

肺吸蟲의 粗항원과 精製항원에 의한 肺吸蟲감염 고양이혈청의 免疫酵素反應

順天鄉大學 醫學部 寄生蟲學教室

李 玉 蘭

延世大學校 醫科大學 寄生蟲學教室

張 在 景

서 론

폐흡충증에 대한 면역반응은 폐흡충증의 보조적 진단을 목적으로 피내반응, 혈청반응등이 이용되고 있다. 숙주의 항체반응의 정도는 숙주의 종류나 항체를 검출하기 위한 검사방법에 따라(Walton과 朱, 1959; Sadun *et al.*, 1959; Seed *et al.*, 1966; Tada, 1967; 한과 우, 1969; 李등, 1970; Hu *et al.*, 1980; Yokogawa *et al.*, 1983), 또는 감염기간, 감염정도에 따라(한과 우, 1969; 李등, 1970; 崔와 李, 1981) 항체 出現시기와 생산된 항체가에 차이가 있다. 또한 同一한 방법을 사용하였을 때 同一種의 동물개체에 따라 항체생산량에 차이가 있다는 것도 보고된 바 있다(Seed *et al.*, 1966; 李등, 1970; 崔와 李, 1981). 면역반응시험에서 항원의 선택은 중요하다 하겠다. 人體 寄生 吸蟲種들은 서로 共有하고 있는 공통항원 때문에 免疫交叉反應을 일으키게 된다는 것도 이미 잘 알려진 사실이다(Hunter *et al.*, 1958; Sadun *et al.*, 1959; 朱와 金, 1965; 李와 崔, 1972; 辻, 1975; Hillyer *et al.*, 1979; Hillyer *et Serrano*, 1983). 한편 他흡충항원과 폐흡충 감염혈청의 면역교차반응은 드물게 나타나기 때문에(윤과 최, 1973; Hu *et al.*, 1980; 박등, 1981; 崔와 李, 1981; 李와 崔, 1983) 진단을 목적으로 한 폐흡충증의 혈청반응검사에 粗항원을 주로 사용하고 있으나 피내반응에서는 간흡충과 빈번히 면역교차반응을 나타내고 있다. 감수성과 특이성이 높은 폐흡충항원 성분을 분석하기 위한 목적으로 항원을 精製하여(Sadun *et al.*, 1959; Sawada *et al.*, 1964a & b; 朱와 金, 1965; 김등, 1983; 유등, 1986) 粗항원에 비해 精製항원의 감수성이 예민하다는 것은 공통적이었으나 이들 항원의 特異性에 대해서는 명시되지 않았거나 피내반응에서는 부분적으로 교차반응이 개선되었다(Sadun *et al.*, 1959; 朱와 金, 1965). 본 실험에서는 정제항원을 affinity chromatography에 의해 粗항원으로부터 항체결합항원을 분리한 것으로 항원의 감수성만을 免疫酵素反應(Enzyme-

linked immunosorbent assay: ELISA)으로 검토하였다. 즉, 감염정도가 다른 폐흡충감염 고양이혈청에 대해서 ELISA방법으로 감염기간에 따른 항체생산의 量的인 양상을 관찰해 보는 한편 affinity chromatography에 의해 분리한 精製항원의 감수성을 粗항원과 비교해 보았다.

재료 및 방법

1. 감염혈청

폐흡충(*Paragonimus westermani*) 감염혈청은 崔와 李(1981)의 실험고양이 혈청으로 본 실험의 감염고양이 群(1~5群)은 回收된 총체數로 再구성되었다. 各群의 고양이數와 감염된 총체數는 Table 1에 나타나 있는 바와 같다. 이들 고양이의 감염전 혈청을 대조혈청으로 사용하였고 피낭유충 투여후 1週 간격으로 採血하여 18週까지의 혈청을 검사하였다.

Table 1. Numbers of recovered worms in each group of experimental cat paragonimiasis

Groups	Numbers of cat (cat No.)	Range of recovered worms	Mean(±SD) of recovered worms
G 1	4(No. 26, 27, 28, 29)	2	2.00(±0)
G 2	8(No. 6, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25)	4~6	4.75(±0.66)
G 3	4(No. 15, 16, 17, 20)	9~14	10.75(±1.92)
G 4	4(No. 4, 9, 12, 13, 14)	18~28	23.20(±3.43)
G 5	5(No. 3, 5, 7, 8, 10)	34~69	48.00(±12.63)

2. 항 원

항원제조용 폐흡충(*Paragonimus westermani*) 成蟲은 피낭유충을 고양이에게 먹이고 6개월 후 부검한 고양이 肺에서 적출하였다. 이들 성충을 등결건조하여 항원

제조용으로 사용하였다.

