

IgG와 IgM 항체를 유도하는 sparganum의 항원에 관한 면역조직화학적 및 전기영동에 의한 연구

경상대학교 자연과학대학 생물학과 및 의과대학 해부학교실*

김 창 환 · 최 완 성*

요 약 : 스파르가눔을 흰쥐와 흰생쥐에게 인공 구강감염을 시켜 감염 2주후부터 숙주의 기생부위에서 총체와 함께 들레의 조직을 적출하여 동결절편을 만들고 이것을 ABC면역효소표지법과 간접형 광학체법(IFA)으로 항원성분의 분포와 그 추이를 추기한 결과, IgG 항체에 의한 면역반응이 총체의 망상유조직에서 인지되었으며 특히 ABC면역효소표지법에 의하면 유조직 중 수질에서 보다 피질층에서 강한 반응성을 나타냈다. 이 중에서도 석회소체가 있는 곳에 염색 반응성이 강하였다. 감염후기에서는 스파르가눔의 외피(tegument) 내외면과 총체를 둘러 싸고 있는 피낭의 막면, 피막 밖에 있는 섬유성 결합조직과 근조직의 간극에서도 항원성분을 관찰할 수 있다. 특히 결합조직 사이에 분포된 소혈관의 들레와 혈관 외벽에 강한 반응이 나타났다. IgM 항체에 인지된 항원성분도 총체의 유조직층중 피질층에서 강한 반응이 나타났다.

스파르가눔의 추출 조항원성분과 배설분비 항원성분을 SDS-PAGE한 후 nitrocellulose 막에 영동 전이하여 IgG, IgM 항체를 유도하는 항원성분을 ABC효소표지항체법으로 조사하였다. 스파르가눔의 추출 조항원 성분 중 흰쥐의 IgG 항체에 인지된 항원 성분은 23개이고 IgM 항체에는 15개의 항원성분이 인지되었다. 흰생쥐에서는 IgG 항체로 16개 항원성분이, IgM 항체에 9개의 항원성분이 인지되었다. 배설분비 항원성분 중 흰쥐의 IgG 항체에 20개 항원성분이, IgM 항체에는 5개의 항원성분이 인지되었다. 흰생쥐의 IgG 항체에 18개, IgM 항체에 11개의 항원성분이 인지되었다.

조항원성분 중 15개 항원성분과 배설분비 항원성분중 13개의 항원 성분이 흰쥐, 흰생쥐의 IgG 항체에 모두 교차반응이 일어났으며 IgM 항체에 반응한 항원성분중 IgG 항체와도 교차반응이 있었다.

Key words: Sparganum(metacestode of *Spirometra erinacei*), rat, indirect immunofluorescent antibody test(IFT), avidin-biotin complex immunoperoxidase assay, excretory-secretory(ES) antigen, calcareous corpuscles, SDS-PAGE, EITB.

서 론

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 & Nakazato, 1976; Lee *et al.*, 1984). 인체에서의 주요 기생부위는 주로 피하조직, 흉근, 복벽 또는 복강내 여러 장기나 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 & Pezeshkpour, 1986; Chan *et al.*, 1987; Chang *et al.*, 1987). 총체가 피하조직이나 근육 등에 기생하였을 때는 의과적 수술로 생체 검사를 통해 쉽게 진단할 수 있으나 뇌나 척수 같은 심층조직 내에 기생하였을 때는 생체검사에 의한 진단에 어려움이 있다. 그러나 최근에는 neurosparganosis의 진단에 CT(computerized tomography)를 이용한 방법이 유도되고 있다(Chan *et al.*, 1987; Chang *et al.*, 1987). 그러나 이 CT에 의한 진단에도 병인을 규명하는데 어려움이 따르는 경우가 많아 면역형광학적 방법이 도입되어 보다 정확한 진단을 유도하고 있으나(Ishii, 1973; Kim *et al.*, 1984), 면역형광학적 진단법에도 다른 기생충과 교차반응을 일으키는 비특이항원, 항체성분과 부적합한 정상혈청의 대조에서 생기는 간수성 문제가 의문시되어 보다 효과적인 방법이 요구되어 왔다(Schantz *et al.*, 1980; Coker-van *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 1984; Mohammed *et al.*, 1984; Flisser &

* 본 연구는 1990년도 한국과학재단 연구조성비의 지원으로 수행되었음.

Larralde, 1986). 근래에는 EITB(enzyme-linked immunoelectroretic transfer blot)을 이용하여 sparganosis의 항원성분에 대한 면역학적 특성을 추구하고 있으나 다른 기생충증에도 교차반응이 있음을 보고하고 있다(Cho *et al.*, 1986; Kim & Yang, 1989; Choi *et al.*, 1988; Cho *et al.*, 1990).

