기생충학잡지 제24권 제2호
The Korean Journal of Parasitology
Vol. 24, No. 2, 177-186, December, 1986

肺디스토마(*Paragonimus westermani*) 感染 고양이 血淸에 對한 ELISA 抗體價의 意義*

가톨릭大學 附設 가톨릭寄生蟲病硏究所
崔源永 · 劉載乙 · 南皓祐 · 崔亨洛

緖 論

肺디스토마(*Paragonimus westermani*) 感染時에 臨床症狀의 特異性이 낮고 喀痰이나 糞便에서 蟲卵檢出率이 낮은 事實은 Chang등(1958) 및 Yun등(1960)에 依해서 잘 알려져 있다. 또한 X-線에 依한 診斷도 肺部 肺디스토마症의 경우 肺結核과 混同되는 例들이 많았다(朱, 1960; Kim등, 1964). 特히 異所寄生의 경우에는 上記의 方法들이 조금도 도움이 될 수 없다. 따라서 肺디스토마症에서는 免疫血淸學的 診斷法이 不可缺한 方法이다.

免疫血淸學的 診斷法中 皮內反應은 特異性이 낮으므로 集團檢査에서 screening하는데는 意義가 있으나 個人의 診斷方法은 되지 못한다. 따라서 오래전부터 補體結合反應, 寒天二重擴散法, 間接螢光抗體法, 免疫電氣泳動法 등이 開發되어 肺디스토마症의 診斷에 利用되어 왔다. 最近에는 免疫酵素診斷法(ELISA)이 Engvall과 Perlmann(1971)에 依하여 紹介된 후 各種寄生蟲疾患에 利用되고 있는데 肺디스토마症에의 利用도 시도되고 있다. 그런데 大部分의 免疫血淸學的 診斷에서 抗原으로 寄生蟲의 抽出物, 即 粗抗原을 使用하면 分類學的으로 近緣에 있는 寄生蟲症과 交叉反應을 일으키는 경우가 많다. 이는 檢査方法의 特異度와 敏感度를 낮추어 僞陽性反應과 僞陰性反應을 나타냄으로써 診斷의 信賴度를 低下시키게 된다. 이 問題를 解決하기 爲하여는 寄生蟲의 構成成分을 分析하고 他寄生蟲과의 共通抗原을 除去하여 特異抗原만을 使用하는 것이 바람직하다. 그러나 蠕蟲類의 경우 蟲體를 構成하고 있는 蛋白質 成分이 매우 複雜하므로 特異抗原만을 分離하는 데는 어려움이 많다.

本 硏究는 實驗的으로 肺디스토마 被囊幼蟲을 感染시킨 고양이에서 感染强度와 感染經過 및 praziquantel로 治療한 後의 免疫酵素抗體法에 依한 抗體價의 變動을 檢討하고자 하였으며 特히 肺디스토마의 抗原을 몇가지 生化學的 方法으로 分劃하여 精製抗原으로서의 有意性을 究明하고자 하였다.

* 本 論文은 1985年度 文敎部 學術硏究造成費의 支援으로 이루어졌음.

實驗材料 및 方法

1. 肺디스토마 粗抗原

江原道 양양郡 어성전里에서 採集한 참가재(*Cambaroides similis*)에서 肺디스토마의 被囊幼蟲(metacercaria)을 分離하여 개 및 고양이에게 經口投與하고 6個月後에 肺디스토마 成蟲을 回收하였다. 이들 成蟲은 生理食鹽水와 蒸溜水로 數回 洗滌하고 20mM Tris buffer(pH 7.4)에서 均質化(homogenization)시킨 後, 10,000*g*로 4°C에서 1時間 遠心分離하여 上淸液을 肺디스토마 粗抗原(crude antigen)으로 使用하였다.

2. 抗原의 分劃

i) Ammonium sulfate 沈澱法

肺디스토마 粗抗原 溶液에 適當量의 ammonium sulfate를 加하여 50% ammonium sulfate溶液이 되게 한 後 18,000*g*로 20分間 遠心分離하여 沈澱物을 分離하였다. 上淸液(50% ammonium sulfate溶液)에 다시 適當量의 ammonium sulfate를 添加하여 65% 溶液으로 만들고 다시 遠心分離하였으며, 이와 같은 方法으로 80% 및 90% ammonium sulfate 溶液으로 만들어 沈澱物을 各各 分離해 내었다. 이 沈澱分劃들은 20mM Tris buffer(pH 7.4)에서 24時間 透析(dialysis)하여 ammonium sulfate를 除去하였다.

ii) Ion exchange chromatography

Anion exchanger인 DEAE-cellulose를 20mM Tris buffer(pH 7.4)에서 使用하였다. 0.5M NaCl溶液으로 0~0.5M NaCl의 鹽濃度구배(salt gradient)를 만들어 試料를 流出시켰는데 2.5ml씩 分劃하였으며 各 分劃의 蛋白質 濃度는 Lowry法을 利用하여 測定하였다.

iii) Gel permeation

20mM Tris buffer(pH, 7.4)에서 Sephadex G-200 gel을 使用하여 試料를 5ml씩 分劃하였고 各分劃의 蛋白質 濃度는 Lowry法으로 決定하였다.

iv) SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis

各 分劃過程의 確認 및 分劃들의 蛋白質 構成과 分子量을 알아보기 爲하여 7.5% acrylamide slab gel을 만들어 分劃들을 電氣泳動하였다. 室溫에서 30mA의 一定한 電流下에 泳動하였으며 silver염색(Merril등, 1981)을 하여 觀察하였다. 이때 Myosin(205K dalton),

β-galactosidase(116K dalton), phosphorylase(97K dalton), bovine albumin(66K dalton), egg albumin(45K dalton) 및 carbonic anhydrase(29K dalton)을 함께 電氣泳動하여 分子量을 決定하는데 使用하였다.

3. 實驗 動物

體重 2kg내외의 健康한 고양이를 各 10마리씩 4群으로 나누어서 肺디스토마의 被囊幼蟲을 60個(60mc群), 30個(30mc群), 15個(15mc群) 그리고 5個(5mc群)씩 經口投與하였다. 各 群마다 5마리는 被囊幼蟲을 感染시키고 150日 後에 praziquantel(Embay 8440, Biltricide®)을 100mg/kg의 容量으로 2回 1日間 投與하였고, 다른 5마리씩은 投藥하지 않았다.

모든 고양이에서 被囊幼蟲 感染前 및 感染後 10日間隔으로 300日間, 30回 採血하여 血淸을 分離하였고 그후 고양이를 屠殺하여 肺디스토마의 感染樣相과 治療樣相을 肉眼的으로 觀察하였다.