a. **粗항원**: 건조된 成蟲을 少量의 食鹽水(0.1%)와 함께 약질구에 넣어 동결(-20°C 이하)한 후 동결상태에서 마쇄하고 용해된 후 再동결하는 동결-용해방법에 의해 1日 2~3回 3일간 마쇄하고 4°C에서 1시간 동안 10,000rpm으로 원심분리한 上清液을 粗항원原液(단백질 농도 20mg/ml)으로 사용하였다.

b. **精製항원**: 정제방법은 "Affinity chromatography, principles & method"(Pharmacia fine chemicals)를 참고하여 정제하였다. Dried CNBr-activated sepharose 4B(Sigma C9142)는 1mM-HCl로 swelling시켜 gel로 만들었다. 페름충감염 고양이 혈청 IgG는 ammonium sulfate(40~45%) 침전법으로 감염 6개월된 고양이 한마리의 혈청으로부터 분리하였다. CNBr-activated sepharose 4B gel과 IgG는 coupling buffer(0.1M-NaHCO₃ [0.5M-NaCl 포함] buffer, pH 8.3) 내에서 overnight(4°C) 반응시켰다. blocking buffer(0.1M-Tris[0.5M-NaCl 포함] buffer, pH 8.0)로 대치하고 室溫에 2시간 방치한 후 coupling buffer(pH 8.3)와 acetate buffer(pH 4.0)로 교대로 gel을 4~5회 세척한 후 0.04M-PBS buffer(pH 7.2)로 균질되게 하여 column(1.5×10cm)에 packing 하였다. 粗항원 2ml를 column에 주입한 후 1 drop/20sec. 속도로 PBS buffer(pH 7.2)를 흘려주며 非結合항원물질(unbound antigen)을 받았다(3ml/tube). 파장 280nm에서 단백질 농도를 측정하여 <0.002로 되면 0.1M-glycine/HCl buffer(pH 2.8)로 바꾸어 IgG에 결합되었던 結合항원(bound antigen)을 받았다. 비결합-결합항원의 단백질 농도곡선은 Fig. 1에 나타내었다. 결합항원은 증류수로 투석한 다음 동결건조시켰다. 건조된 결합항원은 少量의 PBS에 녹여 단백질

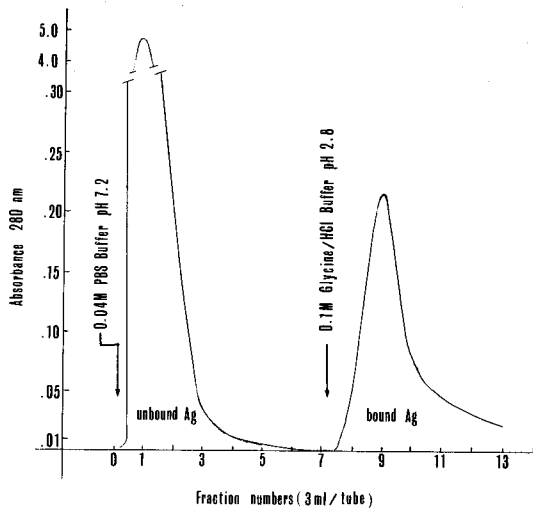


Fig. 1. Affinity chromatography of crude worm extract of *Paragonimus westermani* using CNBr-activated Sepharose 4B.

농도를 측정(Lowry *et al.*, 1951)하고 (1mg/ml) 精製항원 原液으로 사용하였다.

3. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Laemmli(1970)의 방법을 기초로 하였다. 粗항원과 精製항원은 10% acrylamide gel에서 표지단백질(markers)과 함께 각각 단백질함량 50 μg을 15 mA/gel로 3~4시간 Tris/Glycine buffer(pH 8.3) 내에서 전기영동시켰다. 영동 후 0.25% Coomassie brilliant blue 염색액에서 overnight 염색하고 10% acetic alcohol로 5~6시간 탈색하였다. 염색된 polypeptides 各 分割의 分子량은 표지단백질 분자량의 표준곡선(李)[1986]의 Table 1, Fig. 1)에 relative mobility(Rf)를 대응시켜 산출하였다. 粗항원은 細分割(일관성없게 나타나는)을 합해서 22개의 분획을 보였고 정제항원은 4개의 분획으로 粗항원의 分割중 No. 6, 7, 9, 20과 같은 Rf를 가진 분획으로 分子量 36,400, 34,700, 27,600, 11,500에 해당한다(Fig. 2).

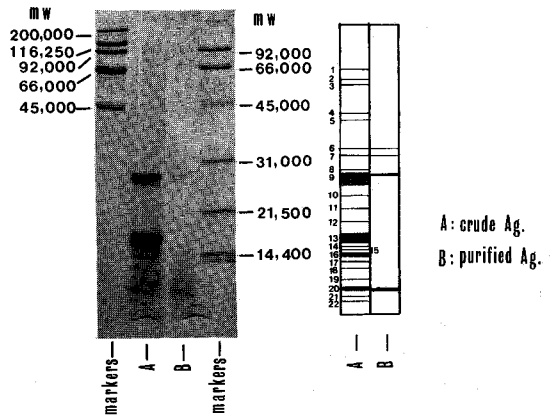


Fig. 2. Electrophoretic analysis of crude and affinity-purified antigens of *Paragonimus westermani*.

