

## Cysticercus와 Sparganum에서 추출한 조항원의 면역학적 특성과 그의 면연진단에 응용 2. Sparganum의 조항원성분의 면역학적 특성

김창환 · James Yang\*

경상대학교 자연과학대학 생물학과, Tropical Disease Unit, Toronto General Hospital, University of Toronto\*

*Spirometra erinacei*의 유충인 sparganum에서 추출한 조항원 단백질을 항원으로 하여 sparganosis, cysticercosis, hydatidosis환자의 IgG 항체와 정상인의 IgG 항체를 혈청반응시켜 ELISA와 EITB에 의해 교차반응을 일으키는 비특이항원 성분과 종특이항원 성분을 추구하였다.

1. sparganum에서 0.01 M PBS (pH 7.4)로 추출한 조항원 단백질을 SDS-PAGE로 전개하여 290 Kd에서 23 Kd범위의 분자량을 가진 25개의 단백질이 분획되었다.

2. sparganum의 조항원을 항원으로하여 ELISA로 sparganosis, cysticercosis, hydatidosis환자의 IgG 항체와의 혈청 반응치는 sparganosis환자에게서는  $0.44 \pm 0.07$ 에서  $1.90 \pm 0.03$ 으로 negative control인 normal sera의 O.D ( $0.15 \pm 0.03$ )를 기준으로 하였을 때 모두 양성이며 민감도(sensitivity)가 100 %이었으며 cysticercosis, hydatidosis환자혈청에서 양성반응이 나타났으며 교차반응도 있었다.

3. EITB에서는 sparganosis환자의 IgG항체에 의해 16개의 항원성분이 인지되었으며 이 중 6개의 항원성분이 정상인의 혈청에서도 인지되어 교차반응을 일으키는 항원성분이었으며 cysticercosis환자혈청에서 인지된 4개의 항원성분 중 2개의 항원성분이 sparganosis 환자혈청에서 인지된 것과 같았으며 hydatidosis환자의 IgG항체에 의해 인지된 19개의 항원성분 중 12개의 항원성분이 sparganosis환자혈청에서 인지된 항원 성분과 같았다.

4. 290 Kd, 200 Kd, 28 Kd의 항원성분은 sparganosis환자의 IgG항체에서만 인지되었고 228 Kd, 152 Kd, 66 Kd항원성분은 hydatidosis환자의 IgG항체에서만 인지되었으며 66 Kd항원성분은 sparganosis, cysticercosis, hydatidosis, 정상인의 혈청에서 모두 인지되었다.

**KEY WORDS: Cysticercus, Sparganum, Antigenic components, Immunodiagnosis, ELISA, EITB, Sparganosis, Cysticercosis, Hydatidosis**

인체 고충증(sparganosis)은 *Spirometra erinacei*의 제 3기 유충인 metacestode (sparganum)가 조직에 침입하여 생기는 기생충병으로 주로 중국 일본 한국 동남아시아 등지에서 보고되었다(Weinstein *et al*, 1954; Iwata, 1976; Tansurat 1971; Cho *et al*, 1975 Araki and Nakazato, 1976; Lee *et al*, 1984). 인체에서의 주요 기생부위는 주로 피하조직, 흉근, 복벽 또

는 부강내 여러장기나 음낭 등에 기생하며(Cho *et al*, 1975; Chi *et al*, 1980; Suzuki *et al*, 1982; Lee *et al*, 1984; Maeno *et al*, 1986), 때로는 뇌나 척수에 기생하여 neurosparganosis를 일으킨다(Park *et al*, 1972; Mineura *et al*, 1980; Kim *et al*, 1981; Anders *et al*, 1984; Fan and Pezeshkpour, 1986; Chan *et al*, 1987; Chang *et al*, 1987). 충체가 피하조직이나 근육 등에 기생하였을 때는 외과적 수술로 생체검사를 통해 쉽게 진단할 수 있으나 뇌나 척수같은 심층조직내에 기생하였을 때는 생체검사에 의한 진단에 어

본 연구는 1987년도 문교부 해외파견 연구조성비의 지원으로 수행되었음.

려움이 있다. 그러나 최근에는 낭미충증 진단에 C.T (computerized tomography)를 이용하여 진단을 유도하고 있는 것과 같이(Hong *et al.*, 1978; Koh and Shim, 1980; Carbajal *et al.*, 1977, 1983), 이 neurosparganosis의 진단에도 C.T를 이용한 방법이 유도되고 있다(Chan *et al.*, 1987; Chang *et al.*, 1987). 그러나 이 C.T에 의한 진단에도 병인을 규명하는데 어려움이 따르는 경우가 많아 면역혈청학적 방법이 도입되어 보다 정확한 진단을 유도하고 있으나(Ishii, 1973; Kim *et al.*, 1984), 면역혈청학적 진단법에도 다른 기생충과 교차반응을 일으키는 비특이 항원, 항체성분과 부적합한 정상혈청의 대조에서 생기는 감수성 문제가 의문시 되어 보다 효과적인 방법이 요구되어 왔다(Schantz *et al.*, 1980; Coker-van *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 1984; Mohammed *et al.*, 1984; Flisser and Larralde, 1986). 근래에는 EITB (enzyme-linked immunoelectrophoretic transfer blot)를 이용하여 복합항원 즉 혼합성분의 면역화학적 특성을 추구하고 있다(Towbin *et al.*, 1979; Burnett, 1981; Towbin and Gordon, 1984; Grogl *et al.*, 1985; Gottstein *et al.*, 1986).

