

怡樂村페흡충 감염 쥐의 혈청에 대한 효소면역 반응(ELISA)

순천향대학교 의과대학 기생충학교실

임병길 · 이옥란 · 남해선

요약 : 怡樂村페흡충(*Paragonimus iloktsuenensis*) 감염 흰쥐 혈청의 항체 생산을 효소면역 반응(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)으로 관찰하였다. 이라촌페흡충의 피낭유충을 흰쥐에 감염시킨 후 격주로 12주까지 채혈한 혈청과 이라촌페흡충 成蟲 추출 粗항원의 반응, 면역교차 반응의 유무를 알기 위해 同혈청과 페흡충(*P. westermani*) 조항원(PWA) 및 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 조항원(CSA)의 반응을 ELISA의 OD값(optical density value)으로 측정하였다. 감염경도별 혈청群(GI, GII, GIII, 및 GIV)은 최수된 총체수로 구분하였다.

이라촌페흡충 감염 흰쥐 혈청은 同항원(PIA)과의 반응에서 감염 후 4주에 수 감염 개체의 평균 OD값이 대조 혈청과 유의한 차이를 나타내어 항체 양성 반응이 인정되었고, 조사된 12주까지 점차 OD값의 증가로 항체가의 증가를 나타내었다. 감염강도별로 구분한 群別 평균 OD값의 數値는 대체로 감염강도와 비례하였으나 감염 6주 이후 군별 OD값의 유의성은 없었고, 개체별 OD값은 보유충체 數에 비례하지 않는 개체들이 많았다. 이라촌페흡충 감염 흰쥐 혈청은 페흡충(*P. westermani*) 조항원(PWA) 및 간흡충(*C. sinensis*) 조항원(CSA)과의 반응(ELISA)에서도 상당한 면역교차 반응을 나타내었다.

Key words: *Paragonimus iloktsuenensis*, rat, ELISA, cross reaction, crude antigen

서 론

이라촌페흡충(*Paragonimus iloktsuenensis*)은 1931년 중국 광둥성 이라촌 지역의 집쥐(*Rattus rattus*, *R. norvegicus*)에서 최초로 발견되어, Chen(1940)에 의해命名된 페흡충으로, 한국에서는 최초로 Yokogawa *et al.* (1971)이 부산 下端에서 중간숙주인 말뚝게(*Sesarma dehaani*)로부터 피낭유충을 발견하였고, 同지역과 집진강 河口(경남 河東)지역의 집쥐(*R. norvegicus*)에서 성충을 발견하였다(Seo and Koo, 1971). 이로써, 한국에서는 人體 페흡충증의 원인이 되는 페흡충(*P. westermani*)과 함께 2種의 페흡충이 알려지었다. 아직 人體 감염例가 보고되지 않아 이라촌페흡충에 대한 연구는 활발치 못하였으나 최근 이 등 (1989)은 개 및 고양이에 실험 감염이 가능함을 보고하여 人體 감염의 가능성도 높다는 것을 알게 되었다. 한국에서 이라촌페흡충에 대한 연구는 이 흡충이 한국에서 발견된 이래 총체의 형태 및 발육, 숙주의 감염경로, 병변, 감염률 및 치료에 대한 연구보고들(Seo *et al.*, 1971, 1972 & 1973; Kang *et al.*, 1975; Rim *et al.*, 1976; 裴 등, 1976; 이 등, 1986a & b; 李 등, 1989; 손 등, 1989)이 있었으나 면역학적 연구는 없었다. 인체 감염의 가능성이 있는 이라촌페흡충이 일부 지역의 집쥐에서 높은 감염 빈도를 나타내고 있으므로, 한국에서의

인체 페흡충증이 반드시 페흡충(*P. westermani*) 감염에 의한 것이라고 확신할 수는 없을 것 같다. 또한 두 蟲의 총란(egg)이 형태학적으로 구별하기 쉽지 않고 수술이나 부검을 하지 않고는 감염된 총체를 얻을 수 없으므로 감염자의 원인 蟲을 쉽게 구별할 수도 없다. 그러나 특이항원(specific antigen)에 의한 면역학적 진단 방법이 개발된다면 감염된 원인 蟲을 구별할 수 있을 가능성이 높다고 본다.

본 실험은 이러한 연구의 일환으로 이라촌페흡충증에서의 항체 생산 및 감염 기간에 따른 항체가의 변동을 ELISA 방법으로 관찰하고, 또한 다른 인체 감염 흡충들과의 면역교차 반응을 알아보기 위하여 시도하였다.