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Voller등(1976)의 방법을 기초로 하였다. 항원原液은 carbonate buffer(pH 9.6)로 단백질 농도 5μg/ml로 만들어 100μl씩 micro-ELISA polystyrene plate의 各 well에 넣고 4°C에서 overnight 반응시킨 후 PBS-Tween buffer(pH 7.4)로 4회 세척하였다. Blocking buffer(carbonate buffer[1% BSA 포함], pH 9.6) 200μl씩을 well에 넣고 1시간(37°C) 반응시킨 후 세척하였다. Diluent buffer(PBS-Tween buffer[1% BSA 포함], pH 7.4)로 희석한 혈청(80배희석) 100μl씩을 well에 넣고 2시간(37°C) 동안 반응시킨 후 세척하였다. Alkaline phosphatase conjugated anti-cat IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.)를 1μl/ml의 농도로 各 well에 100μl씩 넣고 37°C에서 3시간 반응시킨 후 세척하였다. Substrate(*p*-nitrophenyl phosphate)는 1mg/ml의 농도로 各 well에

100 μ l씩 넣고 暗所(室溫)에서 45분간 반응시킨 후 파장 410nm에서 optical density value(OD value)를 측정하였다. 粗항원은 소 고양이 혈청반응에 사용하였고 精製항원은 各 群의 감염오양이 중에서 2마리씩의 고양이 혈청만을 ELISA반응에 사용하였다. 즉, 1군 : No. 27, 29; 2군 : No. 22, 23; 3군 : No. 17, 20; 4군 : No. 9, 12; 5군 : No. 3, 8 등이다. 粗항원과 精製항원에 의한 ELISA반응의 各 群의 평균 OD치를 산출하고 群別로 兩항원에 의한 혈청반응의 감수성을 비교하였다.

결 과

1. 粗항원에 의한 ELISA 성적

감염된 소 고양이 個體 혈청에 대한 ELISA반응의 OD값을 측정하여 各 群의 평균 OD값을 산출하였다. 各 群의 대조혈청과 감염 후 1주~18주의 OD값의 범위, 평균치를 Fig. 3에 표시하였다. 各 群의 평균 OD값으로 평가된 항체생산 양상은 1군과 2군은 3週에, 3군은 2週에, 4群과 5群은 1週에 각각 대조혈청에 비해 $p < 0.05$ 의 유의한 差異로 상승하였다. 같은 群内の 同一한 蟲體數로 감염된 고양이 個體別로 항체생산량에 차이가 있었다. 1群의 No. 29는 10週에 OD값 0.7이상을 나타냈고 18週에 0.96으로 1群의 개체중 최고의 OD값을 나타냈다. No. 27은 소 감염기간중 18週에 0.72가 가장 높은 OD값으로 1群에서 가장 낮았다. 2群과 3群의 평균 OD값 1.0 이상이 된 시기는 16週였으나 개체別로는 2群에서는 14週(No. 6, 19, 25), 16週(No. 18, 22, 23), 18週(No. 21) 이후 OD 1.0 이상이 되었고 No. 24는 소 감염기간중 16週에 OD값 0.83이 최고치였다. 3群의 No. 20, No. 15는 各 各 12週, 16週 이후 OD 1.0 이상을 나타냈고 No. 16, No. 17은 소 감염기간중 OD 1.0 미만이었

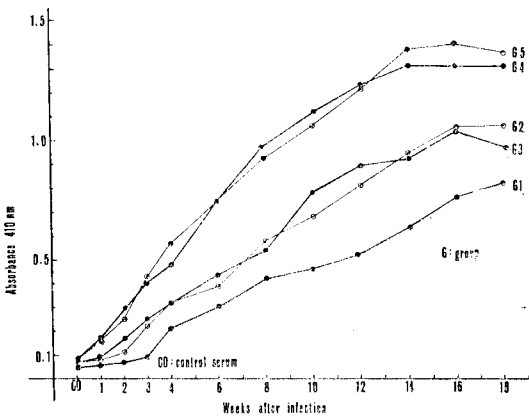


Fig. 3. Antibodies as detected by crude antigen of *P. westermani*; the specific IgG antibody titers in sequence from cats experimentally infected with worms of 2(G1), 4~6(G2), 9~14(G3), 18~28(G4), 34~69(G5) were measured using ELISA.

다. 4群과 5群의 평균 OD값은 10週 이후 1.0 이상이 되었고 개체別로는 4群에서는 5週(No. 9), 8週(No. 13), 10週(No. 12), 11週(No. 4, 14)에, 5群에서는 9週(No. 7), 10週(No. 5, 8, 10), 11週(No. 3) 이후에 OD 1.0 이상을 나타내었다.

