

애집개미(*Monomorium pharaonis*)
항원의 흡입성 알레르겐으로서의
역할 및 주알레르겐 특성 규명

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 철 우

애집개미(*Monomorium pharaonis*)
항원의 흡입성 알레르겐으로서의
역할 및 주알레르겐 특성 규명

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 철 우

애집개미(*Monomorium pharaonis*)
항원의 흡입성 알레르겐으로서의
역할 및 주알레르겐 특성 규명

지도 홍 천 수 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 철 우

김철우의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

본 연구를 시작하게 해 주시고 끊임없는 관심과 학문적인 지도로 이끌어 주신 은사 홍천수 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 연구를 진행하고 논문을 작성하는 데 있어 많은 조언을 주신 소아과학 교실의 김규언 교수님, 김동수 교수님, 미생물학 교실의 이봉기 교수님, 기생충학 교실의 용태순 교수님께 감사를 드립니다. 그리고 연구진행에 많은 도움을 주시고 어려운 실험과정에 직접 참여하여 주신 아주의대 내과학교실의 박해심 교수님 및 김현아 연구원께도 깊은 감사를 드립니다. 마지막으로 실험 진행과 정리에 많은 도움을 준 알레르기내과 실험실의 최수영 연구원에게 고마움을 전합니다.

언제나 한결같은 마음으로 기도하며 격려해 주신 어머니님 및 가족에게 감사 드리며, 힘들고 어려울 때 기댈 언덕이 되어준 사랑하는 아내 영화와 해맑은 웃음으로 기쁨과 편안함을 주는 사랑하는 아들 상윤, 도윤에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 재료	7
가. 애집개미 채집	7
나. 애집개미 조항원 제조	7
2. 생활환경 내에 존재하는 애집개미 단백 항원 측정 및 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정	7
가. 대상가구 및 거주자	7
나. 도시가구 실내 먼지 내 단백질 추출	8
다. 토끼 항혈청 제조	8
라. 제조한 토끼 항혈청의 항원 특이성 규명	8
마. 먼지 내 애집개미 항원 측정을 위한 억제 ELISA 실험	9
바. 조항원 및 먼지 추출액을 이용한 IgG inhibitory immunoblot	10
사. 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정	11
아. 통계분석	11
3. 애집개미 알레르겐의 특성 규명	12
가. 대상환자	12
나. 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험	12
다. ELISA법에 의한 애집개미-특이 IgE 측정 및 억제 ELISA 실험	13
라. 애집개미 항원의 SDS-PAGE 및 특이 IgE immunoblotting	13
마. 애집개미 조항원에 대한 2-dimensional PAGE 및 immunoblotting	13
바. 주알레르겐 N-말단 아미노산 배열 분석	14

III. 결과	15
1. 생활환경 내에 존재하는 애집개미 단백질 항원 측정 및 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정	15
가. 제조한 토끼 항혈청의 항원 특이성 규명	15
나. 먼지 내 애집개미 단백질 항원 측정을 위한 억제 ELISA 실험	15
다. 대상가구 실내 먼지에서 애집개미 단백질 항원의 측정	16
(1) 대상가구 거실 먼지 내 애집개미 단백질 항원 측정	17
(2) 대상가구 주방 먼지 내 애집개미 단백질 항원 측정	19
(3) 대상가구 침실 먼지 내 애집개미 단백질 항원 측정	22
라. 애집개미 조항원 및 애집개미 항원이 측정된 먼지를 이용한 IgG inhibitory immunoblot	22
마. 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정	23
2. 애집개미 알레르겐의 특성 규명	25
가. 대상환자의 특성 및 ELISA법에 의한 애집개미-특이 IgE 측정	25
나. 애집개미-특이 IgE에 대한 억제 ELISA 실험	25
다. 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험 및 증례	27
라. 애집개미 항원의 SDS-PAGE 및 특이 IgE immunoblotting	29
마. 애집개미 항원의 2-dimensional PAGE 및 immunoblotting	31
바. 주알레르겐의 N-말단 아미노산 배열 분석	32
IV. 고찰	34
V. 결론	41
참고문헌	43
영문요약	48

그림 차례

- 그림 1. 애집개미 (*Monomorium pharaonis*;
Pharaoh ant) 5
- 그림 2. 애집개미 항원의 흡입성 알레르겐으로서의
역할 및 주알레르겐 특성 규명 연구 체계 . 6
- 그림 3. 애집개미 조항원으로 감작시켜 제조한 토끼
항혈청을 이용한 억제 ELISA 실험 결과 . 15
- 그림 4. 먼지 내 애집개미 항원을 측정하기 위한
억제 ELISA 실험의 표준곡선 16
- 그림 5. 대상가구 먼지내에 있는
애집개미 항원 측정 결과 17
- 그림 6. 대상가구 거실 먼지에서 측정한
애집개미 단백질 항원의 계절별 변동 양상 . 19
- 그림 7. 거실 먼지에서 애집개미 항원이 검출된
가구에서 실내에서 개미 포획 여부에 따른
항원량의 계절별 비교 20
- 그림 8. 대상가구 주방 먼지에서 측정한
애집개미 단백질 항원의 계절별 변동 양상 . 21

그림 9. 애집개미 조항원 및 애집개미 항원이 측정된 먼지 추출물을 이용한 IgG inhibitory immunoblot	23
그림 10. 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정	24
그림 11. 호흡기 알레르기 환자를 대상으로 시행한 알레르기 피부단자시험 양성률	25
그림 12. 호흡기 알레르기 환자에서 애집개미- 특이 IgE 측정 결과	26
그림 13. 애집개미-특이 IgE에 대한 억제 ELISA 실험	27
그림 14. 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험 예	30
그림 15. 애집개미 항원의 SDS-PAGE	30
그림 16. 애집개미-특이 IgE immunoblotting	31
그림 17. 애집개미 항원에 대한 2-dimensional PAGE 및 immunoblotting	33
그림 18. 애집개미의 분류	39

표 차례

표 1. 개미 포획여부에 따른 거실에서 애집개미 항원 검출 양상	18
표 2. 개미 포획여부에 따른 주방에서 애집개미 항원 검출 양상	20
표 3. 개미 포획여부에 따른 침구류 먼지에서 애집개미 항원 검출	22
표 4. 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험에서 양성반응을 보인 9예의 임상 특성	29
표 5. 애집개미 항원 분획 별 특이 IgE 결합 양상	32
표 6. 32 kDa 주알레르겐의 N-말단 아미노산 배열 순서	33

애집개미(*Monomorium pharaonis*) 항원의 흡입성 알레르겐으로서의 역할 및 주알레르겐 특성 규명

개미에 의한 알레르기 질환은 침에 쏘인 후 나타나는 개미독 알레르기가 대표적으로 가벼운 종창에서부터 전신 알레르기반응까지 다양하게 나타날 수 있다. 개미에서 나오는 항원을 흡입하여 알레르기 질환이 발병한다는 보고는 현재까지 없는 상태이나, 실내에 주로 서식하는 애집개미가 흡입성 알레르겐으로 작용하여 기관지천식과 같은 호흡기 알레르기 질환을 일으킬 가능성이 있음이 최근 제시되었다. 현재 애집개미의 서식은 증가하고 있으며, 애집개미가 흡입성 알레르겐으로 작용한다면 추후 애집개미에 의한 호흡기 알레르기 환자도 계속 증가할 것이다. 그러나 현재까지 애집개미 항원이 흡입성 알레르겐으로 작용한다는 연구결과는 전혀 없는 상태로서 그에 대한 규명이 꼭 필요하다. 이에 본 연구에서는 애집개미 항원이 흡입성 알레르겐으로 작용한다는 가설을 세우고 이를 증명하고자 하였다.

먼저 매일 생활하는 실내 공간에 애집개미 항원이 존재하여 흡입에 의하여 노출이 가능함을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 서울지역에 위치한 56가구를 계절별 (2001년 4월, 7월, 10월 및 2002년 1월)로 직접 방문하여 거실, 주방 및 침실에서 먼지를 채집하였다. 토끼를 면역시켜 애집개미에 특이적인 항혈청을 제조한 후, 채집한 집 먼지내에 애집개미 항원이 존재하는 지를 억제 ELISA 실험으로 측정하였으며, 거주자를 대상으로 애집개미-특이 IgE를 측정하였다. 애집개미 항원의 흡입 노출 가능성이 밝혀지면 주알레르겐을 확인하고 특성을 규명하였다. 이를 위하여 호흡기 알레르기 환자를 대상으로 IgE ELISA 및 억제 ELISA 실험을 시행하여 애집개미의 항원성 및 특이성을 확인하였으며, IgE immunoblotting 및 2-dimensional PAGE를 시행하여 알레르겐 성분 및 주알레르겐을 확인하였다. 그리고 주알레르겐에 대한 N-말단 아미노산 배열 순서를 결정하였다. 결과는 다음과 같았다.

서울지역 35.7% 가구의 실내 먼지에서 애집개미 항원이 검출되었

다. 애집개미 항원은 계절에 영향을 받았으며, 가을 및 겨울 실내 먼지에서 봄 및 여름에 비하여 높은 농도로 측정되었다 ($p < 0.05$). 실내에서 개미가 잡힌 가구에서 애집개미 항원의 검출률이 높았으나, 실내에 개미가 잡히지 않은 일부 가구에서도 높은 농도의 개미 항원이 검출되었다. 대상가구에 거주하는 거주자 중 11.5%에서 애집개미-특이 IgE 항체가 검출되었으며, 실내 먼지에서 애집개미 항원이 검출되는 가구에 거주하는 거주자 (19.6%)에서 검출되지 않는 가구의 거주자 (4.8%)보다 특이 IgE 검출률이 높았다.

541명의 호흡기 알레르기 환자를 대상으로 애집개미의 항원성을 조사한 결과, 14.8%의 환자가 애집개미 항원을 이용한 피부단자시험 및 특이 IgE 측정에서 양성반응을 보였다. 애집개미에 감작되어 있고 병력상 애집개미에 의한 천식이 의심되는 환자 10명을 대상으로 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험을 시행한 결과, 9명의 환자가 양성반응을 보여 애집개미 알레르기에 의한 기관지천식을 임상적으로 확인하였다. 한편 애집개미 항원은 일부 환자에서는 전혀 교차반응을 나타내지 않았으나, 일부 환자에서는 마디개미, 바퀴, 집먼지진드기와 교차반응을 보이는 등 다양한 형태의 교차반응을 보였다. IgE immunoblotting 및 2-dimensional PAGE 상 애집개미 주알레르겐은 32 kDa 및 10 kDa로 확인되었으며, 32 kDa 알레르겐은 pI 값이 각각 5.62, 5.17, 5.00, 4.81 였고, 10 kDa은 5.58, 5.28, 5.22, 5.16 였다. 32 kDa 주알레르겐에 대한 N-말단 아미노산 배열을 확인하였으며, 그 결과 32 kDa 알레르겐들은 같은 아미노산 배열을 갖는 동일한 성분으로 마디개미의 chymotrypsin과 65%의 homology를 보였다.

이상의 결과로 애집개미는 도시 가구의 실내에 서식하며 여러 알레르겐 성분을 통하여 호흡기 알레르기 질환을 일으킬 수 있는 흡입성 알레르겐으로 작용함을 최초로 규명하였으며, 주알레르겐을 확인하고 그 특성을 함께 규명하였다. 본 연구 결과를 바탕으로 향후 다양한 분자생물학적 연구를 통한 진단용 시약 및 치료용 약제 개발이 필요할 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 애집개미, 흡입성 알레르겐, 기관지천식, 주알레르겐

애집개미(*Monomorium pharaonis*) 항원의 흡입성 알레르겐으로서의 역할 및 주알레르겐 특성 규명

<지도교수 홍 천 수>

연세대학교 대학원 의과학과

김 철 우

I. 서 론

알레르기 질환은 유전적 요인과 환경적 요인의 상호작용, 즉 유전적 소인이 있는 사람이 주위 환경내의 여러 알레르겐에 노출되어 감작이 되고, 그 결과 면역학적 과민반응이 나타나서 발병한다¹. 알레르겐에 대한 감작은 유전적 소인, 나이, 폭로 시점, 알레르겐 노출량 등 다양한 요인에 복합적으로 영향을 받는다². 알레르겐은 실내·외 환경에 널리 분포되어 있고 생활환경의 변화로 인하여 알레르겐으로서의 중요도가 시대에 따라 변할 수 있다³. 최근 연구 결과 아토피 및 알레르기 질환이 증가한다고 알려져 있으며, 아토피 증가는 환경의 변화에 따른 흡입성 항원에의 노출 증가 등 생활환경의 변화가 중요한 원인으로 작용한다^{4,5}. 즉 주거환경이 다세대 형태를 취하며 밀폐된 실내 공간에서 생활하는 시간이 많아지고, 가습기와 같은 물을 이용하는 시설물의 증가, 외부 환경과의 차단, 실내공기의 환기 감소 등과 같은 환경변화는 개별 알레르겐에 대한 감작 정도에 영향을 미치는 것으로 추정된다⁵. 알레르겐에 대한 노출의 증가는 기존에 존재하던 알레르겐에 대한 단순한 양적 증가뿐만 아니라 생활환경의 변화로 인하여 이전에는 문제가 되지 않았던 물질이 새롭게 항원성을 나타내어 감작을 일으켜 질병을 유발하는 것도 포함된다^{6,7}. 현재 기존에 그 중요성이 확인되지 않은 새로운 알레르겐 등이 다수 밝혀지고 있으며 그러한 알레르겐의 특성에 관한 연구가 많이 진행되고 있다⁷⁻⁹. 새로운 알레르겐을 찾아내는 것은 면역학적 및 분자생물학적 연구를 통하여 재조

합 알레르겐 및 단클론 항체의 대량생산을 가능하게 하여 새로운 진단용 시약 및 치료용 약제를 개발하는데 이용될 수 있으며, 특별한 원인을 알 수 없어 고식적인 대증요법만 시행받고 있는 환자에게 새로운 치료방침을 제공할 수 있기 때문에 알레르기학의 중요한 연구분야이다.

알레르겐은 수 십 개의 항원성분을 가진 단백질 복합체로 구성되어 있다. 항원 구성 성분 중 IgE 항체 반응을 일으키는 부분이 알레르겐이며, immunoblotting 실험에서 이러한 알레르겐 중에 임상적으로 입증된 알레르기 환자의 50% 이상과 반응하는 단백질 띠가 관찰되는 경우 이 부분을 주알레르겐 (major allergen) 이라고 정의한다¹⁰.

