

## 부분정제 폐흡충 항원의 유용성 검토

중앙대학교 의과대학 기생충학교실

김석일 · 강신영 · 조승열

### 서 론

폐흡충증의 면역학적 진단에 있어 폐흡충(*Paragonimus westermani*)과의 계통발생학적 근접종, 특히 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 감염자와 교차반응이 있음은 이미 잘 알려진 사실이다. 이러한 교차반응에 의한 위양성, 위음성반응으로 인해 진단의 신뢰도가 떨어지는 문제를 해결하기 위하여 정제된 폐흡충항원을 이용하려는 노력은 피내반응검사에서 시작되었다.

Veronal buffered saline(VBS) 추출항원을 비롯하여 성충의 산·염기 용해성 단백질 성분(Sadun *et al.*, 1959), 활성 펩타이드(주 및 김, 1965) 등을 정제항원으로 사용하였는데 주 및 김(1965)에 의하면 저분자 펩타이드 항원을 사용할 경우 간흡충감염자와의 교차반응은 감소하지만 항원가의 저하를 동반하게 되어 폐흡충감염자에서 피내반응의 구진 크기(wheal size)가 감소하였다고 하였다.

한편, Yokogawa *et al.* (1962)에 의하여 피내반응이 치유후 20년까지 양성반응으로 나타난다는 사실이 지적되었으며 한편 보체결합반응은 치유된 뒤 3~9개월 후에 음성반응으로 전환되므로 폐흡충증의 현증진단 및 치유판정에 유용하다고 하였다.

또한 면역이중확산법(Yogore *et al.*, 1965; 이등, 1970), 면역전기영동법(Tsuji, 1974; 최등, 1976), 간접형광항체법(최등, 1975; Cho and Soh, 1976) 등의 면역학적 검사법을 이용하여 폐흡충증 진단의 신뢰도를 높여 왔다.

최근 Cho *et al.* (1981)은 폐흡충 성충의 생리식염수 추출액을 항원으로 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)를 적용하여 민감도(sensitivity) 86.0%, 특이도(specificity) 100%의 좋은 성적을 보고하였고, 한편 김등(1983)은 충체의 분비배설액을 항원으로 사용하여 ELISA를 실시하였고, 이등(1982)은 면역이중확산법, 면역전기영동법 및 ELISA를 비교하는 등, 폐흡충증의 혈청학적 진단에 ELISA가 유용하다고 하였다.

또한 양등(1983), 진등(1983)은 간흡충증의 진단에

응용하여 방법의 간편함과 재현성의 우수함을 들어 간흡충증의 면역학적 진단방법으로 ELISA가 가치있다고 보고하였다.

폐흡충 감염자 혈청에서 특이 IgG 항체를 검출하는 위의 보고에서, ELISA는 사용하는 항원의 종류에 따라, 또한 흡광도로 표시하는 양성 기준값을 얼마로 결정하느냐에 따라 진단의 민감도와 특이도가 달라지고 있음을 알 수 있었고, 간흡충 감염자나 건강인 혈청등에서 일부 교차반응, 비특이반응이 일어날 수 있음을, 또한 폐흡충 감염자에서 음성반응으로 나타나는 경우가 있음을 알 수 있었다.

이 실험은 폐흡충증의 면역혈청학적 진단에 사용할 폐흡충 항원을 생화학적으로 분리정제함으로써 폐흡충 항원의 정제가 가능한 것인지, 또한 부분정제한 폐흡충항원의 유용성을 알아볼 목적으로 실시하였다.

### 재료 및 방법

#### A. 항원 제조

사용한 항원은 폐흡충 항원 11가지와 간흡충 항원 1가지로 총 12가지이었다. 생리식염수 추출항원은 Cho *et al.* (1981)의 방법에 따라 제조하고, 생리식염수 추출항원을 단백질 분자량별로 분리하기 위하여 Sephadex G-200 gel column에 통과시켜 부분정제항원을 얻었다. 모든 항원은 냉동건조하였거나 회석하여 단백질 함량을 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 1mg/ml가 되도록 조정하여 다음 실험에 사용할 때까지 -20°C에 냉동보관하였다.

#### 1. 폐흡충 조항원(*P. westermani* whole worm extract=PWWWE)

경기도 강화군 길거리 폐흡충 유행지에서 잡은 가재(crayfish)에서 폐흡충 피낭유충을 분리하고 10kg의 개 2마리에 각각 피낭유충 100개씩을 실험감염시키고 감염 제12주에 도살하여 폐흡충 성충을 얻었다.

회수한 충체를 생리식염수로 3회 세척하여 충체 표면의 이물질들을 제거한 다음, 45마리용 20ml의 생리식염수에 넣고 teflon coated homogenizer로 갈아 충체 균질액을 만들었다. 충체의 생리식염수 균질액을 실온

에서 2시간동안 잘 흔들어 준 다음, 4°C 냉장고에 하룻밤 방치하여 수용성 단백질 성분을 추출하였다. 다음날 4°C에서 10,000×g로 30분간 원침하여 얻은 상층액을 PwWWE로 사용하였다. 45마리의 폐흡충 성충으로 제조한 PwWWE 20ml내의 총 단백질 함량은 64mg이었다.