감염 후 18週까지의 OD값에 의한 各 群의 평균과 개체別로 본 항체 생산의 양상은 1群의 평균 OD값은 3週 이후 18週(No. 27은 16週)까지 계속 상승하였다. 2群은 개체別로 16週까지 OD값이 상승되고 그 후 낮아지는 개체(No. 6, 25)와 16週 이후 같은 정도의 OD값을 유지하는 개체(No. 18, 23, 24), 18週까지 계속 상승하는 개체(No. 19, 21)로 구성되었으나 2群의 평균 OD값은 16週 이후 같은 정도를 유지하였다. 3群의 群평균 OD값은 16週까지 상승하고 18週에 약간 떨어졌으나 개체別로는 16週까지 계속 상승하고 18週에 12週의 OD값으로 낮아지는 개체(No. 15, 20)와 16週 이후 같은 정도를 유지하는 개체(No. 16, 17)로 구성되었다. 4群과 5群의 개체別로는 감염초기로부터 18週까지 OD값이 계속 상승하는 개체(No. 4)와 12주까지 상승하고 그 이후 같은 정도를 유지하는 개체(No. 9), 14주까지 상승하고 그 이후 낮아지는 개체(No. 5, 7, 10, 13), 16주까지 상승하고 그 이후 낮아지거나(No. 8, 12, 14) 같은 정도를 유지하는 개체(No. 13)로 구성되었다. 4군과 5군의 群평균 OD값은 兩群 모두 14週까지 상승하고 그 이후 같은 정도의 OD값을 유지하였다.

2. 精製항원에 의한 ELISA 성적

精製항원에 의한 ELISA 성적은 개체別 또는 群평균치로서 대체로 감염 12週 이전에 粗항원에 의한 OD값보다 높았고 경감염에서는 18週까지 정제항원의 감수성이 粗항원 보다 높았다(Fig. 4). 1群의 No. 27과 No. 29는 3週에 各 各 粗항원에 의한 OD값의 1.4배, 3.5배 높아져 개체차는 있으나 3週 이후 18週까지 群평균 OD값은 粗항원에 의한 OD값 보다 높았고 10週 이후 OD 1.0 이상이 되었다. 2群의 No. 22와 No. 23은 3週에 各 各 粗항원에 비해 1.8배, 1.2배로 OD값이 컸으며 12週 이후 OD 1.0 이상이 되었다. 群평균 OD치는 2週 이후 18週까지 粗항원에 의한 OD값 보다 높았다. 3群의 精製항원에 의한 群평균 OD값은 4週에 粗항원에 의한 OD값의 1.6배 높았다. 8週에는 OD 1.0 이상이 되었고 粗항원 보다 2.3배 높아져서 兩항원에 의한 OD차이중 가장 컸다. 10週 이후 兩항원에 의한 OD차는 점차 줄어들었고 群 평균치로서는 조사된 16주까지 精製항원에 의한 OD값이 粗항원에 의한 OD값 보다 높았으나 No. 20은 16주 때에는 精製항원에 의한 OD값이 粗항원에 의한 OD값 보다 낮았다. 4群과 5群의 個體들은 3週 이후 精製항원에 의한 OD값이 粗항원에 의한 OD값 보다 높아져(최고 1.5배) 6週에 OD 1.0 이상이 되었으나 10週 이후 대체로 精製항원의 OD값의 증가폭이 粗항원의 증가폭 보다 작아졌다. 4群의 No. 9와 5群의 No. 3은 11주 이후 精製항원에 의한 OD값이 粗항원에