이 실험에서는 sparganum의 조항원 성분을 항원으로 하여 ELISA와 EITB를 도입하여 sparganum에서 감염되어 생긴 IgG항체뿐만 아니라 같은 촌충목(cestoda)에 속하며 유충시기에 조직성 기생을 하는 *Cysticercus cellulose*와 hydatid (*Echinococcus sp.*)의 metacestode감염으로 생긴 IgG항체를 면역혈청학적 반응을 시켜 sparganum의 조항원성분 중 특이항원 성분과 비특이항원 성분을 확인하고 ELISA에서의 false positive성분을 추구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### sparganum 총체의 준비

*Spirometra erinacei*의 중간숙주인 유허목 (*Natrix tigris*)을 구입 해부하여 피하와 근육조직에 있는 총체를 적출하여 생리식염수에 3회 씻은 다음 냉동건조 시켰다.

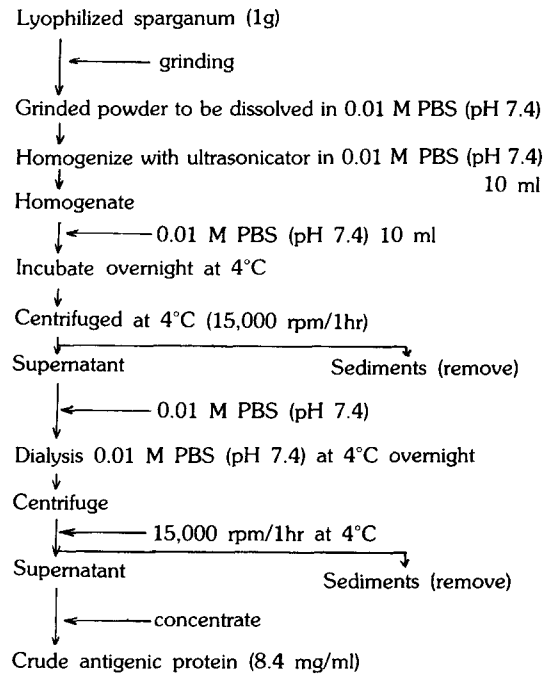


Fig. 1. Extraction procedure of the crude antigenic protein from sparganum.

### 조항원의 준비

sparganum의 조항원성분 추출과정은 Fig. 1과 같이 냉동건조 시킨 sparganum 1g을 막자바위에서 분쇄한 후 0.01 M PBS (pH 7.4)용액 10 ml를 넣어 용해시키면서 균질화시킨 다음 다시 ultrasonicator (Braun Sonic 1510, B-Braun Melsungen AG)로 100 watt에서 30초간 균질화하고 60초간 냉각시키는 과정을 10회 반복하였다. 이 과정이 끝나면 다시 0.01 M PBS용액 10 ml를 더 첨가하여 조항원성분이 용출되도록 4°C에 12시간 방치한 후 15,000 rpm으로 1시간 원심분리 시켜 침전물을 제거하고 상정액을 취하여 0.01 M PBS (pH 7.4)에 12시간 투석 하였다. 투석한 재료를 단백질함량 8.4 mg/ml되게 농축하여 조항원성분으로 사용하였으며 사용시까지 -20°C에 냉동보관 하였다. 조항원의 단백질정량은 Bradford (1976)의 방법을 참고로 Bio Rad protein assay reagent (Richmond, California)를 사용하여 정량하였다.

### 혈청의 준비

혈청은 Toronto General Hospital 입원환자 중 C.T., ELISA, IHA, 생체검사 등으로 sparganosis, cysticercosis, hydatidosis환자로 진단된 사람의 혈청을 사용하였고 sparganosis환자 혈청의 일부는 중앙대학교 의과대학 기생충학교실에서 보관하던 혈청을 사용하였으며 정상인의 혈청은 병원직원 중 ELISA에 음성으로 판정된 사람의 혈청을 대조혈청으로 사용하였다.

### Micro-ELISA

ELISA는 Voller *et al* (1976; 1978)가 기술한 방법에 따라 sparganum의 조항원 단백질을 antigen coating buffer인 0.05 M carbonate bicarbonate buffer (pH 9.6)로 1:1000으로 희석하여 polystyrene microplate의 각 well에 100  $\mu$ l(항원단백질 함량 0.4  $\mu$ g/100  $\mu$ l)씩 주입하여 37°C에서 12시간 방치시켜 항원을 건조·피복시켰다. 조항원 단백질이 피복된 microplate를 세척용액(0.9 % NaCl, 0.05 % Tween-20)으로 3분간씩 3회 씻은 다음 검사혈청(항혈청)을 3 % SMP-PBS-T 용액(3 % skim milk powder, 0.01 M PBS pH 7.4, 0.05 % Tween-20)에 1:100으로 희석하여 microplate의 각 well에 100  $\mu$ l씩 주입하고 37°C의 습실에서 1시간동안 정온반응을 시켰다. 이 과정이 끝난 후에 다시 전과같이 세척액으로 씻고 여기에 goat antihuman IgG HRP (horse raddish peroxidase) conjugated serum (gamma chain, ICN Chemical Credential Immunobiologicals)을 3 % SMP-PBS-T용액에 1:10,000으로 희석하여 각 well에 100  $\mu$ l씩 주입하여 37°C습실에서 다시 1시간 정온반응 시켰다. 정온반응이 끝난 후 세척용액으로 씻고 여기에 기질 용액 OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (o-phenylene-diamine 50 mg을 0.1 M phosphate citrate buffer (pH 5.0)에 용해시키고 여기에 0.5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 OPD용액 10 ml당 100  $\mu$ l씩 넣고 혼합)를 100  $\mu$ l씩 각 well에 주입하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 여기에 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 50  $\mu$ l씩을 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 titer-spectrophotometer에서 492 nm의 파장으로 OD (optical density)를 측정 판독하였다.

### SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SDS-PAGE는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 discontinuous SDS-buffer system을 사용하였으며 mini protean II set (Bio Rad)와 power supply (Bio Rad 250/200)를 사용하여 Bio Rad instruction manual에 따라 전기영동 하였다. 영동하기 전에 조항원 단백질을 sample buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.0 ml, glycerol 0.8 ml, 10 % (w/v) SDS 1.6 ml, 2-mercaptoethanol 0.4 ml, distilled water 4.0 ml]에 1:4로 희석한 후 100°C에서 3분간 가열하였다. 이 sample을 각 well에 20  $\mu$ l(단백질 함량 168  $\mu$ g/20  $\mu$ l)씩 주입하였고 standard marker protein (Bio Rad laboratories)은 200 Kd에서 14.4 Kd범위의 SDS-PAGE용 표준단백질을 sample buffer에 1:20으로 희석한 후 10  $\mu$ l씩 주입하여 전기영동을 하였다. SDS-PAGE에서 resolving gel은 1%의 SDS를 포함한 12 % polyacrylamide gel을 사용하였고 stacking gel은 5 % polyacrylamide gel을 사용하여 실온에서 stacking gel에서는 25 mA, resolving gel에서는 50 mA로 bromophenol blue가 gel의 말단에 이를때 까지 전개하였다. 전개된 gel은 nitrocellulose membrane에 electrotransfer blot하여 EITB에 사용하였고 일부는 Morrissey (1981)가 기술한 방법에 따라 0.2 % coomassie blue R-250 용액(0.2 % coomassie R-250, 45 % methanol, 10 % acetic acid)에 염색하였고 또 일부는 Oakley *et al* (1980), Morrissey (1981), Tsang *et al* (1984) 등이 기술한 방법에 따라 silver stain을 하여 단백질분획을 추궁하였다.

### EITB (Enzyme-linked Immunelectrophoretic Transfer Blot)

SDS-PAGE로 전개분리된 sparganum의 조항원 단백질을 Towbin (1979), Burnette (1981), Gershoni (1983), Tsang *et al* (1984), Grogle *et al* (1985)등이 기술한 방법을 참고로 하여 Bio-Rad manual procedure에 따라 nitrocellulose membrane에 electrotransfer blot하였다. electrotransfer blot은 Tris-glycin (pH 8.3)/20

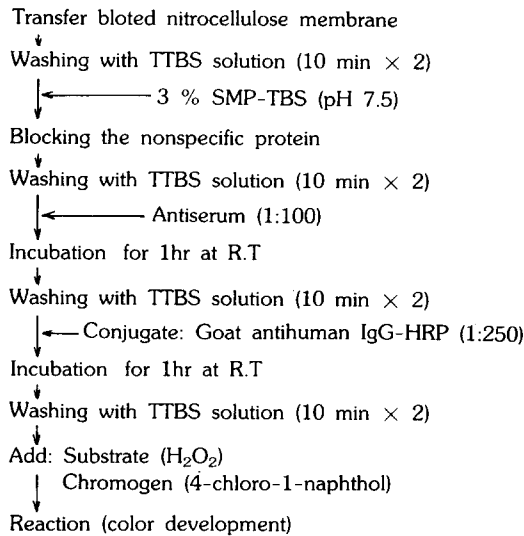


Fig. 2. Procedure of enzyme-linked immunoblot assay.

% methanol transfer buffer로 30 V (0.11 A)정압하에서 17시간 영동, 전이시켰다. 영동전이가 끝난 후 nitrocellulose막을 길이로 잘라 효소표지면역반응검사(enzyme-linked immunoassay)에 사용하였으며 또 일부는 Amido black용액 (0.15 % amido black 65 ml, methanol 25 ml, acetic acid 10 ml)에 염색하여 대조구로 하였다.

#### ELIA (Enzyme-linked Immunoassay)

효소표지면역검사는 Fig. 2와 같은 과정으로 sparganum조항원 단백질이 영동전이된 nitrocellulose막을 Tween-20 Tris buffered saline (TTBS, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5)에 10분씩 2회 씻은 다음 비특이 단백질을 제거하기 위해 blocking solution으로 3 % skim milk powder-TBS에 1시간 동안 반응시킨 후 다시 10분씩 2회 씻고 sparganosis, cysticercosis, hydatidosis환자의 혈청과 정상인의 혈청을 1 % SMP-TBS에 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 과정 후에 다시 전과같이 TTBS용액으로 씻고 goat antihuman IgG-horse raddish peroxidase serum (gamma chain, ICN Chemical Credential Immunobiologicals)을 1 % SMP-TBS에 1:500으로 희석한 conjugate용액에 실온에서 1시간 동안

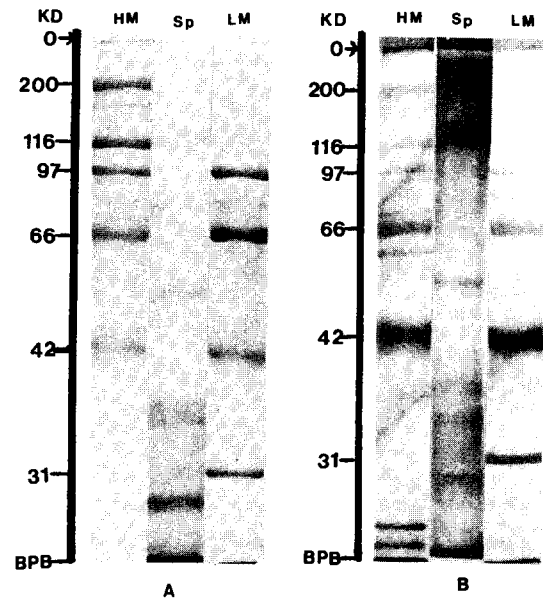


Fig. 3. Resolved band of crude antigenic protein extracted from sparganum (metacestode of *Spirometra sp.*) by 12 % SDS-PAGE. A: Protein was visualized by staining with coomassie blue R-250 and 19 band was identified. B: Protein was visualized by staining with silver stain and 25 band was identified. HM, high molecular marker. LM, low molecular marker. SP, sparganum. KD, kilo dalton (MW). BPB, bromophenol blue. O, origin.