재료 및 방법

1. 항원(antigen):

1) 이라촌페흡충 조항원(*P. iloktsuenensis*-whole worm-saline homogenated crude antigen: PIA)

경남 河東産 말뚝게(*Sesarma dehaani*)로부터 분리한 이라촌페흡충의 피낭유충을 흰쥐(albino rats)에 주입시킨 후 12~15주에 屠殺하여 성충을 얻었다. 全蟲체(whole worm) 식염수 추출물인 조항원은 Tsuji(1975)의 방법을 기초로 하였다(담배질 농도: 5.7 mg/ml)(Lowry, 1951).

2) 폐흡충 조항원(*P. westermani*-whole worm-saline homogenated crude antigen: PWA)

이락촌폐흡충 항원(PIA)과 같은 방법으로 만들었다(단백질 농도: 9 mg/ml).

3) 간흡충 조항원(*C. sinensis*-whole worm-saline homogenated crude antigen: CSA)

上記 항원들과 같은 방법으로 만들었다(단백질 농도: 2 mg/ml).

2. 항혈청(antisera):

1) 이락촌폐흡충 감염 혈청

이락촌폐흡충의 항원청은 실험 감염된 흰쥐의 혈청으로, 경남 河東産 말뚝게(*Sesarma dehanni*)로부터 분리한 피낭유충(분리 과정에서 대부분 囊膜이 벗겨진 유충) 50~80개(마리)씩을 40마리의 흰쥐(체중 150~200 g)에 gastric catheter로 주입시킨 후 2週 간격으로 12주까지 채혈한 혈액에서 분리한 감염기간 별 혈청으로, 부검(감염 12~15주) 후 흰쥐 개체별로 회수한 蟲體數를 감염 총체수로 하였다. 흰쥐 개체별로 회수된 총체 각각은 0~67마리였고, 이 중 12주 이전에 채혈 도중 사망하거나 病死한 개체를 제외한 나머지 개체들의 혈청을 면역 실험에 사용하였다. 감염강도(회수 총체수) 별로 4群(GI, GII, GIII 및 GIV)으로 나누었다(Table 1).

2) 비감염 혈청

비감염군(GI)의 혈청은 피낭유충을 투여하지 않은

Table 1. Recovered worms of *Paragonimus iloktsuenensis* in each rat group

Rat group (No. of rats)	No. worms recovered/rat							
GI (4)	no worm							
II (5)	1,	3,	4,	5,	7			
GIII (4)	10,	10,	13,	19				
GIV (7)	22,	22,	24,	24,	25,	40,	40	

Table 2. The mean OD values in ELISA of paragonimiasis iloktsuenensis rat sera (100× diluted) and crude antigens; *P. iloktsuenensis*(PIA), *P. westermani*(PWA), and *C. sinensis*(CSA)

Crude antigen	Group	Control	2	4	6	8	10	12
PIA	GI	0.053	0.088	0.102	0.095	0.081	0.087	0.093
	II	0.033	0.169	0.457	0.651	0.761	0.855	0.950
	GIII	0.048	0.192	0.345	0.613	0.969	1.232	1.130
	GIV	0.050	0.282	0.671	0.885	0.998	1.149	1.270
PWA	II	0.058	0.132	0.389	0.518	0.853	0.972	0.951
	GIII	0.082	0.167	0.274	0.670	0.877	1.132	1.092
	GIV	0.060	0.158	0.525	0.922	1.069	1.323	1.113
CSA	II	0.042	0.081	0.144	0.273	0.472	0.625	0.720
	GIII	0.036	0.102	0.188	0.344	0.549	0.699	0.743
	GIV	0.073	0.095	0.179	0.329	0.699	0.812	0.903

실지로 미감염된 2마리의 흰쥐와, 피낭유충은 주입시켰으나 부검에서 총체(worm)가 발견되지 않은 2마리의 흰쥐 혈청으로 구성되었다.

3) 대조 혈청(control sera)

감염 혈청에 대한 대조로써 이락촌폐흡충 감염 흰쥐 순개체의 피낭유충을 주입시키기 前의 미감염 혈청이다.

3. 효소면역 반응(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA):

효소면역반응은 Voller *et al.*(1976)의 방법에 準하여 李 등(1988)과 같이 진행하였다. 항원(PIA; PWA; CSA)의 농도는 10 µg/ml, 효소결합 면역글로불린은 alkaline phosphatase conjugated anti-rat IgG(Sigma A-9654), 검사 혈청은 100배 희석(100×) 된 것을 사용하였다.