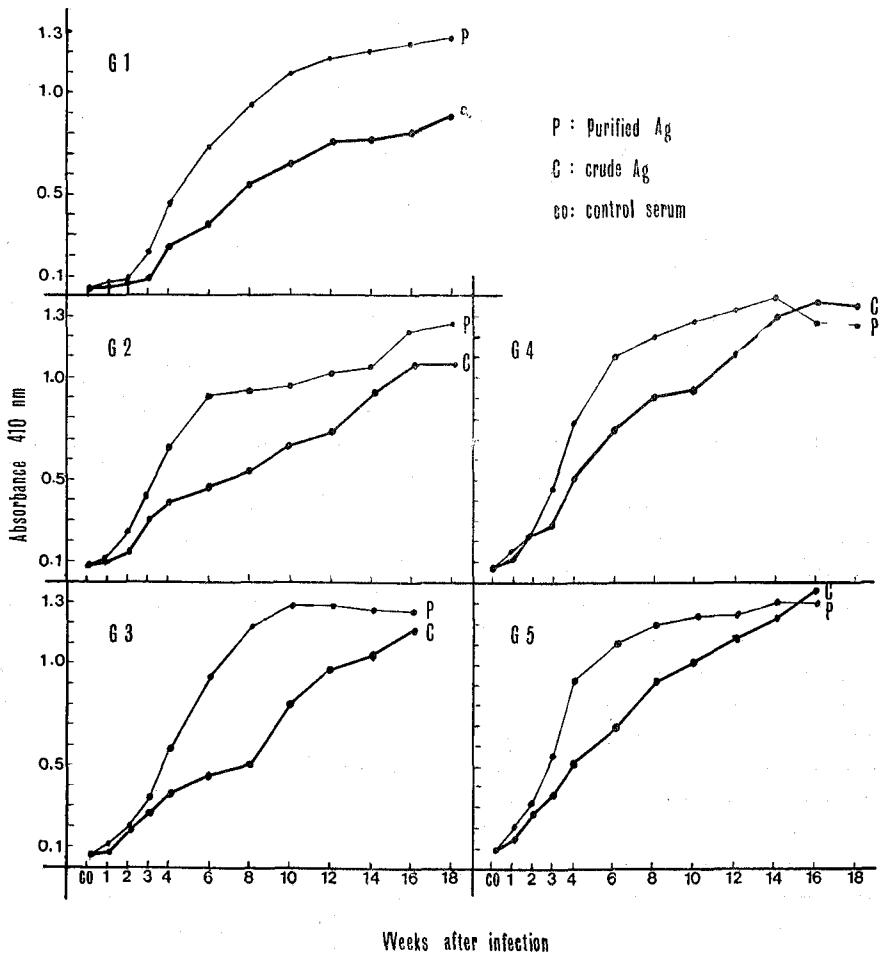


Fig. 4. IgG antibody titer curves in ELISA of paragonimiasis westermani cat sera against crude and purified antigens of *P. westermani*.

의한 OD값 보다 낮아졌고 4群的 No.12와 5群的 No. 8 은 16週 이후 粗항원에 의한 OD값 보다 낮아졌다. 4 群과 5群的 群평균 OD값은 Fig.4에서 보는 바와 같이 16週 이후 精製항원에 의한 OD값은 粗항원에 의한 OD 값 보다 낮았다.

고 찰

폐흡충 감염고양이 혈청에 대해서 ELISA반응의 OD 값에 의해 관찰된 감염蟲體數와 항체생산량의 관계는 동물개체에 따라 차이가 있었다. 감염동물 개체에 따른 항체생산량의 차이는 Seed *et al.*(1966), 李 등 (1970), 崔와 李(1981)도 보고한 바 있다. 본 실험의 결과 총체數의 증가는 개체차는 있으나 1군에서 보다 2~3군의 항체생산량이 증가되었고, 4~5群的 항체생산량은 2~3群 보다 증가되어 감염蟲體數의 증가는 대체로 항체생산량의 증가와 관계되었다. 그러나 4群과 5群的 평균 감염된 蟲體數는 각각 23, 48마리의 큰 차

이에도 불구하고 평균 OD값은 유사하고 또한 개체별 OD값도 4群이상의 감염蟲體數로서는 총체數의 多少가 항체생산량의 多少와 관계가 없는 것으로 나타났다. 즉 4群的 감염총체數(20~30마리)는 體重 2~3kg의 고양이가 생산할 수 있는 항체량에 충분한 감염총체數로 생각되며 4군과 5군의 평균 OD값에 별 차이를 볼 수 없는 것과 항체생산량이 감염총체數에 관계없이 개체차가 크게 나타나는 것도 그런 이유라 생각된다.

모든 감염군은 감염후 4주에 OD값이 현저히 상승되었다. 즉 1군은 대조혈청과 $p < 0.01$, 2~5군은 $p < 0.001$ 의 유의한 차로 상승되었다. 이는 ELISA 보다 반응 감수성이 예민하지 못한 침강반응에서도 4주에 대체로 양성반응을 나타내는 것으로 보아(李 등, 1970; 崔와 李, 1981) 총체가 폐에 도달하여 정착하기 시작하는 시기에 항체생산이 활발해지는 것으로 보인다.

감염기간에 따른 항체생산 양상은 대체로 少數총체를 보유한 고양이가 혈청반응은 검사한 18주內에서는 평균 OD값은 16~18주 까지 계속 상승하는 것으로 나타

났으나 多數층체로 감염된 혈청반응에서는 12~16주에 최고치를 나타내고 그 이후 같은 정도의 OD값을 유지하거나 감소되는 경향이었고 이는 Imai(1970)와 유사한 결과였다. Tada등(1967)은 *Paragonimus miyazaki*로 감염된 쥐의 혈청침강반응으로 감염 90일 이후 침강대數의 감소를 관찰하고 이는 蟲囊(cyst)內 층체의 배설이 원활치 못한 때문으로 보았다. 한편 Seed등(1966)은 蟲囊內의 층체는 항체와 접촉없이 成蟲으로 자랄 수 있다고 한 바 있고 본 실험에서 특히 多數층체로 감염된 개체에서 12~16주 이후에 OD값(항체量)이 감소되는 것은 蟲囊형성 정도와 관계되는 것으로 이 시기에 蟲囊의 囊壁(cyst wall)이 잘 발달되는 때문으로 보여진다.