4. 免疫酵素抗體法(ELISA)

免疫酵素抗體法(ELISA)은 McLaren등(1978)과 Voller등(1979)의 方法을 약간 修正하여 使用하였다.

肺디스토마의 粗抗原과 分劃抗原들은 0.05M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)로 2 μg/ml의 濃度로 만들어 使用하였고 實驗血淸은 Tween 20을 添加한 0.01M phosphate buffered saline(pH 7.4)으로 100倍 稀釋하여 使用하였다. 抗原 分劃過程에서 檢定을 爲한 陽性血淸은 60個의 肺디스토마 被囊幼蟲을 感染시킨 고양이의 240日後 血淸을, 陰性血淸은 正常 고양이의 血淸을 利用하였는데 역시 100倍 稀釋하여 使用하였다. Alkaline phosphatase conjugated anti-cat goat IgG는 Tween 20을 添加한 0.01M phosphate buffered saline (pH 7.4)로 1,000倍 稀釋하였고 基質은 $MgCl_2$를 0.5 mM로 添加한 10% diethanolamine buffer(pH 9.8)에 1mg/ml의 濃度가 되도록 p-nitrophenyl phosphate를 녹여서 使用하였다.

成 績

1. 抗原의 分劃

1) Ammonium sulfate에 依한 抗原分劃

肺디스토마 粗抗原을 0~50%의 ammonium sulfate 濃度에서 沈澱한 分劃(PA1), 51~65%의 濃度에서 沈澱한 分劃(PA2), 66~80%의 濃度에서 沈澱한 分劃(PA3), 81~90%의 濃度에서 沈澱한 分劃(PA4), 그리고 90% 以上의 ammonium sulfate 濃度에서 沈澱하지 않은 分劃(PA5)으로 나누었다. 이들 各 分劃들과 陽性血淸사이의 ELISA값은 PA1 分劃이 0.532, PA2 分劃이 0.570으로 粗抗原의 0.344보다 높았고 PA3 分劃은 0.298이었으며 PA4와 PA5 分劃은 各各 0.164와 0.086으로 매우 낮았다. 그리고 陰性血淸과의 ELISA값은 모두가 0.1 未滿의 매우 낮은 값을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Absorbance values of ELISA for fractionated antigens by ammonium sulfate differential precipitation

Antigen	positive serum	negative serum
Crude Antigen	0.344	0.025
PA1 fraction	0.532	0.071
PA2 fraction	0.570	0.071
PA3 fraction	0.298	0.057
PA4 fraction	0.164	0.032
PA5 fraction	0.086	0.014

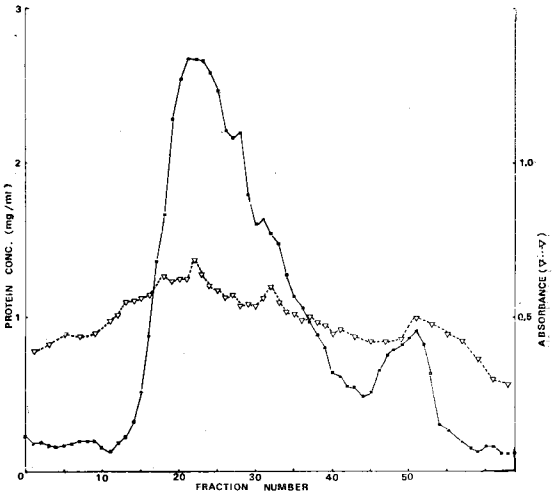

Fig. 1. Elution profile of PA1 (precipitated by 0~50% ammonium sulfate from crude antigen of *P. westermani*) through DEAE-cellulose column and absorbance of ELISA for its fractions against a reference positive serum.

2) Ion exchange chromatography

PA1, PA2 및 PA3 分劃들을 DEAE-cellulose column에 通過시켰다. 그 結果 PA1 分劃은 0.06M NaCl 濃度에서 蛋白質이 遊離되기 始作하여 0.35M NaCl까지 大部分의 蛋白質이 流出되었으며 各 分劃들의 陽性血淸에 對한 ELISA값은 0.446~0.688 사이에 分布하고 있었다(Fig. 1). 그리고 PA2 分劃 및 PA3 分劃은 各各 0.06M~0.23M NaCl과 0.15~0.37M NaCl 濃度下에서 蛋白質의 大部分이 流出되었으며 ELISA값은 PA1 分劃에서와 같이 大部分의 分劃들에서 높은 값을 나타내었다(Fig. 2와 Fig. 3).

3) Gel permeation

PA1, PA2 및 PA3 分劃들을 DEAE-cellulose column에 通過시켜 얻은 分劃들 중 PA1은 26번~44번(PA1'), PA2는 32번~41번(PA2') 그리고 PA3은 29번~42번까지의 分劃들(PA3')을 모아서 各各 Sephadex G-200 column을 通過시켰다.

Sephadex G-200 gel을 通過한 PA1'는 分子量이 높

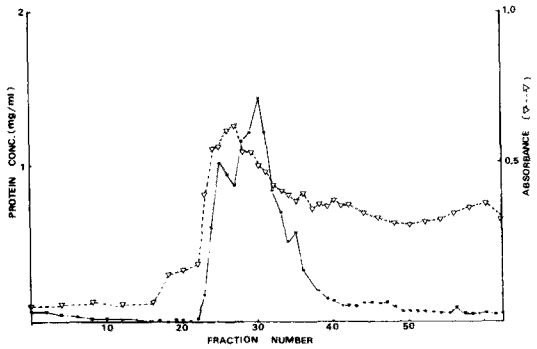

Fig. 2. Elution profile of PA2 (precipitated by 51~65% ammonium sulfate from crude antigen of *P. westermani*) through DEAE-cellulose column and absorbance of ELISA for its fractions against a reference positive serum.

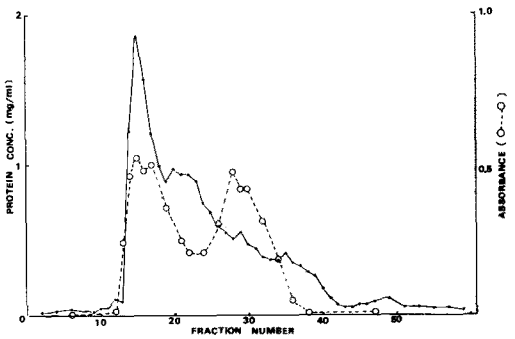

Fig. 4. Elution profile of PA1′ through Sephadex G-200 gel and absorbance of ELISA for its fractions against a reference positive serum. PA1′ is the fraction which is filtered PA1 through DEAE-cellulose column.