2. 폐흡충 분비설항원(P. westermani secretory-excretory components=PwSEC)

실험감염시킨 개로부터 회수한 45마리의 폐흡충 성충을 생리식염수로 3회 세척하고 20ml의 인산염 완충액(phosphate buffered saline: PBS, pH 7.5, 0.01M)에 넣고 실온에서 8시간, 36°C 항온기에서 하룻밤 방치하여 충체의 분비물, 배설물을 모아 homogenizer로 균질화하고 초음파기 (LS-75, Branson instruments Inc., USA)로 2 Amp.에서 10분동안 처리한 다음 4°C에서 10,000×g로 30분간 원침하여 상층액을 PwSEC로 사용하였다. 20ml내의 총 단백질 함량은 12mg이었다.

3. 폐흡충 체항원(P. westermani somatic extract =PwSM)

폐흡충 성충 45마리로부터 PwSEC를 만들고 난 충체를 PwWWE제조 방법과 같은 조작으로 처리하여 얻은 것을 PwSM으로 사용하였다. 20ml내의 총 단백질 함량은 40mg이었다.

4. 부분 정제 폐흡충 항원

위 3가지 PwWWE, PwSEC 및 PwSM을 각각 6ml (단백질함량 6mg)씩 1.6×22cm의 Sephadex G-200 gel column(LKB, Sweden)에 주입하고 5ml/hr.의 유속으로 증류수를 흘려 시험관당 1.7ml씩 50개의 분획을 받았다. 각 분획을 받는 동안 UV-monitor(LKB, Sweden)를 이용하여 파장 280nm에서 단백질 분자량에 따른 분포 곡선을 기록하였다. 겔여과의 단백질 분포 곡선에 따라 분자량별로 한데 분획을 모아 농축한 것을 부분 정제 폐흡충 항원으로 사용하였으며 그 종류는 다음과 같다(Fig. 1).

- ① 폐흡충 조항원의 제 1분획 (=PwWWE Fr. 1)
- ② 폐흡충 조항원의 제 2분획 (=PwWWE Fr. 2)
- ③ 폐흡충 조항원의 제 3분획 (=PwWWE Fr. 3)
- ④ 폐흡충 분비설항원의 제 1분획 (=PwSEC Fr. 1)
- ⑤ 폐흡충 분비설항원의 제 3분획 (=PwSEC Fr. 3)
- ⑥ 폐흡충 체항원의 제 1분획 (=PwSM Fr. 1)
- ⑦ 폐흡충 체항원의 제 2분획 (=PwSM Fr. 2)
- ⑧ 폐흡충 체항원의 제 3분획 (=PwSM Fr. 3)

5. 간흡충 조항원(C. sinensis whole worm extract =CsWWE)

간흡충 감염 환자의 담도 수술에서 얻은 간흡충 성충 1.63gm으로 PwWWE 제조 방법에 따라 만든 것을 CsWWE로 사용하였다.

B. 실험 혈청

객담검사에서 폐흡충 충란이 발견된 폐흡충 감염자 10명, 대변검사에서 간흡충 충란이 발견된 간흡충 감염자 10명 및 폐흡충, 간흡충에 감염되어 있지 않은 건강한 10명, 총 30명에서 채혈하여 분리한 혈청을 -20°C에 냉동 보관해 두었다가 실험에 사용하였다.

C. Micro-ELISA 방법

각 항원과 혈청의 ELISA는 Cho et al. (1981)의 방법에 따라 실시하였다.

즉, 평바닥의 polystyrene microtiter plate(Dynatech 제품, USA)를 사용하여 항원을 단백질 함량 5µg/ml이 되도록 carbonate buffer(pH 9.6)에 1:200으로 희석하여 200µl씩 각 well에 넣고 실온에서 하룻밤 방치하여 항원을 부착시켰다. 다음날 아침에 항원액을 버리고 saline/Tween 20으로 3회 수세하고 혈청을 PBS/Tween 20(pH 7.4)에 1:100으로 희석하여 넣고 항온기에서 36°C로 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 혈청액을 버리고 3회 세척한 다음, peroxidase conjugated antihuman IgG (Cappel, USA)를 PBS/Tween 20에 1:2,000으로 희석하여 넣고 36°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 3회 세척한 다음, 기질용액(증류수 99ml+1% 0-phenylenediamine 1ml+6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50µl)을 200µl씩 각 well에 분주하여 넣고 25°C 항온기내에서 30분동안 발색시킨 후, 8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20µl로 반응을 정지시키고 micro-cell을 사용하여 분광광도계(Gilford, USA)로 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험 결과

A. Sephadex G-200 겔여과에 의한 폐흡충 항원의 분리양상

PwWWE를 Sephadex G-200에 통과시킨 결과 3가지 분획으로 분리되었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 제 1분획(=PwWWE Fr. 1), 제 2분획(=PwWWE Fr. 2) 및 제 3분획(=PwWWE Fr. 3)으로 분리되었는데 제 1분획과 제 3분획은 단백질 분자량별 분포 곡선이 예리하였고 제 2분획은 제 3분획앞에서 작은 곡선으로 나타났다. 또한 제 1분획과 제 3분획의 색상이 불투명한 유백색인 반면 제 2분획은 투명한 잿빛을 띄었다. 각 분획의 단백질 함량의 백분율은 제 1분획이 28.0%, 제 2분획이 21.6%, 제 3분획이 50.4%를 차지하고 있었다.