이 스파르가눔(sparganum)의 항원성분에 대한 기초적 특성을 추구하기 위해서 스파르가눔의 총체에서 IgG 항체와 IgM 항체를 유도하는 항원성분을 간접형광 항체법(IFA)와 효소표지항체법(ELISA)으로 총체내의 소재와 항원성분의 추이를 면역조직화학적으로 추구하고 스파르가눔에서 추출한 조항원성분과 총체의 배설분비 항원성분과의 특성을 비교조사하였다.

재료 및 방법

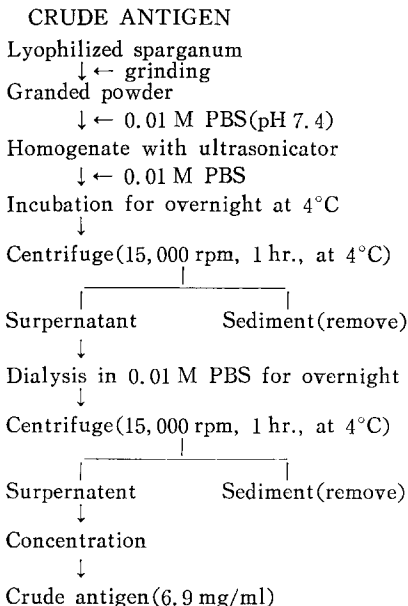
스파르가눔(sparganum)의 준비

유린목이(*Rhabdophis tigrina*)와 무자치(*Elaphe rufodorsata*)를 구입하여 피하조직 또는 내장조직에 기생하고 있는 스파르가눔을 적출 채집하여 생리식염수로 3회 씻고 -70°C 에 보관하거나 ES 항원을 추출하기 위하여 RPMI 1640 배지에 배양하는데 사용하고 일부는 냉동건조시킨 후 -20°C 에 보관하였다.

숙주에 스파르가눔의 인공감염

채집한 스파르가눔을 두단에서 5 mm 길이(scolex, neck 포함)로 절단한 부분을 흰생쥐(ICR계), 흰쥐(Wistar imanichi albino rat)에 각 20 마리씩 인공구강감염시켰다.

스파르가눔의 조항원 준비



Kim & Yang (1989)이 기술한 방법에 따라 Fig. 1과 같이 냉동건조(lyophilize)시킨 스파르가눔을 homogenizer로 균질화한 다음 0.01 M PBS(pH 7.4) 용액에서 12시간 방치한 후 원심분리(15,000 rpm/1 hr./ 4°C)하여 상청액을 취하고 이것을 0.01 M PBS에 투석하였다.

이것을 다시 원심분리하여 상청액을 취하여 조항원으로 사용하였다. 조항원의 단백질 정량은 Bradford (1976)의 방법을 참고로 Bio Rad Protein Assay Reagent(Richmond, California)를 사용하여 정량하였으며 단백질 함량은 6.9 mg/ml이었다.

스파르가눔의 배설분비 항원 준비

Horii *et al.*, (1984)이 기술한 방법에 따라 채집한 스파르가눔을 RPMI 1640 배양액으로 37°C 에서 배양하면서 배양액을 수확하여 원심분리(15,000 rpm/1 hr./ 4°C)한 후 상청액을 0.01 M PBS로 투석후 다시 원심분리하여 상청액을 취해 농축시켜 ES항원으로 사용하였다. ES항원의 단백질 함량은 조항원의 경우와 같이 Bio Rad Protein Assay reagent를 사용하여 정량하였다(Fig. 1). 단백질 함량은 2.2 mg/ml이었다.

항혈청의 준비

스파르가눔을 흰생쥐, 흰쥐에게 인공감염시켜 일정간격(2주, 4주, 6주, 8주)을 두고 채혈하여 혈청을 만들어 항혈청(antiserum)으로 사용하였으며 사용시 까지 -20°C 에 보관하였다.

또한 스파르가눔에서 추출한 조항원성분과 Freund's complete adjuvant를 혼합하여 Freund *et al.* (1948), Hosoi(1969)가 기술한 방법을 참고로 하여 Fig. 2와 같이 흰생쥐, 흰쥐에 주입하여 면역을 시킨 다음 2주

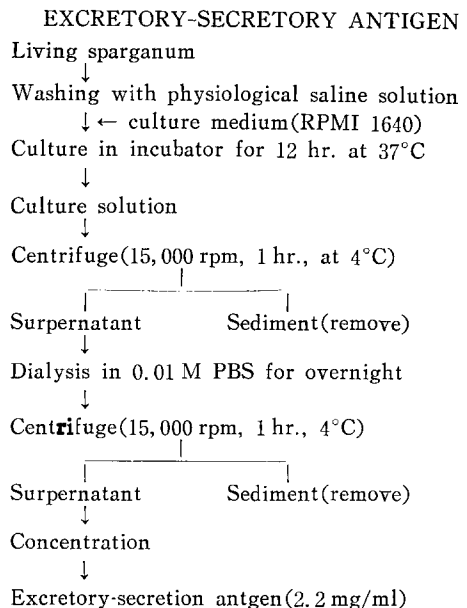


Fig. 1. Procedure for preparation of crude antigen and excretory-secretory antigen from sparganum.

