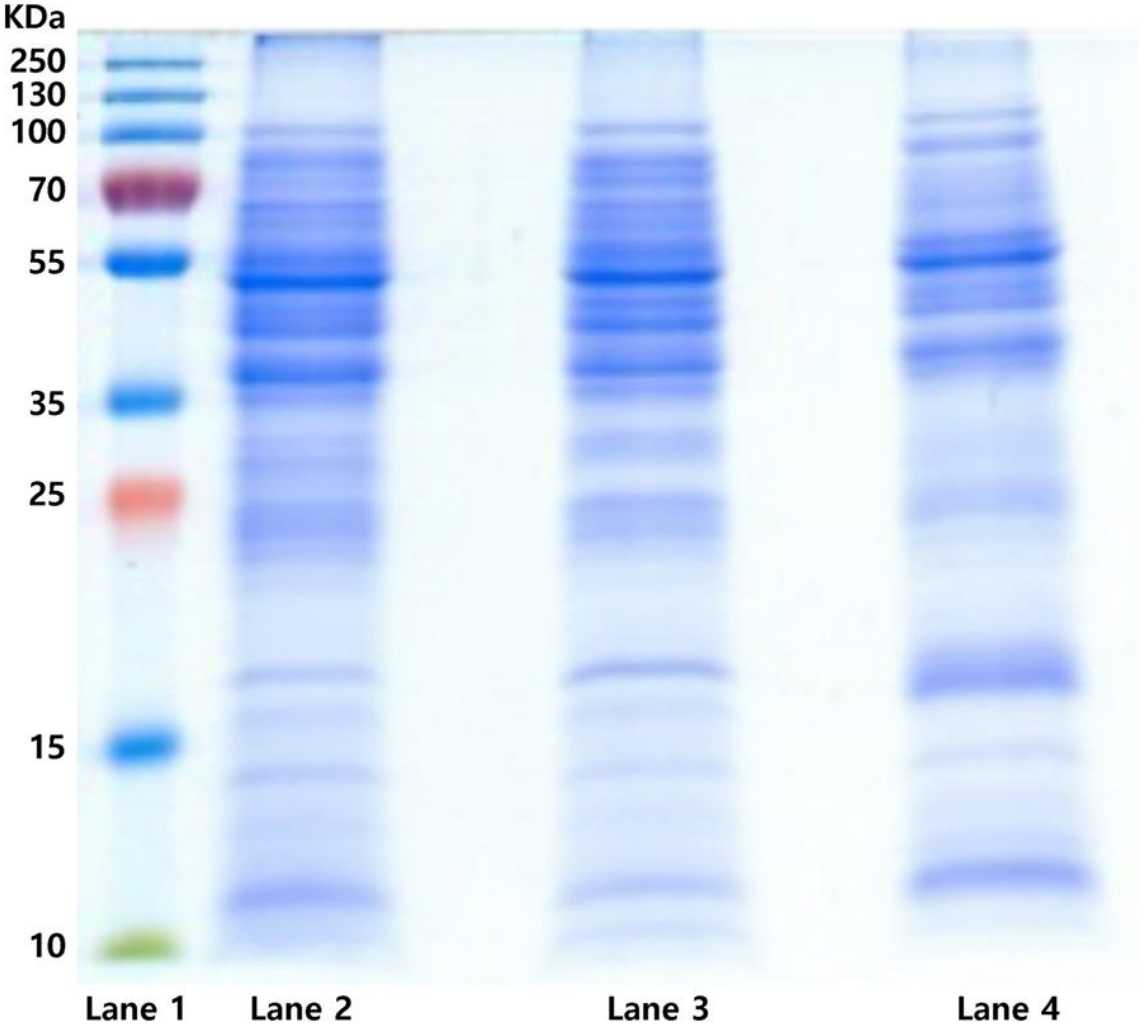

그림 7. 15% SDS-polyacylamid gel을 사용한 국내산 자생 소나무류의 꽃가루 단백질 전기영동 결과

Lane 1, SDS-PAGE marker ; Lane 2, P. densiflora extract
Lane 3, P. thunbergii extract ; Lane 4, P. rigida extract

5%, 10%, 15% SDS-PAGE 실험 결과, 소나무, 곰솔, 리기다 소나무 꽃가루 단백질의 분자량은 공통되는 부분이 많았으나 일부 서로 다른 부위가 존재함을 확인하였다.

3-2 소나무류 꽃가루들의 IgE 유도 특성 비교

소나무류 꽃가루가 가장 많이 비산되는 시기는 대략 2주 내 임을 감안하여 15일 동안 생쥐에 흡입 및 피부를 통한 알레르기 유발 실험을 수행하였다 (Shin-ichi TAMURA, 1986, Leticia Tordesillas et al. 2015). 먼저 정상 생쥐군(대조군)에서 5일, 10일, 15일에 채취한 혈청의 IgE 양을 분석한 결과 시간이 지남에 따른 변화가 없음이 확인되었다(그림 8). 피부감작유발 실험군과 흡입감작유발 실험군에서 채취한 혈청은 대조군에 비하여 IgE 양이 많았으며 시간이 지남에 따라 증가함이 확인되었다 (그림 8).