PwSEC의 경우, Fig. 1에서 보는 것처럼 PwWWE의 경우와 비교하여 제 2분획이 나타나지 않은 채 제 1분획(=PwSEC Fr. 1)과 제 3분획(=PwSEC Fr. 3)으로 분리되었다. 이때 제 1분획과 제 3분획의 색상은 불투명한 유백색이었고, PwSEC의 50개 시험관의 분획을 받는 동안 PwWWE의 제 2분획의 색상과 같은 투명한 잿빛을 띤 분획을 발견할 수 없었다. PwSEC의 제 1분획과 제 3분획의 단백질 함량의 백분율은 각

**Table 1.** Results of ELISA between the various antigenic preparations of *P. westermani* and the sera of 10 paragonimiasis cases

Serum No.	Pw-WWE	PwSEC	PwSM	PwWWE Fr. 1	PwWWE Fr. 2	PwWWE Fr. 3	PwSEC Fr. 1	PwSEC Fr. 3	PwSM Fr. 1	PwSM Fr. 2	PwSM Fr. 3	CsWWE
1	*1.35	1.85	0.77	2.07	0.17	0.18	2.39	0.30	1.33	0.19	0.35	0.13
2	1.02	1.91	0.49	1.99	0.23	0.23	2.60	0.33	0.93	0.14	0.27	0.12
3	0.79	1.39	0.42	1.67	0.11	0.14	2.14	0.19	0.74	0.08	0.16	0.07
4	1.25	1.86	0.71	1.89	0.22	0.22	2.29	0.32	1.07	0.19	0.29	0.09
5	0.79	1.43	0.50	1.65	0.15	0.16	1.88	0.22	0.65	0.09	0.12	0.12
6	0.72	1.62	0.50	2.33	0.21	0.20	2.37	0.25	0.87	0.12	0.14	0.15
7	0.59	0.59	0.51	1.57	0.18	0.18	1.15	0.15	0.54	0.12	0.15	0.18
8	0.74	1.24	0.42	1.61	0.20	0.19	1.96	0.22	0.78	0.12	0.18	0.10
9	0.64	1.14	0.33	1.49	0.15	0.19	1.68	0.19	0.64	0.07	0.17	0.09
10	0.38	0.73	0.24	0.93	0.10	0.14	1.31	0.17	0.50	0.05	0.10	0.10
Mean	0.83	1.38	0.49	1.72	0.17	0.18	1.98	0.23	0.81	0.12	0.19	0.12
±S.D.	±0.30	±0.46	±0.16	±0.38	±0.04	±0.03	±0.48	±0.06	±0.25	±0.05	±0.08	±0.03

PwWWE: *P. westermani* whole worm extract  
 PwSEC : *P. westermani* secretory-excretory components  
 PwSM : *P. westermani* somatic extract  
 PwWWE Fr. 1: *P. westermani* whole worm extract, fractions 1  
 PwWWE Fr. 2: *P. westermani* whole worm extract, fractions 2  
 PwWWE Fr. 3: *P. westermani* whole worm extract, fractions 3  
 PwSEC Fr. 1: *P. westermani* secretory-excretory components, fractions 1  
 PwSEC Fr. 3: *P. westermani* secretory-excretory components, fractions 3  
 PwSM Fr. 1: *P. westermani* somatic extract, fractions 1  
 PwSM Fr. 2: *P. westermani* somatic extract, fractions 2  
 PwSM Fr. 3: *P. westermani* somatic extract, fractions 3  
 CsWWE: *C. sinensis* whole worm extract  
 (\*: Absorbance at 492nm)

**Table 2.** Results of ELISA between the various antigenic preparations of *P. westermani* and the sera of 10 clonorchiasis cases

Serum No.	Pw-WWE	PwSEC	PwSM	PwWWE Fr. 1	PwWWE Fr. 2	PwWWE Fr. 3	PwSEC Fr. 1	PwSEC Fr. 3	PwSM Fr. 1	PwSM Fr. 2	PwSM Fr. 3	CsWWE
1	0.04	0.05	0.04	0.13	0.02	0.08	0.11	0.05	0.12	0.04	0.08	0.19
2	0.07	0.06	0.06	0.21	0.02	0.11	0.19	0.07	0.22	0.05	0.07	0.33
3	0.05	0.05	0.04	0.14	0.02	0.10	0.14	0.06	0.19	0.05	0.10	0.13
4	0.06	0.04	0.06	0.17	0.03	0.10	0.15	0.07	0.17	0.04	0.08	0.31
5	0.05	0.04	0.03	0.13	0.03	0.09	0.14	0.09	0.21	0.03	0.08	0.13
6	0.07	0.06	0.06	0.16	0.01	0.05	0.17	0.06	0.17	0.02	0.07	0.34
7	0.08	0.09	0.08	0.24	0.02	0.06	0.22	0.06	0.22	0.02	0.06	0.38
8	0.10	0.09	0.08	0.24	0.02	0.06	0.22	0.06	0.22	0.02	0.06	0.38
9	0.06	0.06	0.06	0.16	0.03	0.05	0.13	0.03	0.13	0.01	0.05	0.28
10	0.06	0.06	0.05	0.15	0.02	0.05	0.14	0.03	0.14	0.02	0.05	0.15
Mean	0.06	0.06	0.05	0.17	0.02	0.08	0.16	0.06	0.18	0.03	0.07	0.25
±S.D.	±0.02	±0.02	±0.01	±0.04	±0.01	±0.02	±0.04	±0.02	±0.04	±0.01	±0.02	±0.09