ELISA에 의한 항체 반응은 absorbance 410 nm에서 측정된 OD값(optical density value)으로 관찰하였다.

결 과

1. 이락촌폐흡충 흰쥐 혈청과 同항원(PIA)의 효소면역 반응(ELISA)

이락촌폐흡충이 회수된 감염 혈청은 감염 기간이 경과됨에 따라 OD값이 대체로 증가되었다. 즉, 감염강도(총체數)에 따라 구분된 군별(GII, GIII 및 GIV) ELISA의 평균 OD값의 크기는 감염 총체수의 크기와 대체로 비례하였으나 (Table 2; Fig. 1) 개체별로는 OD값(항체가)의 크기는 감염 총체수의 크기와 무관하게 보였다. 즉 1마리 총체가 회수된 GII의 개체(No. 16)의 8주: OD 1.027)는 19마리 총체가 회수된 GIII의 개체(No. 4)의 8주: OD 0.663)보다 OD값이 컸고, 역시 4마리 총체가 회수된 GII의 개체의 OD값(1.120)은 24마리 감염 개체(GIV)의 OD값(0.800) 보다 크게 나타나는 경우가 있었다.

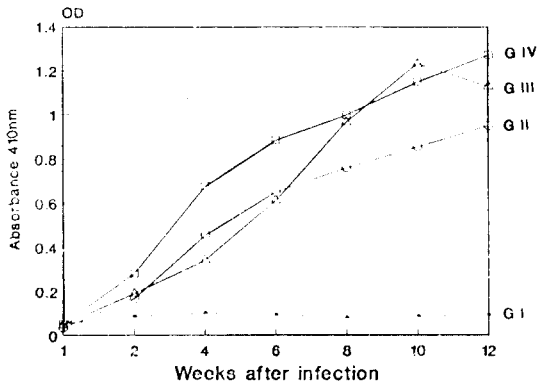


Fig. 1. The mean OD values in ELISA of each group for *Paragonimus iloktsuenensis* antigen and rat sera.

감염 후 평균 OD값이 GII 및 GIV는 12주까지 계속 증가되었고, GIII는 10주까지 증가되고 12주에 다소 떨어지는 OD값을 나타내었다 (Table 2; Fig. 1). 개체에 따라서는 6, 8, 10주까지 증가된 OD값을 12주까지 유지하는 개체들, 감염 후 12주까지 계속 증가되는 개체, 6주 이후 OD값의 증감의 기복을 나타내는 개체가 있었다.

감염강도 별로 구분한 群別 평균 OD값의 차이의 통계적인 유의성은, 미감염군인 GI과 감염 총체수가 가장 많은 GIV가 감염 2주에 OD값의 유의한 차이를 나타내었고, 감염 4주에는 GI과 GII의 OD값도 유의한 차이를 나타내었다. 감염群들(GII, GIII 및 GIV)의 OD값의 차이는 감염 4주의 GIII의 OD값이 다른 群들과 평균 OD값의 유의차를 나타내었고 감염 12주에 GIV가 다른 감염群들(GII 및 GIII)의 평균 OD값과 유의한 차이를 나타내었으나 나머지 감염기간중 群別 OD값의 차이에 유의성은 없었다(Table 3).

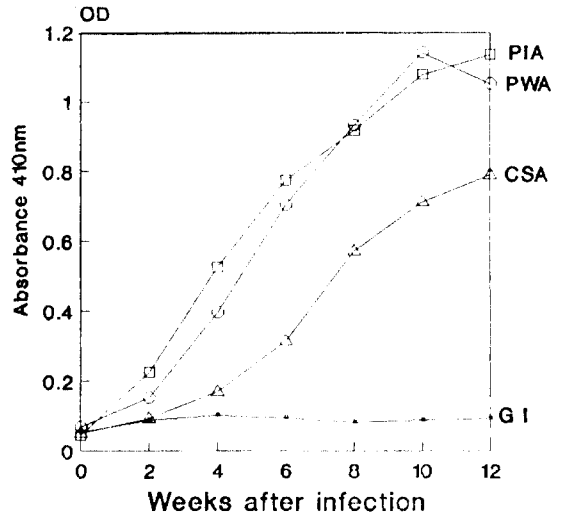


Fig. 2. The mean OD values in ELISA of paragonimiasis iloktsuenensis rat sera and each antigen of PIA, PWA or CSA.