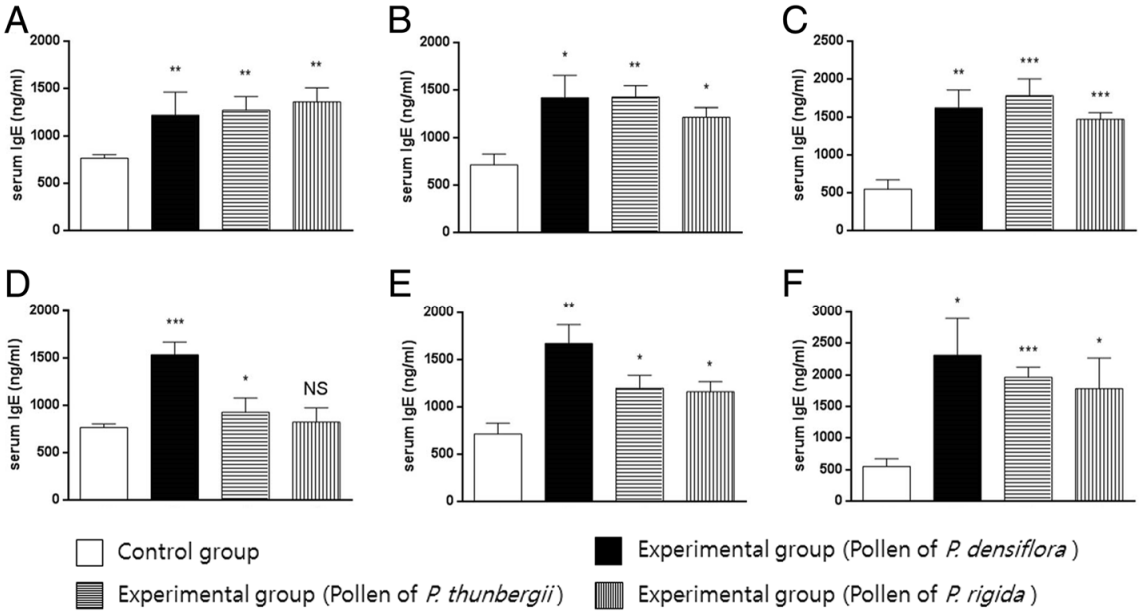

그림 8. 실험용 생쥐에 자생 소나무류 꽃가루를 피부 감작 및 흡입 감작 처리 후 생성되는 IgE 분석

피부감작유발 실험군의 경우, 세 종류의 소나무 꽃가루들 모두 실험동물 생쥐에서 5일째부터 IgE 생성량이 유도되어 15일째까지 유사한 정도로 증가하였다(그림 8A-8C). 흡입감작 유발실험의 경우, 5일과 10일째에 소나무 꽃가루를 처리한 그룹에서는 IgE의 양이 뚜렷하게 증가했지만 나머지 두 종류의 꽃가루를 처리한 그룹에서는 IgE의 증가가 매우 미약했다(그림 8D, 8E). 그러나 15일째에는 세 종류 꽃가루를 처리한 그룹 모두에서 IgE 생성이 뚜렷하게 증가하였으며 세 종류의 꽃가루를 처리한 그룹들이 비슷한 정도의 IgE 양을 보였다(그림 8F). 또한 15일째에는 세 종류 꽃가루

처리한 그룹 모두 피부감작 유발실험의 경우에 비해 더 많은 양의 IgE를 유도함을 확인하였다(그림 8C, 8F). 이로부터 국내에 분포하는 소나무, 곰솔, 리기다 소나무의 꽃가루가 동물에서 알레르기 반응을 일으킬 수 있는 꽃가루로 사료된다.

3-3 소나무 꽃가루와 특이적으로 결합하는 IgE 분석

대조군에 비해 소나무 꽃가루 항원에 특이적으로 결합하는 IgE양이 상대적으로 높게 나타난 실험군의 수는 총 15명이며 (75%, 환자번호 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20), 이 중 높게 나타난 IgE의 순서는 환자번호 20>14>15>9>10>4>6>19>17>13>11>12>1>7>2이었다(그림 9).

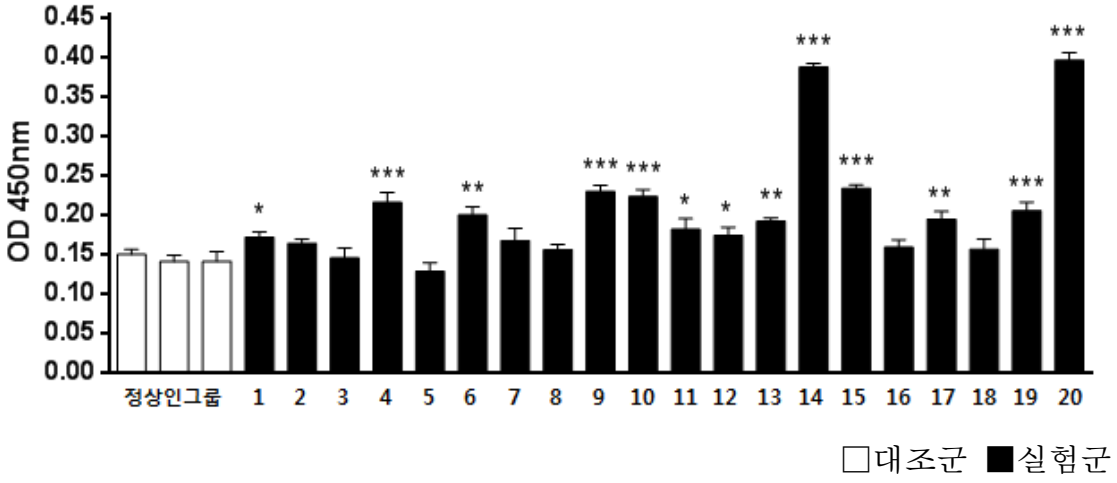

그림 9. 소나무 꽃가루 항원과 특이적으로 결합하는 IgE 측정값

3-4 곰솔 꽃가루와 특이적으로 결합하는 IgE 분석

대조군에 비해 곰솔 꽃가루 항원에 특이적으로 결합하는 IgE양이 상대적으로 높게 나타난 실험군의 수는 총 10명이며 (50%, 환자번호 4, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 19, 20) 이 중 가장 높게 나타난 IgE의 순서는 환자번호 20>14>15>4>10>19>9>13>12>6 이었다 (그림 10).

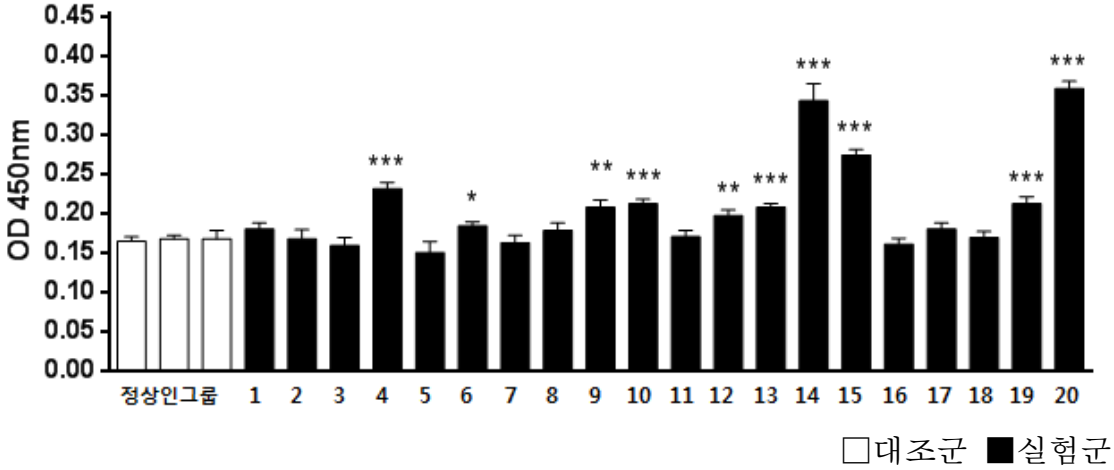

그림 10. 곰솔 꽃가루 항원과 특이적으로 결합하는 IgE 측정값

3-5 리기다 소나무 꽃가루와 특이적으로 결합하는 IgE 분석

대조군에 비해 리기다 소나무 꽃가루 항원에 특이적으로 결합하는 IgE양이 상대적으로 높게 나타난 실험군의 수는 총 13이며 (65%, 환자번호 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20) 이 중 가장 높게 나타난 IgE의 순서는 환자번호 14>20>9>19>15>10>13>6>8>11>17>16 이었다(그림 11).