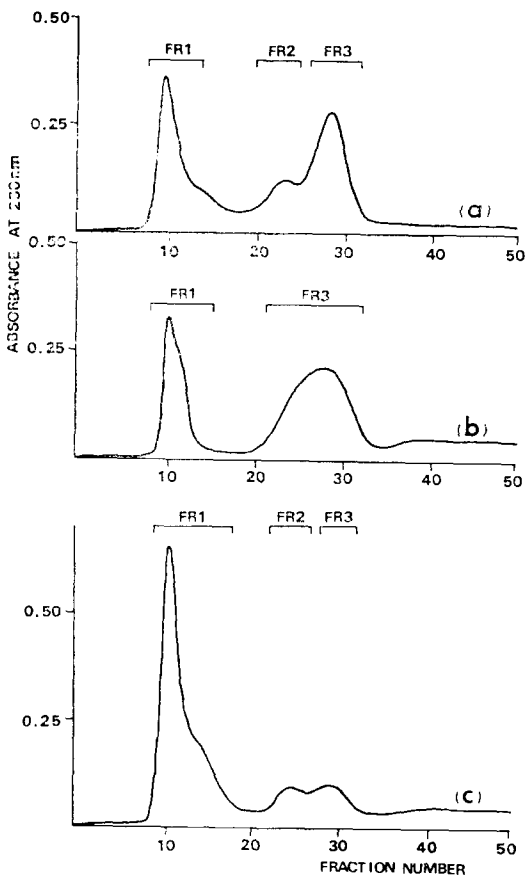
각 14.0%, 86.0%이었다.

PwSM의 겔여과에 의한 분획의 분리 양상은 Fig. 1에서 보는 바와 같이, 예리한 분포 곡선의 제 1분획(=

PwSM Fr. 1)과 작은 폭선모양의 제 2분획(=PwSM Fr. 2)과 제 3분획(=PwSM Fr. 3)으로 분리되었다. 이들 각 분획의 색상은 PwWWE의 각 분획의 색상과

**Table 3.** Results of ELISA between the various antigenic preparations of *P. westermani* and the sera of 10 non-infected cases

Serum No.	Pw-WWE	PwSEC	PwSM	PrWWE Fr. 1	PwWWE Fr. 2	PwWWE Fr. 3	PwSEC Fr. 1	PwSEC Fr. 3	PwSM Fr. 1	PwSM Fr. 2	PwSM Fr. 3	CsWWE
1	0.12	0.05	0.04	0.16	0.04	0.13	0.21	0.14	0.26	0.06	0.11	0.06
2	0.05	0.03	0.02	0.07	0.02	0.07	0.09	0.04	0.10	0.01	0.04	0.04
3	0.07	0.03	0.03	0.12	0.02	0.07	0.11	0.04	0.14	0.01	0.06	0.04
4	0.10	0.05	0.05	0.16	0.03	0.13	0.16	0.08	0.26	0.03	0.10	0.06
5	0.11	0.04	0.04	0.12	0.02	0.10	0.16	0.08	0.23	0.02	0.09	0.06
6	0.07	0.03	0.03	0.10	0.01	0.09	0.08	0.04	0.13	0.01	0.09	0.04
7	0.07	0.03	0.03	0.12	0.03	0.13	0.12	0.06	0.15	0.03	0.08	0.04
8	0.13	0.06	0.06	0.18	0.04	0.14	0.19	0.11	0.24	0.04	0.11	0.07
9	0.07	0.03	0.04	0.12	0.02	0.11	0.12	0.08	0.16	0.02	0.10	0.05
10	0.09	0.05	0.06	0.19	0.02	0.11	0.17	0.09	0.21	0.02	0.09	0.07
Mean	0.09	0.04	0.04	0.13	0.03	0.11	0.14	0.08	0.19	0.03	0.09	0.05
±S.D.	±0.03	±0.01	±0.01	±0.04	±0.01	±0.03	±0.04	±0.03	±0.06	±0.02	±0.02	±0.01



**Fig. 1.** Sephadex G-200 gel filtration of saline extracts of adult *P. westermani*.  
 (a) *P. westermani* whole worm extract (PwWWE)  
 (b) *P. westermani* secretory-excretory components (PwSEC)  
 (c) *P. westermani* somatic extract (PwSM)

일치하였고 단백질 함량의 백분율은 제 1분획이 41.3%, 제 2분획이 38.6%, 제 3분획이 20.1%를 차지하였다.