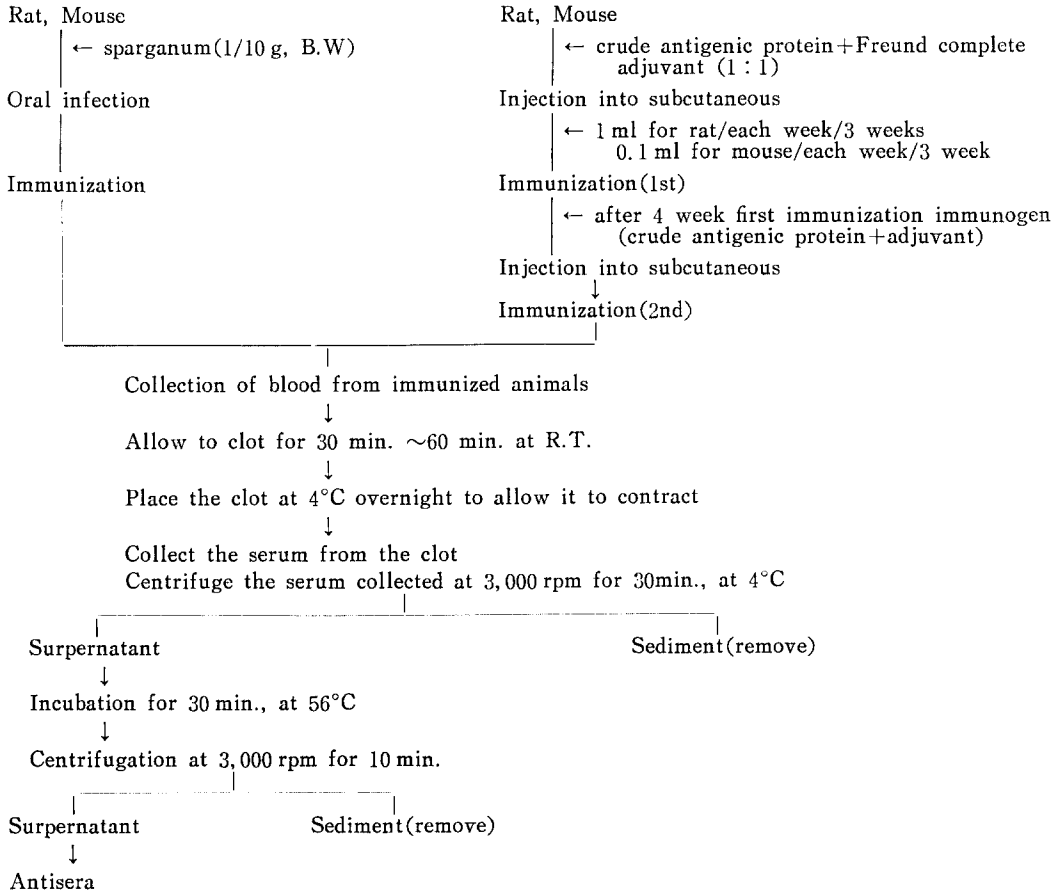


Fig. 2. Procedure for the preparation of primary antisera from rats and mice.

재, 4주째, 6주째, 8주째에 채혈하여 혈청을 만들어 항혈청으로 사용하였다.

면역조직화학적 방법

간접형광항체법 : Kamiya *et al.* (1980), Kondo *et al.* (1984), Parsons *et al.* (1986), Takahashi *et al.* (1988) 이 기술한 방법을 참고로 하여 숙주에서 분리한 스파르가눔과 그 주위의 조직을 10% buffered neutral formalin에 고정하고 세척한후 cryostat sectioner로 8~10 μm로 절편을 만들어 slide에 붙여 건조시키고 항혈청(antiserum)과 antimouse IgG FITC conjugated (Sigma), antimouse IgM FITC conjugated (Sigma), antirat IgG FITC conjugated (Sigma), antirat IgM FITC conjugated (Sigma)로 반응시킨 후 형광현미경 (fluorescent microscope)으로 490 nm의 파장에서 관찰, 사진촬영을 하였다 (Fig. 3).