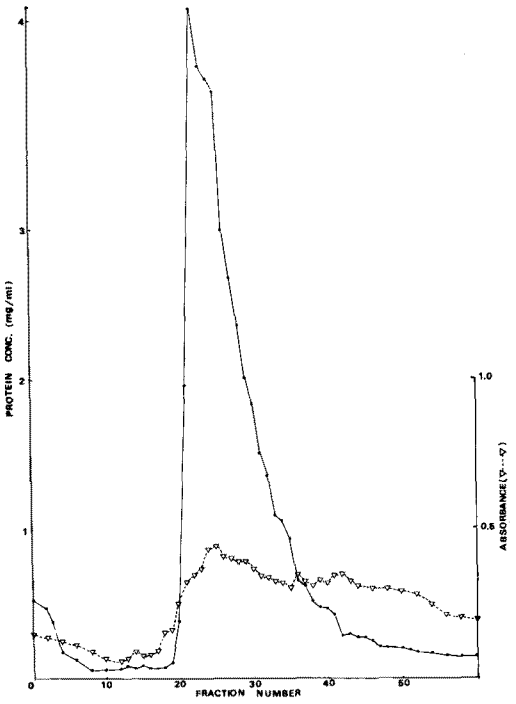

Fig. 3. Elution profile of PA3 (precipitated by 66~80% ammonium sulfate from crude antigen of *P. westermani*) through DEAE-cellulose column and absorbance of ELISA for its fractions against a reference positive serum.

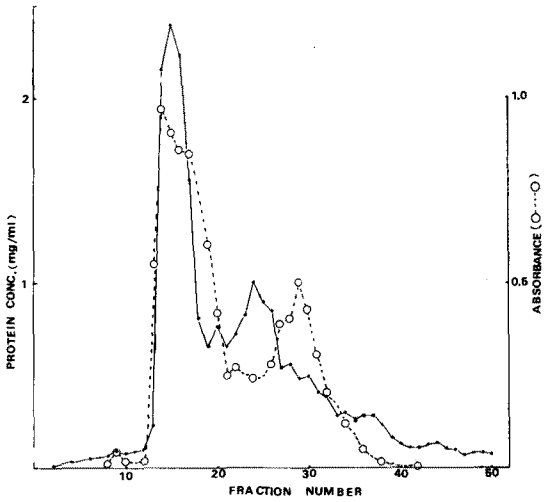

Fig. 5. Elution profile of PA2′ through Sephadex G-200 gel and absorbance of ELISA for its fractions against a reference positive serum. PA2′ is the fraction which is filtered PA2 through DEAE-Cellulose column.

은 部分에서 蛋白質量이 많았는데 陽性血淸과의 ELISA값은 分子量이 큰 部分(PA1-Ⅰ)과 分子量이 작은 部分(PA1-Ⅱ)에서 높게 나타났다(Fig. 4). PA2′의 蛋白質 流出樣相은 分子量이 큰 部分의 蛋白質이 PA1′의 경우보다 더 많았으며 ELISA값은 分子量이 큰 部分(PA2-Ⅰ)에서 아주 높고 分子量이 작은 部分(PA2-Ⅱ)에서도 높게 나타났다(Fig. 5). PA3′의 경우에는 PA1′ 및 PA2′와 달리 分子量이 큰 蛋白質 部分이 적고 分子量이 작은 蛋白質 部分이 많았는데, 分子量이 큰 部分(PA3-Ⅰ)에서만 陽性血淸에 對한 ELISA값이 높게 나타나고 分子量이 작은 部分에서는 낮게 나타났다(Fig. 6).

4) SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis

Ammonium sulfate 沈澱, ion exchange chromatography 및 gel permeation에 依하여 分劃된 分劃들 中

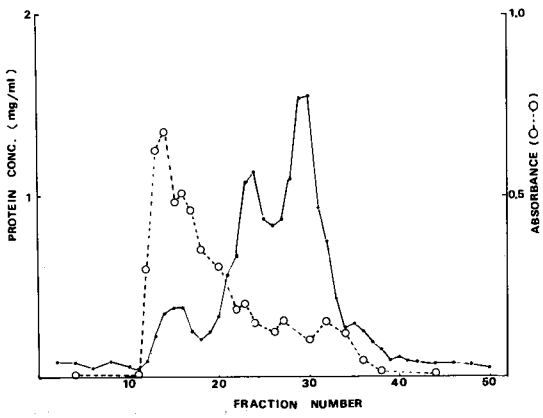

Fig. 6. Elution profile of PA3′ through Sephadex G-200 gel and absorbance of ELISA for its fractions against a reference positive serum. PA3′ is the fraction which is filtered PA3 through DEAE-cellulose column.

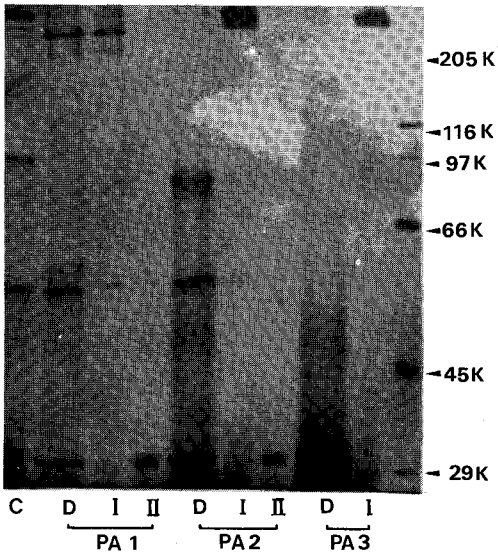

Fig. 7. SDS-PAGE patterns of crude and fractionated antigens.
C : crude antigen
D : fraction which is fractionated by DEAE-cellulose chromatography
I : fraction of high molecular weight proteins
II : fraction of low molecular weight proteins

ELISA값이 높은 PA1-I, PA1-II, PA2-I, PA2-II 및 PA3-I 分劃들과 粗抗原을 SDS 存在下에 電氣泳動하였다. 그 結果 肺디스토마 粗抗原은 分子量 270K dalton의 蛋白質부터 매우 작은 分子量의 蛋白質까지 多樣한 蛋白質構成을 보였는데 그중 250K~240K dalton, 92K dalton, 50K dalton 및 30K dalton 以下의 蛋白質들이 뚜렷하였다. 그리고 PA1-I 分劃은 270K~196K dalton 및 55K dalton의 蛋白質이 明確하게 나타났고, PA2-I 分劃은 255K~225K dalton의 蛋白質이, PA3-I 分劃은 255K~240K dalton의 蛋白質이 뚜렷하였다. PA1-II와 PA2-II 分劃은 모두 30K dalton의 蛋白質이 뚜렷하게 觀察되었다(Fig. 7).

