

돼지 *Anisakis* 症의 血清學的

診斷에 관한 研究

文武洪·崔源弼 (慶北大學校 獸醫學科)

緒 論

Anisakis 線虫은 海棲 哺乳類인 鯨類와 鰭脚類의 第1 胃壁에 頭部를 穿入하여 寄生하며 體長이 約 60cm 되는 蛔虫의 일종이다. 虫卵은 宿主의 糞便과 함께 海水中에 배출하여 水温이 15~25℃에서 3~4 일내에 孵化하여 第1 期 幼虫이 된다. 이들은 第1 中間宿主인 海棲 새우에 먹혀서 第2 期 幼虫으로 發育하며 이 새우들은 海棲 魚介類^{18, 39, 56, 60}에 먹혀서 第3 期 幼虫으로 發育한다. 이 3 期 幼虫을 含有하고 있는 魚類와 오징어가 鯨類나 鰭脚類에 攝取되면 3 期 幼虫은 다시 終宿主의 胃에서 成虫이 된다.

사람이나 家畜^{11, 33, 34, 58}이 第3 期 幼虫을 含有하고 있는 魚介類를 날로 섭취하였을때 그 속에 있던 幼虫은 사람과 家畜의 胃腸壁에 侵入하여 *Anisakis* 症을 일으킨다.

人體 *Anisakis* 症은 네덜란드에서 van Thiel²⁹이 처음으로 밝힌 이래 國內外에서 多數例가 報告^{1, 31, 32, 40, 44, 49, 50, 52, 55}되므로서 人體의 重要한 寄生虫性 疾病으로 취급하게 되었다.

돼지 *Anisakis* 症은 Ifagagi¹¹가 처음으로 밝힌 이래 博井 등⁴⁸이 屠畜豚의 胃壁에 侵入한 *Anisakis* 幼虫을 검출하였으며 芦沢 등³³은 돼

지 *Anisakis* 症의 病理解剖組織學的 所見을 記述한바 있다. 虫體는 胃低部와 噴門部의 胃粘膜에 侵入하고 있었으며 돼지 1 頭당 侵入된 虫體數는 最高 170마리 例도 있었다고 보고하였다. 虫體는 보통 胃粘膜에 1마리씩 독립하여 침입하였으나 때로는 2~4마리가 동일장소에 함께 침입한 예도 있었다고 하였다. 林⁵⁷은 *Anisakis* 型 幼虫을 돼지에 人工 감염 시킨 결과 그 病原性이 높은 사실을 밝혔다. 文과 郭⁵⁸은 경북 안동지방의 屠畜豚의 胃에서 *Anisakis* 型 幼虫의 自然 감염예를 國內에서는 처음으로 밝혔으며 이들 유충은 모두 *Anisakis* type 1으로 定하였다. 總 318頭의 돼지 胃를 査하여 9두에서 本 幼虫의 감염을 査할 수 있었으므로 그 査 染율은 2.8%였다. 姜 등⁵⁹은 全 南 道에서 돼지 *Anisakis* 症의 自然 染 疫와 病 理 解 剖 學 的 所 見을 報告하였다.

寄生虫 感染症을 위한 免疫學的 診斷을 위해 서 다수의 研究 보고^{3, 5, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 20}가 있으며 또 한 人體 및 실험동물의 *Anisakis* 症을 위한 免疫學的 診斷에 관해서도 많은 研究 보고가 있으나^{23, 35, 37, 59} 돼지 *Anisakis* 症을 위한 면역學的 診 斷을 시도한 예는 지금까지 查 査할 수 없다.

森下 등⁴³은 생 리 식 염 수에 依 依한 *Anisakis* 幼虫

의 抽出抗原으로 皮内反應을 실시한 바 있다. 小林³⁵⁾은 *Anisakis*症의 皮内檢査를 위한 抗原으로서 *Anisakis*幼虫의 虫体 抽出液(SOM항원)과 脫皮時에 飼養液中에 放出되는 排泄物 및 分泌物(ES항원)을 사용하였다. Ruitenber³⁷⁾는 *Anisakis*症의 血清學的 진단을 위해서 補體結合反應(CF)과 *Anisakis*幼虫의 凍結切片을 사용한 間接螢光抗體法(IFA)을 비교 검토하였다. 이들 방법은 *Anisakis*症 患者 血清에서 모두 항체를 용이하게 검출할 수 있었으나 蛔虫症, 幼虫内臟移行症, 胞虫症 그리고 條虫症의 환자혈청에 대해서 CF는 IFA보다 더 높은 양성반응을 나타내었다고 하였다. 우⁵⁰⁾는 가토에 *Anisakis*幼虫을 經口投與한 후 Unger氏液으로 抽出한 *Anisakis*幼虫 항원으로서 CF와 免疫擴散法(ID)을 적용하여 항체가를 경시적으로 검사하였다. 吉村 등⁵³⁾은 *Anisakis*症의 血清學的 진단을 위해서 Latex응집반응(LA)을 실시한 결과 상당히 선명한 반응을 얻었다고 하였다. 近藤 등⁵⁰⁾도 LA에 의해서 幼線虫 移行症의 면역학적 진단에 관해서 검토한 바 있다.

鈴木 등⁴⁵⁾은 澱分gel 전기영동에서 *Anisakis*幼虫의 특징적인 분획을 분리 정제하여 농축한 결과 이것은 赤褐色을 나타내었으며 虫体の hemoglobin과 일치하였다고 하였다. 虫体 hemoglobin은 *Anisakis*幼虫의 抗原物質中에서 가장 특이성이 높았다고 보고한 바 있다.

本 研究에서는 鈴木 등⁴⁵⁾, Smith와 Morrison²⁵⁾ 그리고 Wittenberg 등³⁰⁾의 虫体 hemoglobin분리법에 따라서 *Anisakis*幼虫으로 부터 항원을 분리 정제하였다. 정제된 이 항원의 특이성을 분석하기 위해서 対応 抗原 抗血清反應, 豚蛔虫 抗血清과의 非対応反應 그리고 非対応 抗原 抗血清의 吸收試驗을 실시하였으며 가토와 돼지에 *Anisakis*幼虫을 人工感染시킨 후 抗体價의 消長을 검사하고 腸内 各種 線虫類 感染豚血清과 線虫類 非感染豚의 血清에 대해서 *Anisakis*幼虫의 정제항원과의 非特異反應을 검사

하여서 돼지 *Anisakis*症의 血清學的 診斷의 가능성을 추구하였다.