**B. Micro-ELISA에 의한 각 항원의 반응**

1. 폐흡충 충란 양성자 혈청과의 반응  
 Table 1에서 보는 바와 같이 정제하지 않은 상태의 PwWWE, PwSEC 및 PwSM과 폐흡충 감염자 혈청과 micro-ELISA를 실시하였던 바, 파장 492nm에서의 흡광도의 평균과 표준편차는 각각  $0.83 \pm 0.30$ ,  $1.38 \pm 0.46$  및  $0.49 \pm 0.16$ 이었다.

위의 세 항원을 Sephadex G-200에 통과시켜 부분 정제한 항원과 폐흡충 감염자 혈청과의 반응을 보면, 제 1분획의 경우, PwSEC Fr. 1은 평균흡광도  $1.98 \pm 0.48$ 로 모든 항원중 가장 높았고, PwWWE Fr. 1은  $1.72 \pm 0.38$ 로 두번째로 높았다. PwSM Fr. 1은  $0.81 \pm 0.25$ 로 PwWWE와는 비슷하나 PwSEC보다는 낮았다.

제 2분획의 경우, PwWWE Fr. 2와 PwSM Fr. 2의 평균흡광도는 각각  $0.17 \pm 0.04$ ,  $0.12 \pm 0.05$ 로 모든 항원중 가장 낮았다.

제 3분획의 경우, PwWWE Fr. 3, PwSEC Fr. 3, PwSM Fr. 3의 평균 흡광도는 0.20 내외이었다.

CsWWE와 폐흡충 감염자 혈청과의 반응은  $0.12 \pm 0.03$ 으로 모든 폐흡충 항원의 평균흡광도보다 낮았다.

2. 간흡충 감염자 혈청과의 반응

폐흡충 항원과 간흡충 혈청과의 반응은 Table 2에서 보는 바와 같이, 모든 폐흡충 항원에서는 평균흡광도가 0.03에서 0.18 사이에 있어 CsWWE와 간흡충 감염자 혈청과의  $0.25 \pm 0.19$ 보다 낮았다.

PwWWE Fr. 1, PwSEC Fr. 1 및 PwSM Fr. 1의 평균흡광도는 각각  $0.17 \pm 0.04$ ,  $0.16 \pm 0.04$  및  $0.18 \pm 0.04$ 로 그의 폐흡충항원의 0.03에서 0.07사이의 값보다 높았으며 개별적으로 보면 CsWWE와 간흡충 감염자 혈청과의 반응보다 높게 나타나는 경우도 있었다.

3. 비감염자 건강인 혈청과의 반응

Table 3에서 보는 바와 같이, 폐흡충 항원과 건강인

혈청과의 micro-ELISA 결과는 폐흡충 항원과 간흡충 감염자 혈청과의 반응과 비슷하게 나타났다.

PwWWE Fr. 1, PwSEC Fr. 1 및 PwSM Fr. 1에서의 평균흡광도는  $0.13 \pm 0.04$ ,  $0.14 \pm 0.04$  및  $0.19 \pm 0.06$ 으로 그의 폐흡충 항원의 0.03에서 0.09 사이의 값보다 높았다.

## 고 찰

이중면역확산법에 사용될 폐흡충의 정제된 항원을 얻기 위하여 Sawada *et al.* (1964)은 폐흡충 성충의 생리식염수 추출액을 여지전기영동(paper electrophoresis)과 starch zone electrophoresis로 처리하여 3가지 정제된 분획의 폐흡충 항원을 얻었다. 세 분획중 한 분획에서 면역반응이 높게 나타났고 나머지 분획에서는 반응이 미약하거나 전혀 나타나지 않았다고 하였다.

본 실험에서 폐흡충 성충의 생리식염수 추출액인 PwWWE를 sephadex G-200 column에 통과시켰을 때 제 1분획, 제 2분획 및 제 3분획의 3가지 부분 정제 항원을 얻을 수 있었던 점이나, 항원성을 알아보기 위한 micro-ELISA에서 제 1분획과 폐흡충 감염자 혈청과의 반응이 제 2분획 및 제 3분획에 비하여 월등하게 높았던 점은 Sawada *et al.* (1964)의 결과와 일치하였다.

Yogore *et al.* (1965)은 폐흡충 생리식염수 추출액과 성충의 분비배설물을 항원으로 사용하여 이중면역확산법과 면역전기영동을 실시하였다. 그 결과 분비배설항원내에서 항원성이 있는 것으로 간주되는 성분은 생리식염수 추출액내에서 발견된다고 하였고, 폐흡충 성충의 분비물, 배설물이 숙주의 항체생성장소에 도달하여 특이 항체가 형성될 것이라고 보고하였다.

본 실험에서 분비배설항원(PwSEC)의 조성이 생리식염수 추출액인 조항원(PwWWE)의 조성에 준하고 있음을 Sephadex G-200 겔여과 양상을 통해 알 수 있었던 점이나, 분비배설항원(PwSEC)이나 특히 그 제 1분획(PwSEC Fr. 1)에서 특이 IgG 항체와 반응하는 정도가 월등하였던 점 등은 위의 Yogore *et al.* (1965)의 결과를 뒷받침해 주는 결과라 생각된다.