2. 肺디스토마의 感染經過 및 感染强度에 따른 ELISA값

肺디스토마 被囊幼蟲을 고양이에게 60個(60mc群), 30個(30mc群), 15個(15mc群) 그리고 5個(5mc群)씩 經口投與하고 10日 間隔으로 血淸을 얻고 粗抗原과 5個의 分劃抗原을 利用해서 ELISA값을 測定하였다. 그 結果 被囊幼蟲 感染後 10~20日 부터 ELISA값이 上昇하기 始作하여 140日~180日에 最高値에 達하였는데, 各 群마다 粗抗原이 가장 낮은 값을 기록하고 PA1-II 分劃抗原이 가장 높은 값을 나타내어, 60mc群은 0.476과 0.841, 30mc群은 0.446과 0.811, 15mc群은 0.462와 0.912 그리고 5mc群은 0.402와 0.771을 各各 기록하였으며 그 후에 0.05~0.1 정도 下降된 값을 계속적으로 유지하였다.

感染强度에 따른 ELISA값의 差異는 5mc群이 다른

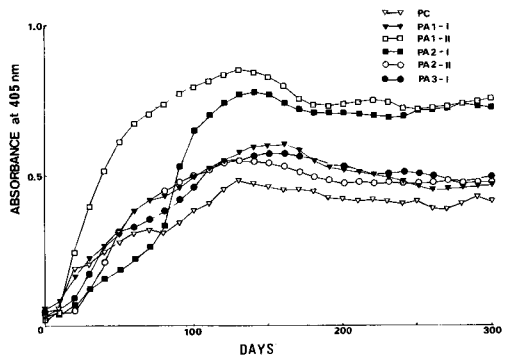

Fig. 8. Mean absorbance curves of ELISA against crude and fractionated antigens in the group of cats given 60 metacercariae.

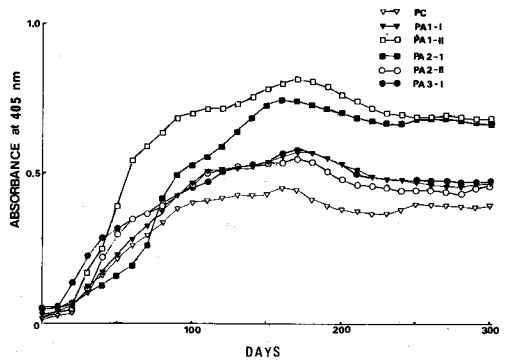

Fig. 9. Mean absorbance curves of ELISA against crude and fractionated antigens in the group of cats given 30 metacercariae.

群에 比하여 0.05 정도 낮은 값을 보였으나 有意한 差異는 나타내지 못하여, 感染强度에 따른 ELISA값의 差異는 볼 수 없었다(Fig. 8, 9, 10과 11).

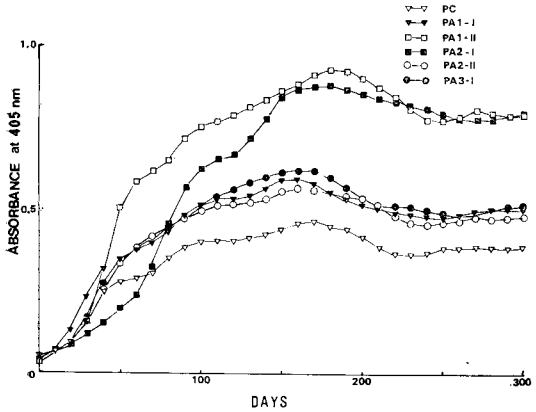

Fig. 10. Mean absorbance curves of ELISA against crude and fractionated antigens in the group of cats given 15 metacercariae.

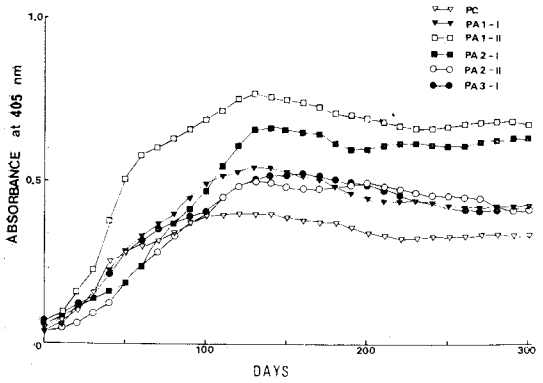

Fig. 11. Mean absorbance curves of ELISA against crude and fractionated antigens in the group of cats given 5 metacercariae.

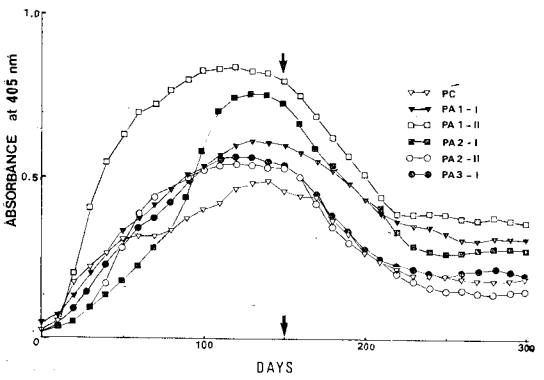

Fig. 12. Mean absorbance curves of ELISA against crude and fractionated antigens in the group of cats given 60 metacercariae and treated with praziquantel.

3. Praziquantel 投與後의 ELISA값의 變動

고양이에게 肺디스토마 被囊幼蟲을 感染시키고 150日 後에 praziquantel을 投與하여 治療한 後 ELISA값

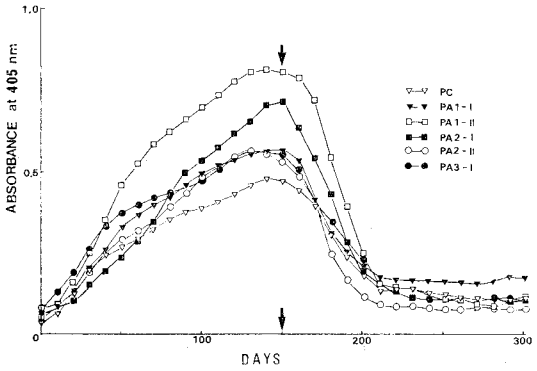

Fig. 13. Mean absorbance curves of ELISA against crude and fractionated antigens in the group of cats given 30 metacercariae and treated with praziquantel.

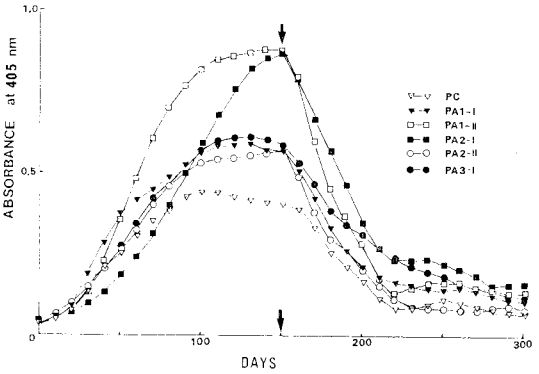

Fig. 14. Mean absorbance curves of ELISA against crude and fractionated antigens in the group of cats given 15 metacecariae and treated with praziquantel.