實驗材料 및 方法

가. 實驗材料

1. 供試動物:

1) 仔豚5頭: 生後 65일령의 렌드레이스와 라지화이트 잡종돈.

2) 腸内 線虫類 感染豚 5頭: 大邱市外 養豚場에서 사육된 돼지중에서 豚蛔虫 단독 感染豚 1頭, 豚蛔虫과 腸結節虫 感染豚 1頭, 豚蛔虫과 豚편충 단독감염돈 1頭 그리고 桿虫 단독 感染豚 1頭.

3) 線虫類 非感染豚 10頭: 大邱市外 양돈장에서 사육된 돼지중에서 5日 간격으로 2回 대변검사를 실시하여 虫卵이 전연 검출되지 않은 돼지.

4) 家兎 10頭: 体重 2 kg 前後의 재래종 雜種.

2. 抗原材料

1) *Anisakis*幼虫: 고등어 복강에서 수집한 신선한 虫体 800g.

2) 豚蛔虫: 대구시 도축장에서 수집한 成虫 20마리.

3. 血清材料

1) *Anisakis*幼虫과 豚蛔虫으로 각각 免疫시킨 家兎血清.

2) *Anisakis*幼虫을 人工感染시킨 家兎血清과 豚血清.

3) 腸内 線虫類 感染豚과 非感染豚의 血清.

나. 方 法

1. 抗原製造

1) *Anisakis*幼虫 및 豚蛔虫의 粗抗原: 凍結

保存된 각 虫体를 Tissue grinder로 마쇄한후 虫体무게의 5배가 되는 0.02M pH7.2buffer (PBS)로 虫体組織液을 抽出하여 원심분리하였다. 상층액을 증류수에 透析하여 각 粗抗原의 原液으로 하였다.

2) 아니사키스유충의 精製抗原 製造: Smith와 Morison²⁵⁾의 虫体 hemoglobin 분리법에 준하였다. 虫体組織液에 ammonium sulfate (31g/100ml)를 가하여 50%飽和溶液으로 하였다. ammonium sulfate가 완전히 용해된 후 원심분리하여 상층액을 채취하였다. 여기에 ammonium sulfate (20.1g/100ml)을 追加하여 73%포화용액으로 하였다 이것을 원심분리 하여 침전물을 少量의 증류수로 용해한 후 0.01M PBS pH7.2에 투석하였다. 다음에 이것을 DEAE Cellulose column chromatography에 의해서 불순단백질을 제거하였다. DEAE Cellulose (Eastman organic chemical co.)를 0.5N·HCl, 0.5N·NaOH 그리고 증류수의 순으로 세조하고 다시 0.01M PBS pH 7.2에 平衡이 될 때까지 세조하였다. 前처리된 DEAE Cellulose 부유액을 column에 流入하여 침강시킨 후 시료를 加하고 0.01M PBS 그리고 0.05M NaCl 0.01M PBS로 층체의 불순 단백질을 분리시키고 키고 다음에 0.1M NaCl 0.01M PBS로 赤色の 항원분획을 溶출시켰다. Sephadex G-200 column chromatography를 위해서 증류수에 沈漬시킨 Sephadex G-200 부유액으로 Column을 만들고 Tris-HCl buffer로서 DEAE Cellulose column chromatography에서 분리한 抗原을 다시 여과하였다.

3) 아니사키스유충 항원의 電氣泳動: 정제 항원의 정제상태를 검사하기 위해서 조항원과 비교하여 Davis⁸⁾法에 따라서 영동하였다.

2. 抗血清製造 및 可檢血清

아니사키스유충 및 돼지회충 면역 家兔血清은 각 虫体の 粗抗原 1ml에 同量의 Freund's co-

plete adjuvant를 혼합하여 각각 3頭의 家兔 臍皮内에 分割注射하고 그 후에는 같은 항원을 1주 간격으로 3회에 걸쳐서 背部皮下에 追加注射하였다.

아니사키스유충의 人工感染 家兔血清은 활동성이 강한 아니사키스유충을 家兔 3頭에 각각 20, 40, 80마리를 經口投与한 후 1주 간격으로 13주까지 耳靜脈으로 부터 採血하여 혈청을 분리하였다.

아니사키스유충의 人工感染豚 血清은 仔豚 5頭를 구입하여 4頭에 아니사키스유충을 經口投与하고 나머지 1頭는 대조구로 하였다. 虫体投与前 18일간 米糖 단독사료와 물만을 급여하면서 5일간격으로 3회 分便검사를 실시하여 虫卵이 검출되지 않았다. 사육 16일째 부터 3일간 매일 1회씩 돼지 1頭당 3마리의 신선한 고등어 내장을 급여하였으며 이때 고등어 1마리의 내장에는 활발한 아니사키스유충이 15~20마리가 감염되어 있었다. 虫体投与後 1주 간격으로 13주까지 耳靜脈으로 부터 採血하여 혈청을 분리하였다.

각종 腸内 線虫類의 自然感染豚과 非感染豚에 대해서 採血하여 혈청을 분리하였다.

3. 아니사키스유충의 人工感染 家兔와 돼지의 白血球 檢査

虫体 感染如否를 간접적으로 확인하기 위해서 虫体投与後 1주 간격으로 13주까지 각각 耳靜脈으로 부터 採血하여 白血球의 總數와 白血球의 百分比를 검사하였다.

4. 間接 赤血球 凝集反應

간접 적혈구 응집반응은 Stavitsky²⁶⁾법에 준하였다. 혈구는 緬羊 적혈구를 사용하였으며 1:20,000배의 탄닌산 용액으로 처리한 적혈구에 각 항원을 吸取시켜 반응에 사용하였다. 血清 稀積液(NRS)은 1%의 正常 家兔血清(가토혈

청 1ml + 0.15M phosphate-buffered saline, pH 7.2 99ml에 면양 적혈구를 1ml 가하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 원심분리하여 상층액을 사용하였다.

陽性反應 血清은 아니사키스유충의 粗抗原으로 면역시킨 가토의 抗血清을 사용하였고 陰性反應, 對照血清은 正常 가토혈청과 海産魚 內臟에 接한 일이 없고 數回 分변검사에서 虫卵이 음성인 돼지혈청을 사용하였다.

5. 免疫擴散法

Ouchterlane법에 준하였다. P. B. S. pH 7.2 100ml에 Noble agar (Difco) 1g을 가하고 加熱하여 용해한 후 슬라이드 그라스에 agar-용액을 3ml씩 流入하여 gel-平板을 만들었다. 凝固한후 직경 0.5mm, 孔間의 중심거리가 10mm가 되도록 구멍을 파고 여기에 0.04ml의 항원 또는 혈청을 滴下하였다. 항원과 혈청사이에 沈降線이 形成되었을 때 amido black 10B로 염색하고 1M acetic acid로 탈색하였다.