반응시킨 다음에 다시 TTBS로 씻고 기질용액과 발색용액(4-chloro-1-naphthol 60 mg을 cold methanol 20 ml에 용해하고 cold TBS 100 ml에 cold 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60 ml을 가하여 사용전에 두용액을 혼합)에 넣어서 실온에서 30분간 반응시켜 발색되게 하였다. 이 과정에 이어 탈이온 증류수에 넣어 반응을 정지시킨 다음 건조시켜 항원성분들을 대조비교하였다.

#### 결과

Sparganum에서 추출한 조항원 단백질성분을 SDS-PAGE로 분획한 결과는 Fig. 3과 같으며 gel을 coomassie blue R-250과 silver염색용액으로 염색하여 항원단백질을 분석하였다.

Coomassie blue R-250용액으로 염색하여 확인된 항원단백질 분획은 290 Kd에서 23 Kd범위의 분자량을 가진 19개의 단백질분획이 분리되

**Table 1.** The O.D for the crude antigenic protein extracted from sparganum against the sparganosis, cysticercosis, hydatidosis and normal sera by ELISA.

Absorbance in				
Case No.	Sparganosis sera mean $\pm$ SD	Cysticercosis sera mean $\pm$ SD	Hydatidosis sera mean $\pm$ SD	Normal sera mean $\pm$ SD
1	1.85 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.027	0.76 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.02
2	1.90 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.025	0.85 $\pm$ 0.12	0.15 $\pm$ 0.04
3	1.20 $\pm$ 0.39	0.19 $\pm$ 0.014	0.98 $\pm$ 0.08	0.13 $\pm$ 0.03
4	0.43 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.027	0.50 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.02
5	0.40 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.031	0.87 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.03
6	-	0.19 $\pm$ 0.031	0.61 $\pm$ 0.03	-
7	-	-	0.75 $\pm$ 0.04	-
8	-	-	0.35 $\pm$ 0.04	-

었으며 이중에서 116 Kd, 53 Kd, 36 Kd, 33 Kd, 23 kd의 단백질분획이 강하게 발현되었으며 silver stain에서는 290 Kd에서 23 Kd범위의 분자량을 가진 25개의 단백질분획이 분리되었고 이중에서 290 Kd, 125 Kd, 116 Kd, 58 Kd, 36 Kd, 28 Kd, 26 Kd등의 단백질분획이 강하게 발현되었다.

### ELISA

Sparganum의 조항원성분과 sparganosis, cysticercosis, hydatidosis환자 혈청에 있는 IgG항체와 면역반응에서 반응역가를 ELISA로 측정 한 결과는 Table 1과 같으며 민감도(Sensitivity: No. of positives/No. of patients.)는 Table 2와 같다. Table 1에서와 같이 sparganosis환자의 혈청과의 반응역가는 O.D가 1.90  $\pm$  0.03에서 0.40  $\pm$  0.03이고 정상인의 혈청과의 반응역가는 O.D가 0.10  $\pm$  0.03에서 0.15  $\pm$  0.04로 이것을 음성기준으로 한다면 sparganosis환자에서의 반응역가는 모두 양성이고 민감도(sensitivity rate)는 100 % 이었다.

Cysticercosis 환자혈청중 IgG항체와의 반응역가는 O.D가 0.15  $\pm$  0.025에서 0.19  $\pm$  0.031으로 6명 중 4명이 음성기준의 O.D보다 높아 양성이었으며 민감도는 66.7 %이었다.

Hydatidosis환자혈청중의 IgG항체와의 반응에서는 O.D가 0.35  $\pm$  0.04에서 0.98  $\pm$  0.08으로 음성기준의 O.D보다 모두 높아 양성이었고 민감

**Table 2.** The sensitivity rate of IgG antibodies in sera of sparganosis, cysticercosis and hydatidosis reacted with crude antigenic protein extracted from sparganum by ELISA.

Sera of patients	No. of cases	No. of positive	Sensitivity rate (%)
Sparganosis	5	5	100
Cysticercosis	6	4	66.7
Hydatidosis	8	8	100

Note; Sensitivity: no. of positives/no. of patients.

도도 100 %이었다. 또한 sparganosis환자의 혈청과의 반응역가보다 높은 O.D가 나타나기도 했다. 또한 sparganum의 항원성분중 cysticercosis와 hydatidosis환자혈청중의 IgG항체와 교차반응이 나타났다.

### EITB

**sparganosis환자의 IgG항체에 의해 인지된 조항원성분 :** 전기영동전이를 한 nitrocellulose membrane을 ELIA (enzyme-linked immunoassay)로 5명의 sparganosis환자혈청의 IgG항체와 면역반응을 시킨결과 sparganum의 항원성분이 Table 3과 같이 290 Kd에서 23 Kd범위의 분자량을 가진 16개의 항원성분이 인지되었다.