미감염群(GI)은 감염 기간 경과에 따른 OD값의 증가를 나타내지 않았다.

2. 이라촌페흡충 감염 흰쥐 혈청과 PWA 및 CSA의 효소면역 반응(ELISA)

이라촌페흡충 감염군(GII, GIII 및 GIV)의 개체 혈청들과 페흡충(*P. westermani*) 조항원(PWA)의 ELISA 결과는 평균 OD값으로 분 배 상당한 면역교차 반응을 나타내었다(Table 2; Fig. 2).

또한 이라촌페흡충 감염 흰쥐 개체 혈청들(GII, GIII 및 GIV)과 감흡충 조항원(CSA)의 ELISA의 OD값으로 나타난 항체 반응도 페흡충 항원(PWA)과의 반응에서보다는 정도가 약하나 면역교차 반응을 관찰할 수

Table 3. Anova & Duncan's multiple comparison test for the OD values of rat sera infected with *P. iloktsuenensis* (value of Pi replaced by rank)

Week/Group	I	II	III	IV	F-value	p-value
0	12.625 A	8.100 A	11.125 A	10.643 A	0.42	0.7403
2	6.500 B	8.900 BA	8.500 BA	15.071 A	3.00	0.0617
4	3.250 C	11.600 BA	8.750 CB	14.857 A	6.35	0.0048
6	2.500 B	10.600 A	11.250 A	14.571 A	6.87	0.0035
8	2.500 B	9.000 A	13.500 A	14.429 A	8.65	0.0012
10	3.000 C	8.800 B	12.250 BA	15.000 A	7.73	0.0021
12	3.500 C	8.800 CB	10.250 B	15.857 A	8.66	0.0012

* Values with the same letter are not significantly different

있었다.

고 찰

이락촌폐흡충의 자인 감염 증속주가 집쥐 (*Rattus rattus* 및 *R. norvegicus*)임은 선 보고자들(Chen, 1940; Seo *et al.*, 1971; Yokogawa *et al.*, 1971)에 의해 알려지고 실험 감염 동물로 흰쥐가 개나 고양이보다 총체회수율이 높다는 사실은 이 등(1989b)에 의해 알려진 바 있다. 본 실험의 목적이 감염력을 보기 위한 것은 아니었지만 흰쥐 개체에 따른 회수총체 수는 주입시킨 피낭유충 수와 큰 차이가 있었다. 주입된 피낭유충 수와 회수총체 수가 일치하지 않는다는 예비 감염 실험을 경험으로, 40마리 흰쥐에 50~80개의 피낭유충을 無作爲로 주입시킨 후 회수한 총체수는 흰쥐 개체별로 다양하여 총체가 없는 것으로부터 67마리(감염 3주 후 病死) 총체까지 다양하였다. 주입시킨 피낭유충 수와 회수총체 수가 대체로 비례하는 폐흡충(*P. westermani*)의 감염력과 큰 차이를 나타낸 원인 중에는 이락촌폐흡충의 얇고 파열되기 쉬운 피낭유충의 囊膜에 있지 않나 생각된다. 이 등(1989b)이 이락촌폐흡충의 증속주에 따른 감염력 차이를 이 얇은 낭벽(cyst wall) 때문인 것으로 추측한 것과 같이 본 실험에서 많은 흰쥐 개체에서 피낭유충 수보다 훨씬 적은 蟲體가 회수된 것은 피낭유충의 낭막이 쉽게 파열되어 낭막이 벗겨진 유충은 보다 쉽게 사멸하거나 감염력을 상실할 수 있기 때문이 아닌가 생각된다.

ELISA의 OD값으로 측정된 이락촌폐흡충 감염 흰쥐의 항체 생산은 감염력의 차이 만큼이나 개체 차가 많았다. 보유충체 수와 항체가가 반드시 비례하지 않는다는 것은 앞서 폐흡충 감염 실험(李 및 張, 1986)이나 간흡충 감염 실험(안 등, 1989; 李 등, 1986)에서도 보고한 바 있으나 본 실험에서는 1마리 또는 4마리 총체가 회수된 개체가 19마리 또는 24마리 총체가 회수된 개체보다 OD값이 큰 개체 차이를 나타내어 그 정도가 좀더 현저하였다. 개체별 항체 생산량 차이의 원인은 잘 모르지만 감염 강도별로 나누어진 群(groups)별 평균 OD값은 GIV群(22~40마리 총체)에서 가장 큰 것으로 보아서 GI의 개체 중에서 GIV의 개체보다 OD값(항체가)이 큰 개체들이 존재하는 원인이 이락촌폐흡충 10마리 미만의 보유충체 수로도 감염 흰쥐의 항체 생산의 충분한 감염수가 되기 때문이라고 생각할 수는 없었다.