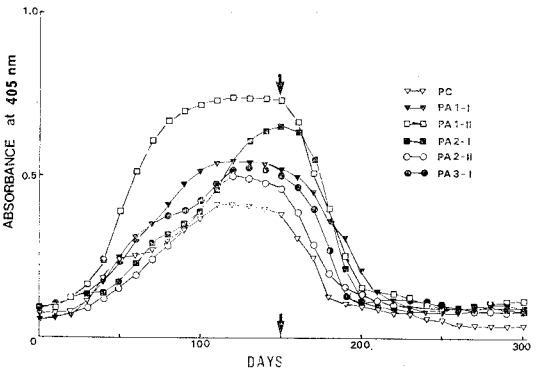

Fig. 15. Mean absorbance curves of ELISA against crude and fractionated antigens in the group of cats given 5 metacercariae and treated with praziquantel.

의 變動을 觀察하였다. 60mc群에서는 praziquantel을 投與하고 곧 ELISA값이 下降하기 始作하여 70~90日 後에는 一定한 값을 유지하였는데 抗原에 따라서 가장 낮은 것은 0.140~0.151(PA2-Ⅱ 分劃), 가장 높은 것은 0.361~0.382(PA1-Ⅱ 分劃)의 ELISA값을 나타내어 被囊幼蟲 感染前 보다는 높은 값을 유지하였다(Fig. 12). 30mc群, 15mc群 및 5mc群에서도 praziquantel投與 後에 ELISA값이 下降하여 60~80日이 경과한 뒤에는 被囊幼蟲 感染前과 거의 비슷한 水準을 보여서 30mc群이 0.082~0.178, 15mc群이 0.075~0.108 그리고 5mc群이 0.040~0.116 사이의 ELISA값을 나타내었고 이 값들은 投藥 150日後 까지 계속 유지되었다(Fig. 13, 14와 15).

4. 分劃抗原別 ELISA값의 比較

肺디스토마에 感染된 고양이의 血淸에 대한 粗抗原 및 各 分劃抗原들의 ELISA값은 最高値에서 모두 PA1-Ⅱ 分劃抗原이 가장 높은 값을 나타내었고 다음이 PA2-Ⅰ 分劃抗原이었다. 그리고 PA1-Ⅰ, PA2-Ⅱ, 및 PA3-Ⅰ 分劃抗原들은 서로 비슷한 값을 나타내었으며 粗抗原이 가장 낮은 값을 보였다. 또한 感染經過에 따른 ELISA값이 抗原에 따라 差異가 있었는데, 感染初期에 PA1-Ⅱ 分劃抗原의 ELISA값이 急激히 上昇하였는데 反하여 PA2-Ⅰ 分劃抗原에서는 感染後 60日~70日까지 완만한 ELISA값의 증가를 보여주었다(Fig. 8, 9, 10과 11).

Praziquantel을 投與한 後, ELISA값은 急激히 下降하였는데 粗抗原 및 各 分劃抗原들 사이에서 差異를 發見할 수 없었다(Fig. 12, 13, 14와 15).

考 察

寄生蟲의 免疫學的 硏究는 近來에 寄生蟲免疫의 成立, 그 機轉, 寄生蟲알레르기의 本態 그리고 免疫診斷에의 應用 등 各 분야에서 많은 進展을 이룩하였다.

肺디스토마症은 우리나라에서 아직도 重要한 風土病의 하나인데 診斷에 있어서 喀痰이나 糞便에서 蟲卵發見이 極히 不良하여 免疫血淸學的 診斷方法이 매우 有用한 疾患이다. 일찌기 Ando(1917, 1921)는 肺디스토마 感染者에서 補體結合抗體가 生成되는 것을 發見하여 實驗的으로 實證하였다. 그후 橫川등(1956)이 本症의 診斷에 補體結合反應을 實施하였고 國內에서는 朱와 李(1961)가 肺디스토마 診斷에 補體結合反應을 利用하였다. Ouchterlony(1958)는 寒天二重擴散法을 開發하였고 Yogore등(1965)이 이를 肺디스토마의 診斷用으로 利用하였으며 免疫電氣泳動法이 Grabar와 Williams(1953)에 依해 開發된 後, 肺디스토마症에 對한 免疫電氣泳動法이 Capron등(1965)과 辻(1968)에 依하여 試圖되었고 崔등(1976)은 肺디스토마症의 治療效果 判定에 免疫電氣泳動法을 利用하였다.

近來에는 ELISA法이 開發되어 寄生蟲 疾患에 利用되고 있는데 國內에서는 李등(1981), 陳등(1983), 梁등(1983), Min과 Soh(1983), 李등(1983), 咸등(1984), 梁등(1984)은 肝디스토마症에 對하여, Cho등(1981), Kim등(1982), 陳등(1983), 조등(1983), 김등(1983), 李와 崔(1983), Cho와 Kim(1983)은 肺디스토마症에 對하여 ELISA法을 適用하였고, 有鉤 및 無鉤條蟲症, 腦囊尾蟲症 그리고 스파르가눔症 등에도 適用을 시도하고 있다. 이 報告들은 ELISA法이 寄生蟲症의 診斷에 感受性이 아주 뛰어나며 特異性도 우수하다고 하였는데 Speiser(1980)는 絲狀蟲과 包蟲症의 診斷에서 ELISA, 間接螢光抗體法, 間接血球凝集反應 및 counter-immunoelectrophoresis 反應을 比較하여 ELISA法이 感受性은 가장 높았으나 特異性은 가장 낮았다고 하였고 松田등(1981), Yogore등(1981)도 ELISA反應이 다른 寄生蟲症과 交叉反應이 있음을 報告하였다.

Sawada등(1964)은 肺디스토마 成蟲의 生理食鹽水抽出液을 paper electrophoresis와 starch zone electrophoresis를 利用하여 3가지 分劃으로 나누어 二重免疫擴散法에 使用하였는데 한分劃에서 免疫反應이 높게 나타났다고 하였고, 김등(1983)은 肺디스토마 抗原을 粗抗原, 分泌排泄抗原, 體抗原으로 나누고 Sephadex G-200에 通過시켜 分劃抗原을 얻어 ELISA를 實施한 結果 第1分劃의 部分精製抗原이 抗原性이 가장 높고 第2, 第3分劃은 粗抗原보다도 抗原性이 낮았다고 하였다. 이같은 結果는 本 實驗에서 PA1-Ⅱ 分劃抗原과 PA2-Ⅰ 分劃抗原이 높은 ELISA값을 나타낸 것과 差異가 있는데, 김등(1983)의 第1分劃 部分精製抗原은 本 實驗의 分劃抗原들 中 總蛋白質量에서 많은 部分을 차지하고 있고 分子量 200K dalton을 넘는 蛋白質들로 되어있는 PA1-Ⅰ, PA2-Ⅰ 및 PA3-Ⅰ 分劃들에 해당되는 것으로 보인다. 그리고 分子量 30K dalton의 蛋白質로 되어 있는 PA1-Ⅱ와 PA2-Ⅱ 分劃은 總蛋白質量에 比해 적은 量이어서 김등(1983)의 경우 Sephadex G-200을 使用한 gel permeation만으로는 分劃되지 않았다고 생각된다.