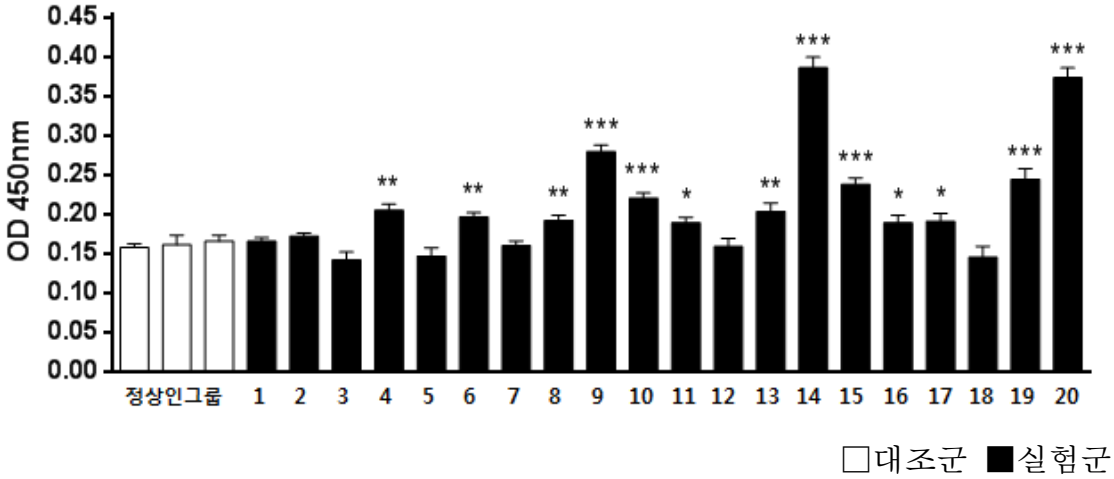

그림 11. 리기다소나무 꽃가루 항원과 특이적으로 결합하는 IgE 측정값

피부반응 검사 결과 소나무, 곰솔, 리기다소나무 꽃가루에서 양성반응을 보이는 20명의 실험군은 대조군(5명)에 비해 흡광도 값이 대체적으로 비슷한 패턴으로 높게 나타남을 확인할 수 있었다(그림 9~11). 또한 실험군 20명 중 9명(45%, 환자번호 4, 6, 9, 10, 13, 14, 15, 19, 20)이 소나무, 곰솔, 리기다 소나무 꽃가루에 공통적으로 반응하였다. 이는 세 종류의 꽃가루 단백항원 중 공통 항원이 존재함을 추정할 수 있다. 3명(환자번호 1, 2, 7)은 소나무에 상대적으로 높은 값을 보이고, 1명(환자번호 12)은 소나무와 곰솔에 반응하고 리기다 소나무에는 반응하지 않았다. 리기다에서만 상대적으로 높은 값이 나오는 검체 (8, 16), 소나무와 리기다에서 높은 값이 상대적으로 측정되는 결과값 등을 통하여 공통항원 외에 서로 다른 특이항원이 존재한다고 생각되어진다. 진단용 소나무항원에 대한 피부반응검사 결과로 제시된 팽진의 크기와의 연관성은 찾을 수 없었다. 또한 실험군 20명과 대조군 5명 각각의 IgE 측정값에는 특이적으로 높은 수치가 보였음에도 불구하고, 전체 통계자료에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다(그림 12).

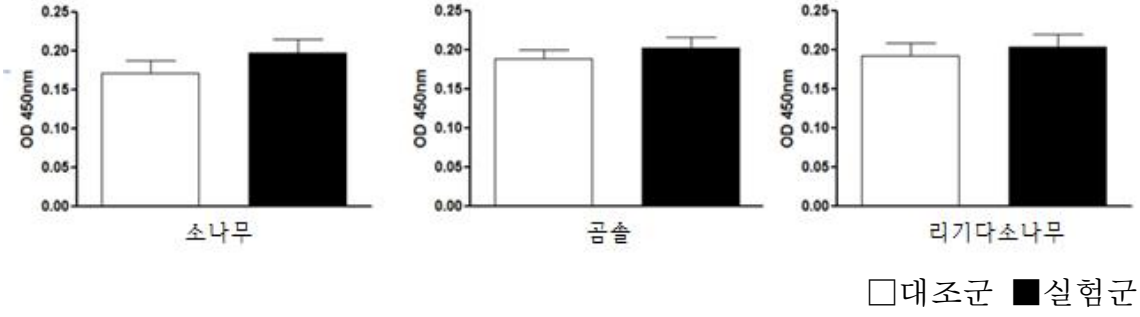

그림 12. 소나무류 꽃가루 항원과 특이적으로 결합하는 IgE 평균값

3-6 소나무류 꽃가루 항원 특이 IgE Immunoblotting

피부 반응 검사용 소나무 꽃가루 항원에 양성반응을 보이는 검체에 대해서 환자의 혈청 내 IgE와 세 종에 대한 항원이 결합하는 단백항원을 관찰하였다. 그 결과, 세 종은 모두 36kDa, 55kDa, 70~72kDa의 단백대에서 강하게 결합하였다. 소나무와 곰솔은 36kDa 부위에서 강하게 결합하였으나 리기다 소나무는 36kDa 부위에서 비교적 약한 단백대가 관찰되었다. 또한 리기다 소나무에서만 42kDa 부위에서 단백대가 확인되지 않거나 약한 단백대가 관찰되었다.(그림 13). 대체적으로 소나무와 곰솔은 항원이 결합하는 부위가 비슷한 반면 리기다 소나무는 36~55kDa 단백대에서 두 종과는 차이를 보였다. 이는 소나무와 곰솔은 2엽송에 해당하여 서로 공통점이 많은 반면 리기다소나무는 3엽송임으로 차이가 나는 것으로 생각된다.