최근 애집개미 (*Monomorium pharaonis*; Pharaoh ant)가 흡입성 알레르겐으로 작용하여 기관지천식을 일으킬 수 있다는 사실이 처음으로 보고된 바 있다¹¹. 개미는 곤충강 (Insecta), 벌목 (Hymenoptera), 개미과 (Formicidae)에 속하며 약 1억년 전에 출현하여 현재 9,000여 종이 전세계에 분포하고 있는 것으로 추정되며, 우리나라에는 100여 종이 서식하고 있다^{12,13}. 애집개미는 개미과, 두마디개미아과 (Myrmicinae)에 속하며 1758년 Linnaeus가 처음 분류하여 발표한 종이다¹⁴ (그림 1). 몸의 길이는 1.5-2 mm 이며 황색 또는 적갈색을 띠며 복부 끝 부분만 흑색이다. 열대성 개미로 실외에는 집을 짓지 않고 실내에서 생활하며, 실내의 벽이나 천정 틈새, 가구 속 등 어둡고 따뜻한 곳에 서식하기를 좋아한다. 한 군체는 수천-수십만 마리이며 기름지고 단 것을 좋아하며 곤충도 잡아먹는 육식성이며, 식품을 오염시키거나 사람을 물기도 하여 피해를 준다¹⁵.

애집개미는 깨물 때 개미산을 주입시켜 심한 통증, 발적 및 종창을 초래하며 중독이 심할 때는 두통, 권태, 발열, 경련, 심계항진 등의 증상을 나타내며 유아에서는 이러한 증상이 더 심하게 나타난다¹⁶. 애집개미를 비롯한 개미과 곤충에 쏘여서 나타나는 진신 알레르기반응인 아나락실라시스는 많이 보고되고 있으며 이에 대한 연구는 상당한 진척을 이루었으나^{17,18}, 개미에서 나오는 항원을 흡입하여 호흡기 알레르기 질환이 나타난다는 보고는 현재까지 없는 상태이다. 애집개미는 현재 일부 지역을 제외하고 전 세계적으로 대부분의 가정에서 문제가

되고 있는 종으로 서식빈도가 해마다 증가하고 있는 것으로 보고되고 있으며, 보건학적 문제로 애집개미의 서식을 박멸하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다¹⁹. 그러나 대부분의 연구 결과에 의하면 서식 개체수를 일시적으로 감소시킬 수는 있으나 도시 가구 내에 분포하고 있는 애집개미의 서식을 완전히 없앨 수 있는 방법은 현재까지 없는 상태이다^{19,20}.



그림 1. 애집개미 (*Monomorium pharaonis*; Pharaoh ant)

애집개미의 가구 내 서식이 증가하는 상황에서 애집개미 항원이 흡입성 알레르겐으로 작용한다면 추후 애집개미는 중요한 실내 알레르겐으로 작용할 것이 분명하며 애집개미에 의한 호흡기 알레르기 환자도 계속 증가할 것이다. 그러나 현재까지 애집개미 항원이 흡입성 알레르겐으로 작용한다는 보고는 전혀 없는 상태로서 그에 대한 규명이 꼭 필요한 상태이다.

이에 본 연구에서는 애집개미 항원이 흡입에 의하여 알레르기 반응을 일으킬 수 있는 흡입성 알레르겐으로 작용한다는 가설을 세우고 이를 증명하고자 하였다. 이를 위하여 첫째, 애집개미 항원이 흔히 생활하는 공간, 즉 실내 환경 내에 존재하는 지를 알아보아 흡입에 의한 노출이 가능한 지를 확인하였으며, 둘째 애집개미 항원이 흡입성 알레르겐으로 작용함이 밝혀지면 주알레르겐을 확인하고 특성을 규명

하고자 하였다 (그림 2).

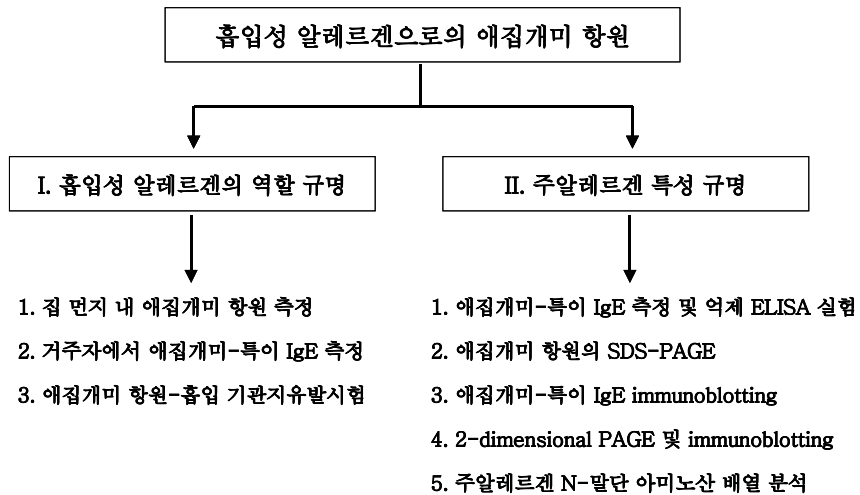


그림 2. 애집개미 항원의 흡입성 알레르겐으로서의 역할 및 주알레르겐 특성 규명 연구 체계

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 애집개미 채집

도시 가구 내에 서식하고 있는 애집개미를 채집하기 위하여 애집개미 알레르기가 의심되는 환자의 가구에서 개미를 채집하였다. 채집된 개미는 전문가 (김병진교수, 원광대, 익산, 전북)에게 의뢰하여 40배 해부 현미경하에서 동정하여 종을 분석하였으며, 애집개미의 성충을 골라내어 -70°C 에 냉동 보관하였다.

나. 애집개미 조항원 제조

냉동 보관된 애집개미 성충을 해동 후, 100% ethyl ether를 g 당 1 mL로 첨가한 후 16시간 증발시켜서 탈지방시키고 1:10 w/v으로 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)과 혼합한 뒤 마쇄기를 이용하여 균질액을 만든 후 4°C 에서 72시간 추출하였다. 추출한 용액을 4°C 에서 10,000 x g로 1시간 동안 원심분리하고 상층액을 모아 삼투막 (pore size 3.5 kD, Spectrum, Huston, TX, USA)에 넣어 72시간 동안 4°C 에서 2차 증류수로 투석을 시행하여 불순물을 제거하였다. 투석 후 추출액을 다시 4°C 에서 10,000 x g로 1시간 동안 원심분리하였고, 그 상층액을 동결 건조하여 조항원 분말을 만든 후 -20°C 에서 냉동 보관하여 항혈청 제조 및 특이 항체 측정 등의 실험에 사용하였다.

2. 생활환경 내에 존재하는 애집개미 단백질 항원 측정 및 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정

가. 대상가구 및 거주자

본 연구의 목적 및 방법에 동의하고 참여를 희망한 서울시내 56가구 및 가구에 실제 거주하는 거주자를 대상으로 하였다. 대상가구를 2001년 4월, 7월, 10월 및 2002년 1월과 같이 3개월 간격으로 계절별로 직접 방문하여 실내 공간에서 먼지를 채집하였으며, 거주자에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 특이 IgE 측정 실험에 이용하였

다. 또한 가구의 실내에 개미가 서식하는 지 알아보고자 끈끈이 트랩을 주방 및 거실에 설치하여 개미가 포획되는 지 확인하였으며 포획된 개미는 종을 분석하였다. 본 연구에 참여한 가구는 연세대의 홍천 수교수가 주관 책임자로 진행한 보건복지부 중점연구과제인 “실내환경오염이 거주자의 건강에 미치는 영향 평가 및 예방모델개발” 연구에 참여한 가구의 일부를 대상으로 하였다.

나. 도시가구 실내 먼지 내 단백질 추출

대상가구를 직접 방문하여 침실의 침구류, 거실 및 주방의 1 m²의 면적에서 2분 동안 진공청소기 (V-582T, LG 전자, 창원, 한국)를 이용하여 실내먼지를 채집하였다. 채집한 실내먼지는 체에 걸러 큰 입자를 제거하였으며, 40 mg의 고운 먼지를 1% BSA-PBST 2 mL에서 24시간 추출 후 10,000 x g 에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 모아 -20℃에서 보관한 후 먼지내에 존재하는 애집개미 단백질 항원 측정 실험에 이용하였다.

다. 토끼 항혈청 제조

White female rabbit에 애집개미 조항원을 Freund's Complete Adjuvant (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 혼합한 후 피하주사 하여 감작하였고, 감작 3주 및 6주 후에 애집개미 조항원을 Freund's Incomplete Adjuvant (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 함께 두 차례 더 면역시켰다. 최종 주사 일주일 후 토끼에서 혈청을 분리하여 -20℃에 보관한 후 항원에 대한 교차반응을 확인하는 억제 ELISA 실험 및 생활 환경 내에 존재하는 애집개미 단백질 항원의 양을 측정하는 억제 ELISA 실험에 이용하였다.

라. 제조한 토끼 항혈청의 항원 특이성 규명

애집개미 조항원을 이용하여 제조한 항혈청의 특이성 및 교차반응 여부를 ELISA 및 억제 ELISA 실험으로 확인하였다. 96 well microplate (Costar, Cambridge, MA, USA) well 당 애집개미 조항원 0.5 µg을 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) 100 µL에 넣은 후 4℃에서

18시간 반응시켰다. PBS-T (137 mM NaCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 27 mM KCl, 0.1% Tween-20, pH 7.4)로 세 번 세척하고 1% BSA-PBS-T 350 μL 씩을 well에 넣어 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 단백 결합을 차단시킨 후, 제조한 항혈청을 여러 비율로 희석한 것을 1차 항체로 well 당 100 μL 씩 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. 세 번 세척한 후 2차 항체인 biotin이 부착된 goat anti-rabbit IgG antibody (Pierce, Rockford, IL, USA)를 1: 1,000으로 희석하여 well 당 100 μL 씩 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 다시 세 번 세척한 후 1,000배 희석된 streptavidin-peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 μL 씩 각 well에 넣은 후 30분 뒤에 PBS-T로 5회 세척하고 ABTS (25 mg 2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid in 50 mM citrate phosphate buffer, 50 μL 30% H_2O_2) 발색용액을 100 μL 씩 넣으며 5분 뒤에 2 mM NaN_3 100 μL 를 넣어 반응을 중단시켰다. 반응이 끝난 후 ELISA reader (Dynatec, Alexandria, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

토끼 항혈청의 특이성 및 교차반응성을 조사하기 위하여 억제 ELISA 실험을 시행하였다. 1차 항체로 토끼 항혈청에 애집개미, 집먼지진드기 및 바퀴 조항원을 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 μg 씩 넣고 실온에서 2시간 반응시킨 후 ELISA를 시행하여 특이성 및 교차반응 여부를 확인하였고, 교차반응이 없는 것을 확인한 후 먼지 내 애집개미 항원 양을 측정하는 억제 ELISA 실험을 실시하였다.

마. 먼지 내 애집개미 항원 측정을 위한 억제 ELISA 실험

생활환경 내의 애집개미 항원 존재 여부를 억제 ELISA 실험을 통하여 측정하였다. Microplate에 well 당 애집개미 조항원 0.1 μg 을 0.1M carbonate buffer (pH 9.6) 100 μL 씩에 넣은 후 재료 및 방법 2-라) 항과 같은 방법으로 실험을 진행하였다. 1차 항체로 2,000배 희석된 토끼 항혈청 100 μL 에 측정하고자 하는 먼지 추출액 100 μL 를 혼합하여 실온에서 2시간 반응시킨 후 사용하였다. 이 후 2-라) 항과 같은 방법으로 실험을 진행시키며 발색용액으로 100 μL 의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-0.01% H_2O_2 (KPL, Gaithersburg, MD,

USA)을 사용하여 증폭시켰고 TMB Stop Solution (KPL, Gaithersburg, MD, USA)으로 발색을 중단한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 애집개미 조항원을 각각 100, 10 및 5 μg 단백/mL, 그리고 이하 두 배씩 6단계 농도까지 희석한 것을 항혈청에 혼합하여 반응을 억제한 것을 1차 항체로 사용하여 표준곡선을 구하였다. 구하여진 표준곡선 중 기울기가 급한 직선에 해당되는 부분만을 선택하여 four-parameter logistic fit를 이용하여 직선으로 변환하여 회귀 방정식을 구하였으며, 이를 기준으로 각각의 먼지 안에 있는 애집개미 단백질 항원의 양을 정량화하였다.

바. 조항원 및 먼지 추출액을 이용한 IgG inhibitory immunoblot

실내 먼지 내 애집개미 단백질 항원을 측정하는 억제 ELISA 실험의 특이성 및 교차반응을 SDS-PAGE 후 토끼 항혈청을 이용한 IgG inhibitory immunoblot으로 확인하였다.

애집개미 조항원을 loading buffer (60 mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 녹이고 끓는 물에 5분간 반응시킨 후, 5% stacking gel 및 13.5% SDS-polyacrylamide gel에서 각각 50 V 및 100 V 전압으로 전기영동 (Small mighty, Hoeffer, San Francisco, CA, USA)을 실시하였다. Gel을 25 V로 60분간 nitrocellulose membrane (NC; pore size 0.45 μm , Amersham, Buckinghamshir, UK)에 전이시키고 4 mm 간격으로 절단한 후, 3% skim milk-TBS-T (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) 용액으로 반응시켜 비특이적 단백질 결합을 차단하였다. 2,000배 희석된 토끼 항혈청 1,900 μL 에 10, 5, 1 및 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 애집개미 조항원, 100 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 집 먼지진드기 조항원, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 독일바퀴 조항원, 그리고 애집개미 조항원이 측정된 먼지와 측정되지 않은 먼지 추출액을 각각 100 μL 씩 넣고 2 시간 동안 실온에서 반응시킨 것을 1차 항체로 사용하여 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 alkaline phosphatase가 결합된 goat anti-rabbit IgG (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1: 1,000으로 희석 후 상온에서 1시간 반응시킨 후, nitroblue tetrazolium

/bromochloro-indolyl phosphate (NBT/BCIP; Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 발색시켰다.