6. 抗原分析

間接 赤血球 凝集反應과 免疫擴散法을 위한 각 항원의 희석농도를 결정하기 위해서 対応 家兔抗血清을 사용하여 box titration을 실시하였으며 交叉反應 試驗을 위해서는 非対応 家兔抗血清을 사용하였다.

吸收試驗을 위해서는 抗原과 抗血清의 原液을 각각 同量으로 혼합한 후 4℃에서 1夜 방치후 원심분리하여 상층액을 사용하였다.

다. 實驗成績

1. 虫体抗原의 Chromatography.

DEAE Column Chromatography에 의해서 용출된 각 抗原의 分劑의 吸光度를 측정하였을 때 5개의 peak로 분리되었다. 이 중 4번과 5번 劑의 Peak에서 赤色分劑이 出現하였다. (Fig. 1.)

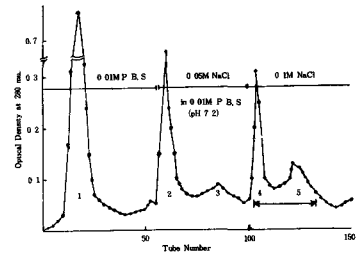


Fig 1. DEAE-cellulose column chromatography (The arrows indicate red fractions which were pooled)

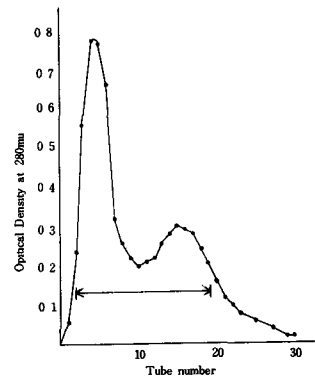


Fig 2. Gel-filtration of sephadex G-200 of fractions separated by DEAE-cellulose (The arrows indicate red fractions which were pooled)

이 赤色분획을 Sephadex G-200 column에 여과하여 각 분획의 吸光度를 측정하였을 때 2개의 Peak로 분리되었다 (Fig. 2.)

2. 虫体抗原의 電氣泳動像

Acrylamide disc gel 전기영동법에 의해서

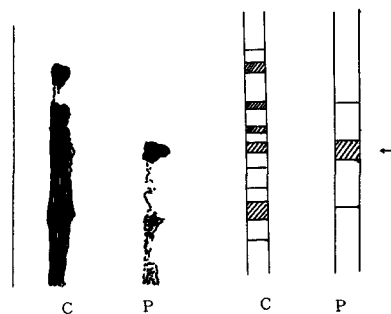


Fig 3 Comparative disc electrophoresis of crude Anisakis antigen (C) and purified Anisakis antigen (P).

Table 1. Two Dimensional Indirect Hemagglutination Tests with the Purified Anisakis Antigen Against Anti-anisakis Rabbit Serum.

Ser-um antigen	Titer								NRS*
	x100	x200	x400	x800	x1600	x3200	x6400	x12800	
x 50	++++	+++	++	+	+	±	-	-	-
x100	++++	++	++	+	+	+	±	-	-
x200	+++	++	++	+	+	+	+	+	-
x400	++	+	+	+	±	-	-	-	-

*NRS : Normal rabbit serum

Anisakis 幼虫의 정제항원의 정제정도를 그 粗抗原과 비교하였을 때 조항원은 9개의 분획으로 분리되었으며 중앙의 강한 帶가 염색전에 적색이 침착한 위치였다 (Fig. 3.)

3. 抗原의 稀積濃度

間接赤血球 凝集反應에 사용할 각 항원의 適正 稀積濃度를 구하기 위해서 box titration을 실시하였다. 抗血清은 아니사키스유충 및 돼지 회충의 粗抗原으로 각각 免疫시킨 家兔血清을 사용하였다. 아니사키스유충과 돼지회충의 조항원은 原液을 1:100으로 희석하였을 때 가장 抗原性이 높았으며 아니사키스 유충의 정제항원은 原液을 1:200으로 희석하였을 때 가장 抗原性이 높았다. 免疫擴散法에서는 모든 항원의 原液을 사용하였을 때 沈降帶가 가장 현저하였다 (Table 1)

4. Anisakis 幼虫 및 豚蛔虫間的 交叉反應

아니사키스유충의 粗抗原과 精製抗原 그리고

돼지회충의 조항원은 각각 対応하는 抗血清에 대한 間接赤血球 凝集價가 각각 1:25,600, 1:12,800, 1:6,400의 抗体價를 나타내었으며 免疫擴散法에서 沈降帶數는 각각 4개, 2개, 4개였다.

非対応 間的 反應에서는 각각 1:600, 1:80, 1:1,600의 항체가 나타내었으며 沈降帶數는 각각 2개, 1개, 2개였다 (Table 2.)

Table 2. Indirect Hemagglutination and Immuno-diffusion Tests with Homologous and Heterologous Antigens Against Ascaris and anisakis Antisera.

Antigens	Antisera			
	Ascaris		Anisakis	
	IHA*	ID**	IHA	ID
Crude Ascaris	6400	++++ #	1600	++
Crude Anisakis	1600	++	25600	++++
Purified Anisakis	80	+	12800	++

* IHA : Indirect hemagglutination

**ID : Immuno-diffusion

± : Number of bands in Immuno-diffusion

Table 3. Two Dimensional Indirect Hemagglutination Test with the Purified Anisakis Antigen Against Anti-ascaris Rabbit Serum.

Ser-um antigen	Titer							NRS*
	x10	x20	x40	x80	x160	x320	x640	
x 50	++	+	+	+	±	-	-	-
x100	+	±	-	-	-	-	-	-
x200	-	-	-	-	-	-	-	-
x400	-	-	-	-	-	-	-	-

*NRS : Normal rabbit serum.

Table 4. Absorption Tests of Anisakis and Ascaris Antisera with Homologous and Heterologous Antigens.