이중 83 Kd의 항원성분은 5명의 sparganosis 환자혈청에서 모두 인지되었고 97 Kd, 64 Kd, 28 Kd항원성분은 5명중 4명에서 인지되었고

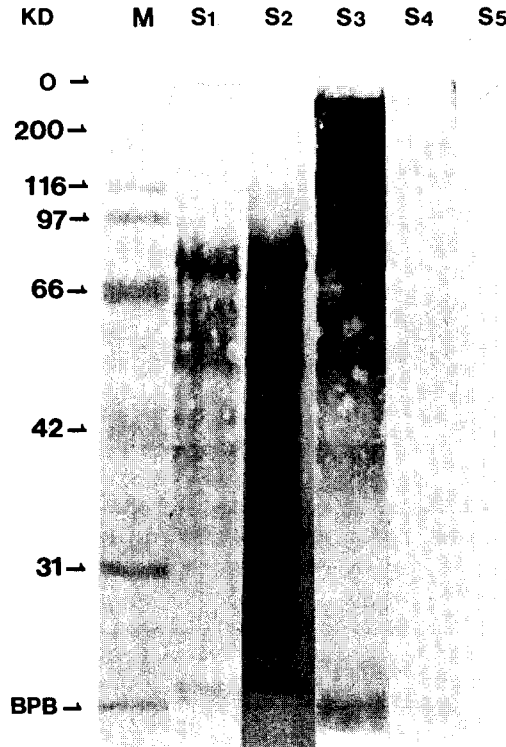


Fig. 4. Antigenic components of sparganum reacted with sera of 5 sparganosis patients. M, marker protein. S, sparganosis patients sera. BPB, bromophenol blue. O, origin. KD, kilo dalton.

125 Kd, 53 Kd, 42 Kd, 39 Kd의 항원성분은 5명중 3명에서 인지되었으며 개인별 혈청반응의 결과는 Fig. 4와 같다.

7명의 정상인의 혈청 중 IgG항체와 sparganum조항원성분과 혈청반응에서 인지된 결과는 Table 3에서와 같이 97 Kd에서 30 Kd범위에 있는 8개의 항원성분이 인지되었으며 이중에서 83 Kd, 64 Kd는 7명 전원에서 인지되었고, 33 Kd는 7명중 2명에서 나머지는 7명중 1명에서 인지되었다.

Sparganosis환자혈청에서 인지된 항원성분과 정상인의 혈청에 의해 인지된 항원 성분을 비교하면 97 Kd, 83 Kd, 73 Kd, 64 Kd, 42 Kd, 33 Kd의 항원성분은 양쪽 혈청의 IgG항체에 의해 교차반응(cross reaction)이 일어난 항원성분이고 36 Kd, 30 Kd의 항원성분은 정상인의 IgG항체

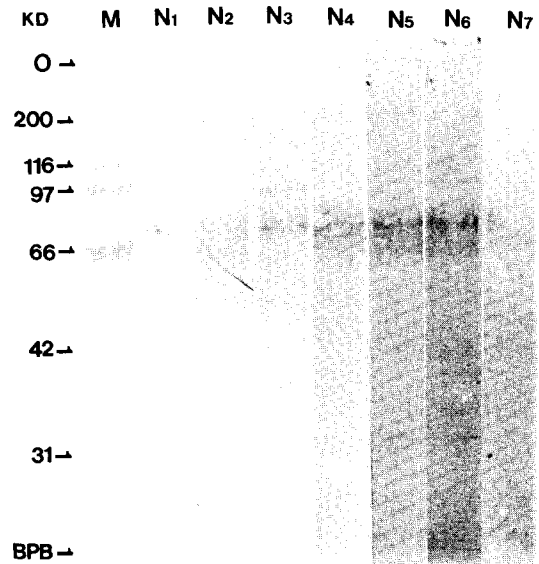


Fig. 5. Antigenic components of sparganum reacted with sera of 7 normal human (control group). M, marker protein. N, normal human sera. O, origin. BPB, bromophenol blue. KD, kilo dalton.

에서만 인지된 항원성분이었다. 개인별 반응결과는 Fig. 5와 같다.

**cysticercosis환자혈청중 IgG항체에 의해 인지된 항원성분**: Table 3에서와 같이 cysticercosis환자의 혈청 중 IgG항체와 반응시켜 인지된 sparganum의 조항원성분은 105 Kd에서 58 Kd의 범위에 있는 4개의 항원성분이고 이중 64 Kd, 61 Kd, 58 Kd은 5명 전원에서 인지되었다. 인지된 항원성분중 64 Kd, 58 Kd는 sparganosis환자의 IgG항체에서도 인지된 항원성분으로 교차반응을 이룬 비특이항원성분이며 105 Kd, 61 Kd의 항원성분은 cysticercosis환자혈청에서 인지되었고 sparganosis환자의 혈청에서는 인지되지 않았으나 hydatidosis환자의 IgG항체에 의해서 인지되었다. cysticercosis환자의 개인별 항원항체반응의 결과는 Fig. 6과 같다.

#### hydatidosis 환자의 혈청중 IgG항체에 의해 인지된 항원성분

8명의 hydatidosis환자의 IgG항체와 반응시켜 인지된 sparganum의 항원성분은 Table 3과 같

**Table 3.** Crude antigenic protein from sparganum reacted with sparganosis, cysticercosis, hydatidosis and normal sera by EITB

Antigenic proteins resolved by 12% SDS-PAGE (MW: Kd)	Crude antigenic protein reacted with			
	sparganosis sera (5 sera)	normal sera (7 sera)	cysticercosis sera (6 sera)	hydatidosis sera (8 sera)
290	+ 2	-	-	-
228	-	-	-	+ 2
200	+ 1	-	-	-
180	-	-	-	-
152	-	-	-	+ 3
125	+ 3	-	-	-
116	-	-	-	-
105	-	-	+ 1	+ 3
97	+ 4	+ 1	-	+ 1
83	+ 5	+ 7	-	+ 3
73	+ 1	+ 1	-	+ 4
66	-	-	-	+ 6
64	+ 4	+ 7	+ 6	+ 8
61	-	-	+ 6	+ 2
58	+ 1	-	+ 6	+ 3
53	+ 3	-	-	+ 5
47	+ 2	-	-	+ 5
42	+ 3	+ 1	-	+ 4
39	+ 3	-	-	+ 6
36	-	+ 1	-	+ 4
33	+ 2	+ 2	-	+ 1
30	-	+ 1	-	+ 2
28	+ 4	-	-	-
26	+ 2	-	-	+ 1
23	+ 1	-	-	+ 1