分劃抗原들 中 肺디스토마 感染初期에 ELISA값의 急激한 上昇을 보인 PA1-Ⅱ 分劃은 肺디스토마의 物質代謝와 관계있어서 感染初期 부터 肺디스토마 體外로 排泄되는 1種의 分泌排泄抗原으로 생각되며 다른 分劃들 特히 PA2-Ⅰ 分劃은 肺디스토마의 體成分과 관계있는 抗原으로 推定된다. 김등(1983)의 경우 第1分劃들 中 分泌排泄抗原의 第1分劃이 가장 抗原性이 높다고 하였는데 分泌排泄抗原은 蟲體 表皮層의 分泌體(secretory body)나 脫落表皮細胞 등 表皮에서 빠져나오는 成分이 대부분일 것으로 생각되므로 이 第1分劃의 많은 部分이 本 實驗의 PA2-Ⅰ 分劃에 해당하고 體表(tegument)를 構成하는 蛋白質일 것으로 推測된다.

Kim등(1982)에 의하면 實驗的으로 肺디스토마를 感染시킨 개에서 ELISA값은 感染 3週日後 부터 上昇하

기 시작하여 12週日後에 最高에 이르고 15週日까지 持續되었다고 하였으며 感染後 8週日이 되어서야 ELISA 값이 陽性範圍內에 든다고 하였다. 本 實驗에서는 陰性反應의 ELISA값은 모두 0.1以下 였는데 肺디스토마 感染 40日(約 6週) 後에는 粗抗原을 비롯한 모든 分劃抗原들에서 0.1 以上의 ELISA값을 나타내어 개의 경우보다 고양이의 경우에 좀더 일찍 肺디스토마의 抗體가 出現함을 알 수 있었다. 그리고 分劃抗原들 中 PA1-Ⅱ 分劃의 경우에 肺디스토마 感染 20日後에 ELISA값의 平均이 0.137, 30日後에 平均 0.236으로서 이 分劃을 使用하면 初期 肺디스토마症의 診斷에 有用할 것으로 생각되었다.

感染强度에 따른 ELISA값은, 肺디스토마 感染 150日 以後의 PA1-Ⅰ, PA2-Ⅱ 및 PA3-Ⅰ 分劃들의 ELISA 값의 平均이 60mc 投與群이 0.506±0.037이고 30mc 投與群은 0.495±0.042, 15mc 投與群은 0.522±0.043 그리고 5mc 投與群은 0.463±0.034로서 感染强度에 따른 ELISA값의 有意한 差異를 볼 수 없었다.

肺디스토마 被囊幼蟲을 感染시키고 150日後에 praziquantel을 投藥하였을 때, 60mc 投與群의 경우는 實驗이 끝날 때(投藥後 150日)까지 ELISA값이 0.152~0.381로서 有意한 陽性反應이었으나 30mc 投與群, 15mc 投與群 및 5mc 投與群에서는 投藥後 90日 以內에 被囊幼蟲 感染前과 비슷한 水準으로 ELISA값이 떨어졌다. 皮內反應의 경우 驅蟲後에 10~20年間 陽性反應이 維持되어서 顯症과 旣往歷의 判定이 곤란하다고 알려져 있으며 Yokogawa등(1962)에 依하면 補體結合反應의 경우 肺디스토마 陽性者를 治療하고 6個月~1年 사이에 陰性으로 轉換된다고 하였으며 梁등(1984)은 實驗動物인 토끼에서 肝디스토마症을 praziquantel로 治療하였을 때 6個月後에 ELISA값이 陰轉되었다고 하였다. 또 Knobloch(1983)는 肺디스토마 感染者를 治療前과 治療後에 ELISA로 IgG抗體를 測定하여 6個月~1年後에 陰性으로 轉換된다고 報告하였다. 本 實驗에서는 60mc 投與群에서만 治療後 5個月까지 陽性範圍의 ELISA값을 나타내었고, 30mc, 15mc 및 5mc 投與群에서는 治療後 3個月에 ELISA값이 陰轉되어 對照를 이루었다. 또한 60mc 投與群의 경우 治療後 ELISA값이 陰轉되지는 않았으나 治療後 50日 정도에는 治療前에 比하여 有意한 差異를 나타내고 있고 다른 群에서도 治療後 50日 이면 治療前 보다 有意한 ELISA값의 下降을 보이므로 2個月이면 驅蟲效果를 判定하는데에 充分하다고 생각된다. 그리고 praziquantel을 投與하고 150日後에 實驗 고양이를 剖檢한 結果, 60mc 投與群에서는 肺디스토마가 寄生했던 씨스트內에 아직도 딱딱한 病變部位가 남아있고 病巢의 回復도 完全하지 않았으며 30mc, 15mc 및 5mc 投與群에서는 이러한 病變痕跡을 찾을 수 없었다. 이같은 樣相으로 보아 治療後 蟲體의 消滅 및 病變의 回復도 ELISA값의 陰轉에 관계가 있다고 判斷된다.

要 約

肺디스토마症의 免疫血淸學的 診斷에 使用하는 成蟲抗原을 몇가지 生化學的 方法으로 分劃하여 精製抗原으로서의 價値를 檢討하고자 하였으며, 實驗的으로 肺디스토마 被囊幼蟲을 感染시킨 고양이에서 感染强度, 感染經過 및 治療에 따른 ELISA 抗體價의 變動을 追跡하였다.

肺디스토마 粗抗原은 ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography 및 gel permeation을 거쳐 5個의 分劃抗原으로 나누었으며 肺디스토마 被囊幼蟲을 60個(60mc群), 30個(30mc群), 15個(15mc群) 그리고 5個(5mc群)씩 各各 고양이 10마리에 經口投與하고, 5마리씩에는 150日後에 praziquantel을 100mg/kg로 2回 1日 投與하였으며 血淸은 10日 間隔으로 채취하였다. 抗原은 2μg/ml의 濃度로 使用하고 實驗血淸은 100倍 稀釋하여 ELISA法을 實施하여 다음의 結果를 얻었다.