Antisera	Anisakis Crude		Anisakis Purified		Ascaris Crude	
	IHA	ID	IHA	ID	IHA	ID
Anisakis serum absorbed with	25600	++++ #	12800	++	1600	++
Anisakis crude antigen	0	-	0	-	0	-
Anisakis purified antigen	40	-	0	-	20	-
Ascaris crude antigen	80	-	160	+	0	-
Ascaris serum absorbed with	1600	-	80	+	6400	++++
Anisakis crude antigen	0	-	0	-	40	-
Anisakis purified antigen	20	-	0	-	640	+
Ascaris crude antigen	0	-	0	-	0	-

* IHA : Hemagglutination test

** ID : Immuno-diffusion test

± : Number of bands of Immuno-diffusion

間接赤血球凝集反應에서 아니사키스유충의 정제항원은 원액으로 부터 1:100의 희석농도까지는 抗蛔虫血清과 交叉反應이 일어났으나 1:200 이상의 희석농도에서는 交叉反應이 일어나지 아니하였다. (Table 3.)

免疫擴散法에서는 아니사키스유충의 정제항원과 조항원은 각각 1:2, 1:4 이상으로 희석하였을 때 교차반응이 제거되었다.

吸收試驗에서는 아니사키스유충 및 돼지회충의 抗血清을 각각 対応抗原으로 吸收하였을 때 그 抗体價는 완전히 소실되었다. 아니사키스유충 항혈청에 돼지회충의 조항원으로 흡수한 후 間接赤血球凝集反應에서 아니사키스유충의 조항원에 대해서는 1:80의 항체가 남아있었고 정제항원에 대해서는 1:160의 항체가 남아있었다. 免疫擴散法에서는 흡수후에 정제항원에 대해서만 1개의 침강대가 출현하였다.

돼지회충의 항혈청에 아니사키스유충의 조항원으로 흡수하였을 때 間接赤血球凝集反應에서 돼지회충의 항원에 대해서는 1:40의 항체

가가 남아있었고 아니사키스유충의 정제항원으로 흡수하였을 때는 1:640의 항체가 남아있었다. 免疫擴散法에서는 아니사키스유충의 정제항원으로 흡수하였을 때만 対応抗原에 대해서 1개의 침강대가 출현하였다. (Table 4.)

5. 아니사키스유충의 人工感染 家兔와 돼지의 血中抗体價의 消長과 白血球變動

1) 家兔의 抗体價의 消長과 白血球變動: 家兔 3頭に 각각 20마리, 40마리, 80마리의 아니사키스유충을 경구투여 하였을 때 모두 虫体投與後 1주째에 1:20내지 1:40의 間接赤血球凝集價가 검출되었으며 2주 내지 3주째에 각각 1:160, 1:320, 1:1280의 최고 항체가에 달한후 점차적으로 下降하여 10주 부터는 1:10내지 1:20의 항체가를 유지하였다 (Fig. 4). 免疫擴散法에서는 80마리의 虫체를 투여한 가토에서만 虫체투여후 3주째에 1개의 침강대가 검출되었다.

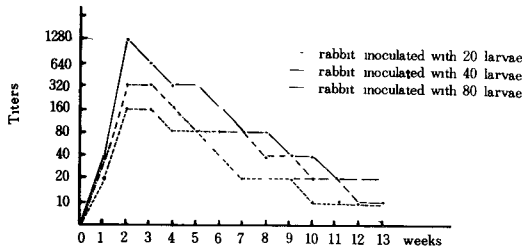


Fig. 4. Changes of indirect hemagglutination titers in rabbits inoculated with *Anisakis* larvae.

白血球의 총수는 총체투여전에 6,400/mm³ 내지 8,300/mm³이었으나 총체투여후 1일째에 20마리, 40마리, 그리고 80마리의 총체를 투여한 가토는 각각 18,500mm³, 22,000/mm³ 그리고 25,000/mm³으로 증가 하였으나 6주 이후부터는 급히

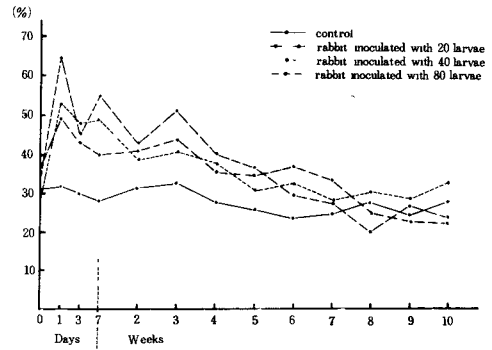


Fig. 5. Changes of pseudoeosinophils in rabbits inoculated with *Anisakis* larvae

下降하여 정상치에 달하였다. 偽好酸球는 총체투여전에 28.1% 내지 37.5%였으나 총체투여 후 1일째에는 각각 49.2%, 53.6%, 그리고 65.4%로 증가한후 불규칙하게 하강하여 8주째부터는 정상치에 달하였다. (Fig. 5.)

Table 5. Indirect Hemagglutination Tests with *Ascaris* and *Anisakis* Antigens Against Pig-sera of Negative Eee.

Pig No.	Antigens	Titer					NRS
		x10	x20	x40	x80	x160	
1	As*	±	±	—	—	—	—
	Pan**	—	—	—	—	—	—
2	As	+	+	+	+	±	—
	Pan	+	±	—	—	—	—
3	As	—	—	—	—	—	—
	Pan	—	—	—	—	—	—
4	As	+	+	±	—	—	—
	Pan	+	±	—	—	—	—
5	As	+	+	±	—	—	—
	Pan	+	+	—	—	—	—
6	As	+	+	+	±	—	—
	Pan	+	+	±	—	—	—
7	As	+	±	—	—	—	—
	Pan	±	—	—	—	—	—
8	As	+	+	±	—	—	—
	Pan	+	±	—	—	—	—
9	As	+	+	±	—	—	—
	Pan	+	±	—	—	—	—
10	As	+	+	+	±	—	—
	Pan	+	±	—	—	—	—

* As : Crude *Ascaris* antigen

**Pan : Purified *Anisakis* antigen

#NRS : Normal rabbit serum

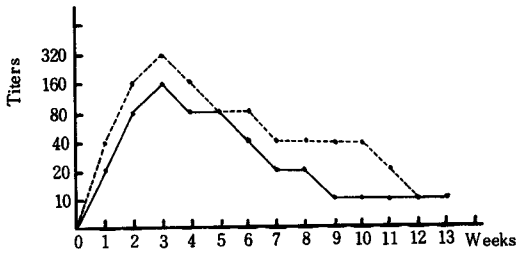


Fig. 6. Changes of indirect hemagglutination titers in pigs inoculated with *Anisakis* larvae.