이락촌폐흡충 감염 흰쥐 개체들의 항체 양성반응이 확실히 인정되는 시기는 대조군과 OD값의 유의차를 보인 감염 4주라고 볼 수 있으며 대체로 이락촌폐흡충이 흰쥐의 폐장에서 정충으로 발육되는 시기와 일치한다.

본 실험 감염군들의 평균 OD값에서 GII와 GIV는 조사된 12주까지 계속 상승되었고 GIII는 10주까지 상

승되고 12주에 나오 밀어졌고 수 감염군의 평균 OD값은 12주까지 계속 상승되는 그래프를 나타내었다(Fig. 2). 감염 후 12주 이후는 검사하지 않은 본 실험에서 이락촌폐흡충 감염 흰쥐에서의 항체 생산량(항체가)의 高平部(plateau)를 잘 알 수는 없으나 개체에 따라 6주 8주, 10주까지 상승된 후 OD값에 별 변동이 없는 개체들, 6주까지 상승되고 8주에 약간 OD값이 떨어지는 개체, 드물게 15주까지 상승되는 개체들이 있었다. 이들 결과로 보아 이락촌폐흡충 감염 흰쥐의 항체가의 plateau는 개체별 차이가 있으나 빠른 것은 감염 6주 이후라고 볼 수 있었다.

감염강도 별 OD값은 대체로 감염 4주 이후 대조군의 OD값과 유의한 차이를 나타내었고 감염군들(GII, GIII 및 GIV)의 평균 OD값은 대체로 6주 이후에는 유의차가 없었으며 이와 유사한 결과는 李 및 安(1987)의 간흡충 감염 동물에서도 보고된 바 있다. 본 실험 감염군들에서 감염총체 수의 차이는 항체 생산량에 큰 영향을 미치지 못하는 것 같다.

이락촌폐흡충 감염 흰쥐 흰청과 폐흡충 粗항원(PWA) 및 간흡충 粗항원(CSA)은 면역교차 반응을 나타내었다(Table 2; Fig. 2). 屬(genus)이 서로 다른 폐흡충과 간흡충의 粗항원이 서로의 粗항원 흰청과 비면리 면역교차 반응을 나타내었던 과거의 연구결과들로 미루어 보아, PWA와 면역교차 반응은 예상된 일이었다. 면역반응의 특이성을 위해서는 항원정제가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

안옥수 · 이옥란(1989) Western blot에 의한 肝吸蟲抗原의 分析. 순천대학교학술논문집, 12: 73-81.

袁鍾華 · 徐丙高 · 李純炯(1976) 怡樂村 肺吸蟲에 關한 研究 V. 白鼠宿主에 組織反應. 기생충학잡지, 14: 1-9.

Chen, H.T. (1940) *Paragonimus iloktsuenensis* sp. nov. for the lung fluke from rats(Class Trematoda: Family Troglotrematidae). *Lingnan Sci. J.*, 19: 191-196.

Kang, S.Y., Cho, S.Y. and Seo, B.S. (1975) Studies on the lungfluke, *Paragonimus iloktsuenensis*. IV. A mathematical analysis on metacercarial density of *Paragonimus iloktsuenensis* in crab host, *Sesarma dehanni*. *Korean J. Parasit.*, 13: 31-37.

李純炯 · 金相俊 · 蔡鍾一 · 孫連睦(1989) 이락촌폐흡충 表皮 微細構造의 發育段階別 變化. 기생충학잡지, 27: 57-66.

이순형 · 김진영 · 한용천 · 이윤성 · 홍성태 · 손운목 · 채종인(1989a) 이락촌폐흡충에 감염된 흰쥐의 폐 병변에 대한 트리자틴텐의 투여 효과. 기생충학잡지, 27: 119-130.