다만 항원성이 높은 분비배설항원의 제 1분획(PwSEC Fr. 1)이 충체포피층의 분비체(secretory body)나 탈락포피세포 등의 충체포피에서 빠져 나오는 분비물에 해당할 것인지, 그렇지 않고, 장관 내용물, 충란 및 배설계에서 빠져 나오는 대사물질들의 관(duct)을 통해 충체 밖으로 나올 배설물에 해당되는지, 또는 분비물이나 배설물에 공통적으로 포함될 것인지에 대해서는 앞으로 확인을 하여야 할 것이다.

여러 폐흡충 항원의 micro-ELISA 결과에서 보면, 특이 IgG 항체를 검출하는 ELISA에 이용할 적합한 항원은 폐흡충 감염자 혈청에서는 특이 IgG 항체와 결합할 때 면역반응이 높게 나오고, 간흡충 감염자나 비감염자인 건강한 혈청과는 반응이 거의 없는 항원이어야 한

다고 할 때, 폐흡충 조항원(PwWWE)보다 분비배설항원(PwSEC)이 더 적합한 항원인 것으로 나타났다.

그러나 12주 폐흡충 성충 45마리에서 얻어지는 분비배설항원의 단백질 함량은 12mg 정도로 조항원의 64mg에 비해 매우 낮아 항원 제조의 어려움이 있다. 또한 Cho *et al.* (1981)은 폐흡충의 생리식염수 추출액 즉 조항원을 사용하여 폐흡충 충란 양성자에서의 반응과 간흡충 감염자나 건강한인에서의 반응을 검토하여 양성 반응의 기준값을 흡광도 0.25에서 결정하여 민감도와 특이도를 다 같이 높일 수 있었다고 보고한 바 있다.

다만 폐흡충의 생리식염수 추출액을 제조함에 있어 충체의 분비배설물이 되도록 빠져 나가지 않도록 처리해야 할 것으로 생각된다. 왜냐하면 분비배설물이 빠져나간 채항원(PwSM)의 경우 조항원(PwWWE)에 비해 특이 IgG 항체와 결합하는 항원성이 1/2정도로 감소되는 것으로 본 실험 결과 나타났기 때문이다.

Sephadex G-200 겔여과에 의한 부분 정제 폐흡충 항원중에서 폐흡충 조항원의 제 1분획(PwWWE Fr. 1)과 분비배설항원의 제 1분획(PwSEC Fr. 1)의 항원성은 정제되지 않은 조항원(PwWWE)에 비해 크게 증강되었다. 즉, 폐흡충 감염자 혈청과의 ELISA에서 특이 IgG 항체를 검출하는 능력이 2~3배 높게 나타났다. 또한 이러한 부분 정제 폐흡충 항원의 반응 감도는 PwWWE를 사용하여 낮은 흡광도 즉, 낮은 특이 IgG 항체가를 보인 폐흡충 감염자에서 높은 항체가를 보인 경우보다 더욱 증강된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 의심되는 폐흡충증 환자임에도 불구하고 항체가 떨어져 있는 사람에서 정제되지 않은 항원을 사용함으로써 비롯될 수 있는 위음성 반응이 정제항원을 사용하여 제거될 수 있고, 아울러 진단의 신뢰도를 높일 수 있다는 점에서 PwWWE Fr. 1, PwSEC Fr. 1의 유용성이 기대된다.

Kim *et al.* (1982)의 보고에 의하면 실험적 폐흡충 감염 개에 있어서 감염 경과에 따른 ELISA에 의한 혈청내 특이 IgG 항체가는 감염 제 3주부터 상승하기 시작하여 감염 제 12주에 최고에 이르고 관찰했던 15주까지 그대로 지속되는 양상을 보인다고 하였다. 또한 감염 제 8주 이후에 ELISA 양성 범위에 든다고 하였다. 숙주가 다르긴 하지만 폐흡충 조항원을 사용한 위의 결과는 인체 폐흡충 감염 초기에 있어 면역진단의 난점을 예상케 하는 결과이다. 낮은 특이 IgG 항체가를 민감하게 검출하는 폐흡충 정제항원을 이용함으로써 이러한 진단의 어려움을 해결할 수 있을 것으로 생각된다.

정제항원이 비단 민감도가 높다고 하여 그 이용가치가 반드시 높다고만 생각할 수 없는 것은 정제항원의 기본목적이 교차반응이나 비특이반응을 제거하는 데 있기 때문이다. 부분 정제된 폐흡충 항원의 제 1분획에서 간흡충 감염자나 건강한 혈청과의 반응이 그의 폐흡충 항원들의 반응보다 유의하게 높게 나타난 점은 의미있는 사실이다. 세가지 정제된 제 1분획들에 있어 폐

흡충 감염자 혈청과의 반응을 보면, PwSEC Fr. 1, PwWWE Fr.1, PwSM Fr. 1의 순으로 같은 제 1분획이지만 흡광도에 있어 크게 차이가 있었다. 반면 간흡충 감염자나 건강인 혈청과의 반응은 세가지 제 1분획에서 차이가 없었는데 오히려 PwSM Fr. 1에서 약간 높게 나타났다.

위의 결과에서, 정제된 제 1분획과 간흡충 감염자 혈청과의 반응이 폐흡충 특이 항원과 간흡충 항체와의 교차반응이라고 한다면 폐흡충 감염자 혈청과의 반응에서 관찰되었던 세가지 제 1분획들에 있어서의 현저한 차이가 간흡충 감염자 혈청과의 반응에서도 나타났어야 할 것이다.