2) 돼지의 항체가 소장과 白血球變動: 돼지에 아나사키스유충을 경구투여한 4頭중 2頭에서 간접적혈구凝集反應에서만 陽性反應을 나타내었다. 최종 총체투여후 1주째에 1:20 내지 1:40의 항체가 인정되었으며 3주째에 1:160 내지 1:320의 최고치에 달한 후 점차 하강하여 1주째 부터는 1:10을 유지하였다 (Fig. 6.)

白血球의 總數는 총체 투여전에 16,500/mm³ 내지 18,600/mm³이었으나 虫体投與後 2주째에 각각 15,300/mm³, 26,500/mm³으로 최고치에 달한 후 점차적으로 하강하였다.

好酸球의 百分比는 총체 투여전에 약 3.5%

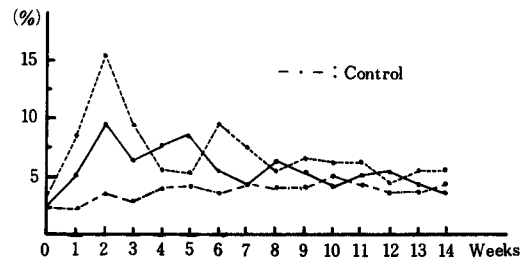


Fig. 7. Changes of eosinophils in pigs inoculated with *Anisakis* larvae.

였으나 최종 총체투여후 1주째에 각각 8.5%, 5.0%였으나 2주째에 15.2%, 9.5%의 최고치에 달하였으며 그 이후에는 급히 하강하여 8주째 부터는 약 5%를 유지하였다. (Fig. 7.)

6) 線虫類의 非寄生豚과 寄生豚의 抗体価: 線虫類 非寄生例과 돼지蛔虫 感染例, 돼지蛔虫과 腸結節虫 感染例, 돼지蛔虫과 腸結節虫 그리고 편충 감염예, 편충 감염예, 그리고 돼지桿虫 감염예에 대해서 각각 돼지회충 粗抗原과 아나사키스유충 精製抗原을 동시에 사용하여 間接赤血球凝集反應을 비교 실시하였다.

非寄生豚 10두중에 돼지회충 조항원에 대한 항체가는 8두에서 1:10 내지 1:80을 나타

Table 6. Indirect Hemagglutination Tests with *Ascaris* and *Anisakis* Antigens Against Pig-sera of Positive Egg.

Pig No.	Species Infected	Antigen	Titer					NRS #
			x10	x20	x40	x80	x160	
	Ascaris	As*	+	±	-	-	-	-
		Pan**	-	-	-	-	-	-
	Ascaris	As	+	+	+	±	-	-
		Esophagostomum	Pan	-	-	-	-	-
	Ascaris	As	+	+	+	±	±	-
		Esophagostomum	Pan	+	±	-	-	-
	Trichuris	As	+	+	+	±	-	-
		Pan	+	+	±	-	-	-
	Strongyloides	As	+	+	+	±	-	-
		Pan	+	+	±	-	-	-

* As : Crude ascaris antigen

**Pan : Purified anisakis antigen

#NRS : Normal rabbit serum

내었고 아니사키스유충 정제항원에 대해서는 1 : 10내지 1 : 20의 항체가를 나타내었다. (Table 5)

한편 선충류 감염된 5두중 돼지회충 조항원에 대해서 모두 양성반응을 나타내었고 그 항체가는 1 : 10 내지 1 : 40이었으며 單一種 虫体 感染豚과 混合 感染豚間에 특별한 차이를 인정할수 없었다. 아니사키스유충 정제항원에 대해서는 3두가 양성반응을 나타내었으며 그 항체가는 1 : 10내지 1 : 20이었다. (Table 6.)

고 찰

鈴木 等^{45, 46)}은 면역전기 영동법에 의해서 아니사키스유충의 항원을 분석하였던바 특이성이 높은 항원이 함유되어 있음은 밝히고 이것을 분리 정제한 결과 충체의 혈색소와 일치하였다고 보고 하였다. 이 정제항원으로 면역시킨 가토혈청에 FITC를 표식한 것을 신선한 충체의 동결절편과 반응시킨 결과 채강에는 강하게 반응하였고 근세포와 소화관 세포에서 약하게 형광을 발한데 비하여 각피에는 전연 형광을 발하지 아니하였다고 보고하였다.

인체 아니사키스증은 면역학적으로 진단하기 위해서 보체결합반응^{23, 57)} 간접형광항체법,²³⁾ 피내반응^{35, 43, 47)} 그리고 Latex응집반응^{35, 37, 53)}이 다양하게 실시된 바 있다. 그리고 가토에 아니사키스유충의 항원으로 면역시킨 후 항체가를 검사하기 위해서 IHA를 실시한 바 있다.⁴⁵⁾ 그러나 돼지 아니사키스증을 위한 면역학적 진단은 시도된 적이 없다.

Jung과 Pacheco¹²⁾는 IHA에 의한 유충내장 이행증을 진단함에 있어서 비특이 반응을 해결하기 위해서 혈청희석 배수 1 : 160 이상에서 일어나는 양성반응만을 인정하였다. Kagan¹³⁾도 유충내장 이행증을 IHA에 의해서 진단할때 회충과의 교차반응을 제거하기 위해서 견회충 항원을 사전에 회충 항혈청으로 흡수시킨후 혈청학적 진단을 실시하였다. Kagan¹⁴⁾등은 포충

증을 IHA에 의해서 진단할때 항원을 비특이 반응이 일어나지 않는 한도까지 희석하여 사용하였다.

아니사키스유충의 정제항원은 돈회충의 항혈청에 대해서 항원 희석배수 1 : 100까지는 교차반응이 일어났으나 1 : 200이상 부터는 일어나지 아니하였다.

그러나 선충류 비기생돈과 각종 장내선충류에 감염된 돈혈청은 대부분의 예에서 정제항원 1 : 200과 1 : 10내지 1 : 40에서 비특이 반응을 나타내었다.

돈회충의 체내이행 시기의 돈혈청은 아니사키스유충의 정제항원에 대해서 양성반응을 일으킬 가능성이 있으나 앞서 돈회충의 유체로서 고도로 면역하여 얻은 가토혈청 (1 : 6,400)에 대해서 아니사키스유충의 정제항원 1 : 200은 교차반응이 일어나지 아니하였고 일반적으로 충체의 자연감염시의 항체가는 인공면역에서 보다 낮기 때문에 아니사키스증의 혈청학적 진단에 돈회충 감염이 장애요인이 되지않을 것이다. 그러나 아니사키스유충의 초기감염과 감염말기에서 항체가가 낮은 시기에는 혈청학적 진단이 곤란한 문제가 있다.