Note; +: positive immunoreaction

이 228 Kd에서 23 Kd범위에 있는 분자량을 가진 19개의 항원성분이 인지되었으며 이 중 64 Kd의 항원성분은 8명 전원에서 인지되었고 66 Kd, 39 Kd의 항원성분은 8명중 6명에서 53 Kd, 47 Kd은 8명중 5명에서 73 Kd, 42 Kd, 36 Kd은 8명중 4명에서 인지되었다.

hydatidosis환자별 항원항체반응의 결과는 Fig. 7과 같다.

또한 sparganosis, cysticercosis, hydatidosis등의 환자혈청과 정상인의 혈청 중 IgG항체에 의해 인지된 sparganum의 항원성분을 비교하면 Table 3에서와 같이 228 Kd, 152 Kd, 66 Kd의 항원성분은 hydatidosis환자의 IgG항체에서만 인지되었고, 64 Kd은 sparganosis, cysticercosis,

hydatidosis환자의 IgG항체와 정상인의 IgG항체 모두에서 인지되어 비특이항원성분이었으며 290 Kd, 200 Kd, 125 Kd, 26 Kd은 sparganosis환자의 IgG항체에서만 인지된 항원성분이다. 나머지의 항원성분은 서로 교차반응을 이끄는 항원성분이다.

## 고찰

본 실험에서는 *Spirometa erinacei* (만손열두촌충)의 유충인 sparganum에서 추출한 조항원 성분과 sparganum, cysticercus와 hydatid감염으로 생성된 각 항체와의 혈청학적 반응으로 인지된

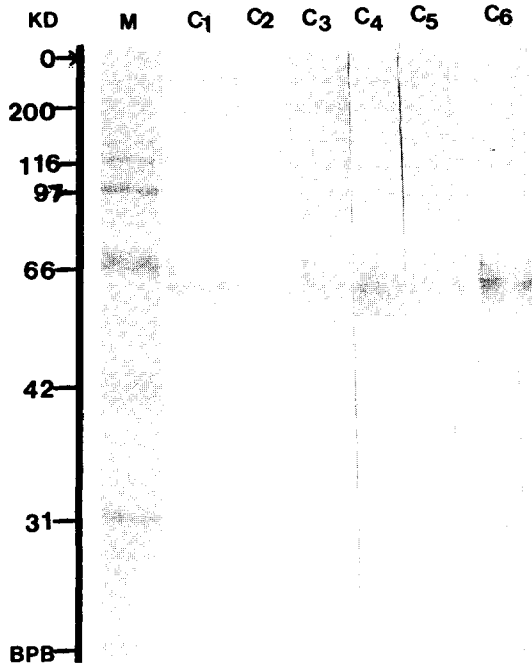


Fig. 6. Antigenic components of sparganum reacted with sera of 6 cysticercosis patients. M, marker protein. C, cysticercosis patients sera. O, origin. BPB, bromophenol blue. KD, kilo dalton.

조항원의 특이성과 민감도 등을 ELISA와 EITB를 이용하여 추구하였으며 ELISA에서 가 양성(false positive)의 원인과 교차반응을 일으키는 항원성분을 추구하였다. sparganum의 조항원 성분을 0.01 M PBS (pH 7.4)로 추출하여 SDS-PAGE로 전개분리한 다음 coomassie R-250 용액으로 염색하여 19개의 항원단백질 분획으로 분리하였고, silver stain에서는 25개의 항원 단백질이 확인되었다. 이러한 차이는 염료에 대한 감수성의 차이 염색과정등 여러조건의 차이에서 오는 것이라고 한다(Oakley *et al.*, 1980; Schleicher and Watterson, 1983) Cho *et al.* (1988)는 생리식염수로 추출한 sparganum의 조항원을 SDS-PAGE하여 28개의 분획을 동정하였다고 보고하여 본 실험에서 확인된 항원단백질의 분획수와 차이가 있었다. 이것은 사용한 gel의 농도차이에서 오는 것으로 생각된다.

ELISA는 Van Weeman *et al.* (1971) 및 Engvall *et al.* (1971) (1972)등이 항원항체를 측정

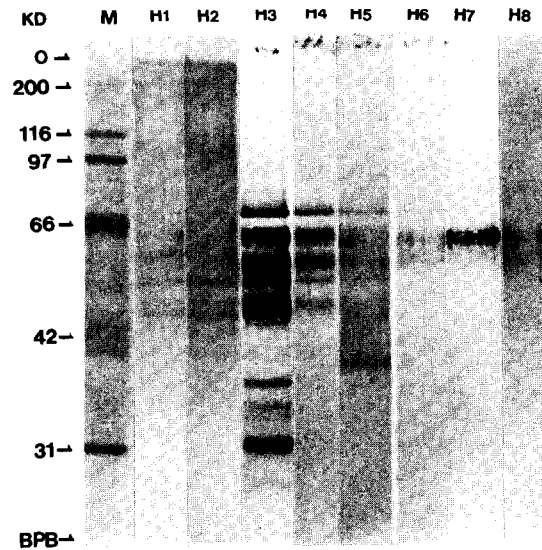


Fig. 7. Antigenic components of sparganum reacted with 8 hydatidosis patients. M, marker protein. H, hydatidosis patients sera. O, origin. KD, kilo dalton. BPB, bromophenol blue.