면역반응 결과에 중요한 요인이 되는 항원의 성상에 따라 반응결과에 차이가 생긴다는 것은 잘 알려진 사실이다. Hillyer등(1979)은 同一한 肝蛭층체항원을 원심분리속도를 달리해서 각각 항체반응이 다른 항원성분이 분리됨을 관찰한 바 있고 Huer등(1985)은 폐흡충항원의 disc-PAGE에 의한 항원성 물질의 전기영동에 의한 분리로 층체의 나이(age)에 따라 물질구성이 다를 것을 보고한 바 있다. 폐흡충의 항원성 물질의 分子量적인 분석으로 감수성, 특이성이 높은 성분을 보고한 예들이 있으나 본실험의 결과와 함께 감수성이 높은 폐흡충 항원단백질의 분자량의 범위는 차이가 많았다. 폐흡충 成蟲의 추출항원을 Sephadex G-200 gel filtration에 의해 분리한 성적으로 Imai(1979)는 分子量 700,000~30,000 범위의 6分劃으로 분리된 항원분획중 감염혈청에 대해서는 면역가토혈청에서 보다 낮은 분자량의 분획이 반응하며 6分劃중 제 4분획의 감수성이 가장 높다 하였다. 김등(1983)에 의해서는 Sephadex G-200 gel filtration에 의해 3개의 분획으로 분리되어 이중 감수성이 높은 분획은 제 1분획으로 관찰되었다. 유등(1986)은 몇단계를 거친 후 Sephadex G-200 gel을 통과시킨 항원성분중 감수성이 높은 항원성분의 분자량은 200,000 이상과 100,000 이하의 2분획으로 관찰한 바 있다. 분석방법이 다르지만 본실험의 SDS-PAGE에 의해서는 감수성이 높은 항원의 분자량의 범위는 37,000~11,000으로 큰 차이를 나타내고 있다.

한국에 共存하는 폐흡충(*Paragonimus westermani*)과 간흡충(*Clonorchis sinensis*)의 粗항원에 의한 면역교차반응은 감염혈청에서는 별 문제가 되지 않으나 皮內반응에서는 빈번히 교차반응을 나타낸다(Hunter et al., 1958; Sadun et al., 1959; 朱와 金, 1965). 교차반응을 제거하기 위한 폐흡충의 항원정제가 시도되었으나(Sadun et al., 1959; Sawada et al., 1964b; 朱와 金, 1965) 이들 精製항원에 의한 皮內반응에서의 면역교차반응은 부분적으로 개선되었거나(Sadun et al., 1959; 朱와 金, 1965) 대장자의 數(5例)가 적었다(Sawada et al., 1964b). 본 정제항원은 粗항원에 비해 감수성이 높았고 특히 경감염에서와 감염초기로 부터

12週 이내의 감염기간중 감수성이 예민하여 기능적인 항원물질이 蟲囊(cyst)의 皮막(cyst wall)이 완성되기전의 항체반응에 예민한 반응을 나타낸것으로 생각된다. 본실험으로 본 정제항원이 감염혈청에 대해 粗항원 보다 감수성이 예민한 것은 알 수 있었으나 다른흡충의 감염(또는 면역)혈청이나 皮內반응에서 교차반응을 일으키지 않는 폐흡충 고유의 특이항원성 물질인지는 확인하지 못하였다. 이점에 대해서는 추후 확인해 보아야 할 것이다.

결론

폐흡충(*Paragonimus westermani*)으로 감염된 고양이에 혈청에 대한 粗항원과 affinity chromatography에 의해 정제된 精製항원의 감수성을 免疫酵素反應(Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA))에 의해 검사하였다. 감염 蟲體數가 다른 감염群(1군~5군)의 감염기간에 따른 항체생산의 量的인 관계를 ELISA의 OD값(optical density value)에 의해 粗항원으로는 全 감염고양이 個體에 대해서 精製항원으로는 各群에서 2個體에 대해서만 검사하였다.

1. 감염 蟲體數의 증가에 따라 항체생산量의 증가는 개체別로는 일치성이 적었으나 群別로는 1群 보다 2~3群, 2~3群 보다 4~5群의 항체量이 증가되었다. 그러나 4群과 5群의 개체들에서는 감염 蟲體數와 항체量은 無關한 것으로 나타났고 兩群의 평균 OD값도 유사하였다.

2. 少數蟲體로 감염된 1~2군은 皮낭유충 투여 후 3週에 대조혈청에 비해 $p < 0.05$ 의 유의한 差로 OD값이 상승되었고 3群은 2週에 ($p < 0.05$), 4~5群은 1주에 ($p < 0.05$) OD값이 상승되어 多數蟲體로 감염된 고양이가 個體에서는 少數蟲體로 감염된 개체에 비해 대체로 일찌기 순환혈액內에 항체가 출현하였다.