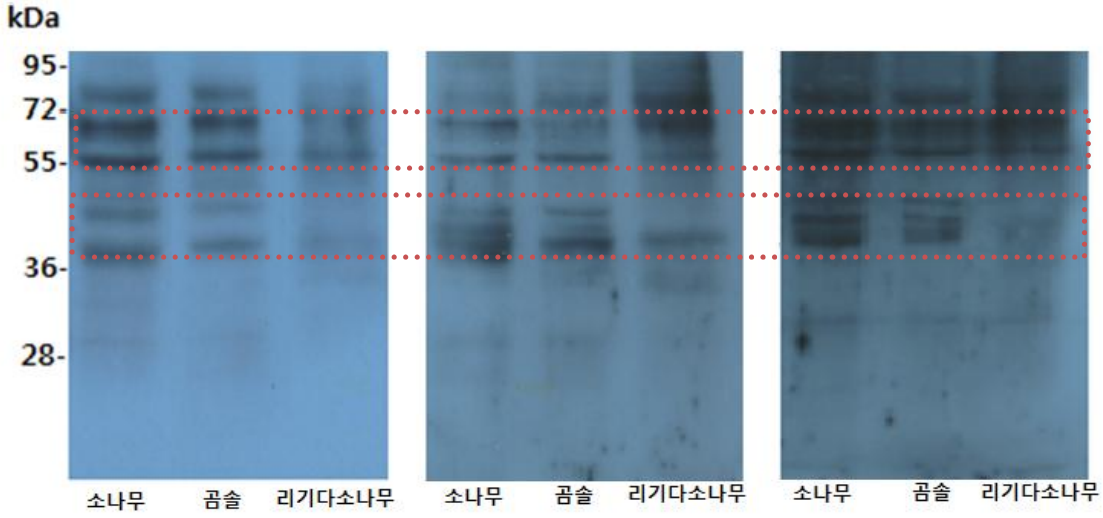

그림 13. IgE Immunoblotting에 의한 자생 소나무류 꽃가루 항원의 결합 IgE 분석

피부반응 검사에서 소나무 항원에 팽진 반응을 보이지 않는 정상인(대조군)의 혈청 내 IgE와 자생소나무류 꽃가루 항원의 결합 유무를 확인하기 위하여 Immunoblotting을 시행하였다. 실험 결과, 자생소나무류 꽃가루 항원과 IgE binding components가 확인되는 양성반응이 관찰되었다. 이는 피부반응 검사에 활용되는 외국에서 수입한 소나무류 진단 항원이 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 종 마다 항원성에 대한 정확한 규명이 필요함을 증명하는 결과라고 생각한다 (그림 14).

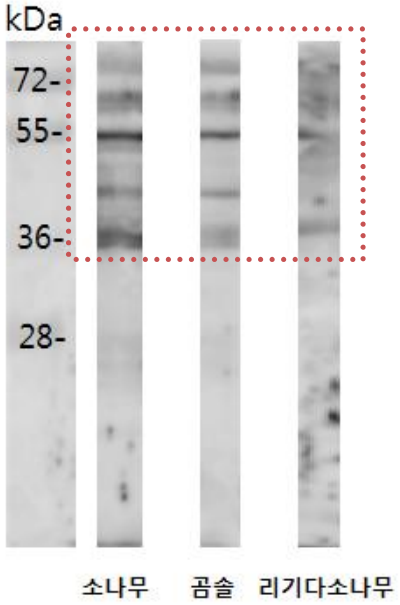

그림 14. 자생소나무류 꽃가루 항원의 결합 IgE (대조군)

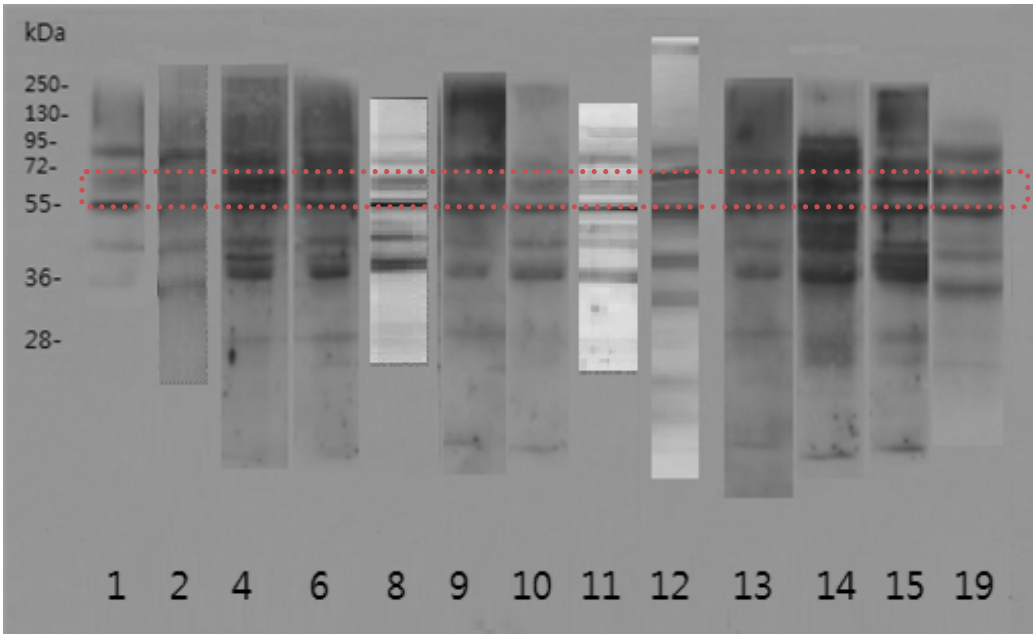

그림 15. IgE Immunoblotting에 의한 소나무 꽃가루 항원의 결합 IgE

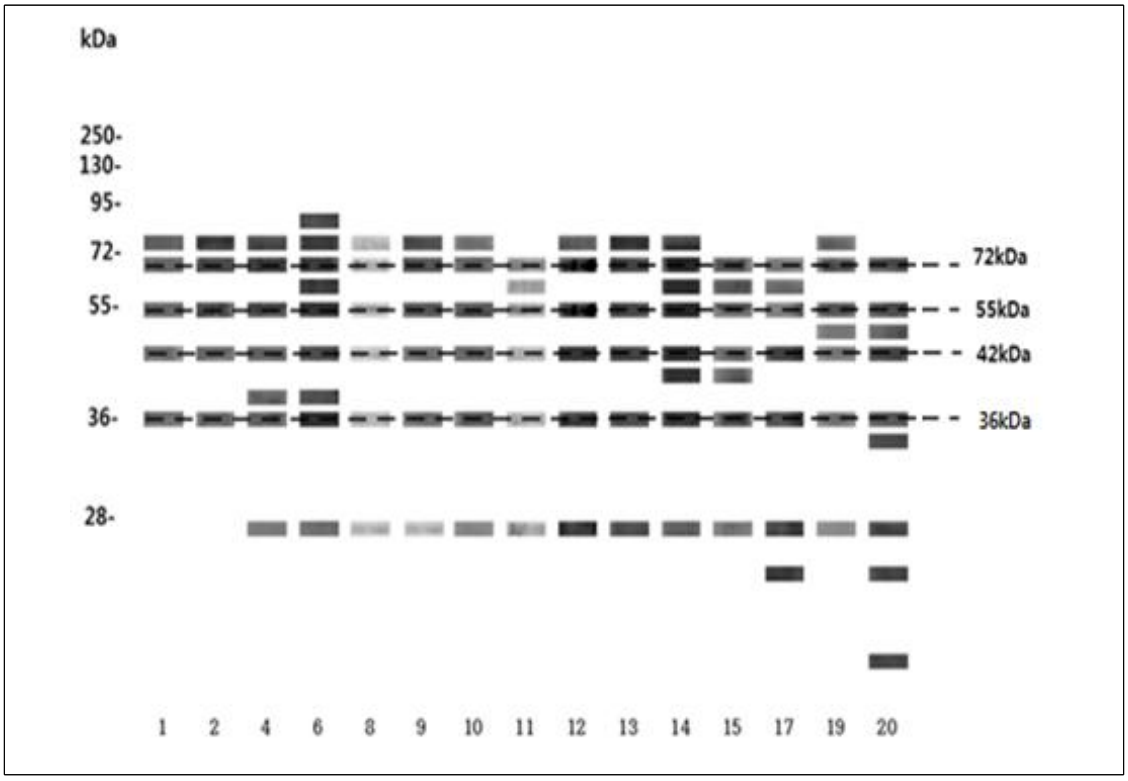

그림 16. 소나무 꽃가루 항원의 결합 IgE 분석표

자생 소나무류 꽃가루 항원과 혈청 간의 특이 IgE 결합의 경향성을 확인하기 위하여 환자 15명의 검체를 재선별하였다. ELISA 실험 후 자생 소나무류 꽃가루 모두에