- 이순형 · 구경희 · 채종인 · 홍성태 · 손운목(1989b) 흰쥐, 개 및 고양이 의 이라쿤레흡충 감염 실험. 기생충학잡지, **27**:197-202.
- 李玉蘭 · 安郁洙(1987) 肝吸蟲 感染 家兎의 免疫診斷에 對한 研究. 1. 全蟲體 抽出物 粗抗原에 對한 ELISA. 순천향대학논문집, **10**:409-414.
- 李玉蘭 · 張在景(1986) 肺吸蟲의 粗항원과 精製 항원에 의한 肺吸蟲 감염 고양이 現狀의 免疫酵素反應. 기생충학잡지, **24**:187-193.
- 李玉蘭 · 鄭坪林 · 南海善(1988) 肝吸蟲 感染 家兎의 免疫診斷에 對한 研究. 2. 成蟲 粗抗原의 精製 및 發育段階別 抗原 分析. 기생충학잡지, **26**:73-86.
- 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.
- Rim, H.J., Kim, M.S., Ha, J.H. and Chang, D.S. (1976) Experimental chemotherapeutic effects of niclofolan(Bayer 9015, Bilevon) on the animals infected with *Paragonimus westermani* or *P. iloktsuenensis*. *Korean J. Parasitol.*, **14**:140-146.
- Seo, B.S. and Koo, B.Y. (1971) Studies on the Lungfluke *Paragonimus iloktsuenensis* Chen, 1940. I. On the Occurrence of *P. iloktsuenensis* in the Natural Final Hosts at the Nakdong and Sumjin River Deltas in Korea. *Seoul J. Med.*, **12**:31-43.
- Seo, B.S. and Kwak, J.W. (1972) Studies on the Lungfluke, *Paragonimus iloktsuenensis*. II. On the Metacercaria, the Second Intermediate Hosts and the Development in Mice. *Seoul J. Med.*, **13**:221-231.
- Seo, B.S. and Lee, W.J. (1973) Studies on the Lungfluke, *Paragonimus iloktsuenensis*. III. Migration, development and egg-production in albino rats. *Seoul J. Med.*, **14**:131-141.
- 손운목 · 홍성태 · 채종인 · 이순형(1989) 섬진강 하구산 말뚝개(*Sesarma dehaani*)의 이라쿤레흡충 피낭유충 감염상. 기생충학잡지, **27**:225-227.
- Tsuji, M. (1975) Comparative studies on the antigenic structure of several helminths by immunoelectrophoresis. *Jap. J. Parasitol.*, **24**:227-236.
- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., Fleck, D.G., Perkins, M. and Oladegin, B. (1976) A microplate enzyme immunoassay for toxoplasma antibody. *J. Clin. Pathol.*, **29**:150-153.
- Yokogawa, M., Araki, K., Koyama, H., Seo, B.S., Lee, S.H. and Cho, S.Y. (1971) On the Lung Fluke, *Paragonimus iloktsuenensis* Chen, 1940 in Korea. *Jap. J. Parasitol.*, **20**:215-221.

— Abstract —

ELISA of rat sera infected with *Paragonimus iloktsuenensis*

Byung-Kil Lim, Ok-Ran Lee and Hae-Seon Nam

*Department of Parasitology, College of Medicine, Soonchunhyang University,
Chun-An 300-090, Korea*

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) of paragonimiasis iloktsuenensis rat sera was performed using crude antigens of *Paragonimus iloktsuenensis*(PIA), *P. westermani*(PWA) and *Clonorchis sinensis*(CSA). Three crude antigens(PIA, PWA, CSA) were prepared to saline homogenated supernatants of whole adult worms. Infected rat sera were obtained biweekly from the albino rats fed 50~80 metacercariae of *P. iloktsuenensis* through gastric catheter. Experimental groups were divided into 4 groups: GI(controls), GII, GIII and GIV according to 1~7 worms as GII, 10~19 worms as GIII and 22~40 worms as GIV, respectively.

In ELISA, the mean OD values of each group for the homologous antigen(PIA) were increased significantly compared to the control sera at the 4th week of infection. With the progress of duration of infection, the mean OD values of infected sera of GII & GIV continuously increased up to the 12th week(last week), but in GIII the mean OD value increased until the 10th week. No significance was noted among the infection dose groups (GII, GIII and GIV), after the 6th week of infection. Also, the OD values of all infected rats did not show any proportional relationships to the number of worms recovered. In brief, the antibody productivity of individual rats were strongly different. The rat sera infected with *P. iloktsuenensis* cross-reacted with those infected with *P. westermani* or *C. sinensis*, as identified by OD values.

[Korean J. Parasit., 28(4):207-212, December 1990]