3. 감염후 18주까지의 항체생산量의 변화는 全 감염고양이가 개체別로는 18주까지 계속 상승하는 개체들(7)과 12~16週 까지 상승하고 그 이후 같은정도의 OD값을 유지하거나(6) 떨어지는 개체들(13)로 구성되었다. 대체로 多數蟲體로 감염된 個體에서는 감염후 12~16주에 최고의 OD값(항체생산量)을 나타내고 그 이후 같은 정도를 유지하거나 떨어지는 경향이였다.

4. Affinity-정제항원에 의한 ELISA의 群別 평균 OD값은 14週까지 全群에서 粗항원에 비해 높았고 특히 6~10週에 높았다. 경감염된 1~2군은 18週까지 精製항원의 감수성이 粗항원 보다 높았고 多數蟲體로 감염된 개체에서 대체로 12週 이후 精製항원과 粗항원에 의한 OD값의 차이는 줄어들었다. 4群과 5群에서는 16週 이후에 精製항원에 의한 평균 OD값이 粗항원에 의한 OD값 보다 낮아졌다.

결론적으로, 全群에서 精製항원은 粗항원에 비해 예민한 감수성을 나타냈고 특히, 경감염과 重감염의 감

염후 10週이전의 감염기간에서 예민한 감수성을 나타냈다.

(ELISA 실험에 수고해주신 연세대의 기생충학교실의 명준옥 선생님과 항원재료를 분양해주신 가톨릭의대 기생충학교실의 유재을 선생님께 감사드립니다.)

참 고 문 헌

- 崔源永, 李玉蘭(1981) 實驗의 肺吸蟲症의 寒天沈降反應. 기생충학잡지, 19(2):101-108.
- 朱一, 金基昇(1965) 디스토마抗原의 精製에 關한 研究. 第1報, 肺디스토마抗原의 精製. 가톨릭大學 醫學部 論文集, 9:153-158.
- 한상희, 우창규(1969) 고양이 페디스토마증에서의 면역확산법과 보체결합반응. 기생충학잡지, 7:160-165.
- Hillyer, G.V., Pelley, R.P. and Diaz, d.L.d. (1979) Solubilization of antigens of *Fasciola hepatica* which react with antibodies to *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 65(1):55-60.
- 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(2):350-358.
- Huer, B., Kim, S.I., Kang, S.Y. and Cho, S.Y.(1985) Electrophoretic patterns of protein from *Paragonimus westermani* in early developmental stages. *Korean J. Parasit.*, 23(2):189-196.
- Hunter, G.W., Ritchie, L.S. and Pan, C.(1958) Immunological studies. II. Intradermal tests and their application in the field for the detection of schistosomiasis japonica, paragonimiasis and clonorchiasis. *Military Medicine*, 122(2):85-96.
- Hu, X., Feng, R., Hu, A., Lin, F., Yan, H. and Tian, G.(1980) Immunodiagnosis of paragonimiasis by counterimmunoelectrophoresis and agar gel diffusion. *Chinese Medical J.*, 93(8):557-561.
- Imai, J.I.(1979) Studies on the antigenic analysis *Paragonimus westermani*. 2. Observations on antibody response against fractionated antigens from adult worm extract. *Tropical Med.(Nagasaki)*, 21(2):45-55.
- 김석일, 강신영, 조승열(1983) 부분정계 폐흡충항원의 유용성검토. 기생충학잡지, 21(2):257-264.
- Laemmler, U.K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227:681-685.
- 李玉蘭, 崔源永(1972) 몇가지 蠕蟲類의 免疫電氣泳動. 自然, 3:1-10.
- 李玉蘭, 崔源永(1983) 肺吸蟲 皮內反應 陽性者에 對한 Agar-gel Diffusion, Counterimmunoelectrophoresis 및 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay의 比較. 기생충학잡지. 21(2):270-280.
- 이옥란(1986) 數種의 웨스테르만肺吸蟲 抗原의 血清免疫沈降反應과 抗原의 電氣泳動像. 순천향대학 논문집, 9(2):239-246.
- 李溫永, 橫川宗雄, 辻守康(1970) 數種의 血清學的 術式에 의한 肺吸蟲 感染血清의 抗體 測定에 關한 研究. 國立保健研究院報, 7:307-321.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.(1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- 박재진, 손현식, 이한용, 이해진, 최수병(1981) Disc 전기영동법에 의한 각종 흡충류의 단백질 성분. 가톨릭 대학 의학부 학생논문집, 4:1-11.
- Sadun, E.H., Buck, A.A. and Walton, B.C.(1959) The diagnosis of paragonimiasis westermani using purified antigens in intradermal and complement fixation tests. *Military Medicine*, 124:187-195.
- Sawada, T., Takei, K. and Yoneyama, K.(1964a) Studies on the immunodiagnosis of paragonimiasis. I. The precipitin reaction with crude and fractionated antigens. *J. Infect. Dis.*, 114(4):311-314.
- Sawada, T., Takei, K. and Yoneyama, K.(1964b) Studies on the immunodiagnosis. II. Intradermal tests with fractionated antigens. *J. Infect. Dis.*, 114(4):315-320.
- Seed, J.R., Sogandares-Bernal, F. and Mills, R.R.(1966) Studies on American paragonimiasis. II. Serological observations of infected cats. *J. Parasit.*, 52(2):358-362.
- Tada, I. (1967) Physiological and serological studies of *Paragonimus miyazaki* infection in rats. *J. Parasitol.*, 53:292-297.
- 辻守康(1975) 數種寄生蟲の感作血清による 免疫電氣泳動像の比較研究. 寄生蟲學雜誌, 24:227-236.
- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A. Fleck, D.G., Perkins, M. and Oladehin, B. (1976) A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J. Clin. Path.*, 29:150-153.
- Walton, B.C., 朱一(1959) 全國의 肺 및 肝디스토마 分布. 綜合醫學, 4(1):103-109.
- Yokogawa, M., Kojima, S., Kobayashi, M., Hata, H., Ito, J., Tsuji, M., Miranda, H., Ibanez, N., Fernandez, E. and Guerra, A.(1983) Peruvian paragonimiasis: Diagnostic value of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA). *Jpn. J. Parasit.*, 32(4):317-322.
- 유재을, 남호우, 최원영(1986) 페디스토마(*Paragonimus*