사. 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정

거주자를 대상으로 혈청 내 애집개미-특이 IgE를 ELISA 법으로 측정하였다. 약술하면 microplate well 당 애집개미 조항원 0.5 μg 을 0.1M carbonate buffer (pH 9.6) 50 μL 와 같이 넣어 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 세 번 세척하고 1% BSA-PBS-T로 비특이적인 단백질을 결합을 차단시킨 후, 1차 항체로 거주자의 혈청을 well 당 50 μL 씩 가한 후 상온에서 1시간 반응시켰다. PBS-T로 세 번 세척한 후 biotin이 부착된 polyclonal anti-human IgE (Vector, Burlingame, CA, USA)를 1: 500 으로 희석하여 well 당 50 μL 씩 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 세 번 세척한 후 500 배 희석된 streptavidin-peroxidase 100 μL 씩을 각 well에 넣은 후 30분 뒤에 PBS-T로 5회 세척하고 ABTS 발색용액을 100 μL 씩 넣으며 5분 뒤에 2mM NaN_3 100 μL 를 넣어 반응을 중단시켰다. 반응이 끝난 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아. 통계분석

정립한 먼지내에 있는 애집개미 단백질 함량 측정법의 재현성 (reproducibility)을 logit 변환 후 얻은 회귀식의 기울기에 차이가 있는지를 공분산분석 (analysis of covariance, ANCOVA)을 통하여 확인하였다. 먼지에서 측정된 애집개미 항원의 양은 먼지 1 g 당 포함된 항원으로 환산하였으며, 통계분석을 하기 위하여 애집개미 항원이 측정되지 않는 경우 측정값을 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ dust로 표시하였다. 실내에 설치한 트랩의 개미 포획에 따른 먼지 내 애집개미 단백질 함량의 측정 여부는 카이 제곱 검정을 이용하였으며, 실내 먼지 내 애집개미 단백질 함량 양의 계절별 변동은 Wilcoxon Signed Ranks Test를, 그리고 실내 개미 포획여부에 따른 단백질 함량은 Mann-Whitney U Test를 이용하여 비교 분석하였다. 통계는 SAS 8.1 프로그램을 이용하였으며, p 값이 0.05 이하인 경우 의미 있는 것으로 해석하였다.

3. 애집개미 알레르겐의 특성 규명

가. 대상환자

재료 및 방법 1-나) 항의 방법으로 제조한 동결건조 조항원을 Coca 용액 (0.9% NaCl, 0.25% NaHCO₃, 0.4% phenol)에 희석한 후 동량의 멸균소독된 glycerine과 혼합하여 피부시험용 시약을 제조하여 알레르기 피부단자시험에 사용하였다 (최종 단백질농도 100 µg/mL 였으며, 이는 1:100 w/v에 해당). 2001년 1월부터 2002년 5월 31일 사이에 연세대학교 세브란스병원 알레르기 클리닉에 내원하여 기관지천식 또는 알레르기 비염으로 진단된 환자를 대상으로 애집개미 및 50종의 혼합 흡입성 알레르겐을 이용하여 알레르기 피부단자시험을 시행하였다. 피부단자시험은 양성 대조액으로 사용한 히스타민에 의한 팽진의 크기와 비교하여 2+ 이상을 양성으로 판정하였다. 피부단자시험에서 애집개미에 강양성 반응을 보이고 병력상 애집개미에 의한 천식이 의심되는 환자를 대상으로 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험을 시행하였다.

나. 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험

애집개미 항원-흡입 기관지유발시험은 이전에 보고한 방법²¹을 일부 변형하여 시행하였다. 즉 일정 농도의 애집개미 항원액을 낮은 농도부터 2분간 Bronchoscreen (Jaeger, Würzburg, Germany)을 통해 일호흡 용적 (tidal volume)으로 흡입시켰으며 FEV₁이 기저치보다 20% 이상 감소하는 것을 양성으로 규정하였다. 처음 흡입하는 애집개미 항원은 피부단자시험에 사용한 애집개미 항원을 1,000 배 희석한 농도 (피부단자시험 시약이 1:100 w/v에 해당하므로, 이는 1:100,000 w/v에 해당하는 농도임)로 하였으며, 여기에 반응이 없는 경우 100 배 및 10 배 희석액을 사용하였다. 따라서 항원 유발시험은 1:100,000 w/v 항원 희석액을 일호흡용적으로 2분간 흡입하고 10분 후 폐기능 검사를 시행하였으며, FEV₁의 감소가 없을 때는 1:10,000 w/v 희석액을 흡입 후 10분에 폐기능 검사를 시행하고 FEV₁의 감소가 없는 경우 마지막으로 1:1,000 w/v 희석액을 흡입하고 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 5시간, 6시간 및 7시간 후에 폐기능을 측정하였다.

다. ELISA법에 의한 애집개미-특이 IgE 측정 및 억제 ELISA 실험

환자 혈청 내 애집개미에 대한 특이 IgE 항체는 앞서 기술한 ELISA 법으로 측정하였다. 1차 항체로는 대상 환자의 혈청을 사용하였으며 2차 항체로는 biotin이 부착된 anti-human IgE antibody를 1:500으로 희석하여 사용하였다. 또한 조항원의 특이성 및 항원성을 조사하기 위하여 애집개미 ELISA에 강양성 반응을 보인 혈청을 이용하여 억제 ELISA 실험을 시행하였다.

라. 애집개미 항원의 SDS-PAGE 및 특이 IgE immunoblotting

조항원을 loading buffer에 녹인 후 끓는 물에 5분간 반응시켰다. 5%/13.5% SDS-polyacrylamide gel에 50 V/100 V으로 전기영동을 실시하여 단백질 항원을 분석하였다. Gel을 25 V로 60분간 NC membrane에 전이시키고 4 mm 간격으로 절단하여 IgE blotting에 사용하였다. IgE blotting을 위해서 membrane을 3% skim milk-TBS-T 용액으로 반응시켜 비특이적 단백질 결합을 차단한 후 PBS에 1:4로 희석한 환자 혈청을 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 alkaline phosphatase가 결합된 goat anti-human IgE (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1: 2,000으로 희석 후 상온에서 1시간 반응시킨 후, NBT/BCIP를 이용하여 발색시켰다.

마. 애집개미 조항원에 대한 2-dimensional PAGE 및 immunoblotting

애집개미 조항원 4 mg을 isoelectric focusing sample buffer (20 mM arginine, 20 mM lysine, 15% glycerol) 1 mL에 녹인 후 이를 pH 범위가 10-3인 isoelectric focusing gel (Novex, San Diego, CA, USA)을 이용하여 100 V에서 60분, 200 V에서 60분 그리고 500 V에서 30분간 전기영동을 실시하였다. 그 후 equilibrium buffer (5% 2-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 및 2.3% SDS)에 30분간 평형화시키고 이를 1.5 mm 두께의 4%/16% 2-dimension SDS-PAGE gel에 삽입한 후 재료 및 방법 3-다) 항과 같은 방법으

로 SDS-PAGE를 실시하였다. 2-dimension SDS-PAGE 한 gel을 membrane으로 전이시킨 후 환자의 혈청과 반응시켰다. 이후 alkaline phosphatase가 결합된 goat anti-human IgE으로 반응시킨 후 Western blue (Promega, Madison, WI, USA) 발색 용액에서 반응시켜 결합부위를 확인하였다.

바. 주알레르겐 N-말단 아미노산 배열 분석

2-dimensional PAGE 후 gel을 60분 동안 PVDF membrane (pore size 0.45 μ m, MSI, Westboro, MA, USA)에 전이시켰다. 그 후 이를 Coomassie-blue 염색을 실시하고 50% methanol 용액에서 탈염색을 시행한 후 공기 중에 말렸다. 이 후 주알레르겐에 해당하는 부위를 절단하고 이를 아미노산 배열결정기 (Procise 491 Protein Sequencing System, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)를 이용하여 N 말단 아미노산 배열을 분석하였다. 아미노산 배열을 확인 후 이를 National Center for Biological Information의 database를 이용하여 기존의 다른 알려진 물질과 상동성 (homology)이 있는지 확인하였다.

III. 결 과

1. 생활환경 내에 존재하는 애집개미 단백질 항원 측정 및 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정

가. 제조한 토끼 항혈청의 항원 특이성 규명

억제 ELISA 실험을 통하여 제조한 토끼 항혈청의 특이성 및 교차 반응성을 확인한 결과, 토끼 항혈청은 애집개미 항원에는 용량-의존적으로 억제되었으나 집먼지진드기 또는 바퀴 항원에는 전혀 억제되지 않아 애집개미 항원 특이성이 있는 것을 확인하였다 (그림 3).

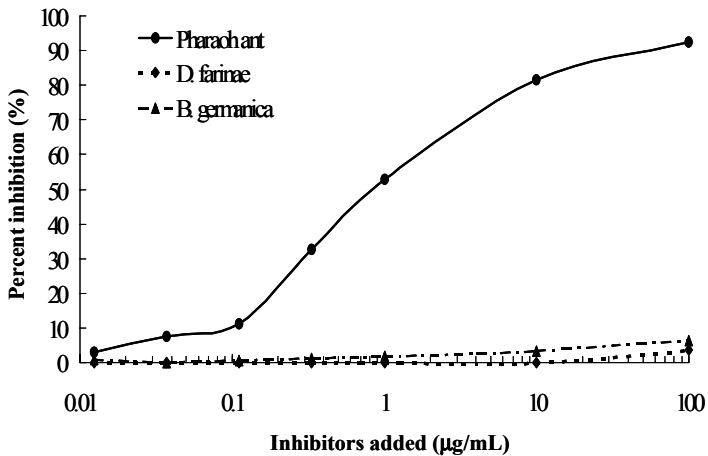


그림 3. 애집개미 조항원으로 감작시켜 제조한 토끼 항혈청을 이용한 억제 ELISA 실험 결과. White female rabbit에 애집개미 (Pharaoh ant) 조항원을 피하주사 하여 제조한 토끼 항혈청은 애집개미 항원에는 용량-의존적으로 억제되었으나, 다른 중요한 실내 알레르겐인 집먼지진드기 (*D. farinae*) 또는 독일 바퀴 (*B. germanica*) 항원에는 전혀 억제되지 않아 애집개미 항원에만 특이적인 반응을 보이는 것을 확인하였다.

나. 먼지 내 애집개미 단백질 항원 측정을 위한 억제 ELISA 실험

토끼 항혈청을 여러 농도의 애집개미 조항원으로 반응시킨 후 억제 ELISA 실험을 시행하여 표준곡선을 구하였다. 표준곡선을

four-parameter logistic fit를 이용하여 직선으로 변환하여 회귀 방정식을 구하였으며, 회귀식의 기울기에 차이가 있는지를 공분산분석을 한 결과 회귀식간에는 기울기의 차이가 없어 억제 ELISA 실험은 재현성이 있는 유용한 방법임을 확인하였다 (그림 4).

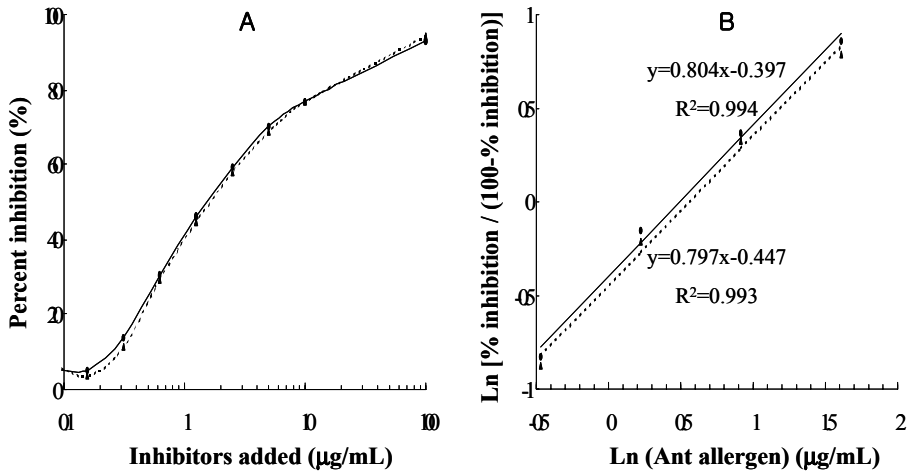


그림 4. 먼지 내 애집개미 항원을 측정하기 위한 억제 ELISA 실험의 표준곡선. 표준곡선(A)을 logit 변환 후 얻은 회귀식(B)의 기울기에 차이가 있는지를 공분산분석을 한 결과 회귀식간에는 기울기의 차이가 없어 억제 ELISA 실험은 유용한 방법임을 확인하였다.

다. 대상가구 실내 먼지에서 애집개미 단백질 항원의 측정

서울시내 56 가구를 2001년 4월, 7월, 10월 및 2002년 1월에 방문하여 먼지를 채집하였고 실내에 끈끈이 트랩을 설치하였다. 대상가구 중 10 (17.9%) 가구에서 실내에 설치한 트랩에서 두 번 이상 개미가 포획되었으며, 포획된 개미는 전부 애집개미였다. 먼지는 거실 56 가구, 주방 45 가구 및 침실 56 가구에서 채집하여 계절별로 총 157개의 먼지를 채집하였다. 억제 ELISA 실험으로 먼지 추출물 내에 애집개미 단백질 항원이 있는 지 정량한 결과, 총 628개의 먼지 중 67개 (10.7%) 먼지에서 애집개미 항원이 측정되었다. 또한 전체 56 가구 중

20 가구에서 한 차례 이상 실내 먼지에서 애집개미 항원이 검출되어, 서울지역 35.7%의 가구 실내에 애집개미 항원이 존재하는 것으로 나타났다. 수거한 먼지에서 애집개미 항원의 검출률을 계절별로 보면 4월 4.5% (7/157), 7월 7.0% (11/157), 10월 15.9% (25/157) 및 1월 15.3% (24/157)로 가을 및 겨울철에 애집개미 항원 검출률이 높은 경향을 보였다 (그림 5).

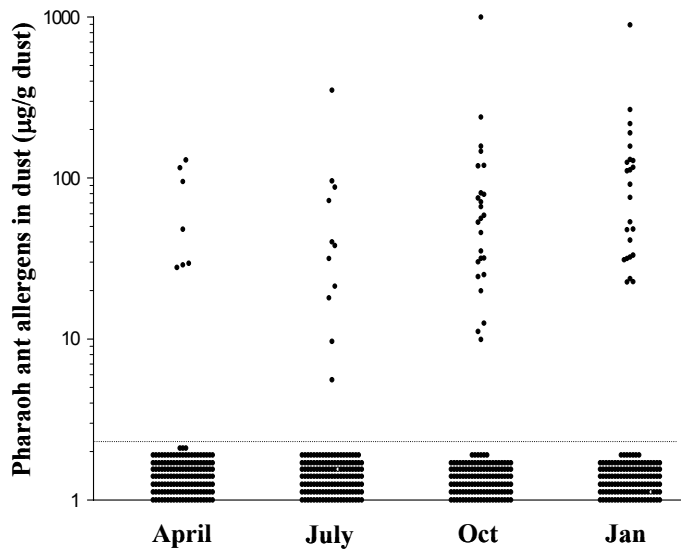


그림 5. 대상가구 먼지내에 있는 애집개미 항원 측정 결과. 애집개미 단백질 항원은 4월 4.5%, 7월 7.0%, 10월 15.9% 및 1월 15.3%로 검출되어 가을 및 겨울철에 높은 검출양상을 보였다.

(1) 대상가구 거실 먼지 내 애집개미 단백질 항원 측정

56 가구 중 18 가구 (32.1%)의 거실 먼지에서 애집개미 항원이 한번 이상 측정되었다. 설치한 끈끈이 트랩에 개미가 잡힌 10 가구 중 7 가구 (70%)의 거실 먼지에서 애집개미 항원이 측정된 반면 개미가 잡히지 않은 46 가구 중에서는 11 가구 (23.9%)에서만 애집개미 항원이 측정되어, 실내에 개미가 서식하는 경우 먼지 내 애집개미 항원의 검출률이 유의 있게 높았다 ($p < 0.05$, 표 1).