1. Ammonium sulfate precipitation에 依해 分劃된 抗原들의 陽性血淸에 對한 ELISA값은 51~65% ammonium sulfate 濃度에서의 沈澱分劃(PA2)이 가장 높았고 다음이 0~50% 沈澱分劃(PA1), 66~80% 沈澱分劃(PA3)의 順이었으며 81~90% 沈澱分劃(PA4) 및 沈澱안된 分劃(PA5)은 ELISA값이 매우 낮았다.

2. PA1, PA2 및 PA3 分劃들을 DEAE-cellulose column에 通過시켜 얻은 分劃들은 ELISA값에서 有意한 差異가 없었다.

3. Sephadex G-200 gel을 通過한 PA1과 PA2 分劃들은 分子量이 큰 部分(PA1-Ⅰ, PA2-Ⅰ)과 分子量이 작은 部分(PA1-Ⅱ, PA2-Ⅱ)에서 높은 ELISA값을 보였으며 PA3 分劃은 分子量이 큰 部分(PA3-Ⅰ)에서만 ELISA값이 높게 나타났다.

4. 電氣泳動의 結果 PA1-Ⅰ 分劃은 主로 分子量 270K~196K dalton의 蛋白質로 되어있고 220K dalton의 蛋白質이 가장 많았으며 PA2-Ⅰ 分劃은 255K~225K dalton의 蛋白質들로, PA3-Ⅰ 分劃은 255K~240K dalton의 蛋白質들로 構成되어 있었다. 그리고 PA1-Ⅱ 및 PA2-Ⅱ 分劃들은 30K dalton의 蛋白質로 이루어져 있었다.

5. 肺디스토마 感染經過에 따른 ELISA값을 보면 感染後 10~20日 부터 上昇하여 140~180日에 最高値에 달하며 以後 0.05~0.1정도 下降한 값으로 계속 維持되었다. 그리고 肺디스토마 感染强度에 따른 ELISA값의 差異는 볼 수 없었다.

6. 고양이에 肺디스토마를 感染시킨 150日後에 praziquantel로 治療하였을 때 60mc 投與群은 治療後 150日까지 陽性範圍의 ELISA값을 維持하였으나 治療前에 比하여는 有意하게 ELISA값이 下降하였다. 30mc, 15mc 및 5mc 投與群의 경우에는 治療後 60~80

日에 ELISA값이 被囊幼蟲 投與前과 비슷한 水準으로 떨어졌다.

7. 各 抗原에 따른 ELISA값은 PA1-Ⅱ 分劃抗原이 가장 높았고 PA2-Ⅰ 分劃抗原이 다음이었다. PA1-Ⅰ, PA2-Ⅱ 및 PA3-Ⅰ 分劃抗原들은 서로 비슷한 ELISA값으로 그 다음이었으며 粗抗原이 가장 낮은 값을 나타내었다. 特히 PA1-Ⅱ 分劃은 感染初期부터 ELISA값이 急激히 上昇하여 感染 20~30日後에는 陽性範圍의 값을 나타내었다. 그리고 praziquantel로 治療한 後의 ELISA값은 各 抗原에 따라 差異를 볼 수 없었다.

參 考 文 獻

Ando, A. (1917) Investigation on *Paragonimus westermani*. 10th report. Complement fixation test on paragonimiasis. *Chugai Iji Shimpo*, 900:1122-1130.

Ando, A. (1921) Complement fixation test in man and dogs infected with *Paragonimus westermani*. *Jpn. J. Microbiol. Soc.*, **15**:391-404.

Capron, A., Bignet, J., Rose, F. et Vernes, A. (1965) Les antigens de *Schistosoma mansoni* II. Etude immunoelectrophoretique comparee. De divers stades larvaries et des adultes des deux sexes aspects immunologiques des relations hote-parasite de la cercaire et de l'adult de *S. mansoni*. *Ann. Inst. Past.*, **105**:798-810.

Chang, H.T., Wang, C.W., Yu, C.F., Hsü, C.F. and Fang, J.C. (1958) Paragonimiasis: A clinical study of 200 adult cases. *Chinese Med. J.*, **77**:3-9.

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.

조승열, 이동근, 강신영, 김석일 (1983) 면역효소진단법을 이용한 폐흡충증 유행의 역학조사. 기생충학잡지, **21**:246-256.

Cho, S.Y. and Kim, S.I. (1983) Detection of paragonimiasis-specific IgG antibody in CSF and pleural effusion by micro-ELISA. *Korean J. Parasit.*, **21**: 286-288.

崔源永, 木村公彦, 辻守康 (1976) 實驗的 肺디스토마症의 驅蟲效果判定을 爲한 免疫電氣泳動法. 기생충학잡지, **14**:94-102.

Engvall, E. and Perlman, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry Pergamon Press*, 8:871-874.

Grabar, P. et Williams, C.A. (1953) Methode permettant l'etude conjuguee des proprietes electrophoretiques et immunochimiques d'un melange de proteines. Application au serum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**:193-194.

咸鉦希, 李駿商, 林漢鍾 (1984) 肝吸蟲感染者에 대한 間接螢光抗體反應(IFAT), 補體結合反應(CFT) 및 ELISA법의 比較研究. 고려대학교 의과대학 논문집, **21**:177-184.

朱一 (1960) 肺結核患者中에서 發見된 肺디스토마. 大韓內科學會誌, **3**:71-74.

朱一, 李溫永 (1961) 肺디스토마의 補體結合反應. 國立防疫研究所報, **4**:88-93.

陳成元, 李駿商, 林漢鍾 (1983) 肝吸蟲 및 肺吸蟲症에 있어서 免疫動物血淸을 利用한 ELISA법과 Ouchterlony법의 比較研究. 고려대학교 의과대학 논문집, **20**:191-199.

Kim, J.W., Cho, C.S., Cha, K.O. and Chung, H.Y. (1964) Non-tuberculous pulmonary diseases in case with original diagnosis of lung tuberculosis. *J. Med. Center*, 5:3-4.

Kim, C.H., Kim, S.I., and Cho, S.Y. (1982) Serological reactions in early stage of experimental paragonimiasis in dog. *Chung-Ang J. Med.*, **7**:335-347.

김석일, 강신영, 조승열 (1983) 부분정제 폐흡충 항원의 유용성 검토. 기생충학잡지, **21**:257-264.

김석일, 강신영, 조승열 (1984) 면역효소 진단법을 이용한 뇌낭미충증 및 스파가르눔증의 면역진단. 기생충학 춘계학술발표초록, 7.

Knobloch, J. (1983) Application of different *Paragonimus* antigens to immunodiagnosis of human lung fluke infection. *International symposium on human trematode infections in Southeast and East Asia (abstract)*:27.