우⁵⁹⁾는 아니사키스유충을 가토에 경구투여한 후 보체결합반응과 면역확산법에 의해서 항체가를 경시적으로 검토하였다. 충체 투여후 1주째에 93.3%(28/30)에서 항체가가 출현하였으며 4~5개월후에는 60%(9/15)에서 음전 하였다. 실험결과와 본 실험에서 가토와 돼지에 대한 아니사키스유충의 경구투여후 검출된 IHA항체가는 시간과 량적인 면에서 대체로 평행하였으나 돼지에서의 항체가는 다소 낮았다.

면역확산법은 Ouchterlony²¹⁾법이 기본원리이나 학자에 따라서 약간의 변법을 이용하고 있다. 본실험에서도 Ouchterlony²¹⁾법을 주로 사용하였으나 Rose와 Bigazzi법²²⁾도 참고하였다. 중체면역 가토혈청과 각 항원간에 출현하는 침강대의 수는 IHA의 항체가와 대체로 비례하였

다.

면역확산법에 의한 교차반응 시험에서 아니사키스유충의 조항원은 원액을 1 : 4로 희석하였을 돈회충 항혈청과 교차반응이 제거되었고 정제항원은 1 : 2로 희석하였을때 교차반응이 제거되었다.

가토와 돼지에 아니사키스유충을 경구투여한 후 2~3주째 IHA항체는 1 : 640내지 1 : 1280일 경우에 침강대가 1개 출현하였다. 그러나 이런 성적은 돼지에서는 없었다. 이 결과를 고찰할때 ID는 IHA보다 민감성이 현저히 낮고 출현하는 침강대수가 소수이므로 항체를 정량적으로 검토하기는 곤란하였다.

3두의 가토에 고등어 복강에서 분리한 아니사키스 유충을 20, 40, 80마리를 경구투여 하였을때 모두 투여후 1주째부터 항체가 검출되었으며 2~3주째에 항체가 가장 높았고 투여충체수에 따라서 대체로 비례하였다. 이러한 결과는 가토에 아니사키스유충을 경구 투여후 CF검사에 의한 우⁵⁹⁾의 실험결과와 대체로 일치하였다.

백혈구의 총수는 충체투여전에 6,400~8,300개(/mm³당)였으나 충체투여 후의 1일째 18,500~25,900개로 최고치에 달하였다. 위 호산구는 28%~37%에서 49%~65%로 급상승한 후에 불규칙하게 하강하였다. 이러한 결과는 松岡⁴²⁾이 가토에 30마리의 아니사키스유충을 경구투여한 후에 백혈구 총수와 위산호산구의 증감을 조사한 결과와 대체로 일치하였다.

충체를 투여한 후에 이것의 감염여부를 확인할 목적으로 가토 1두에 20마리의 유충을 투여한 후에 5일이 지나서 부검한결과 복강과 위에서 5마리의 살아있는 유충을 회수하였다. 그중에 1마리는 복강의 장기 표면에서 활동하였고 3마리는 섬유소성 포낭내에 포위되어서 복강에 유리하였다. 나머지 1마리는 위저부의 점막에 충체의 전반부를 침투시키고 있었고 위저부의 장막에 광범한 출혈소견을 육안으로 볼 수

가 있었다.

고등어 복강에서 수집한 활력이 강한 50마리의 아니사키스 유충을 여러번 돼지에 경구투여하였더니 백혈구의 변동도 없고 항체도 검출되지 않았다. 부검한 결과 충체를 발견할수 없었다.

저항성을 감소시킨 돼지에게 각각 아니사키스 유충을 함유한 내장을 급여하였을때 최종 급여 후 2주째에 백혈구의 현저한 변동이 인정되었고 특히 산호성 백혈구는 대조구에 비해서 6-11% 정도로 증가하였다. 그리고 IHA항체는 3주째에 1 : 160, 1 : 320의 높은 치에 달하였다. 이것은 인공감염 실험이 순조롭게 진행되는 것으로 보였다. 그러나 충체투여후 항체와 산호성백혈구의 감소가 곧 뒤 따랐던 것은 돈체내에 들어간 유충이 단기간에 한해서 공격한 후 사멸된 것으로 판단되었다.

아니사키스 유충의 정제항원으로 간접적혈구 응집반응에 의한 돼지 아니사키스증을 진단할때 1 : 80내지 1 : 160이상의 항체를 양성판정 기준으로 설정한다면 돼지 아니사키스증을 위한 특이성이 인정되는 한 혈청학적 진단법이 될것으로 기대된다.

결 론

돼지 *Anisakis*증을 위한 혈청학적 진단을 시도할 목적으로 DEAE Celluloses 및 Sephadex G-200 Column Chromatography에 의해서 *Anisakis*유충으로부터 항원을 정제하여 抗原성을 분석하고, 돼지에 *Anisakis*유충을 인공 감염시킨후 간접적혈구 응집반응으로 혈중 항체의 소장을 검사하여 돼지 *Anisakis*증의 혈청학적 진단의 가능성을 追求한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. *Anisakis*幼虫의 精製抗原은 原液으로부터 1 : 200의 희석농도 (0.036mg Protein/ml, LOWRY)가 간접 적혈구 응집반응의 적정농도였으며 동시에 이 농도는 豚蛔虫과 교차반응을 일

오키지 아니하였다.

2. 가토와 돼지에 *Anisakis* 幼虫을 경구투여 하였을때 虫体 投與後 2~3주째에 항체가 가장 높았다.

3. 간접적혈구 응집반응에서 *Anisakis* 幼虫의 정제항원 1:200을 사용하여 돼지 *Anisakis* 症을 진단하기 위한 양성판정 경준항체는 1:80 내지 1:160이상이었다

[附記]: 이 研究는 1981年度 文敎部 學術研究 助成費에 의하여 이루어졌음.