표 1. 개미 포획여부에 따른 거실에서의 애집개미 항원 검출 양상

		거실 먼지 내 애집개미 항원 검출	
		(+)	(-)
애집개미 포획	(+)	7	3
	(-)	11	35

거실 먼지에서 애집개미 항원의 검출을 계절별로 살펴보면 봄 3 가구 (5.4%), 여름 6 가구 (10.7%), 가을 10 가구 (17.9%) 및 겨울 10 가구 (17.9%)에서 애집개미 항원이 측정되어 가을과 겨울철에 비교적 높은 검출률을 보였다. 또한 거실 먼지에서 애집개미 항원이 검출된 가구만을 대상으로 비교해 보면 봄과 여름에 비하여 가을 및 겨울철에 실내 먼지에서 검출되는 애집개미 항원이 유의 있게 높아 항원의 계절별 변동 양상을 확인할 수 있었다. 즉 봄 (median and percentiles: 0.1; 0.1 to 0.1 $\mu\text{g/g}$ dust), 여름 (median and percentiles: 0.1; 0.1 to 21.4 $\mu\text{g/g}$ dust)에 비하여 가을 (median and percentiles: 28.0; 0.1 to 72.0 $\mu\text{g/g}$ dust) 및 겨울 (median and percentiles: 32.7; 0.1 to 112.0 $\mu\text{g/g}$ dust)에 거실 먼지내에 있는 애집개미 항원 양이 유의 있게 높았다 (그림 6, $p < 0.05$).

한편 거실 먼지에서 애집개미 항원이 검출된 가구에서 실내에서의 개미 포획 여부에 따른 항원양을 비교해보면 여름에는 개미가 포획된 가구에서 항원량이 의미 있게 높았으나 봄, 가을 및 겨울에는 개미가 포획되지 않은 가구에서도 거실 먼지에서 애집개미 항원이 검출되어 눈으로 보이는 실내의 개미 서식이 없더라도 애집개미 항원에 노출될 수 있는 소견을 보였다 (그림 7).

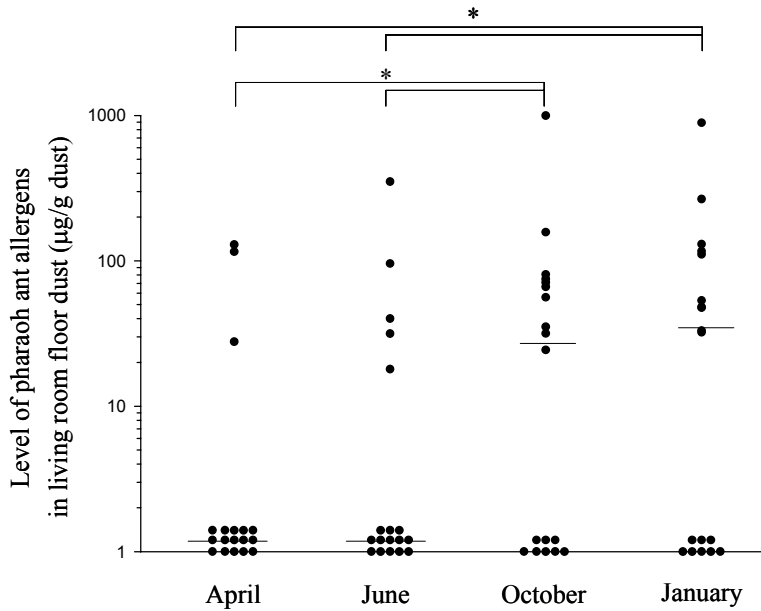


그림 6. 대상가구 거실 먼지에서 측정된 애집개미 단백질 항원의 계절별 변동 양상. 애집개미 항원이 검출된 가구를 대상으로 비교해 보면 봄과 여름에 비하여 가을 및 겨울철에 실내 먼지에서 검출되는 애집개미 항원이 유의 있게 높은 계절별 변동 양상을 확인할 수 있었다. *: $p < 0.05$

(2) 대상가구 주방 먼지 내 애집개미 단백질 항원 측정

56 가구 중 45 가구의 주방에서 실내 먼지를 채집하였으며, 그 중 13 가구 (28.9%) 먼지에서 애집개미 항원이 측정되었다. 특히 트랩에 개미가 잡힌 9 가구 중 7 가구 (77.8%)의 주방 먼지에서 애집개미 항원이 측정되어 개미가 잡히지 않은 가구의 16.7%에 비하여 애집개미 항원이 유의 있게 높게 검출되었다 (표 2, $p < 0.05$).

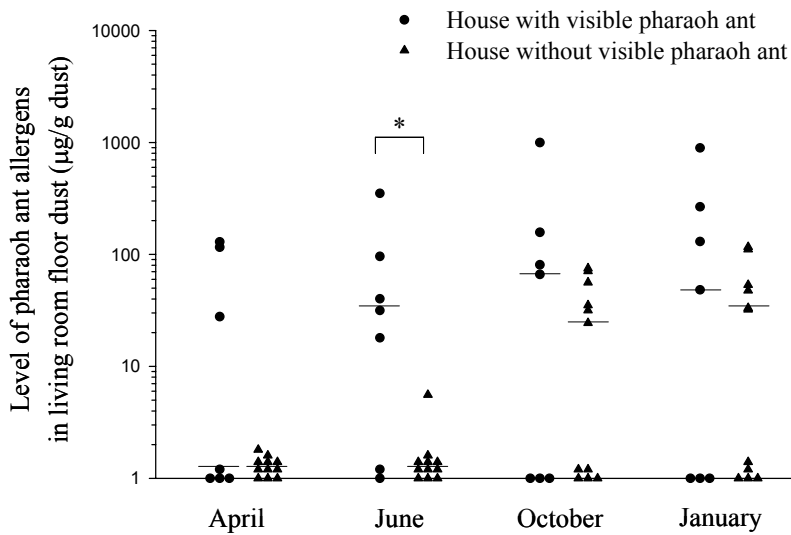


그림 7. 거실 먼지에서 애집개미 항원이 검출된 가구에서 실내에서 개미 포획 여부에 따른 항원량의 계절별 비교. 봄, 가을 및 겨울에는 개미가 포획되지 않은 가구에서도 거실 먼지에서 애집개미 항원이 검출되어 눈으로 보이는 실내의 개미가 없더라도 애집개미 항원에 노출될 수 있는 소견을 보였다. *: $p < 0.05$

표 2. 개미 포획여부에 따른 주방에서의 애집개미 항원 검출 양상

		주방 먼지 내 애집개미 항원 검출	
		(+)	(-)
애집개미 포획	(+)	7	2
	(-)	6	30

계절별로 주방 먼지에서 애집개미 항원의 검출 정도를 살펴보면 봄 3 가구 (6.7%), 여름 4 가구 (8.9%), 가을 9 가구 (20.0%) 및 겨울 10 가구 (22.2%)에서 애집개미 항원이 측정되어 거실과 유사하게 가

을과 겨울철에 비교적 높게 애집개미 항원이 검출되었다. 또한 주방 먼지에서 애집개미 항원이 검출된 가구만을 대상으로 살펴보면 봄 (median and percentiles: 0.1; 0.1 to 14.5 $\mu\text{g/g}$ dust)과 여름 (median and percentiles: 0.1; 0.1 to 29.6 $\mu\text{g/g}$ dust)에 비하여 가을 (median and percentiles: 25.1; 0.1 to 86.2 $\mu\text{g/g}$ dust) 및 겨울 (median and percentiles: 41.1; 11.4 to 142.6 $\mu\text{g/g}$ dust)에 측정되는 애집개미 항원이 의의 있게 높아 거실과 유사한 계절별 변동을 보였다 (그림 8, $p < 0.05$). 한편 실내에서 개미 포획 여부에 따른 항원양을 비교해보면 개미가 포획된 가구의 주방먼지 내에 있는 애집개미 항원량이 높은 경향을 보였으나 대상가구 수가 적어 통계적인 의의성은 확인할 수 없었다.

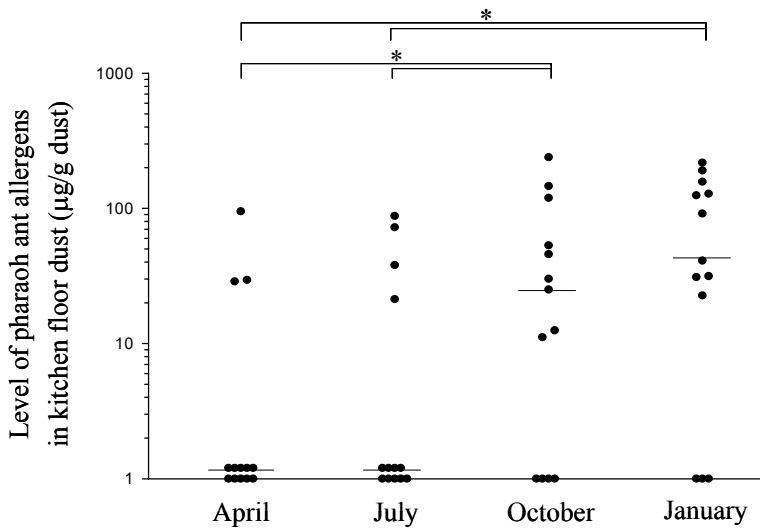


그림 8. 대상가구 주방 먼지에서 측정된 애집개미 단백질 항원의 계절별 변동 양상. 애집개미 항원이 검출된 가구를 대상으로 비교해 보면 봄과 여름에 비하여 가을 및 겨울철에 실내 먼지에서 검출되는 애집개미 항원이 의의 있게 높은 계절별 변동 양상을 확인할 수 있었다.

*: $p < 0.05$

(3) 대상가구 침실 먼지 내 애집개미 단백질 항원 측정

56 가구 중 6 가구 (10.7%)의 침실 침구류 먼지에서 애집개미 항원이 측정되었다. 그 중 4 가구는 트랩에 개미가 잡힌 가구였으며, 2 가구는 개미가 잡히지 않은 가구로 개미가 잡힌 가구의 침구류 먼지에서 애집개미 항원의 검출률 (40.0%)이 개미가 잡히지 않은 가구에서 (4.3%)보다 유의 있게 높았다 (표 3).

계절별로 침실먼지에서 애집개미 항원의 검출 정도를 살펴보면 봄 1 가구 (1.8%), 여름 1 가구 (1.8%), 가을 6 가구 (10.7%) 및 겨울 4 가구 (7.1%)에서 애집개미 항원이 측정되어 역시 가을과 겨울철에 비교적 높게 애집개미 항원이 검출되었다. 그러나 침실에서 측정되는 애집개미 항원의 양은 거실과 주방에 비하여 상대적으로 낮고, 대상수가 적어 거실과 주방 먼지에서 관찰된 계절별 애집개미 알레르겐의 변동 양상은 관찰되지 않았다.

표 3. 개미 포획여부에 따른 침구류 먼지에서 애집개미 항원 검출

		거실 먼지 내 애집개미 항원 검출	
		(+)	(-)
애집개미 포획	(+)	4	6
	(-)	2	44

라. 애집개미 조항원 및 애집개미 항원이 측정된 먼지를 이용한 IgG inhibitory immunoblot

애집개미 조항원 및 실내먼지에서 애집개미 항원이 측정된 먼지 추출물을 이용하여 토끼 항혈청에 대한 IgG inhibitory immunoblot을 시행한 결과 애집개미 조항원에는 용량-의존적으로 단백질 결합이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 애집개미 항원이 측정된 먼지추출물에 의해서도 IgG 결합이 억제되었다. 그러나 애집개미 항원이 측정되

지 않은 먼지 추출물, 그리고 혼한 실내 알레르겐인 집먼지진드기 및 바퀴 항원에는 IgG 결합이 억제되지 않아 애집개미 항원 측정을 위한 억제 ELISA 실험이 특이적이었음을 확인할 수 있었다 (그림 9).

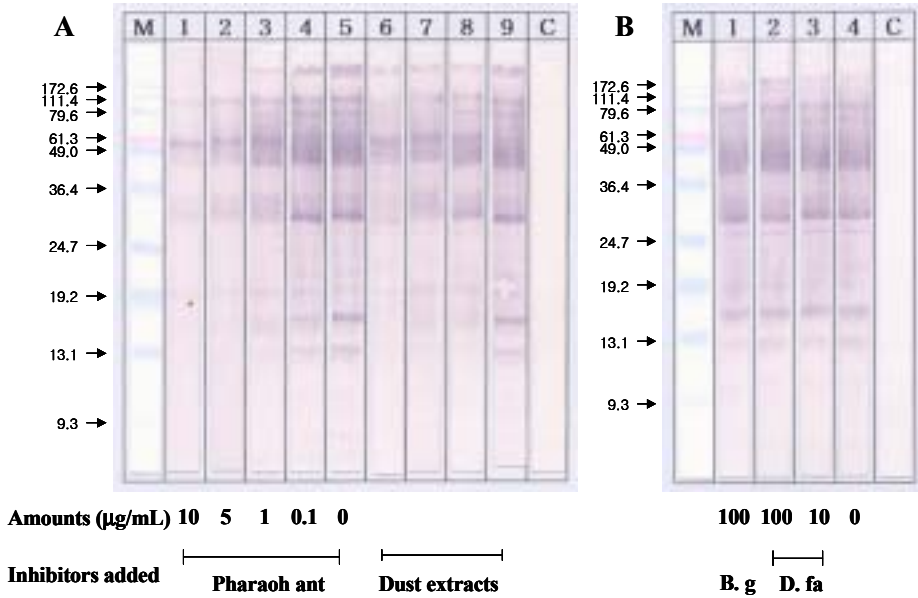


그림 9. 애집개미 조항원 및 애집개미 항원이 측정된 먼지 추출물을 이용한 IgG inhibitory immunoblot. 2,000배 희석된 토끼 항혈청에 10, 5, 1 및 0.1 µg/mL 농도의 애집개미 (*Pharaoh ant*) 조항원 (그림 9-A, lane 1-4) 및 애집개미 조항원이 측정된 먼지 (그림 9-A, lane 6-8)와 측정되지 않은 먼지 (그림 9-A, lane 9) 추출물, 그리고 100 및 10 µg/mL 농도의 집먼지진드기 (*D. fa*) 조항원 (그림 9-B, lane 2,3), 100 µg/mL의 독일바퀴 (*B. g*) 조항원 (그림 9-B, lane 1)을 각각 넣고 2 시간 동안 반응시킨 것을 1차 항체로 사용하여 inhibitory immunoblot을 시행함. Inhibition을 하지 않은 대조군은 그림 9-A의 lane 5 및 그림 9-B의 lane 4임. 애집개미 조항원에는 용량-의존적으로 단백 결합이 억제되었으며, 애집개미 항원이 측정된 먼지 추출물에 의해서도 IgG 결합이 억제되었다. 그러나 집먼지진드기 및 독일 바퀴 항원에는 IgG 결합이 억제되지 않아 애집개미 항원 측정을 위한 억제 ELISA 실험의 특이성을 확인할 수 있었다.