공통적으로 높게 반응하는 검체(4,6,9,10,13,14,15,19,20), 소나무꽃가루에만 상대적으로 높은 값이 나오는 검체(1,2), 리기다에서만 상대적으로 높은 값이 나오는 검체 (8,), 소나무와 곰솔에서만 상대적으로 높은 값이 나오는 검체(12), 소나무와 리기다에서 높은 값이 나오는 검체 (11, 17)를 대상으로 IgE Immunoblotting을 소나무, 곰솔, 리기다소나무 꽃가루 단백질에 대하여 각각 실시하였다. 소나무 꽃가루 단백질 Immunoblotting 결과, 모두에서 28, 36, 42, 55, 72, 85kDa의 단백항원이 검출되었다(그림 15, 그림 16).

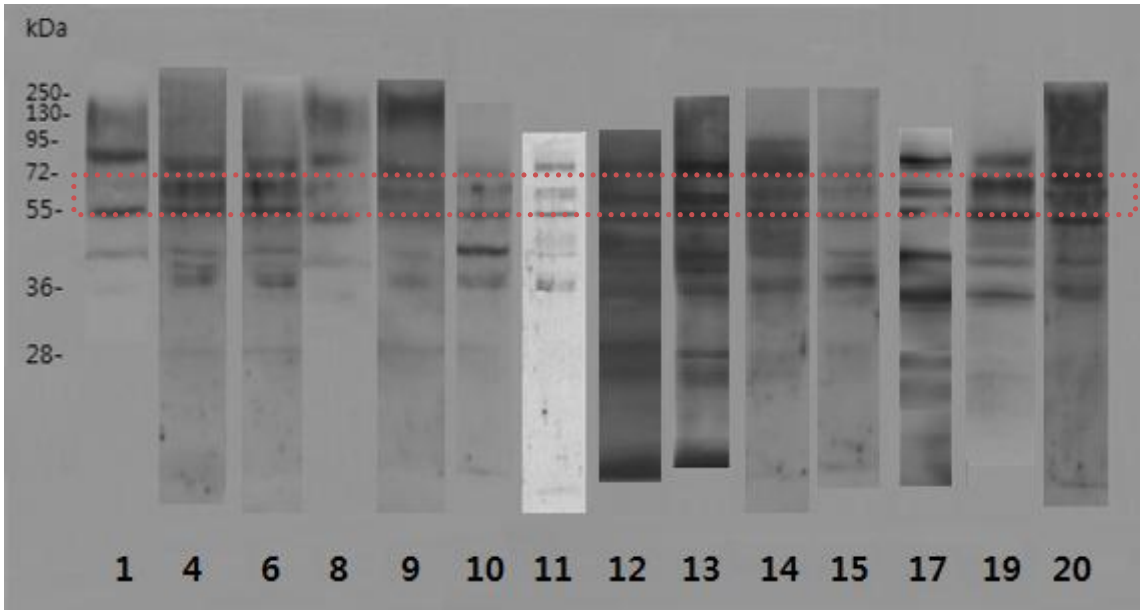

그림 17. IgE Immunoblotting에 의한 곰솔 꽃가루 항원의 결합 IgE

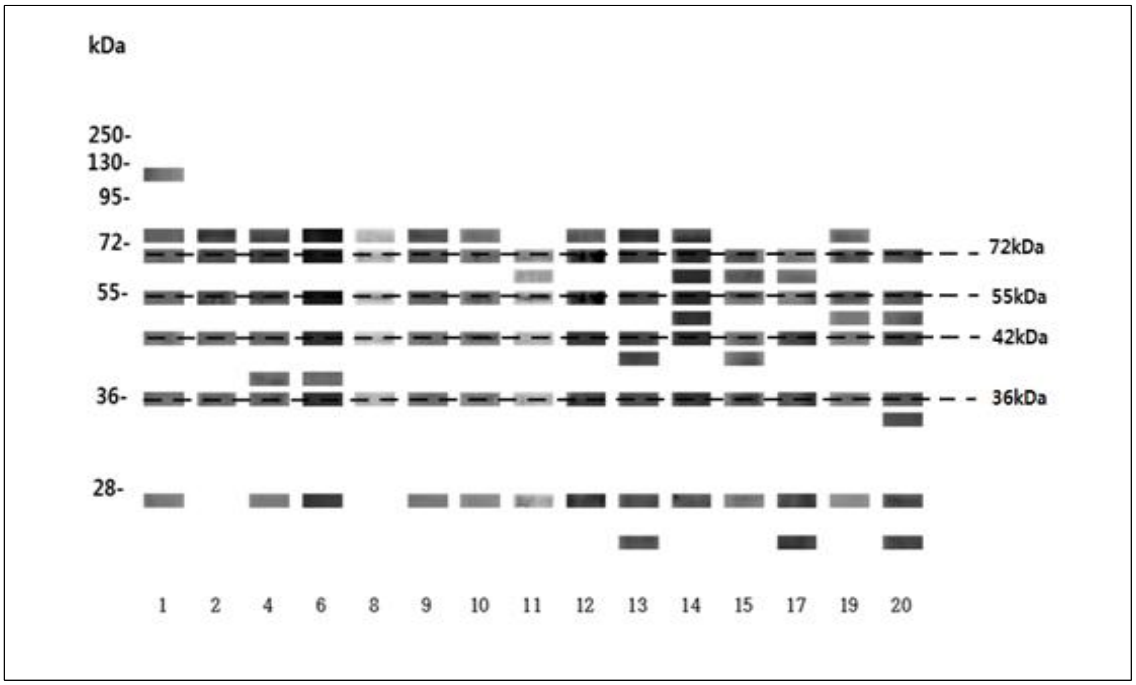

그림 18. 곰솔 꽃가루 항원의 결합 IgE 분석도

곰솔 꽃가루 단백질 Immunoblotiing 결과, 28, 36, 42, 55, 72, 85kDa의 분자량에서 소나무와 거의 같은 분자량이 공통항원으로 존재함을 확인하였다(그림17, 그림18).