《參考文獻》

1. Asami, K., Watanuki, T., Sakai, H., Imano, H. and Okamoto, R. (1965): Two cases of stomach granuloma caused by *Anisakis*-like larval nematodes in Japan. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 14: 119-123.
2. Boyden, S. V. (1951): The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exper. Med.*, 93: 107-120.
3. Bozicevich, J., Tobie, J. E., Thomas, F. H., Hoyem, H. M. and Ward, S. B. (1951): A rapid flocculation test for the diagnosis of trichinosis. *pub. Health Rep.*, 66: 806-814.
4. Cho, S. Y., Chu, J. G., Kim, I. S., Min, Y. Y., Chun, W. C., Son, J. H. and Kim, K. H. (1980): A case of human anisakiasis in Korea. *The Seoul J. Med.*, 21: 203-207
5. Cohen, S. and Sadun, E. H. (1976): *Immunology of parasitic infections* Blackwell Scientific publ. p. 47-161.
6. Davis, E. J. (1960): Disc electrophoresis. *Ann. N. Y. Sci.* 121: 404-427.
7. Engvall, E. and Perlmann, P. (1972): Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti immunoglobulin antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, 109: 129-135.
8. Fishman, A. (1965): Reactivity of latex and complement fixation tests in hydatid disease. *J. Parasit.* 51: 497-500.
9. Garabedian, G. A., Matossian, R. M. and Djanian, A. Y. (1957): An indirect hemagglutination test for hydatid disease. *J. Immunol.* 78: 269-272.
10. Hogarth-Scott, S. (1966): Visceral larva migrans-An immunofluorescent examination of rabbit and human sera for antibodies to the ES antigens of the second stage larvae of *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* (Nematoda). *Immunology*, 10: 217-223
11. Itagaki, S. (1928): A new larval nematode (*Anisakinae*) found in the stomach of swine. *J. Jap. Socie. Vet. Scie.*, 7: 99-102
12. Jung, R. C. and PacheCo, G. (1960): Use of a hemagglutination test in visceral larva migrans. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 9: 185-191.
13. Kagan, I. G. (1958): Hemagglutination tests with *Ascaris* antigens. *J. Immunol.*, 80: 396-699
14. Kagan, I. G. and Barga, U. (1956): Studies on the serology of Trichinosis with hemagglutination, agar diffusion tests and precipitin ring tests. *J. Parasit.* 42: 257-245.
15. Kagan, I. G., Norman, L. and Allan, D. S. (1959): Studies on the serology of visceral larva migrans. I. Hemagglutination and Flocculation tests with purified *Ascaris* antigens. *J. Immunol.*, 83: 297-301.
16. Kagan, I. G., Norman, L. and Allan, D. S. (1960): Studies on Echinococcosis: Serology of crude and fractionated antigens prepared from *Echinococcus granulosis* and *Echinococcus multilocularis*. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 9: 248-261.
17. Kagan, I. G., Pellegrino, J. and Memoria, J. M. P. (1961): Studies on the standardization of the intradermal test for the diagnosis of bilharziasis. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 10: 200-207.
18. Kliks, M. M., Desowitz, R. S., Stemmerman, G. (1981): *Anisakis* nematodes from Hawaiian fish: Survey and mammalian thogenicity studies. *Jap. J. Parasit.*, 30 (suppl): 87.
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. B. and Ranall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 193: 256-275.
20. Oliver-Gonzalez, J., Huribrink, P., Conde, F. and Kagan, I. G. (1969): Serologic activity of antigen isolated from the body fluid of *Ascaris suum*. *J. Immunol.*, 103: 15-19.
21. Ouchterlony, O. (1958): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy.*, 5: 1-78.
22. Rose, N. R. and Bigazzi, P. E. (1980): *Methods in immunodiagnosis*. Wiley Medical publ. p. 65-82.
23. Ruitenber, E. J. (1970): *Anisakis: Pathogenesis, Serodiagnosis and Prevention*. Doctoral thesis, Rijksuniversiteit, Utrecht, Netherlands.
24. Ruitenber, E. J. and Buys, J. (1979): *Trichinella spiralis* infections in pigs. Comparison of homologous passive cutaneous anaphylactic (PCA) reactions with the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet. Parasit.*, 5: 73-78
25. Smith, M. H. and Morrison, M. (1963): Isolation of *Ascaris* haemoglobins. *Biochim. Biophys. Acta*, 71: 364-370.
26. Stavitsky, A. B. (1954): Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and several applications of hemagglutination and hemagglutination-in-

- hibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immunol.*, 72: 360-367.
27. Taffs, L. F. (1964): Immunological studies on experimental infection of pigs with *Ascaris suum* Goeze, 1782. III. The antibody response and acquired immunity. *J. Helminth.*, 38: 129-150.
 28. Van Thiel, P. H. (1962): Anisakiasis. *Parasitology*, 52 (suppl): 16-17.
 29. Van Thiel, P. H., Kuipers, F. C. and Roskany, R. T. H. (1960): A nematode parasite to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop. Geogr. Med.*, 2: 97: 113.
 30. Wittenberg, B. A., Okazaki, T. and Wittenberg, J. B. (1965): The hemoglobin of *Ascaris perenteric* fluid. I. Purification and spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, III: 485-495.
 31. Yokogawa, M. and Yoshimura, H. (1965): Anisakis-like larvae causing eosinophilic granulomata in the stomach of man. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 14: 770-773.
 32. 浅見敬三, 今野宥, 綿貫勲, 酢井元(1963): 肉芽腫症例. *寄生虫学雑誌*, 13: 325.
 33. 芦沢広三, 野坂大, 立山晋, 薄井万平(1973): 豚の胃アニサキス症に関する研究 第2報 寄生部位の肉眼的病変所見に於て. *宮大農報*, 20: 179-189.
 34. 北山晴彦, 大林正土, 佐藤博, 北村之利(1967): イヌにおける, 寄生性肉芽腫に, 関する調査. *寄生虫学雑誌*, 16: 28-35.
 35. 小林昭夫, 熊田三由, 石崎達, 勝呂毅, 小糸賢六郎(1968): アニサキス幼虫体抽出液にうびに同虫体の排せ物, 分泌物抗原による皮内反応, 一般入における皮内反応成績. *寄生虫学雑誌*, 17: 407-413.
 36. 近藤力王至(1979): 寄生虫領域における免疫血清学的診断法について—ラテノワス凝集反応を中心に—*予防医学 オサカ*, 20: 1-10.
 37. 近藤力王至, 吉村裕之, 赤尾信明, 大西義博, 岡本敏小泉勤, 坪田宣之(1979): ラテノワス凝集反応(LA)による幼線虫移行症(VLM)の免疫診断に関する研究. *寄生虫学雑誌*, 18(増刊号): 37.
 38. 近藤力王至, 吉村裕之, 大西義博, 赤尾信明, 坪田宣之, 鈴木俊夫, 石郷岡清基(1980): 廣節裂頭条虫症の免疫血清学的研究(2) ラテノワス凝集反応と酵素抗体法による検討. *寄生虫学雑誌*, 29: 55-59.
 39. 小山力, 小林昭夫, 熊田三由, 小宮義孝, 大島智夫, 影井昇, 石川俊雄, 町田昌昭(1969). 海産魚類 おしひ スルメイカより見出される Anisakidae 幼線虫の形態学的および分類学的検討. *寄生虫学雑誌*, 18: 466-487.
 40. 小山力, 熊田三由, 鈴木博通, 大昭啓, 唐沢洋一, 大林正土, 横川宗雄(1972): *Terranova* 人体感染について, II, 人の胃より見出 *Terranova* sp. 幼虫の形態学的特徴. *寄生虫学雑誌*, 21: 257-261.
 41. 谷口正明(1966): Anisakis の研究 (1) 抗原性. *寄生虫学雑誌*, 15: 502-506.
 42. 松岡義雄(1966): 実験的アニサキス症における血液所見 (Larva migrans の研究 4). *四国医誌*, 22: 556-580.
 43. 森下哲夫, 小林瑞穂, 坂田六郎, 五藤基, 山田稲好, 木神原弘, 三島誠也, 古橋二郎, 平岡義雄, 山田正仁(1965): Anisakis 症の皮膚反応. *寄生虫学雑誌*, 15: 502-506.
 44. 鈴木博通, 大昭啓, 唐沢洋一, 大林正土, 小林力, 熊田三由, 横川宗雄(1972): *Terranova* 人虫感染について. I. *Terranova* 幼虫感染 5 症例の臨床所見. *寄生虫学雑誌*, 21: 252-256.
 45. 鈴木俊夫(1968): アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究 1. 電気泳動法による抗原の分析. *寄生虫学雑誌*, 17: 213-220.
 46. 鈴木俊夫, 白木公, 大鶴正満(1969): アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究 2. 抗原の分離精製. *寄生虫学雑誌*, 18: 232-240.
 47. 鈴木俊夫, 白木公, 関野敏, 大鶴正満, 石倉肇(1970): アニサキス症の免疫学的診断法に関する研究 3. 精製抗原を用いての皮内反応. *寄生虫学雑誌*, 19: 1-9.
 48. 薄井万平, 芦沢広三, 野坂大, 立山晋(1973): 豚の胃アニサキス症に関する研究 3. 精製抗原を用いての皮内反応. *寄生虫学雑誌*, 19: 1-9.
 49. 横川宗雄, 吉村裕之(1963): 胃潰瘍を思わせる寄生性線虫移行症. *千葉医学会雑誌*, 38: 513-518.
 50. 吉村裕之(1966): 人の消化管の好酸性肉芽腫を起因するアニサキス様幼虫移行症に於て. *Minophagen Medical Review*, 11: 105.
 51. 吉村裕之, 赤尾信明, 近藤力王至, 大西義博(1979): アニサキス症の臨床病理学的研究, 特に幼虫の消化管外寄生例に於て. *寄生虫学雑誌*, 28: 347-354.
 52. 吉村裕之, 近藤力王至, 赤尾信明, 大西義博, 渡辺豊七郎, 新野武吉, 相川公太郎(1979): 消化管を穿通したアニサキス幼虫による腹腔(大網および腸間膜)内肉芽腫形成の2例. *胃と腸*, 14: 519-522.
 53. 吉村裕之, 近藤力王至, 大西義博, 赤尾信明, 坪田宣之(1978): 過去三年間の当教室, アニサキス症例の集計—特に臨床病理と免疫診断—*日本医事新報*, 2837: 29-32.
 54. 姜文日, 林鳳鎬, 李政吉(1981): 돼지의 Anisakis 型 虫症에 관한 病理学的 研究. *大韓獣医学誌*, 21: 7-10.
 55. 金鍾煥, 鄭奉熙, 趙商昊, 金承煥(1971): Anisakis sp. 의 人体寄生例 1例報告. *기생충학잡지*, p: 39-42.
 56. 林貞澤(1967): Anisakis 型 幼虫에 관한 研究. I. 濟州道近海産 主要魚種에 있어서 Anisakis 型 幼虫의 寄生狀況調査研究. *大韓獣医学會誌*, 7(부록): 13.
 57. 林貞澤(1975): Anisakis 型 幼虫에 관한 研究. *大韓獣医学會誌*, 15: 293-307.
 58. 文武洪, 郭守東(1981): 돼지 Anisakis 症의 自然發生例. *大韓獣医学會誌*, 21: 45-50.
 59. 우창규(1971): Anisakis 증의 면역학적 진단법. *카톨릭대학교 의학부 論文集*, 20: 155-166.
 60. 田世圭, 鄭富寬, 劉奉錫(1968): Anisakis 類에 관한 研究 1. 各種海産魚類에 있어서의 Anisakis 類 幼虫의 分布. *韓水誌*, 1: 1-6.

Studies on the Serodiagnosis for Swine Anisakiasis

Moon Moo-Hong, D. V. M., M. S

Choi Won-Pil, D. V. M., Ph. D.

College of Agriculture, Gyungpook National University

Abstract

A serological diagnosis for swine anisakiasis was tried out

An antigen (hemoglobin) of *Anisakis* larvae from *Scomber japonicus* was extracted and purified by means of DEAE cellulose and Sephadex G-200 column chromatography.

The antigen was tested its specificity by means of indirect hemagglutination test and gel diffusion test with anti-*Anisakis* rabbit sera, anti-*ascaris suum* rabbit sera and pig sera diagnosed negative egg and positive egg in various intestinal parasites. and the changes of antibody titers on rabbit and pig experimentally infected with *Anisakis* larvae were tested.

The results obtained were as follows:

1. The optimal concentration of the purified *Anisakis* larvae antigen for indirect hemagglutination test was found to dilute as 1:200 from the original solution (7.2mg protein/ml, Lowry) on block titration of the antigens against known positive rabbit serum.

2. The concentrations of the purified *Anisakis* larvae antigen in 1:100 dilution and below gave cross-reaction against anti-*ascaris suum* rabbit serum and was removed the cross-reaction in 1:200 dilution and above.

3. Indirect hemagglutination titers of rabbit and pig sera experimentally infected with *Anisakis* larvae against the purified *Anisakis* larvae antigen were highest at 2nd or 3rd week after administration of the worms and then declined during the period from 5 weeks to 12 weeks.

4. Most pig sera of negative egg and of positive egg in various intestinal nematodes gave indirect hemagglutination titer of 1:10 or 1:20 against the purified *Anisakis* larvae antigen.

5. On the basis of above distribution, a positive criterion titer of swine anisakiasis could be determined as 1:80 or 1:160 and above.