마. 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정

56 가구에 실제 거주하는 거주자 113명을 대상으로 혈청 내 특이

IgE 항체를 ELISA 법으로 측정하였다. 대상 거주자는 남자 50명, 여자 63명이었으며 평균연령은 37.0 ± 19.8 세 (최저 5세, 최대 65세)였다. 특이 IgE 측정 결과, 13명 (11.5%)의 거주자에서 애집개미 특이 IgE가 측정되었다 (그림 10). 애집개미 특이 IgE가 측정된 13명 중 10명은 실내 먼지에서 애집개미 항원이 측정된 가구에 거주하는 거주자였으며, 실내 먼지에서 애집개미 항원이 측정되지 않은 가구에 거주하는 3명에서도 애집개미 특이 IgE가 측정되었다. 또한 실내 먼지에서 애집개미 항원이 검출된 가구에 거주하는 거주자 51명 중 10명 (19.6%)에서 애집개미 특이 IgE가 측정된 반면, 실내에서 애집개미 항원이 측정되지 않은 가구에 거주하는 62명중에서는 3명 (4.8%)만이 특이 IgE가 측정되었다.

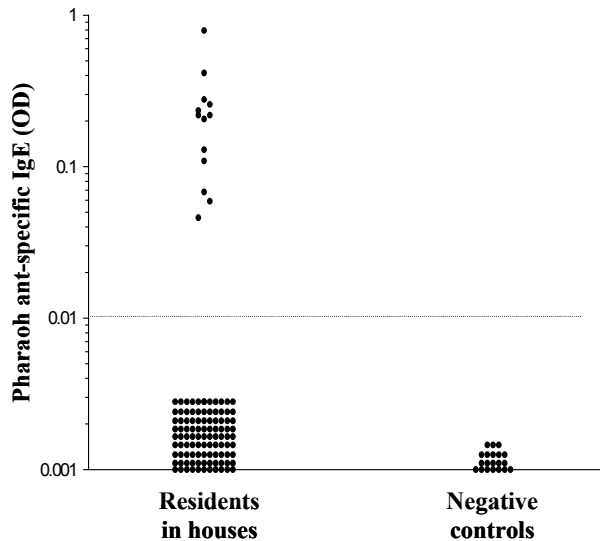


그림 10. 거주자에서 애집개미-특이 IgE 측정. 대상가구에 거주하는 113명 중 11.5%의 거주자에서 애집개미 특이 IgE가 측정되었으며, 10명은 실내 먼지에서 애집개미 항원이 측정된 가구에 거주하는 거주자이였으나, 애집개미 항원이 측정되지 않은 가구에 거주하는 3명에서도 애집개미 특이 IgE가 측정되었다.

2. 애집개미 알레르겐의 특성 규명

가. 대상환자의 특성 및 ELISA법에 의한 애집개미-특이 IgE 측정

2001년 1월부터 2002년 5월 31일 사이에 연세대학교 세브란스병원 알레르기 클리닉에 내원하여 기관지천식 또는 알레르기 비염으로 진단된 541명의 환자를 대상으로 하였다. 대상환자는 기관지천식 221명 (40.9%), 알레르기 비염 149명 (27.5%) 그리고 기관지천식과 알레르기 비염이 동반된 환자 171명 (31.6%) 이었다. 남자 263명 (48.6%), 여자 278명 (51.4%) 였으며 평균 연령은 37.9 ± 15.1 세였다. 541명 중 107명 (19.8%)이 피부단자시험에서 애집개미에 양성 반응을 보였고 그 중 80명 (전체 대상의 14.8%)에서 ELISA로 측정한 애집개미-특이 IgE가 양성반응을 보였다 (그림 11 및 12).

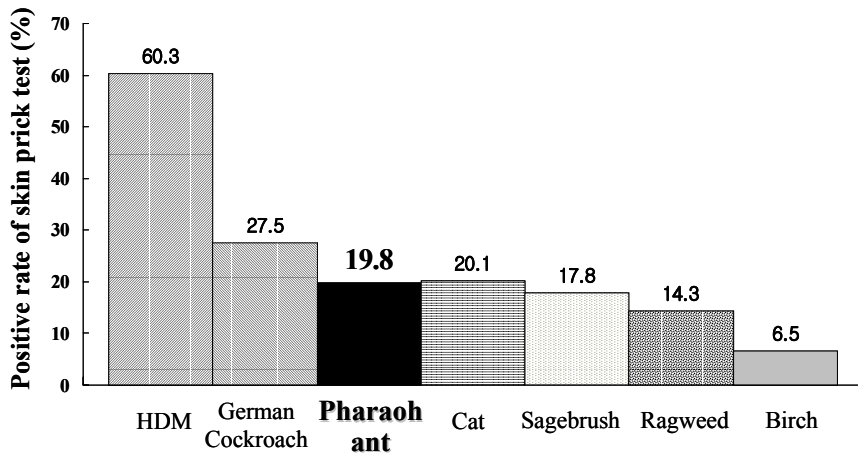


그림 11. 호흡기 알레르기 환자를 대상으로 시행한 알레르기 피부단자시험 양성률. 집먼지진드기 (HDM) 알레르겐에 대한 감작률이 가장 높았으며, 541명 중 19.8%의 환자가 애집개미에 양성 반응을 보였다

나. 애집개미-특이 IgE에 대한 억제 ELISA 실험

애집개미 조항원의 특이성 및 특이 항체의 교차반응을 조사하기 위하여 애집개미 ELISA에 강양성 반응을 보인 혈청을 이용하여 억제

ELISA 실험을 시행하였다. 그 결과 일부 혈청은 집먼지진드기 및 바퀴항원뿐만 아니라 왕침개미 또는 마디개미 (imported fire ant; *Solenopsis* species)와 같은 다른 개미 항원에 의하여서도 전혀 억제되지 않았으며, 일부는 마디개미에만 교차반응을 보였다. 또한 다른 일부 혈청은 마디개미뿐만 아니라 바퀴 및 집먼지진드기 항원에 의하여서도 억제되는 등 다양한 형태의 억제 소견을 보였다 (그림 13).

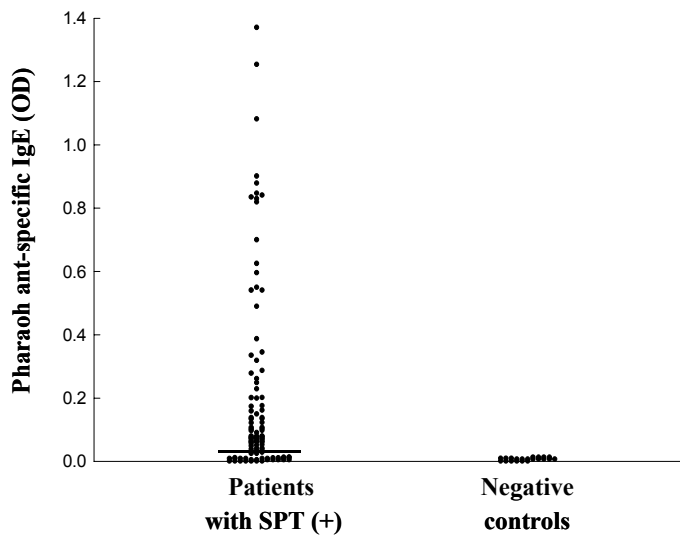


그림 12. 호흡기 알레르기 환자에서 애집개미-특이 IgE 측정 결과. 피부단자시험에서 애집개미에 양성반응을 보인 107명 중 80명 (전체 대상의 14.8%)에서 애집개미 특이 IgE가 측정되었다.

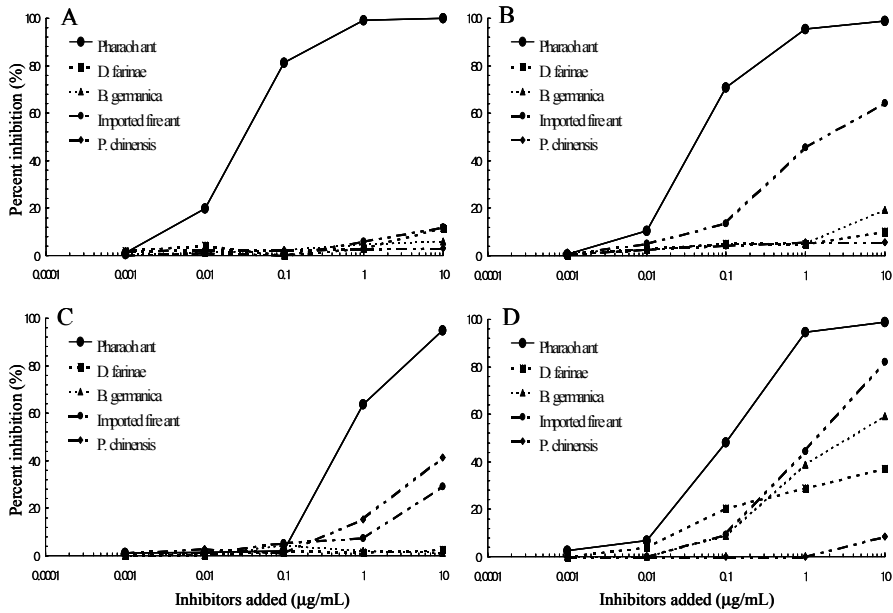


그림 13. 애집개미-특이 IgE에 대한 억제 ELISA 실험. 일부 혈청은 집먼지진드기 (*D. farinae*), 독일 바퀴 (*B. germanica*), 왕침개미 (*P. chinensis*) 및 마디개미 (imported fire ant) 항원에 전혀 억제되지 않고 애집개미 항원에만 억제되었으며 (A), 일부는 애집개미와 함께 마디개미에만 억제되는 소견을 보였다 (B). 다른 일부 혈청은 왕침개미 및 마디개미에 약하게 억제되었으며 (C), 또 다른 일부는 개미류와 함께 바퀴 및 집먼지진드기 항원에 의해서도 억제되는 (D) 등 다양한 형태의 억제 소견을 보였다.

다. 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험 및 증례

10명의 환자를 대상으로 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험을 시행하였고, 그 중 9명의 환자가 양성반응(조기 천식반응 4명 및 이중 천식반응 5명)을 보여 애집개미 항원 흡입에 의하여 천식이 나타남을 임상적으로 확인하였다 (표 4).

애집개미 항원-흡입 기관지유발시험에서 양성반응을 보인 환자의 자세한 임상 소견을 1명의 예 (표4의 No. 2 환자)를 들어 기술하면 다음과 같다.

58세 여자가 3년 간 지속된 기침 및 호흡곤란을 주소로 내원하였

다. 단순 폐기능 검사는 정상이었으나 메타콜린 천식유발시험에서 PC20-M이 10.0 mg/mL로 양성반응을 보여 기관지과민성이 있었고 유도객담검사 상 객담 내 호산구 비율이 52%로 기관지천식에 합당한 소견을 보였다. 알레르기 피부단자시험 상 애집개미 9x3/43x18, 마디개미 4x4/20x17, 집먼지진드기 (*D. farinae*) 2x2/10x10, 히스타민 5x3.5/27x17로 애집개미에 양성 반응을 보였으며, ELISA로 측정된 애집개미-특이 IgE 흡광도는 0.835 였다. 환자의 가구 실내에 애집개미가 서식함을 확인하였고, 개미 서식이 많을 때 천식 증상이 악화되는 소견을 보여 애집개미 알레르기에 의한 기관지천식이 의심되어 환자의 집에서 애집개미를 채집하여 항원 추출과정을 거친 후 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험을 시행하였다. 1:100,000 w/v 농도의 애집개미 항원을 2분간 흡입한 30분 후 FEV₁이 28% 감소하였으며, 흡입 6시간 후에는 FEV₁이 47% 감소하는 이중 천식 반응을 보였으며, 항원 흡입 7시간 후에도 폐기능 저하가 지속되고 호흡곤란이 심해 기관지확장제를 흡입한 후 회복되었다 (그림 14). 반면 집먼지진드기 항원-흡입 기관지유발시험에서는 1:1,000 w/v의 항원을 흡입하였음에도 특이 소견이 관찰되지 않았다. 환자는 애집개미에 의한 기관지천식으로 확진되었으며 약물치료와 함께 애집개미에 대한 환경관리 후 집안의 개미 서식이 없어졌으며, 아울러 천식 증상도 없어졌다. 항원-흡입 기관지유발시험 1년 후 시행한 메타콜린 천식유발시험에서 음성반응을 보여 기관지과민성도 없어진 상태로 현재 추적, 관찰 중이다.

표 4. 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험에서 양성반응을 보인 9예의 임상 특성

No	Sex	Age (years)	Dx ¹	PC20-M ² (mg/mL)	Pharaoh ant			Skin reactivity to other allergen
					SPT ³	sIgE ⁴	Challenge	
1	F	46	BA ⁵	12.2	4+	0.901	Early ⁷	IFA ⁹ 3+
2	F	58	BA	10.0	3+	0.835	Dual ⁸	IFA, HDM ¹⁰ 2+
3	F	49	BA	0.59	4+	0.374	Early	All (-)
4	F	40	BA/AR ⁶	0.59	4+	0.569	Dual	Dog 3+, Cat 2+
5	M	18	BA/AR	1.79	4+	0.879	Dual	IFA, Cockroach 3+
6	F	35	BA	0.08	3+	0.445	Early	Birch 4+
7	F	17	BA/AR	0.09	4+	0.471	Dual	All (-)
8	M	22	BA	0.63	4+	0.207	Early	Cockroach 3+
9	M	20	BA/AR	1.72	4+	0.198	Dual	HDM 2+

¹ Dx: diagnosis

² PC20-M: provocative concentration of methacholine responsible for 20% decrement of FEV₁

³ SPT: skin prick test, Results were graded by A/H ratio

⁴ sIgE: Pharaoh ant-specific IgE, Level of IgE was described as ELISA OD

⁵ BA: bronchial asthma

⁶ AR: allergic rhinitis

⁷ Early: early asthmatic response

⁸ Dual: dual asthmatic response

⁹ IFA: imported fire ant

¹⁰ HDM: house dust mite

라. 애집개미 항원의 SDS-PAGE 및 특이 IgE immunoblotting

조항원을 전기영동하여 단백 항원을 분석한 결과, 100 kDa 에서부터 6 kDa 사이에 약 30개 정도의 단백 분획을 확인할 수 있었다 (그림 15).