westermani) 감염 고양이 혈청에 대한 ELISA 항체
가의 의의. 대한기생충학회 28회 초록집, pp. 15-16.

윤백현, 최원영(1973) 페디스토마의 혈청학적 연구.
가톨릭大學 醫學部 論文集, 25:163-176.

=Abstract=

**ELISA of paragonimiasis in cat by crude and purified antigens of
*Paragonimus westermani***

Ok Ran Lee

Department of Parasitology, Soonchunhyang University College of Medicine

Jae Kyung Chang

Department of Parasitology, College of Medicine, Yonsei University

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) using crude and affinity-purified antigens of adult worms of *Paragonimus westermani* was performed for infected cat sera with different worm burden, from preinfection to 18th week after infection.

Crude antigen was used with supernatant of homogenated worms by freezing-thawing method, and the supernate was centrifuged for 1 hour at 10,000 rpm at 4°C. Affinity-purified antigen(antibody-bound antigen) was prepared from fractions(bound and unbound) of crude antigen by affinity chromatography on CNBr-activated sepharose 4B, and IgG as a ligand was prepared from paragonimiasis cat serum(6 months infected) obtained by ammonium sulfate(40%~45% saturated) precipitation method. By SDS-PAGE, crude antigen showed 22 polypeptide fractions while purified antigen showed 4 fractions: 36,400, 34,700, 27,600 and 11,500 in molecular weights.

All cats were divided into five groups(G_1 - G_5) by different worm burdens. The mean of recovered worms(\pm SD) and the number of cats in each group are as follows: G_1 , 2 worms(0) and 4 cats; G_2 , 4.75(\pm 0.66) and eight; G_3 , 10.75(\pm 1.92) and four; G_4 , 23.20(\pm 3.43) and five; G_5 , 48(\pm 12.63) and five cats.

The results were summarized as follows:

1. The antibody levels(OD value) increased by worm burden in G_1 to G_4 generally. However, individual antibody levels were not exactly related with worm burden in all groups, especially there was a wide difference in G_4 and G_5 . These results suggested that the worm burden in G_4 (about 20~30 worms) is enough to produce antibody maximum in cats of 2~3kg weight.

2. The antibody levels increased significantly ($p < 0.05$) compared to control sera at the 3rd week in G_1 and G_2 , at the 2nd week in G_3 , and at the 1st week in G_4 and G_5 . Especially in the 4th week, OD value increased more in G_1 ($p < 0.01$) and in G_2 to G_5 ($p < 0.001$). In the pattern of antibody levels by ELISA in each group, OD in G_1 increased to the 18th week continuously, in G_2 OD was maintained same after the 16th week, but in G_3 it decreased after the 16th week, and it was maintained same in G_4 and G_5 after the 14th week.

3. The antibody levels by ELISA with the affinity-purified antigen were higher than those with crude antigen in all groups generally. Especially, the difference of OD values between two antigens was larger from the 4th to the 10th week. In G_1 and G_2 OD with purified antigen was higher than that with crude one to the 18th week. It was also higher in G_3 than that with crude antigen to the 16th week and OD of G_4 and G_5 were higher before the 14th week than that with crude antigen, however became lower at the 16th week.

Consequently, the antibody level in ELISA with affinity-purified antigen was more sensitive at the early weeks after infection and in light infection groups than that with crude antigen.