이런 점을 생각할 때, 정제된 제 1분획내의 폐흡충 특이 항원이 교차반응 또는 비특이 반응을 나타내는 것인지 그렇지 않고 폐흡충 특이 항원외의 공통분포적인 또다른 항원물질이나 항원구조에 의한 반응인지에 대해 앞으로 추구할 필요가 있다고 생각된다.

Hillyer and Serrano(1983)는 간질(*Fasciola hepatica*)과 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*) 사이에는 공통항원이 있고 이 공통항원은 폐흡충 조항원(PwWWE)내에도 존재함을 증명하였다. 이 세가지 흡충류 사이의 공통항원은 표피항원(tegument antigens)에 속한다고 하고, 폐흡충 조항원을 실험동물에 면역시킴으로써 만손주혈흡충의 감염 총체수를 줄일 수 있다고 보고하였다.

앞으로 폐흡충의 표피항원에 대한 연구가 뒷받침되고 affinity chromatography 등 다른 생화학적 방법에 의한 항원정제와 정제항원의 성상을 밝힘으로써 본 실험에서 부분 정제하여 얻은 폐흡충 조항원, 분비배설항원의 제 1분획은 폐흡충증의 면역혈청학적 진단용 항원으로 또는 면역용 항원으로 이용될 수 있을 것이다. 또한 폐흡충증 환자의 혈청내 특이 항원을 검출하려 한다면 좋은 항원이 될 수 있을 것으로 판단된다.

### 결 론

폐흡충증의 면역혈청학적 진단에 이용할 폐흡충 항원을 정제할 목적으로 폐흡충 성충의 조항원(PwWWE), 분비배설항원(PwSEC), 체항원(PwSM)과 겔여과법으로 부분적으로 정제한 분획을 가지고 폐흡충 총단 양성자, 간흡충 감염자 및 비감염자인 건강인 혈청과 micro-ELISA를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 폐흡충 성충의 세가지 추출액을 Sephadex G-200 column에 통과시켰을 때 조항원 및 체항원은 제 1, 2, 3 분획으로 분비배설항원은 제 2 분획이 나타나지 않은 제 1, 3 분획으로 분리되었다. 각 분획의 단백질 함량의 백분율은 조항원의 경우 28.0%, 21.6%, 50.4%, 체항원은 41.3%, 38.6%, 20.1%, 분비배설항원은 14.0%, 0%, 86.0%로 나타났다.

2. 각 항원과 폐흡충 총단 양성자 혈청과의 micro-

ELISA 결과, 분비배설항원의 제 1 분획이 특이 IgG 항체를 검출하는 항원성이 가장 높았고 다음이 조항원의 제 1 분획, 분비배설항원, 조항원 순으로 평균 흡광도는 각각 1.98, 1.72, 1.38 및 0.83이었다. 제 2, 3 분획은 0.20으로 항원성이 미약하였다.

3. 각 폐흡충 항원과 간흡충 감염자 혈청과의 반응은 전반적으로 미약하였고, 세가지 제 1 분획은 평균 흡광도 0.17로 그밖의 항원들의 0.06에 비해 높았다.

4. 비감염자 건강인 혈청과의 반응은 간흡충 감염자 혈청과의 반응과 비슷하였다.

이상의 결과에서 폐흡충 조항원, 분비배설항원의 제 1 분획의 부분 정제 폐흡충 항원이 폐흡충증의 특이 IgG 항체를 검출하는 항원성이 월등함을 알 수 있었고 폐흡충증의 면역학적 진단용 항원으로 유용하다고 생각되었다.

(이 연구의 생화학적 측면을 도와주신 중앙의대 생화학교실 이희성부교수, 권년수선생, 이동욱선생께 감사드리고 논문원고를 다듬어 주신 중앙의대 미생물학 교실 양용태교수님께 역시 감사드립니다.)

### 참 고 문 헌

Cho, K.M. and Soh, C.T. (1976) Indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of paragonimiasis and clonorchiasis. *Yonsei Reports Trop. Med.*, 7: 26-39.

Cho, S.Y., Hong, S.T., Rho, Y.H., Choi, S.Y. and Han, Y.C. (1981) Application of micro-ELISA in serodiagnosis of human paragonimiasis. *Korean J. Parasit.*, 19: 151-156.

최원영, 木村公彦, 辻守康(1976) 실험적 페디스토마증의 구충효과 판정을 위한 면역전기영동법. *기생충학잡지*, 14: 94-102.

최원영, 이원구, 이옥란(1975) 간접형광 항체법에 의한 페디스토마증의 진단법 연구. *기생충학잡지*, 13: 152-158.

주 일, 김기승(1965) 디스토마 항원의 정제에 관한 연구 제 1보. 페디스토마 항원의 정제. *가톨릭대학교 의학부 논문집*, 9: 153-158.

Hillyer, G.V. and Serrano, A.E. (1983) The antigens of *Paragonimus westermani*, *Schistosoma mansoni*, and *Fasciola hepatica* adult worms: Evidence for the presence of cross-reactive antigens using antigens of *Paragonimus westermani*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32: 350-358.