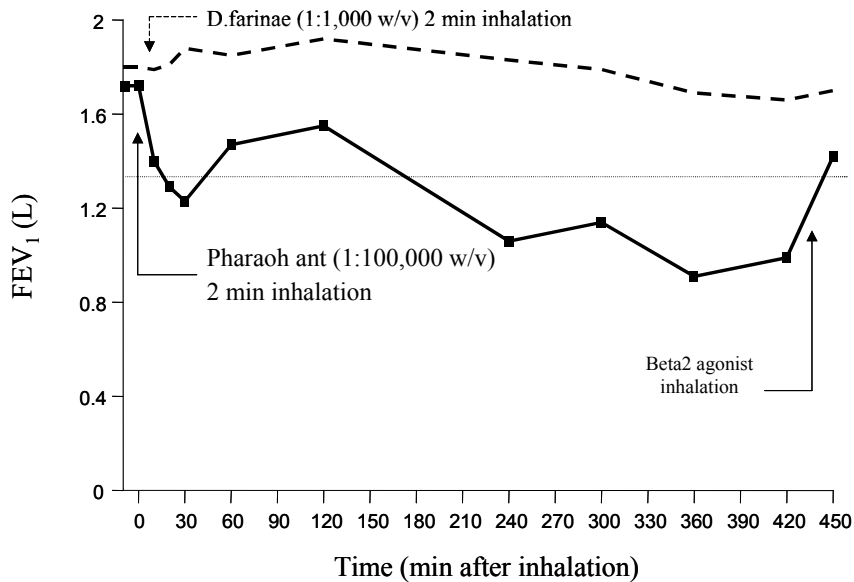


그림 14. 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험 예. 피부단자시험 및 혈청 특이 IgE 검사에서 애집개미 (pharaoh ant)에 양성인 환자로 애집개미 항원 흡입 후 이증 천식 반응을 보여, 애집개미에 의한 천식으로 확진되었으며 환경관리 후 천식 증상 및 기관지과민성 없어진 상태로 관찰 중이다.

애집개미 특이 IgE가 양성인 환자의 혈청을 이용하여 IgE immunoblotting을 시행한 결과, 특이 IgE와 결합하는 여러 단백띠를 관찰할 수 있었으며 그 중 특히 32 kDa 및 10 kDa에 대하여서 가장 높은 빈도의 결합 양상을 보였다 (그림 16). Immunoblotting에서의 IgE 결합 양상을 애집개미의 개별 항원 분획별로 정리하여 보면, 분자량 80 kDa에서부터 10 kDa 사이에 20개의 뚜렷한 단백 분획이 관찰되었다 (표 5). 개별 환자별로 다양한 단백 결합 양상을 보이지만, 그 중 분자량 32 kDa 및 10 kDa 부위가 70% 이상의 환자 혈청과 반응하여 이 부위가 애집개미의 주알레르겐임을 확인되었다.

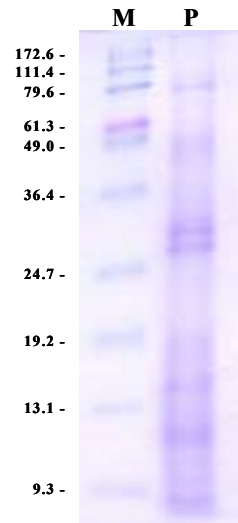


그림 15. 애집개미 항원의 SDS-PAGE

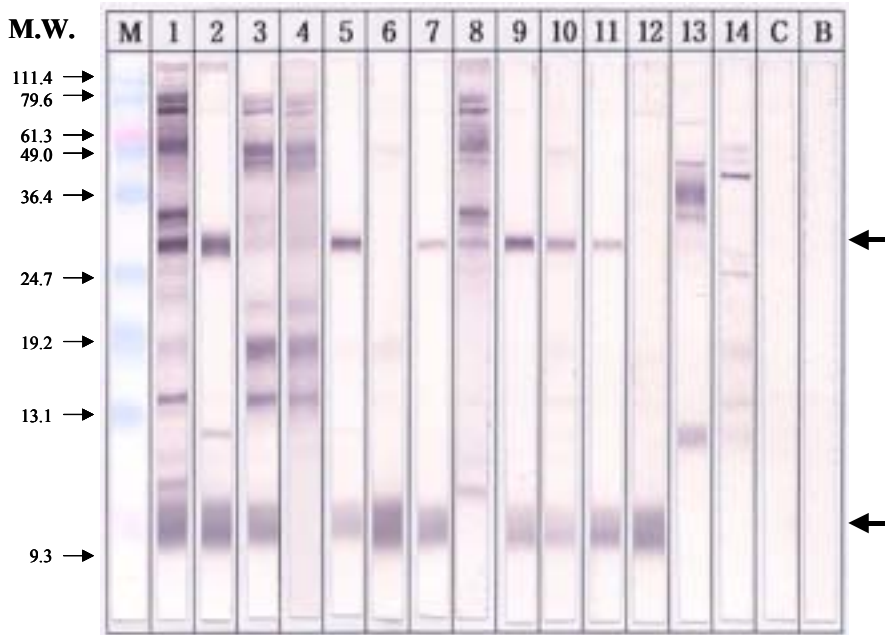


그림 16. 애집개미-특이 IgE immunoblotting. 피부단자시험 및 혈청 특이 IgE 검사상 애집개미 알레르기로 판정된 환자의 혈청 (lane 1-14), 음성 대조 혈청 (lane C) 및 buffer 대조액 (lane B)으로 IgE immunoblotting을 시행하였다. 그 결과 특이-IgE와 결합하는 여러 분획을 확인하였으며, 그 중 32 kDa 및 10 kDa (화살표) 부위가 가장 높은 빈도의 결합 양상을 보여, 이 부위가 애집개미의 주알레르겐으로 확인되었다. M.W.: molecular weight, M: marker protein

마. 애집개미 항원의 2-dimensional PAGE 및 immunoblotting

애집개미-특이 IgE 값이 높은 혈청으로 2-dimensional PAGE gel을 NC membrane에 전이하여 immunoblotting을 시행한 결과, 혈청 IgE와 결합하는 여러 점이 있었으며, 특히 주알레르겐으로 추정되는 분자량 32 kDa 및 10 kDa 부위를 확인할 수 있었다. 분자량 32 kDa의 알레르겐은 pI 값이 각각 5.62, 5.17, 5.00, 4.81을 나타냈으며, 10 kDa의 알레르겐은 pI 값이 각각 5.58, 5.28, 5.22, 5.16으로 나타났다 (그림 17).

표 5. 애집개미 항원 분획 별 특이 IgE 결합 양상

M.W ¹ \ Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	binding (%)
79.0	●	●	●	●				●							5/14 (35.7)
77.0	●	●	●	●				●		●	●	●			8/14 (57.1)
70.0				●				●					●		3/14 (21.4)
58.0	●		●	●		●		●		●				●	7/14 (50.0)
47.0			●	●				●		●			●	●	6/14 (42.9)
45.0			●	●										●	3/14 (21.4)
36.0													●		1/14 (7.1)
35.0	●		●	●				●					●		5/14 (35.7)
34.0	●							●							2/14 (14.3)
32.0	●	●	●	●	●			●	●	●	●	●			10/14 (71.4)
30.0													●		1/14 (7.1)
25.0	●							●					●		3/14 (21.4)
22.0	●		●	●											3/14 (21.4)
18.0	●		●	●		●				●			●		6/14 (42.9)
15.0	●		●	●						●			●		5/14 (35.7)
13.0	●														1/14 (7.1)
12.0		●			●								●	●	4/14 (28.6)
11.5	●							●							2/14 (14.3)
11.0	●							●							2/14 (14.3)
10.0	●	●	●		●	●	●		●	●	●	●			10/14 (71.4)

그림 16의 특이 IgE immunoblotting 결과를 정리함.

¹ M.W.: molecular weight, unit is kDa

바. 주알레르겐의 N-말단 아미노산 배열 분석

애집개미 항원을 2-dimensional PAGE 후 gel을 PVDF membrane에 전이시킨 다음 주알레르겐에 해당하는 부위를 절단하고, N-말단 아미노산 배열을 분석하였다. 그 결과 분자량 32 kDa의 pI 5.62, 5.17 및 5.00에 해당하는 주알레르겐의 아미노산 배열을 확인하였으며 이들은 서로 같은 아미노산 배열을 갖는 동일한 물질임을 확인하였다. 또한 확인된 32 kDa 알레르겐의 N-말단 아미노산 배열을 미국의 National Center for Biological Information의 데이터베이스와 비교한 결과 이는 마디개미의 chymotrypsin과 65%의 상동성이 있음을 확인

하였다 (표 6). 그러나 분자량 10 kDa에 해당하는 주알레르겐은 N-말단이 blocking 되어 있어 아미노산 배열을 확인할 수 없었다.

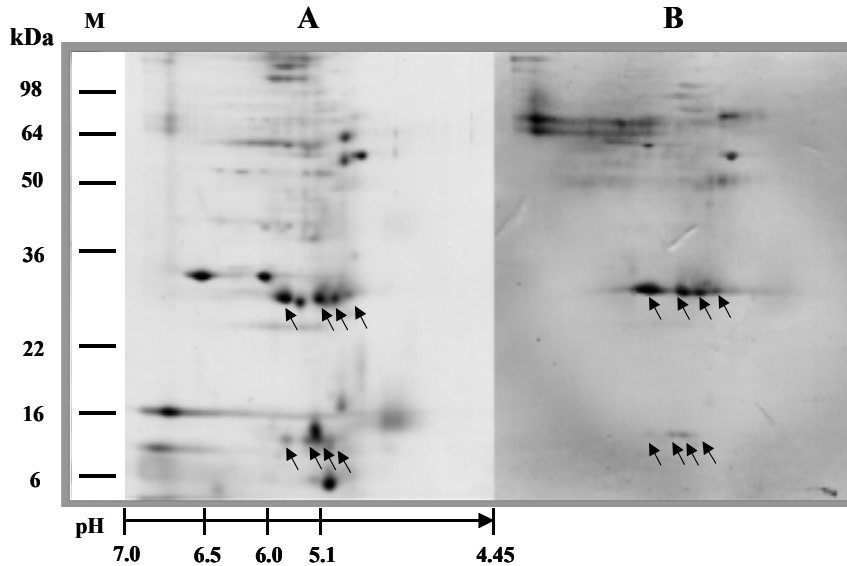


그림 17. 애집개미 향원에 대한 2-dimensional PAGE 및 immunoblotting. 애집개미 향원의 2-dimensional SDS-PAGE gel(A)을 NC membrane에 전이하여, 특히 IgE가 높은 양성 혈청으로 IgE-immunoblotting을 시행(B)하였다. 32 kDa 및 10 kDa 부위가 주알레르겐이며, 32 kDa의 알레르겐은 pI 값이 각각 5.62, 5.17, 5.00, 4.81 이었고, 10 kDa의 알레르겐은 pI 값이 각각 5.58, 5.28, 5.22, 5.16로 나타났다 (화살표).

표 6. 32 kDa 주알레르겐의 N-말단 아미노산 배열 순서

Amino acid sequence
Val-Val-Gly-Gly-Asn-Glu-Ala-Pro-Val-Gly- Gly-Tyr-Pro-Phe-Ile-Val-Ser-Leu-Gln-Leu

IV. 고 찰

알레르기 질환의 진단 및 치료 과정에서 원인 항원, 즉 알레르겐에 대한 연구는 필수적인 요소이다. 알레르겐에 대한 연구를 바탕으로 피부단자시험, 특히 항체 측정 및 유발검사 등에 사용할 진단용 시약을 만들 수 있으며 환경조절 및 알레르겐 면역치료와 같은 치료용 약제를 개발할 수 있다^{22,23}. 또한 최근에는 알레르겐 성상에 대한 기초 연구와 분자면역학적 기술을 접목하여 T 세포와의 반응성은 유지하나 IgE 항체와는 결합하지 않는 항원을 제조하여 환자 치료에 직접 이용하고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있다²⁴.

알레르겐은 종류에 따라 수십개의 항원을 가진 단백질의 복합체로 구성되어 있다. 구성 물질 중 IgE 항체 반응을 일으키는 부분이 알레르겐이며, immunoblotting 실험에서 이러한 알레르겐 중에 임상적으로 입증된 알레르기 환자의 50% 이상과 반응하는 단백질 띠가 관찰되는 경우 이 부분을 주알레르겐으로 정의하며, 그 외 소수의 환자 혈청에서만 반응하는 부분을 부알레르겐 (minor allergen)으로 부른다¹⁰. 알레르기 질환의 진단 및 치료에 사용되는 알레르겐 추출물은 표준화가 꼭 필요하며, 항원을 표준화하는 방법은 여러 가지가 있으나 검사 항원내의 주알레르겐 함량 비교에 의한 표준화가 가장 많이 권장되고 있으며, 항원 내 주알레르겐의 함량은 주알레르겐에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 이용한 이중-효소면역흡착법에 의해서 측정된다²⁵. 따라서 주알레르겐에 대한 특성 연구 및 분리는 알레르기 학문의 필수적인 요소로써, 현재 집먼지진드기 및 바퀴 항원과 같은 중요한 알레르겐의 유전자 구조 및 단백질 성상이 밝혀져 있으며 재조합 알레르겐의 대량 생산 및 분자면역학적 특성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{26,27}. 이러한 연구를 바탕으로 집먼지진드기 및 바퀴 항원 등은 주알레르겐을 측정하는 방법을 통하여 환경 내에 존재하는 알레르겐 양을 측정할 수 있다. 그러나 주알레르겐이 밝혀져 있지 않아 정량법이 확립되지 않은 알레르겐을 환경 내에서 측정할 때는 민감한 환자의 특이 IgE를 이용한 억제 ELISA 또는 억제 RAST 실험 등을 통하여 알레르겐 양을 측정할 수 있다^{28,29}.