하기 위하여 고안 사용한 이래 방사면역진단법 (radioimmunoassay)보다 민감도가 크고 방사면역진단법의 난점을 해소할 수 있는 가능성을 가진 방법으로 주목되어 왔다. 또한 ELISA가 기생충증 진단에 도입되어 trichinosis (Ljungström *et al.*, 1974, Ruitenber *et al.*, 1974), malaria, trypanosis, chagas disease, toxoplasmosis (Voller *et al.*, 1974, 1975a, 1975b, 1975c, 1976), hydatidosis (Farag *et al.*, 1975, 1986), cysticercosis (Arambulo *et al.*, 1978)등의 진단에 이용하여 그 가치가 인정되었다. sparganosis의 진단에는 Okabe and Murase, 1957의 침강반응과 피내 반응의 진단보고가 있었으며 Ishii (1973)의 간접형광항체법(IFA)의 진단보고가 있었고 ELISA는 Kim *et al.*, 1984의 보고가 있었다. 본 실험에서도 ELISA로 sparganum의 조항원과 sparganosis환자의 IgG항체와의 혈청반응 역가가 Kim *et al.* (1984)이 보고한 0.13 - 1.44의 O.D와 민감도 85.7 % 보다 높은 값이었다. 또한 hydatidosis, cysticercosis환자의 IgG항체와도 교차반응이 있었으며 민감도는 hydatidosis는 100 %, cysticercosis에서는 66.7 %이었다. Kim *et al.* (1984)는 cysticercosis와 paragonimus



의 항원에 대하여 sparganosis환자의 IgG항체와 교차반응이 없다고 보고하였으나 Cho *et al* (1988)는 *cysticercus*의 낭액을 항원으로 하고 Kim and Yang (1988)는 *cysticercus*의 조항원을 항원으로 하여 sparganosis환자의 IgG항체와 교차반응이 있었다고 보고하였으며 Ishii (1973)도 sparganum항원과 filariasis (elephantiasis), 일 본주혈흡충증 환자혈청과의 침강반응에서 교차반응이 있었다고 보고하였으며 본 실험에서도 cysticercosis, hydatidosis환자혈청과 교차반응이 있었던 것과 일치하였다. EITB에서 sparganum의 조항원 성분과 sparganosis, cysticercosis, hydatidosis환자의 정상인의 IgG항체와 혈청반응을 시켜 항원성분을 추구한 결과 SDS-PAGE에서 분획된 25개의 단백질성분 중 sparganosis환자의 IgG항체에 의해 16개의 항원성분이 cysticercosis환자의 혈청에서 4개, hydatidosis환자혈청에서는 19개, 정상인의 혈청에서는 8개의 항원성분이 각각 인지되었으며 이 중 64 Kd의 분자량을 가진 항원성분은 검사에 관여한 환자와 정상인의 IgG항체에 의해 모두 인지되어 비특이항원성분이라고 생각되며, 290 Kd, 200 Kd, 125 Kd, 28 Kd의 항원성분은 sparganosis환자의 IgG항체에 의해서만 인지되었고 228 Kd, 152 Kd, 66 Kd항원성분은 hydatidosis환자의 IgG항체에서만 인지되었다.

또한 cysticercosis환자의 IgG항체에서보다 hydatidosis환자의 IgG항체에 의해 인지된 항원성분이 많았으며 이것은 ELISA에서 cysticercosis와 hydatidosis환자의 혈청과의 교차반응을 측정 민감도와도 그 경향이 일치되었다. Cho *et al* (1988)는 sparganum의 조항원을 EITB하여 34 Kd와 29 Kd의 단백질분획이 모든 환자의 혈청에서 강한 반응을 나타냈다고 보고하였다. 본 실험에서는 28 Kd의 항원성분이 5명 중 4명에서, 33 Kd는 5명 중 2명에게서 인지되었고, 또 97 Kd, 64 Kd은 5명 중 4명에게서 83 Kd의 항원성분은 5명 전원에게서 인지되어 Cho *et al* (1988)이 보고한 것과 약간의 차이가 있었다.

## 시사

본 연구에 사용된 sparganosis환자의 혈청을 분양해 주신 중앙대학교 의과대학 조승열 박사님께 깊은 사의를 표합니다.

## 인용문헌

- Anders, K., K. Foley., E. Stern, and W. J. Brown, 1984. Intracranial sparganosis: An uncommon infection-- Case report. *J. Neurosurg.* **60**:1282-1286.
- Araki, J and H. Nakazato, 1976. Two cases of Sparganosis mansoni presumption of the parasitism under pericardium and the movement of parasite during seven years. *Jap. J. Parasit.* **25**:1-7.
- Arambulo III, P. V., K. W. Walls, S. Bullok and I. G. Kagan 1987. Serodiagnosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). *Acta Trop (Basel)* **35**:63-67.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Bumette, W. N., 1981. Western blotting electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radio graphic detection with antibody and radio iodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**:196-203.
- Carbajal, R. J., E. Palacios, B. Azar-Kia, and R. Churchill, 1977. Radiology of cysticercosis of the central nervous system including computed tomography. *Radiology* **125**:127-131.
- Carbajal, R. J., P. Salgado, R. Gutierrez, A. Escobar, G. Araffo, and E. Palacios, 1983. The acute encephalic phase of neurocysticercosis: computed tomographic manifestations. *Am. J. Neuroradiol.* **4**:51-55.
- Chan, S. T., C. H. Tse, Y. S. Chan, and D. Fong, 1987. Sparganosis of the brain. *J. Neurosurg.* **67**:931-934.
- Chang, K. H., S. Y. Cho, J. G. Chi, W. S. Kim, M. C. Han, C. W. Kim, H. J. Myung and K. S. Choi, 1987. Cerebral sparganosis: CT Characteristics. *Radiology* **165**:505-510.
- Chi, J. G., H. S. Chi, and S. H. Lee, 1980. Histopathologic study on human sparganosis. *Korean J. Parasitol.* **18**:15-23.
- Cho, S. Y., J. H. Bae, B. S. Seo, and S. H. Lee, 1975. Some aspects of human sparganosis in Korean. *Korean J. Parasitol.* **13**:60-77.
- Cho, S. Y., S. I. Kim, S. Y. Kang, D. Y. Choi, J. S. Suk,