진성원, 이준상, 임한중(1983) 간흡충 및 폐흡충증에 있어서 면역동물 혈청을 이용한 ELISA법과 Ouchterlony법의 비교 연구. *고려대학교 의과대학 논문집*, 20: 191-199.

Kim, C.H., Kim, S.I. and Cho, S.Y. (1982) Serolo-

- gical reactions in early stage of experimental paragonimiasis in dog. *Chung-Ang J. Med.*, 7 : 335-347.
- 김동찬, 이은영, 이종수, 안순애(1983). 폐흡충증의 면역진단: 분비배설 항원에 의한 ELISA 시험. 기생충학잡지, 21 : 130.
- 이옥란, 최원영, 장재경(1982) 폐흡충 피내반응 양성자에 대한 Cuchterlony 반응, Counterimmunoelectrophoresis 및 ELISA 반응의 비교검토. 기생충학잡지, 20 : 223.
- 이은영, 横川宗雄, 辻守康(1970) 수종의 혈청학적 분석에 의한 폐흡충 감염혈청의 항체 측정에 관한 연구. 국립보건연구원보, 7 : 307-321.
- Lowry, C.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 256-277.
- Sadun, E.H., Walton, B.C., Buck, A.A. and Lee, B. K. (1959) The use of purified antigens in the diagnosis of clonorchiasis sinensis by means of intradermal and complement fixation tests. *J. Parasit.*, 45 : 129-134.
- Sawada, T., Takei, K. and Yoneyama K. (1964) Studies on the immunodiagnosis of paragonimiasis. I. The precipitin reaction with crude and fractionated antigens. *J. Inf. Dis.*, 114 : 311-314.
- Tsuji, M. (1974) On the immunoelectrophoresis for helminthological researches. *Japanese J. Parasit.*, 23 : 11-21.
- 양정성, 이준상, 일한종(1983) 간흡충증 진단에 있어서 ELISA법의 응용에 관한 연구. 고려대학교 의과대학 논문집, 20 : 201-209.
- Yogore, M.G., Lewert, R.M. and Madraso, E.D. (1965) Immunodiffusion studies on paragonimiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14 : 586-591.
- Yokogawa, M., Tsuji, M. and Okura, T. (1962) Studies on the complement fixation test for paragonimiasis as the method of criterion of cure. *Japanese J. Parasit.*, 11 : 117-122.

—Abstract—

**On the Applicability of Partially Purified Antigenic Preparations  
of *Paragonimus westermani***

Suk-Il Kim, Shin-Yong Kang and Seung-Yull Cho

*Department of Parasitology, College of Medicine,  
Chung-Ang University, Seoul 151, Korea*

In order to obtain more specific antigenic preparation for the diagnosis of human paragonimiasis, crude saline extract of whole worm (=PwWWE), secretory-excretory components (PwSEC) and secretion-excretion-free somatic extract (PwSM) of 12 week-old *Paragonimus westermani* were filtrated through Sephadex G-200 gel column.

The adult *Paragonimus* worms were obtained from experimentally infected dogs. A total of 11 antigenic solutions was lyophilized or diluted to adjust protein content of 1mg/ml.

To evaluate the antigenicity of crude antigens and fractions, micro-ELISA was done with the sera from *P. westermani* infected cases, *C. sinensis* infected cases and non-infected control cases to detect *Paragonimus* specific IgG antibody.

The results were as follows:

1. When the PwWWE was filtrated through Sephadex G-200 gel, it was separated into three fractions; PwWWE Fr. 1, PwWWE Fr. 2 and PwWWE Fr. 3. The percentage of protein content was 28.0%, 21.6% and 50.4% respectively.

The PwSM was also separated into three fractions; PwSM Fr. 1, PwSM Fr. 2, PwSM Fr. 3. and their percentage of protein content was 41.3%, 38.6% and 20.1%.

However, the PwSEC showed different fractionation pattern; *i.e.* fraction 1 (=PwSEC Fr. 1) and 3 (PwSEC Fr. 3) without fraction 2. The percentage of protein content was 14.0% in PwSEC Fr. 1 and 86.0% in PwSEC Fr. 3.

2. When the antigenicity of each *Paragonimus* crude antigen and fractionated antigen was evaluated for specific IgG antibody by micro-ELISA in 10 human paragonimiasis sera, PwSEC Fr. 1 was the most potent antigen showing the mean absorbance 1.98. The PwWWE Fr. 1, PwSEC, PwWWE were next to that; their mean absorbance were 1.72, 1.38 and 0.83 respectively. The antigenicity of fractions 2 and 3 was much weaker in binding specific IgG antibody.

3. When the antigens were reacted in micro-ELISA with 10 human clonorchiasis sera, most antigens showed weak reactivity. Each fraction 1 of crude antigens reacted higher than other fractions or crude antigens; the mean absorbance was 0.17 in fraction 1, but in others the absorbances were about 0.06.

4. With non-infected control sera, the result of micro-ELISA revealed almost same pattern with those of the clonorchiasis sera.

From the above results, it became apparent that PwWWE Fr. 1, especially PwSEC Fr. 1 was the most potent antigen reacted with *Paragonimus* specific IgG antibody.