본 연구에서는 먼지내에 있는 애집개미 단백 항원 양을 특이 항체가 있는 환자의 혈청을 이용하지 않고 토끼를 감각시켜 제조한 항혈청을 이용하여 측정하였다. 그 이유는 연구결과에서도 나타난 바와 같이 환자의 애집개미-특이 IgE는 억제 ELISA 실험 결과 다른 중요한 실내 알레르겐인 집먼지진드기 및 바퀴 항원과 교차반응을 일으킬 가능성이 있는데, 본 연구의 대상 시료인 실내 먼지에서는 이런 알레르겐이 다량으로 존재하기 때문에 교차 반응을 배제하기 위하여 애집개미만 감각시킨 토끼 항혈청을 사용하였으며, 항혈청에 대한 억제 ELISA 실험 결과 집먼지진드기 및 바퀴 항원과 교차반응이 없는 것을 확인한 후 이후의 실험을 진행하였다. 다른 항원과의 교차반응이 없는 환자의 혈청을 사용할 수도 있으나, 이런 경우 실험에 필요한 다량의 혈청을 확보하기가 어려워 인위적으로 제조한 토끼 항혈청을 실험에 이용하였다. 실제로 일정한 시료 내에 있는 미세한 양의 항원을 측정하는 방법으로 여러 면역화학적 방법이 있다. Kopplman 등³⁰은 그 중 환자의 혈청을 이용한 immunoblotting은 비특이적인 정량법이고, 토끼 항혈청을 이용한 immunoblotting은 특이적이나 민감도가 떨어지는 방법이라고 하였다. 또한 환자의 혈청을 이용한 IgE 억제 반응은 좋은 검사법이나 검사에 필요한 혈청 확보가 어려운 단점이 있는 반면, 감각된 토끼의 항체를 이용한 ELISA 방법이 민감도와 특이도가 높은 가장 유용한 방법이라고 하였다. 이런 이유로 토끼 항혈청을 이용하여 먼지 또는 공기 중에 존재하는 알레르겐 성분을 정량하는 연구가 많이 진행되고 있으며, 본 연구에서도 토끼를 감각시켜 항혈청을 제조하여 연구를 진행하였다^{9,31,32}. 이러한 방법으로 수행한 먼지 내 애집개미 항원 측정 억제 ELISA 실험은 logit 변환 후 얻은 회귀직선의 r^2 값 및 기울기에 대한 ANCOVA 분석, 그리고 immunoblot 실험에서 나타난 특이적인 반응 양상을 살펴보면 유용하고 타당한 검사였음을 확인할 수 있었다.

흡입에 의하여 알레르겐이 인체에 어느 정도 노출되는 지는 공기 중에 비산되어 있는 알레르겐을 정량함으로써 간접적으로 평가할 수 있다. 따라서 일정한 방식으로 공기를 채집하여 그 속에 포함된 알레르겐을 면역학적 방법을 통하여 정량하고 있다^{28,29,31-33}. 그러나 집먼지

진드기나 바퀴 향원과 같은 주요한 실내 알레르겐은 상대적으로 무거워 위 일상 활동에 의하여 방해되지 않는 한 공기 중에 비산되지 않고 바닥에 가라앉아 있다. 따라서 이런 알레르겐에 대한 노출 정도는 공기 시료를 이용하지 않고 바닥 먼지를 수거하여 먼지내에 포함된 알레르겐을 측정하여 평가한다^{6,34-40}. 본 연구에서도 애집개미 알레르겐에 노출되는 정도를 공기 시료가 아닌 먼지내에 포함된 알레르겐 양을 측정하여 평가하였다. 실제 연구에서는 모든 가구를 대상으로 시행하지는 않았지만 일부 가구에서 공기를 채집하여 공기 중에 있는 애집개미 항원을 검출하여 보았으나, 항원이 검출된 공기 시료는 없었다 (결과 생략). 이러한 결과는 애집개미 항원도 상대적으로 무거운 공기 중에 비산되어 있기보다는 바닥에 가라앉아 있다가 사람의 활동에 의하여 비산되면서 흡입되는 것임을 시사한다.

비록 통년성 알레르겐이라고 할지라도 대부분의 알레르겐은 온도, 습도, 주위 환경 등과 같은 여러 조건에 따라 분포양이 다르며 계절적인 변동 양상을 보인다³⁵⁻³⁸. 본 연구에서 측정한 애집개미 항원양도 계절적인 변동 양상을 보였으며, 가을 및 겨울철에 상대적으로 많은 양을 나타냈다. 집먼지진드기 알레르겐은 여름에 주알레르겐 양이 최고에 이르는 것으로 알려져 있다^{35,36}. 그러나 일부 연구에 의하면 집먼지진드기 개체수는 서식하기 좋은 조건이 되는 여름에 최고에 도달하나, 개체의 서식에 의하여 배출되는 알레르겐 양은 가을에 최고에 이른다고 한다³⁷. 바퀴의 서식도 6월에 가장 높은 개체수를 보이나 바퀴 알레르겐은 8월 이후에 최고 농도에 도달한다고 한다³⁸. 애집개미 알레르겐이 가을 및 겨울에 최고 농도에 도달하는 것은 개체수가 이 시기에 많아져서 나타난 현상일 수도 있으나 집먼지진드기 및 바퀴와 마찬가지로 개체수가 많아지고 일정 시간이 지난 후에 알레르겐 배출이 많아져서 나타난 현상일 수도 있다. 한편 본 연구의 대상인 애집개미와 같은 흡입성 알레르겐은 아니지만 마디개미의 개미독 알레르기를 연구한 Hannan 등¹⁸의 연구에 의하면 알레르기 성분 자체의 계절적 변동도 가능하다. 즉 마디개미에 쏘이는 것은 여름보다는 봄에 자주 일어나지만 마디개미 알레르기에 의한 전신 알레르기 증상은 여름에 더 흔히 일어나는 현상을 기초로 마디개미의 알레르기 항원성을

역제 RAST 실험으로 조사한 결과, 주요 알레르겐 성분인 phospholipase A의 항원성이 여름에 가장 강하게 나타난다고 하였다¹⁸. 따라서 애집개미 알레르겐의 계절적 변동 양상도 개체수의 차이가 아니라 곤충의 생태과정에서 나올 수 있는 항원성의 변화에 기인하여 나타난 현상일 가능성도 배제할 수 없다.

애집개미 항원을 측정된 결과, 실내에서 개미가 잡히지 않고 거주자가 개미의 실내 활동을 인정하지 않은 46 가구 중 11 가구 (23.9%)에서 애집개미 항원이 측정되었다. 이는 애집개미가 실내에 서식한다는 증거가 없어도 개미 항원이 실제로는 생활환경에 분포되어 있을 수 있다는 것으로, 알레르겐을 분비하는 원인체가 실내에 없어도 알레르겐 자체는 실내에 존재할 수 있다는 것은 기존의 연구에서도 나타나는 사실이다. 즉 바퀴 알레르겐의 분포를 살펴본 연구에 의하면 실내에 바퀴가 서식하지 않아도 바퀴 알레르겐은 실내에서 검출된다고 한다. 499 가구를 대상으로 실내 알레르겐 분포를 연구한 Chew 등³⁹에 의하면 실내에 바퀴가 서식하지 않는 가구의 48%에서도 바퀴 알레르겐이 검출되었으며, 38 가구를 대상으로 한 Pollart 등⁴⁰의 연구에서도 바퀴 서식이 없는 가구의 20%에서 바퀴 알레르겐이 높은 농도로 측정되었다. 따라서 본 연구에서 나타난 실내의 애집개미 서식과 개미 알레르겐 분포 사이에 나타나는 이러한 차이는 특이하지만 가능한 현상으로, 정확하게 그 원인을 알 수는 없으나 몇 가지로 추정할 수 있다. 먼저, 실제로는 개미가 서식하며 실내에서 생활하고 있으나 거주자가 확인하지 못하고 본 연구에서 설치한 끈끈이 트랩에도 포획되지 않았을 수도 있으며, 애집개미가 연구시점 이전에 서식하였기 때문에 연구 당시에는 실내에 개미가 없으나 개미 항원이 잔존할 수도 있다. 또한 애집개미 항원이 거주자의 일상 활동 또는 다른 매개체에 의하여 다른 장소에서 이차적으로 이동되어 왔을 수도 있다. 그리고 측정된 항원이 애집개미 항원이 아니고 실내에 존재하는 다른 종류의 항원이 교차반응을 일으켰을 가능성도 배제할 수는 없다. 그러나 실험에 사용한 토끼 항혈청이 집먼지진드기나 바퀴 항원에 전혀 교차반응을 일으키지 않는 특이적인 혈청이었으며, 실제 실험에서는 모든 먼지에서 애집개미 항원뿐만 아니라 집먼지진드기 및 바퀴 항원

양도 측정하였는데 이 둘 사이에 어떠한 상관성도 없었기 때문에 이러한 항원과의 교차반응 가능성은 없는 것으로 판단된다 (결과 생략).

본 연구에서 실내 먼지에서 애집개미 항원이 검출된 가구에 거주하는 거주자 중 19.6%에서 애집개미-특이 IgE가 측정된 반면, 실내에서 항원이 측정되지 않은 가구에 거주하는 거주자에서는 4.8%만이 특이 IgE가 측정되었다. 항원노출에 따라 나타나는 특이 IgE 반응의 이러한 차이는 항원 노출에 따른 항체 반응의 인과관계를 설명하는 것일 수 있으나 이에 대하여는 추후 보다 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다. 실제로 원인 항원에 노출되는 양에 따른 IgE 감각의 차이는 잘 알려진 현상이며³⁴, 따라서 애집개미 항원이 IgE 반응을 일으킬 수 있는 역치 농도를 확인하는 것은 향후 중요한 연구과제의 하나이다.

애집개미 항원이 흡입성 알레르겐으로 작용한다는 것을 증명하기 위하여 애집개미-특이 IgE가 있고, 실내에 개미가 서식하는 가정에 거주하는 환자를 대상으로 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험을 시행하였고, 그 결과 9명의 애집개미 알레르기에 의한 천식환자를 확인하였다. 표 4에서와 같이 9명의 환자 대부분은 50여종의 다른 흡입성 알레르겐에 음성 또는 약한 반응만을 보여 기존의 검사로는 비아토피성 천식으로 분류될 수 있는 환자들이었다. 이들은 대부분 원인 물질에 대한 직접적인 관리 없이 증상에 대한 치료만 받아온 환자들로 애집개미에 의한 천식 진단 하에 집안의 개미 관리 후 증상이 소실되거나 호전되는 것을 쉽게 관찰할 수 있었으며, 이러한 임상적인 결과 역시 본 연구의 중요한 성과 중의 하나이다. 한편 9명의 기관지유발 시험 양성 환자 중 5명이 조기반응과 함께 후기반응이 함께 나타나는 이중반응을 나타낸 점은 애집개미에 의한 천식반응이 면역학적 기전에 의하여 나타나는 현상임을 설명하며, 아울러 애집개미 알레르겐이 강력한 항원성을 갖는 물질임을 시사한다⁴¹.

애집개미 알레르겐의 교차항원성을 억제 ELISA 실험을 통하여 확인한 결과, 일부 혈청은 다른 항원과 전혀 교차반응을 보이지 않았으나 애집개미-특이 IgE는 집먼지진드기, 바퀴 및 마디개미와 교차반응을 보이기도 하였다. 여기서 주목할 점은 다른 개미 항원과의 교차

반응 여부인데 애집개미 항원은 마디개미와는 교차반응을 잘 보였으나, 왕침개미 (*Pachycondyla*)와는 교차반응을 잘 나타내지 않았다. 애집개미의 분류를 살펴보면 그러한 차이의 원인을 추정할 수 있다 (그림 18). 즉 애집개미는 개미과 (Family Formicidae) 두마디개미아과 (Subfamily Myrmicinae)에 속하며 마디개미도 두마디개미아과에 속한다⁴². 그러나 왕침개미는 개미과 침개미아과 (Subfamily Ponerinae)에 속하며, 이러한 종 분류의 차이로 인하여 애집개미는 우리나라에서 개미독 알레르기를 잘 일으키는 왕침개미보다는 마디개미와 더 교차반응을 잘 일으키는 것으로 보인다.

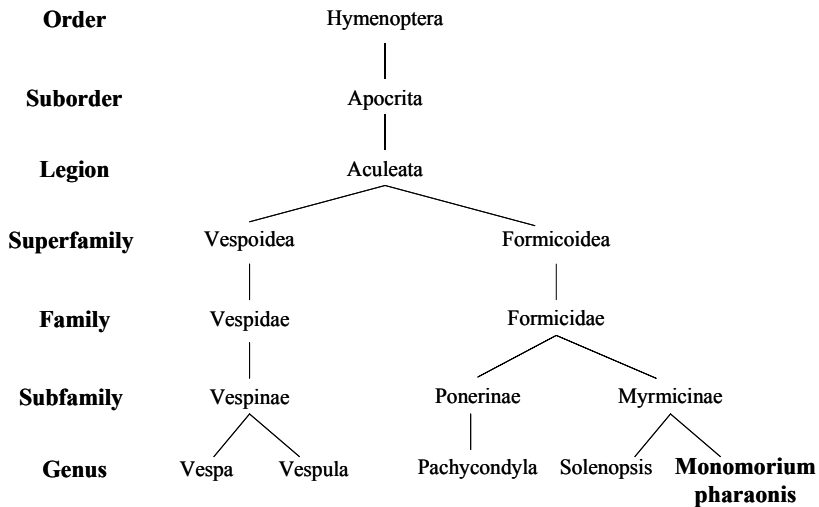


그림 18. 애집개미의 분류

SDS-PAGE, IgE-immunoblotting 및 2-dimensional PAGE를 통하여 애집개미의 주알레르겐이 32 kDa 및 10 kDa 부위임을 확인할 수 있었다. 분자량 32 kDa 부위의 알레르겐은 pI 값이 각각 다른 네 개의 점으로 나타났는데, N-말단 아미노산 배열을 20개까지 분석한 결과 아미노산 배열이 같아 이들은, 이 후의 아미노산 배열에 약간의 차이가 있는 동종알레르겐 (isoallergen)으로 추정된다. 32 kDa 주알레르겐의 아미노산 배열을 확인 후 National Center for Biological

Information의 데이터베이스와 비교한 결과 이는 마디개미의 chymotrypsin과 상동성이 있음을 확인하였다. 기관지천식을 비롯한 알레르기 질환에서 chymotrypsin은 단백질을 분해할 수 있는 능력 또는 그 자체가 알레르겐으로 작용하여 염증반응을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다. 즉 돼지풀 꽃가루에는 chymotrypsin을 비롯한 단백분해효소가 포함되어 있어 단백질을 분해하고 염증발생을 예방하는 단백분해효소 억제제를 비활성화시켜 기도 염증을 악화시킨다^{43,44}. 또한 집먼지진드기의 주알레르겐 중 하나인 Der f 6 또는 Der p 6는 chymotrypsin으로 알려져 있다⁴⁵⁻⁴⁷. 따라서 추가 연구가 필요한 상태이지만 애집개미의 주알레르겐의 하나인 32 kDa 알레르겐이 chymotrypsin과 유사한 물질이라면 흡입성 알레르겐으로 작용하면서 단백분해능을 통한 염증반응 악화가 가능하여 강력한 알레르겐으로 작용할 수 있을 것으로 추정된다. 본 연구에서는 아쉽게 10 kDa 주알레르겐의 N-말단 아미노산 배열을 확인할 수 없었는데, 10 kDa 부위가 애집개미의 주요한 알레르겐으로 판단되므로 추후 이에 대한 연구가 꼭 필요하다.