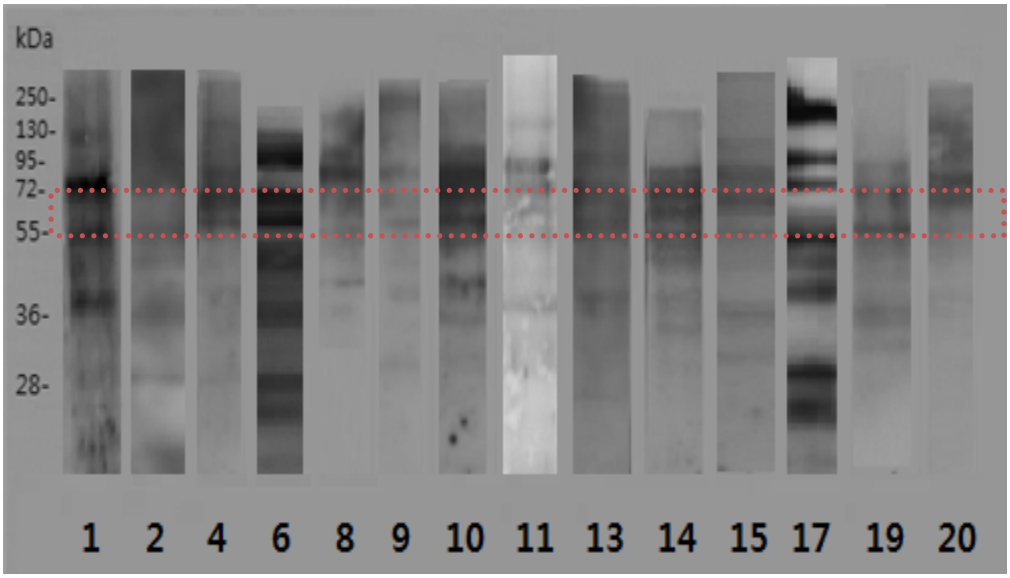

그림 19. IgE Immunoblotting에 의한 리기다 소나무 꽃가루 항원의 결합 IgE

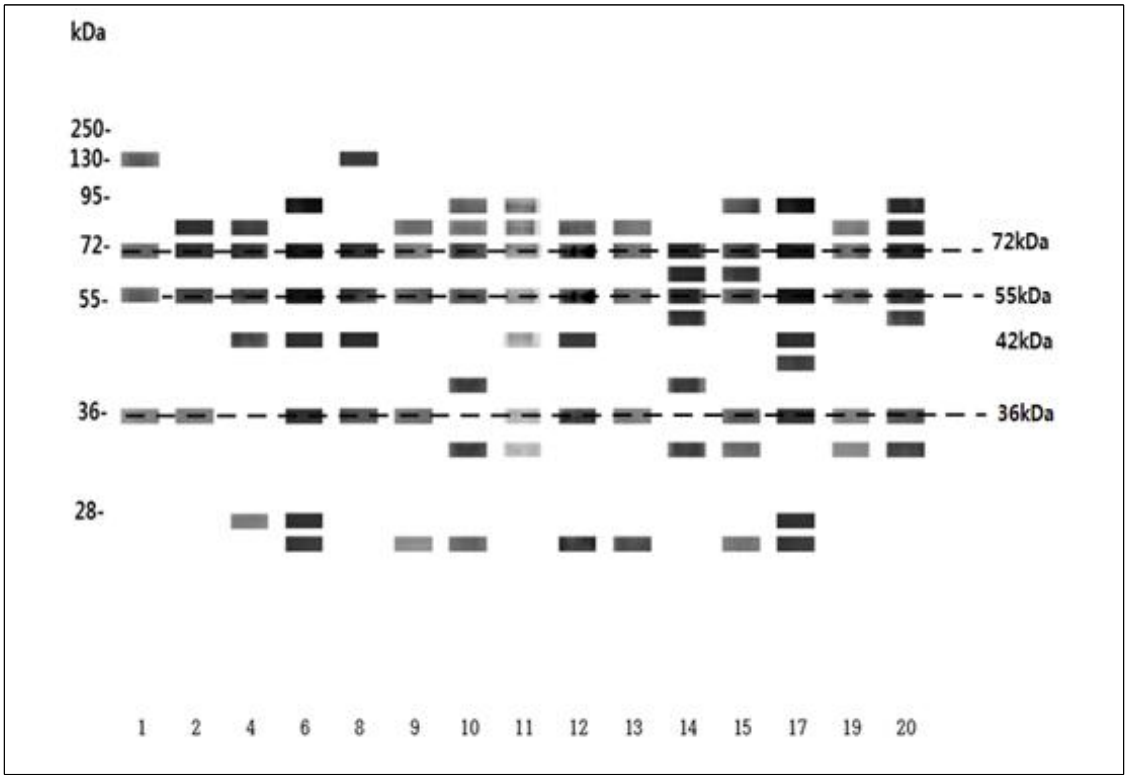

그림 20. 리기다소나무 꽃가루 항원의 결합 IgE 분석도

리기다소나무 꽃가루 단백질의 경우, 공통적인 항원밴드는 42kDa은 발견되지 않거나 약한 단백대가 확인되었으며, 28, 36, 55, 72, 85kDa의 분자량에서 공통항원으로 존재함을 확인하였다(그림 19, 그림 20).

소나무꽃가루에 대하여 36~42kDa (검체4,6,14,15), 42~55kDa (검체19,20), 55~72kDa (검체6,11,14,15,17)에서 추가적인 밴드가 보였다(그림 15, 그림 16). 곰솔꽃가루에 대하여 36~42kDa (검체4,6,13,15), 42~55kDa (검체14,19,20), 55~72kDa (검체 11,14,15,17)에서 추가적인 밴드가 보였다(그림17, 그림 18). 리기다소나무꽃가루에 대하여 36~42kDa (검체4,6,8,10,11,12,14,17,20), 42~55kDa (검체14), 55~72kDa (검체 14,15)에서 추가적인 밴드가 보였다(그림 19, 그림 20). 세 종 모두에 대하여 반응성이 강한 분자량은 36, 55, 72kDa이었다.

일반적으로 침엽수 중 소나무류 꽃가루의 주항원은 42kDa과 대략 6~8kD크기를 지니는 단백질들로 알려져 있다(Weber, 2005). 또한 *Pinus radiata*의 경우 allergy를 유발하는 주항원들은 140, 85, 70, 55, 42, 32, 22, 19 그리고 6~8kDa에 해당한다는 보고가 있다(Gastaminza 등, 2009; Cornford 등, 1988). 본 연구에 사용한 3종류의 소나무류 꽃가루들의 단백질을 비교한 결과, 공통적인 항원밴드는 85, 72, 55, 36, 28kD으로 *Pinus radiata*의 주항원과 거의 유사한 패턴을 보임을 알 수 있다. 향후 밴드의 주항원 부위를 파악한 결과를 바탕으로, 분자량을 확인하고 분석하여 주 알레르겐으로 작용하는 단백질을 규명할 필요가 있다.