- K. S. Choi, Y. S. Ha, C. S. Chung and H. J. Myung, 1986. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in serological diagnosis of human neurocysticercosis using paired samples of serum and cerebrospinal fluid. *Korean J. Parasitol.* **24**:25-41.
- Cho, S. Y., S. Y. Kamg, and Y. Kong, 1988. Antigenic protein fractions reacting with sera from human sparganosis as revealed by SDS-PAGE/EITB. *Korean J. Parasitol.* **26**:149-152.
- Coker-van, M., P. Brown, and C. Gajdusck 1984. Serodiagnosis of human cysticercosis using a chromatofocused antigenic preparation of *Taenia solium* cysticerci in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Trans. Res. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**:492-496.
- Engvall, E and P. Perlman 1971. ELISA: Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**:871-874.
- Engvall E. and P. Perlman, 1972. ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.* **109**:129-135.
- Fan, K. J. and G. H. Pezeshkpour 1986. Cerebral sparganosis. *Neurology* **36**:1249-1251.
- Farag, H., D. Bout, and A. Caorib. 1975. Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *biomedicine*, **23**:276-278.
- Flissr, A and C. Larralde 1986. Cysticercosis. In: Immunodiagnosis of Parasitic Disease (K. F. Walls and P. M. Schwartz eds.). Academic press, New York.
- Gershoni, M. J., 1983. Review; Protein blotting. Principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**:1-15.
- Gottstain B., V. C.W. Tsang, and P. Schantz, 1986. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**:308-313.
- Grögl, M., J. J. Estrada, G. MacDonald, and R. E. Kuhn. 1985. Antigen-antibody analysis in neurocysticercosis. *J. Parasit.* **71**:433-442.
- Hong, S. K., K. S. Choi, and B. S. Shim 1978. Cysticercosis of the central nervous system. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **7**:417-423.
- Ishii, A. 1973. Indirect fluorescent antibody test in human sparganosis. *Jap. J. Parasitol.* **22**:75-78.
- Iwata, S. and S. Matsuda 1967. Adult mansonis tapeworm (*Diphyllobothrium erinacei*) parasitized in man. *Jap. J. Parasit.* **16**:568.
- Kim, H., S. I. Kim, and S. Y. Cho. 1984. Serological diagnosis of human sparganosis by means of micro-ELISA: *Korean J. Parasitol.* **22**:222-28.
- Kim, C. H and J. Yang. 1988. Immunological characterization of antigen from cysticercus and sparganum, and their application to the development of immunodiagnostic system. 1. Immunological characterization of crude antigenic components from *Cysticercus cellulose*. *Korea J. Parasitol.* **26**:245-254.
- Kim, S. C., J. D. Kim and J. H. Shim 1981. A case of *Sparganum mansonii* in the intracerebral region. *J. Korean Neurosurg. Assoc.* **10**:589-591.
- Koh, Y. C. and B. S. Shim 1980. C. T. Findings of parasitic infestations of the brain in Korea. *J. Korean Neurosurg. Soc.*, **9**:7-18.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature.* **227**:680-685.
- Lee, S. H., J. Y. Choi, B. S. Soe and S. Y. Cho. 1984. Two cases of human infection by adult of *Spirometra erinacei*. *Korean J. Parasitol* **22**:66-71.
- Ljungström, I., E. Engvall, and E. J. Ruitenber, 1974. ELISA, enzyme linked immunosorbent assay a new technique for serodiagnosis of trichinosis. *Parasit.* **69**, XXIV. *Proceedings of the British Society for Parasitology.*
- Maeno, Y., A. Sano, K. Nagase, T. Toani, T. Abe, S. Suzuki, and K. Tonkai, 1986. A case of human infection with adult *diphyllobothrium erinacei*. *Jap. J. Parasit.* **35**:11 (Supp. 13).
- Miller, R. C., M. A. Goldberg., D. G. Heiner, A. Myers, and A. goldber, 1984. A new immunologic test for CNS Cysticercosis. *Neurology.* **34**:695.
- Mineura, K. and T. Mori, 1980. Sparganosis of the brain. Case report. *J. Nerosurg.* **52**:588-590.
- Mohammad, I. D., D. G. Heiner, B. L. Miller, and I. G. Kagan, 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis *J. Clin. Microbiol.* **20**:775-779.
- Morrissey, H. J. 1981. Silver stain for protein in polyacrylamide gels; A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**:307-310.
- Oakley, B. R., D. R. Kirsch, and N. R. Morris, 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**:361-363.
- Okabe, H. and K. Murase, 1957. Immunological study in sparganosis. *Kurume J. Med.* **20**:907-913.
- Park, S. H., J. D. Rhee, S. K. Dang, and J. K. Kim. 1972. A case of preport of *Sparganum mansonii* in the spinal canal. *J. Korean Neurosurg. Assoc.* **1**:204-207.
- Ruitenber, E. J., P. A. Steerenberg, B. J. M. Brosi, and J. Buys 1974. Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infection in pigs by enzyme-linked immunosorbent assay. *Bull. Wild. Hlth. Org.* **51**:108-109.
- Schantz, M. P., D. Shanks, and Marianna Wilson. 1980. Serologic crossreactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**:609-612.