이상의 연구 결과를 종합하면 애집개미는 도시 가구의 실내에 서식하면서 여러 알레르겐을 통하여 흡입에 의한 호흡기 알레르기 질환을 일으킬 수 있음을 세계에서 최초로 규명하였다. 또한 애집개미 주알레르겐은 32 kDa 및 10 kDa 부위임을 확인하였으며, 32 kDa 주알레르겐에 대한 N-말단 아미노산 배열을 확인하였다. 현재까지 알려지지 않은 전혀 새로운 알레르겐이면서 많은 환자에서 면역학적 과민반응을 일으키는 애집개미의 흡입성 알레르겐으로의 역할을 규명한 본 연구결과는 향후 주알레르겐 유전자 클로닝을 통한 재조합 알레르겐의 생산, 주알레르겐에 대한 B 세포 및 T 세포 항원결정인자 연구와 같은 분자면역학적 연구를 수행하여 진단용 시약 및 치료용 약제를 개발하는데 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결 론

도시 가정의 실내에 많이 서식하는 애집개미가 알레르기 항원성이 있으며, 항원의 흡입에 의하여 호흡기 알레르기 질환을 유발할 수 있다는 가설을 세우고, 애집개미 조항원을 이용한 연구결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 애집개미 항원에 대한 토끼 항혈청을 제조한 후 애집개미 단백질 항원 측정을 위한 재현성 있는 억제 ELISA 실험을 정립하였으며, 이를 통하여 서울 지역 도시가구내의 먼지내에 있는 애집개미 단백질 항원을 측정하였다. 측정 결과, 35.7% 가구의 실내 먼지에서 애집개미 항원이 검출되었으며, 애집개미 항원은 계절에 영향을 받았으며, 가을 및 겨울철 실내 먼지에서 높은 농도로 측정되었다.

2. 실내에서 개미가 잡힌 가구에서 애집개미 항원의 검출률이 높았으나, 실내에 개미가 잡히지 않은 가구의 일부에서도 높은 농도의 개미 항원이 검출되었다.

3. 11.5%의 거주자에서 애집개미-특이 IgE 항체가 검출되었으며, 실내 먼지에서 애집개미 항원이 검출되는 가구에 거주하는 거주자에서 검출되지 않는 가구의 거주자보다 특이 항체 검출률이 높았다 (각각 19.6% 및 4.8%).

4. 호흡기 알레르기 환자의 14.8%가 애집개미 항원을 이용한 피부 단자시험 및 특이 IgE 측정에서 양성반응을 보여 애집개미에 감각되어 있음을 확인하였다.

5. 애집개미에 감각되어 있고, 병력상 애집개미에 의한 천식이 의심되는 환자를 대상으로 애집개미 항원-흡입 기관지유발시험을 시행하여, 9명의 애집개미 알레르기에 의한 기관지천식 환자를 확인하였다.

6. 애집개미 항원은 일부 환자에서는 전혀 교차반응을 나타내지 않았으나, 일부 환자에서는 마디개미, 바퀴, 집먼지진드기와 교차반응을 보이는 등 다양한 형태의 교차반응을 보였다

7. 애집개미 주알레르겐은 32 kDa 및 10 kDa 부위로 확인되었다.

32 kDa 주알레르겐에 대한 N-말단 아미노산 배열을 확인하였으며, 이는 마디개미의 chymotrypsin과 65%의 아미노산 배열 상동성을 보였다.

이상의 결과로 애집개미는 도시 가구의 실내에 서식하며 여러 알레르겐을 통하여 흡입에 의한 호흡기 알레르기 질환을 일으킬 수 있음을 규명하였다. 본 연구 결과를 바탕으로 향후 애집개미 주알레르겐의 유전자 클로닝을 통한 재조합 알레르겐의 생산, 주알레르겐에 대한 B 세포 및 T 세포 항원결정인자 연구와 같은 분자면역학적 연구를 수행하여 진단용 시약 및 치료용 약제를 개발하는데 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

참고 문헌

1. Boulet LP, Turcotte H, Laprise C, Lavertu C, Bedard PM, Lavoie A, et al. Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. *Clin Exp Allergy* 1997;27:52-59.
2. Gergen PJ, Turkeltaub PC, Kovar MG. The prevalence of allergic skin tests reactivity to eight common aeroallergens in the U.S. population: Results from the second National Health and Nutrition Examination survey. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:669-679.
3. 김철우, 이재훈, 정혜원, 최소래, 정준원, 박중원, 등. 기관지천식 환자에서 흡입성 알레르겐에 대한 피부반응도의 변화양상. 천식 및 알레르기 2001;21:205-215.
4. Nakagomi T, Itaya H, Tominaga T, Yamaki M, Hisamatsu S, Nakagomi O. Is atopy increasing? *Lancet* 1994;343:121-122.
5. Ledford DK. Indoor allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:327-334.
6. Platts-Mills TA. How environment affects patients with allergic disease: Indoor allergens and asthma. *Ann Allergy* 1994;72:381-384.
7. Kim YK, Son JW, Kim HY, Park HS, Lee MH, Cho SH, et al. New occupational allergen in citrus farmers: citrus red mite (*Panonychus citri*). *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82:223-228.
8. Berto JM, Pelaez A, Fernandez E, Lombardero M, Ferrer M. Siberian hamster: a new indoor source of allergic sensitization and respiratory disease. *Allergy* 2002;57:155-159.
9. Curtis L, Lee BS, Cai D, Morozova I, Fan JL, Scheff P, et al. Pigeon allergens in indoor environments: a preliminary study. *Allergy* 2002;57:627-631.

10. Liebers V, Sander I, Van Kampen V, Raulf-Heimsoth M, Rozynek P, Baur X. Overview on denominated allergens. *Clin Exp Allergy* 1996;26:494-516.
11. 김철우, 최수영, 이승환, 박중원, 홍천수. 새로운 흡입성 알레르겐으로 애집개미의 항원성. *천식 및 알레르기* 2001;21:403.
12. Holldobler B, Wilson EO. *The ants: classification and origins*. Cambridge (MA): The Belknap Press of Harvard University Press; 1990. p.4-141.
13. Choi BM, Masaki K, Choi MK. Study on distribution of ants (Formicidae) from Korea (II): formic fauna in Mt. Halla. *Cheong Ju Tea Coll* 1985;22:439-462.
14. Linnaeus C. *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio 10. Holmiae. [1.1. 1758] p580.
15. 서병호. 제 2편 각론. *최신임상기생충학*. 제 2판. 일조각; 1984. p.348.
16. 주종필. 절지동물. *동물의학*. 제 1판. 국제문화; 1991. p.669.
17. Yun YY, Ko SH, Park JW, Hong CS. Anaphylaxis to venom of the *Pachycondyla* species ant. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:879-882.
18. Hannan CJ Jr, Stafford CT, Rhoades RB, Wray BB, Baer H, Anderson MC. Seasonal variation in antigens of the imported fire ant *Solenopsis invicta*. *J Allergy Clin Immunol* 1986;78:331-336.
19. Vail KM, Williams DF. Pharaoh ant (Hymenoptera: Formicidae) colony development after consumption of pyriproxyfen baits. *J Econ Entomol* 1995;88:1695-1702.
20. Oi DH, Vail KM, Williams DF. Bait distribution among multiple colonies of Pharaoh ants (hymenoptera: Formicidae). *J Econ Entomol* 2000;93:1247-1255.
21. 이원기, 김철우, 윤용석, 박중원, 홍천수. 성인 기관지천식 환자의

- 특이 기관지유발시험에 따른 반응양상. 알레르기 1996;16:325-334.
22. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:228-238.
 23. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:558-562.
 24. Platts-Mills TA, Mueller GA, Wheatley LM. Future directions for allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:335-343.
 25. American Academy of Allergy Asthma and Immunology (AAAAI). The use of standardized allergen extracts. Position statement. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:583-586.
 26. Jacquet A, Haumont M, Massaer M, Daminet V, Garcia L, Mazzu P, et al. Biochemical and immunological characterization of a recombinant precursor form of the house dust mite allergen Der p 1 produced by *Drosophila* cells. *Clin Exp Allergy* 2000;30:677-684.
 27. Bush RK. Molecular biology of allergens. *Immunol Allergy Clin* 1996;16:535-563.
 28. Cruz MJ, Rodrigo MJ, Anto JM, Morell F. An amplified ELISA inhibition method for the measurement of airborne soybean allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:42-48.
 29. Taylor AV, Swanson MC, Jones RT, Vives R, Rodriguez J, Yunginger JW, et al. Detection and quantitation of raw fish aeroallergens from an open-air fish market. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:166-169.
 30. Koppelman SJ, Knulst AC, Koers WJ, Penninks AH, Peppelman H, Vlooswijk R, et al. Comparison of different immunochemical methods for the detection and quantification of hazelnut proteins in food products. *J Immunol Methods* 1999;229:107-120.

31. Kimura JY, Matsuoka H, Ishii A. ELISA inhibition method in detection of mite and chironomid antigens in environmental samples of dust, soil and air. *Allergy* 1990;45:167-173.
32. Sandiford CP, Nieuwenhuijsen MJ, Tee RD, Taylor AJ. Measurement of airborne proteins involved in Bakers' asthma. *Clin Exp Allergy* 1994;24:450-456.
33. Wiley K, Smith MM, Allan LJ, Griffin P. Measurement of airborne flour exposure with a monoclonal antibody-based immunoassay. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:278-284.
34. Kuehr J, Frischer T, Meinert R, Barth R, Forster J, Schraub S, et al. Mite allergen exposure is a risk for the incidence of specific sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:44-52.
35. Chew GL, Higgins KM, Gold DR, Muilenberg ML, Burge HA. Monthly measurements of indoor allergens and the influence of housing type in a northeastern US city. *Allergy* 1999;54:1058-1066.
36. 홍천수, 이미경. 서울 집먼지내 집먼지 진드기 Group I 알레르겐의 측정과 Der f1의 월별 변동에 관한 조사. *알레르기* 1992;12:482-492.
37. Platts-Mills TA, Hayden ML, Chapman MD, Wilkins SR. Seasonal variation in dust mite and grass-pollen allergens in dust from the houses of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:781-91.
38. Mollet JA, Vailes LD, Avner DB, Perzanowski MS, Arruda LK, Chapman MD, et al. Evaluation of German cockroach (Orthoptera:Blattellidae) allergen and seasonal variation in low-income housing. *J Med Entomol* 1997;34:307-311.
39. Chew GL, Burge HA, Dockery DW, Muilenberg ML, Weiss ST, Gold DR. Limitations of a home characteristics questionnaire as a predictor of indoor allergen levels. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1536-1541.

40. Pollart SM, Smith TF, Morris EC, Gelber LE, Platts-Mills TA, Chapman MD. Environmental exposure to cockroach allergens: analysis with monoclonal antibody-based enzyme immunoassays. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:505-510.
41. Fish JE, Peters SP. Bronchial challenge testing. In Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, editors. *Allergy : Principles and Practice*. 5th ed. St. Louis: Mosby; 1998. p.454-464.
42. 한국곤충학회, 한국응용곤충학회. 한국곤충명집. 건국대학교 출판부; 1994
43. Bagarozzi DA Jr, Pike R, Potempa J, Travis J. Purification and characterization of a novel endopeptidase in ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *J Biol Chem* 1996;271:26227-26232.
44. Bagarozzi DA Jr, Travis J. Ragweed pollen proteolytic enzymes: possible roles in allergies and asthma. *Phytochemistry* 1998;47:593-598.
45. Kawamoto S, Mizuguchi Y, Morimoto K, Aki T, Shigeta S, Yasueda H, et al. Cloning and expression of Der f 6, a serine protease allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Biochim Biophys Acta* 1999;1454:201-207.
46. Bennett BJ, Thomas WR. Cloning and sequencing of the group 6 allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 1996;26:1150-1154.
47. Yasueda H, Mita H, Akiyama K, Shida T, Ando T, Sugiyama S, et al. Allergens from *Dermatophagoides* mites with chymotryptic activity. *Clin Exp Allergy* 1993;23:384-390.

Abstract

***Monomorium pharaonis* ant: identification of novel inhalant allergens and characterization of its major allergens**

Cheol-Woo Kim

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Chein-Soo Hong)

The sting from ants can cause a range of allergic responses including anaphylaxis in sensitized individuals. There has been no data about the role of ant in the pathogenesis of respiratory allergic diseases. In recent years the indoor house ant, *Monomorium pharaonis* (pharaoh ant), has become a widely spread household throughout the Korea and other parts of the world. Although it was recently mentioned as a possible cause of respiratory allergies, no detailed study has been performed whether pharaoh ant represents an indoor inhalant allergen source. This study was performed to prove the hypothesis that pharaoh ant has potential to liberate several allergenic materials which play an important role in the pathogenesis of respiratory allergy.

The pattern of distribution and the amount of pharaoh ant antigens in the living environment were measured to determine whether inhalant exposure to pharaoh ant antigens can be occurred by domestic activities. Home visiting and collection of floor dusts were performed at 3-month interval for 1 year at 56 houses in Seoul, Korea. Pharaoh ant antigens in fine dusts were detected and quantified by inhibition ELISA assays using polyclonal rabbit IgG antibodies, and IgE antibodies to pharaoh ant antigens in residents' sera were measured by using ELISA.

Patients with bronchial asthma or allergic rhinitis were enrolled

in clinical study. To identify IgE-binding components and major allergens, IgE ELISA and inhibition ELISA, IgE immunoblotting, 2-dimensional PAGE and N-terminal amino acid sequencing were performed. Finally, allergen-bronchial challenge tests were performed for the clinical confirmation of pharaoh ant allergy.

Pharaoh ant antigens were detected in at least one indoor site of 35.7% houses. Level of pharaoh ant antigens showed seasonal variation with peak in autumn and winter. Detection rate of pharaoh ant antigens was significantly higher in houses with visual evidence of ant infestation than in houses without infestation, but significant amount of pharaoh ant antigens was also measured in about 20% of houses not reporting signs of ant. Thirteen (11.5%) among 113 residents had pharaoh ant-specific IgE. Pharaoh ant-IgE were more detected in residents (19.6%) with pharaoh ant antigens detected homes than residents (4.8%) without ant antigens.

Eighty (14.8%) of 541 patients with respiratory allergy showed both positive skin reactivity and specific IgE to pharaoh ant. The inhibition ELISA assays indicated that pharaoh ant allergens had various pattern of cross-reactivity to house dust mite, cockroach, and other ant allergens from *Solenopsis* species. Two important IgE-binding components (32 kDa and 10 kDa) were identified as major allergen of pharaoh ant, and N-terminal amino acid sequence of 32 kDa allergen was determined. Finally, pharaoh ant-bronchial challenge tests were conducted for 10 patients, and nine patients showed typical pattern of asthmatic reactions.

These results indicate that considerable level of pharaoh ant antigens is distributed in urban indoor environment, and pharaoh ant antigens are important inhalant allergens. Results of this study will ultimately lead to the development of new diagnostic tools and therapeutic vaccines for the respiratory allergic diseases.

Key Words : *Monomorium pharaonis*, inhalant allergen, bronchial asthma, major allergen