4. 결론

국내 자생하는 소나무류 중 소나무, 곰솔, 리기다소나무의 꽃가루는 모두 IgE 생성을 유발하는 특성을 지니며, 피부 감작보다는 흡입 감작 시 더 많은 IgE를 유발함을 동물실험을 통하여 확인하였다. 특히 세 종류의 소나무류 중 소나무 꽃가루가 IgE를 유발하는 특성이 가장 강하였다.

알러지 진단용으로 외국에서 수입한 외국산 소나무류 꽃가루에 감작된 환자(알레르기 진단용 SPT KIT: 외국에서 수입한 알레르기 진단용)의 혈청에 대해서 자생 소나무류 꽃가루 단백질을 투입했을 때 결합하는 IgE양은 대조군(정상인)에 비해 상대적으로 높게 나타났다. 그리고 소나무, 곰솔, 리기다소나무 꽃가루는 각각 IgE 결합정도가 유사한 패턴을 보였다. 그러나 소나무, 곰솔, 리기다소나무 중 어느 종이 인체에서 항원성이 높은지는 통계적으로 유의한 결과를 볼 수 없었다. 이와 별개로, 국외 소나무류 꽃가루에 감작되지 않은 정상인군에서 일정농도 이상의 IgE양이 측정되는 경우가 있었다. Immunoblotting 결과에서는 피부반응검사에 활용하는 진단용 항원에 팽진반응을 보이지 않는 혈청에 대하여서도 IgE가 결합하는 양성반응이 관찰되었다. 이는 국외 진단용 소나무 꽃가루와 자생 소나무류 꽃가루의 항원성이 차이가 날 수 있는 가능성을 제시한다. 정확한 항원성을 판별하기 위해서는 수입산 진단용 시료보다는 자생식물 꽃가루 단백질의 피부반응검사를 실시하여 항원성 유무와 정도를 확인할 필요가 있다.

국외 소나무 꽃가루항원에 대한 피부반응검사에서 알 수 있는 팽진의 크기와 자생 소나무류 꽃가루 단백질과 반응하는 IgE양과의 연관성은 확인할 수 없었다.

IgE가 결합하는 주 알레르겐에 대해서 자생 소나무류는 거의 유사한 결합부위를 확인할 수 있었다. 세 종 모두에 대하여 36kDa, 55kDa, 72kDa의 분자량이 주요 알레르겐으로 볼 수 있고, 이 중 반응성이 가장 강한 밴드는 72kDa 밴드였다. 이는 국외에서 보고된 소나무류 주항원 분자량(28,36,42,55,72,85kDa) 중 공통적으로 존재하는 항원 부위임을 알 수 있다. 공통항원 외에 자생소나무류(소나무, 곰솔, 리기다 소나무) 꽃가루에서 추가로 36~42kDa, 42~55kDa, 55~72kDa 사이에서 IgE가 결합하는 부위를 확인하였다. 이와 같이 수입산 진단용 소나무류 꽃가루 시료에 공통적으로 존재하는 단백질 분자량이 인체 내에서 알레르기를 일으킬 경우는 진단 및 치료에 수입한 진단용 Kit를 사용해도 무관하다. 그러나 자생소나무류에서만 특이적으로 관찰되는 IgE결합 단백질 성분에 의해 알레르기가 유발될 경우에는 정확한 진단과 치료가 이루어지지 않는다.

해당 항원으로 작용하는 분자량에 대한 성분 분석을 통해 항원의 성분에 대한 규명

연구도 필요하다. 식물 꽃가루의 단백질 추출방법은 종마다 각각 다르다. 그러므로 한반도 자생식물 꽃가루에 대한 항원성의 연구는 지속적으로 이루어져야 하며, 그 결과를 기반으로 피부반응검사 및 진단과 치료가 이루어져야 한다.

자생식물 화분의 항원성에 대한 기초자료가 꾸준히 확보되면, 감작율 진단 시 외래종 화분을 이용한 기존 조사에 대한 불확실성을 줄여 알레르기 질환의 효율적 예방관리, 진단에 기여할 수 있다. 또한 거시적인 관점에서는 도시생태 계획 시에도 확보된 정보를 기반으로 항원성이 낮은 식물의 조림 등에 이를 활용할 수 있다.

참고문헌

Anderson, J. H. (1985). Allergenic airborne pollen and spores in Anchorage, Alaska. Annals of allergy, 54(5), 390-399.

荒木英齊. (1960). 花粉症の研究: I. 空中花粉の季節的変動. アレルギー, 9(8), 648-655.

Bostock, J. (1819). Case of a periodical affection of the eyes and chest. Medico-chirurgical transactions, 10(Pt 1), 161.

Calenoff, E., Beigler, M. A., Friesen, G. L., & Nichols, J. L. (1990). Stable antigenic extracts methods. U.S. Patent No. 4,963,356. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Choi, S. H., Jung, I. Y., Kim, D. Y., Kim, Y. H., Lee, J. H., Oh, I. B., & Choi, K. R. (2011). Seasonal distribution of airborne pollen in Ulsan, Korea in 2009-2010. Journal of Ecology and Field Biology, 34(4), 371-379.

Choi, S. W., Lee, J. H., Kim, Y. H., Oh, I. B., & Choi, K. R. (2014). Association between the sensitization rate for inhalant allergens in patients with respiratory allergies and the pollen concentration in Ulsan, Korea. The Korean Journal of Medicine, 86(4), 453-461.

Cornford, C. A., Fountain, D. W., Burr, R. G., & O'leary, L. (1988). Hayfever in university students (letter). The New Zealand Medical Journal, 101, 520.

_____, Fountain, D. W., & Burr, R. G. (1990). lgE-binding proteins from pine (Pinus radiata D. Don) pollen: evidence for cross- reactivity with ryegrass (Lolium perenne). International Archives of Allergy and Immunology, 93, 41-46.

Cox, L., & Jacobsen, L. (2009). Comparison of allergen immunotherapy practice patterns in the United States and Europe. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 103(6), 451-460.

_____, Esch, R. E., Corbett, M., Hankin, C., Nelson, M., & Plunkett, G. (2011). Allergen immunotherapy practice in the United States: guidelines, measures, and outcomes. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 107(4), 289-299.

Falagiani P. (1990). Pollinosis. CRC Press, Boca Raton, FL, 20-32.

Farnham, J. E. (1988). A new look at conifer allergy (editorial). Allergy and Asthma Proceedings, 9(3), 237-238.

_____, & Vaida, G. A. (1982). A new look at New England tree pollen. Allergy and Asthma Proceedings, 3(2), 320-326.

Freeman, G. L. (1993). Pine pollen allergy in northern Arizona. Annals of Allergy, 70(6), 491-494.

Frølund, L., Madsen, F., Gerner Svendsen, U., & Weeke, B. (1986). Reproducibility of standardized bronchial allergen provocation test. Allergy, 41(1), 30-36.