李重根, 閔得映, 任敬一, 李根泰, 蘇鎭璋 (1981) 간흡충 감염 진단을 위한 ELISA법의 효용성에 관한 연구. 연세의대논문집, **14**:133-147.

李玉蘭, 崔源永 (1983) 肺吸蟲 皮內反應 陽性者에 對한 Agar-gel Diffusion, Counter immunoelectrophoresis 및 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay의 比較. 기생충학잡지, **21**:270-279.

李用基, 柳在淑, 李根泰, 任敬一 (1983) 간흡충증에 있어서 항체검출을 위한 enzyme-linked immunosorbent assay와 thin layer immunoassay의 비교. 기생충학잡지, **21**:265-269.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.

McLaren, M., Draper, C.C., Roberts, J.M., Minter-Goedbloed, E., Ligthart, G.S., Teesdale, C.H., Amin, M.A., Omer, A.H.S., Bartlett, A. and Voller, A. (1978) Studies on the enzyme linked immunosor-

bent assay (ELISA) test for *Schistosoma mansoni* infections. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, **72**:243-253.

Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. (1981) Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gel shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, **211**:1437-1438.

松田肇, 中尾稔, 田中寛, 永田傳, Nosenas, J.S., Blas, B.L., Portillo, C.P. and Santos, A.T. (1981) ペルオキシダーゼ標識抗體, 5-アミノサリチル酸基質を用いた日本住血吸蟲症の ELISA反應の研究. 寄生蟲學雜誌, **30**:363-372.

Min, D.Y. and Soh, C.T. (1983) Elevation of specific IgE antibody in *Clonorchis sinensis* infection. *Korean J. Parasit.*, **21**:27-31.

Ouchterlony, O. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy*, **5**:1-78.

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.

Speiser, F. (1980) Application of the enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of filariasis and echinococcosis. *Tropenmed. Parasit.*, **31**:459-466.

辻守康 (1968) 免疫電氣泳動法による寄生蟲學領域の研究. 醫學のあゆみ, **67**:531-536.

Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1979) The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) A guide with abstracts of microplate applications. *Dynatech Europe* (*ed.*)

梁正成, 李駿商, 林漢鍾 (1983) 肝吸蟲病診斷에 있어서 ELISA법의 應用에 관한 硏究. 고려대학교 의과대학논문집, **20**:201-209.

梁元容, 李駿商, 林漢鍾 (1984) 肝吸蟲感染家兎에 있어서 感染强度, 經過 및 治療에 따른 ELISA抗體價의 變動에 관한 實驗的 硏究. 고려대학교 의과대학논문집, **21**:81-88.

Yogore, M.G., Lewert, R.M. and Marraso, E.D. (1965) Immunodiffusion studies in paragonimiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **14**:586-591.

Yogore, M.G., Lewert, R.M. and Blas, B.L. (1981) Schistosomiasis japonica in barrio San Antonio, Basey, Samar, in the Philippines. V. The Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) compared with quantitative stool examination and the circumoval precipitin (COP) test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **30**:1252-1262.

横川宗雄, 粟野林 (1956) 肺吸蟲症의 補體結合反應. 日本醫事新報, 1703:27.

Yokogawa, M., Okura, T., Tsuji, M., Iwasaki M. and Shigeyasu, M. (1962) Chemotherapy of paragonimiasis with bithionol III. The follow-up studies for one year after treatment with bithionol. *Jpn. J. Parasit.*, **11**:103.

Yun, D.J. (1960) Paragonimiasis in children in Korea. *J. Pediatrics*, **56**:736-751.

=Abstract=

Purification of antigenic proteins of *Paragonimus westermani* and their applicability to experimental cat paragonimiasis

Won-Young Choi, Jae-Eul Yoo, Ho-Woo Nam and Hyung-Rak Choi
Catholic Institute of Parasitic Disease, Catholic Medical College

This study was designed to evaluate the partially purified antigens which were fractionated from crude extract of *Paragonimus westermani* and to monitor the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in experimental cat paragonimiasis during the course of infection as well as before and after chemotherapy.

Crude extract of 6-month-old adult *P. westermani* was fractionated to 5 antigens by successive applications of ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography and gel filtration. And the cats, 10 in each group, were infected with 60, 30, 15, and 5 metacercariae, then the half of each group was treated with praziquantel 2 times in one day of 100mg per kilogram of weight on 150 days after the infection. Sera were collected every 10 days.

ELISA was performed with the concentration of 2μg/ml antigen, 100 times diluted sera and 1,000 times diluted alkaline phosphatase conjugated anti-cat IgG.

The results were as follows:

1. Absorbance by ELISA with proteins precipitated by differential concentration of ammonium sulfate was the highest at 51~65% precipitate (PA2), followed by 0~50% precipitate (PA1), 66~80% precipitate (PA3), and 81~90% precipitate (PA4). Unprecipitated protein over 90% ammonium sulfate (PA5) showed the lowest antigenicity.

2. Fractionation of PA1, PA2, and PA3 through the DEAE-cellulose column did not differentiate the antigenic proteins.

3. By passing through the Sephadex G-200 column, PA1 and PA2 were fractionated to high molecular weight proteins and those of low molecular weight which showed high absorbance by ELISA (PA1-Ⅰ, Ⅱ and PA2-Ⅰ, Ⅱ). But PA3 was shown to have a fraction of high molecular weight proteins (PA3-Ⅰ) which showed high antigenicity.

4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of PA1-Ⅰ, PA1-Ⅱ, PA2-Ⅰ, PA2-Ⅱ, PA3-Ⅰ, and crude extract was performed. Fraction PA1-Ⅰ was composed of proteins which had the molecular weight of 270 kilodaltons(KD) to 196 KD; of them 220KD protein was major band. Fraction PA2-Ⅰ was composed of 255~225 KD, and PA3-Ⅰ, 255~240 KD, respectively. Fraction PA1-Ⅱ and fraction PA2-Ⅱ consisted of 30 KD proteins.

5. Absorbance by ELISA began to increase within 10~20 days after the infection and reached the highest on 140~180 days, then made plateau thereafter.

6. Absorbance by ELISA decreased after praziquantel treatment. In 60 metacercariae infection group, the absorbance had been decreasing, but remained within the positive range during observation period, while those of 30, 15, and 5 metacercariae infection groups turned to negative range.

7. Fraction PA1-Ⅱ showed the highest antigenicity in ELISA, then fraction PA2-Ⅰ, fraction PA1-Ⅰ, fraction PA2-Ⅱ, fraction PA3-Ⅰ and crude extract followed. In early phase of infection, the absorbance of fraction PA1-Ⅱ showed more rapid increase than those of the other fractions and it came to positive range at 20~30 days after infection.