Fountain, D. W., & Cornford, C. A. (1991). Aerobiology and allergenicity of Pinus radiata pollen in New Zealand. Grana, 30, 71-75.

Gastaminza, G., Lombardero, M., Bernaola, G., Antepara, I., Munoz, D., Gamboa, P. M., Audicana, M. T., Marcos, C., & Ansotegui, I. J. (2009). Allergenicity and cross-reactivity of pine pollen. Clinical & Experimental Allergy, 39, 1438-1446.

Harris, R. M., & German, D. F. (1985). The incidence of pine pollen reactivity in an allergic atopic population. Annals of Allergy, 55, 678-679.

Hong, C. S. (2015). Pollen allergy plants in Korea. Allergy, Asthma & Respiratory Disease, 3(4), 239-254.

Howlett, B. J., Vithanage, H. I. M. V., & Knox, R. B. (1981). Pollen antigens, allergens, and enzymes. Commentaries in plant science, 2(19), l91-207.

Joo, Y. J. (1965). Studies on pollinosis: Pollen survey in Seoul. Korean J. Otolaryng, 8, 11-22.

Jung, I. Y., & Choi, K. R. (2013). Relationship between airborne pollen concentrations and meteorological parameters in Ulsan, Korea. Journal of Ecology and Environment, 36(1), 65-71.

Kalliel, J. N., & Settipane, G. A. (1988). Eastern pine sensitivity in New England. Allergy and Asthma Proceedings, 9(3), 233-235.

Kim, Y. L., Lee, S. K., Oh, S. H., Moon, B. S., Park, H. S., & Hong, C. S. (1987). A study of allergy skin tests with Korean pollen extracts. Yonsei Medical Journal, 28(2), 112-118.

Kwon, S. E., Lim, D. H., Kim, J. H., Son, B. K., Park, Y. S., Jang, H. J., Kim, B. H., Kim, G. M., Yoo, Y. S., & Park, K. W. (2015). Allergy Asthma Respir Dis, 3(1), 54-61.

Lewis, W. H., & Imber, W. E. (1975). Allergy epidemiology in the St. Louis, Missouri, area: II grasses. Annals of allergy, 35(1), 42.

Newmark, F. M., & ltkin, I. H. (1967). Asthma due to pine pollen. Annals of Allergy, 25, 251-252.

Nilsson, S. T., & Spieksma, F. T. M. (1992). Traveller's allergy service guide. Palynological Laboratory, Swedish Museum of Natural History, and Fisons Sweden AB.

Oh, J. W., Lee, H. R., Kim, J. S., Lee, K. I., Kang, Y. J., Kim, S. W., Kook, M. H., Kang, H. Y., Kim, J. S., Lee, M. H., Lee, H. B., Kim, K. E., Pyun, B. Y., Lee, S. I., & Han, M. J. (2000). Aerobiological study of pollen and mold in the 10 states of Korea. Pediatric Allergy And Respiratory Disease, 10, 22-33.

Park, J. W., Ko, S. H., Kim, C. W., Jeoung, B. J., & Hong, C. S. (1999). Identification and characterization of the major allergen of the Humulus japonicus pollen. Clinical and Experimental Allergy, 29(8), 1080-1086.

Park H.J., Lim H.S., Park K.H., Lee J.H., Park J.W., & Hong C.S., (2014). Changes in allergen sensitization over the last 30 years in Korea respiratory allergic patients: a single-center, Allergy Asthma Immunol Res 6, 434-443.

Pettyjohn, M. E., & Levetin, E. (1997). A comparative biochemical study of conifer pollen allergens. Aerobiologia, 13, 259-267.

Potter, P. C., & Cadman, A. (1996). Pollen allergy in South Africa. Clinical & Experimental Allergy, 26(12), 1347-1354.

Rowe, A. H. (1939). Pine pollen allergy. Journal of Allergy, 10, 377-378.

Shahali, Y., Majd, A., Pourpak, Z., Tajadod, G., Haftlang, M., & Moin, M. (2007). Comparative study of the pollen protein contents in two major varieties of Cupressus arizonica planted in Tehran. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology, 6(3), 123-127.

Tamura, S., Kobayashi, T., Kikuta, K., Nakagawa, M., Sakaguchi, M., &

Inouye, S.(1986). IgE antibody responses against Japanese cedar pollen in the mouse. Microbiology and Immunology, 30(9), 883-891.

Tordesillas, L., Goswami, R., Benedé, S., Grishina, G., Dunkin, D., Järvinen, K. M., Maleki, S. J., Sampson, H. A., & Berin, M. C. (2015). Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. The Journal of Clinical Investigation, 124, 4965-4975.

Walker, I. C. (1921). Frequent causes and the treatment of seasonal hay-fever. Archives of Internal Medicine, 28, 71-118.

Weber, R. W. (2005). Cross-reactivity of pollen allergens: recommendations for immunotherapy vaccines. Current opinion in allergy & clinical immunology, 5(6), 563-569.

Yoon, M. G., Kim, M., Jin, H. J., Shin, Y. S., & Park, H. S. (2013). Identification of immunoglobulin E binding components of two major tree pollens, birch and alder. Allergy, Asthma & Respiratory Disease, 1(3), 216-220.

_____,. (2014). Identification of IgE binding components of two major weed pollens, ragweed and mugwort. Allergy, Asthma & Respiratory Disease, 2(5), 337-343.

ABSTRACT

Over the years, pine pollens have been excluded as an allergen due to its relatively large size, low protein content, and waxy hydrophobic layer, despite their abundance. However, recent studies suggest the possibilities of pine pollens being allergens, and it has been reported that allergy symptoms were highly prevalent in areas with considerably large pine forests and high possibility of exposure to the pollen. Therefore, we conducted a comparative analysis of the allergenicities of the pollens from the dominant species of Korean pines, red pine (*Pinus densiflora*), black pine (*Pinus thunbergii*), and pitch pine (*Pinus rigida*) In order to determine specific allergens , we clarified the protein composition of various pollens which are potentially allergenic, and three different protein compositions, originated from *P. densiflora*, *P.thunbergii*, and *P. rigida* pollen, were identified. Next, we tested antigenicity of the pollens by sensitizing Balb/c mice. As duration of sensitization took longer via skin and airway, all three pollens were able to induce IgE increment. Notably, sensitization through airway induced more IgE than that of skin. Ability of IgE induction was superior in pollen from pine tree than two counterparts, which suggested that the pollen from pine tree is the utmost inducible factor for IgE compare to other pollens from *P.thunbergii*, and *P. rigida.* To assess whether the pollens might have antigenicity to human, we carefully measured serum IgE level of patients with pine tree pollens, and concluded that domestic pine tree originated pollens have actual allergenic effects. Analysis of IgE immunoblotting bands revealed not only common antigens (28,36,42,55,72,85kDa) which are already reported, but also new antigens from domestic pine tree originated pollens 36~42kDa, 42~55kDa, and 55~72kDa.