효소표지 항체법 (Enzyme-linked immunoassay) :

위에서 기술한 방법으로 절편을 만들어 Guesdon *et al.* (1979), Hsu *et al.* (1981), Da Costa Castro *et al.* (1987)이 기술한 방법을 참고로 하여 Fig. 3과 같은 과정으로 1차 항혈청(primary antisera), biotin

conjugated goat antimouse IgG(Caltag laboratories, Inc.), biotin conjugated goat antirat IgG(Jackson Immunoresearch laboratories, Inc.), biotin rabbit antirat IgM(Zymed laboratories, Inc.), biotin goat antimouse IgM(Zymed laboratories, Inc.), 기질[3,3'-diaminobenzidine(Sigma)+H₂O₂]로 처리하여 발색시켜 관찰하였다.

SDS-PAGE: Laemmli(1971)가 기술한 방법을 참고로하여 1% SDS를 포함한 5~20% gradient polyacrylamide gel을 사용하여 스파르가눔의 조항원 추출물과 배설분비물을 전기영동하여 Morrissey *et al.* (1981), Oakley *et al.* (1980), Merrill *et al.* (1981), Tsang *et al.* (1983)이 기술한 방법으로 silver stain, Coomassie blue R-250으로 염색하였다.

EITB: Towbin *et al.* (1979, & 1984), Burnette (1981), Gershoni(1983), Tsang *et al.*(1983), Grogl *et al.* (1984)들이 기술한 방법을 참고로 하여 SDS-PAGE한 gel을 electrophoretic transfer instruction을 사용하여 nitrocellulose membrane(Bio Rad)으로 전이시킨 다음 Fig. 4와 같이 enzyme-linked immunoa-

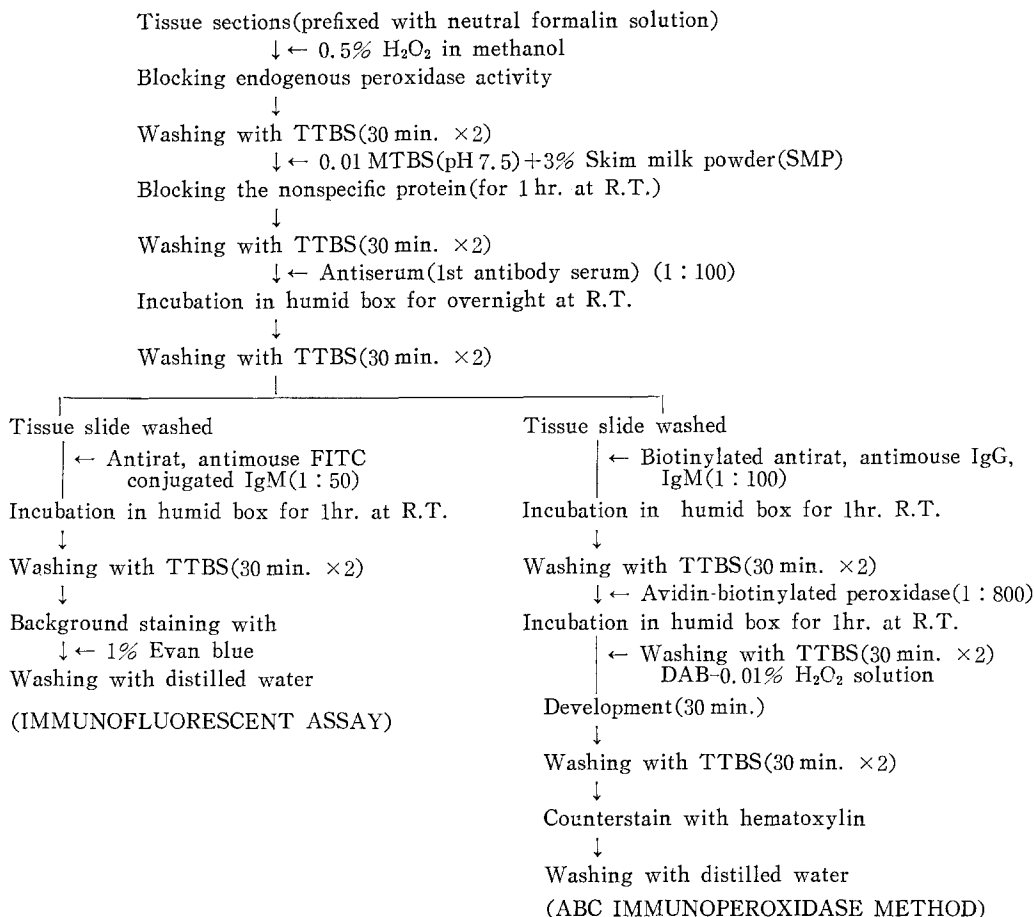


Fig. 3. Procedure of immunohistochemical method in immunofluorescent assay and ABC immunoperoxidase assay.

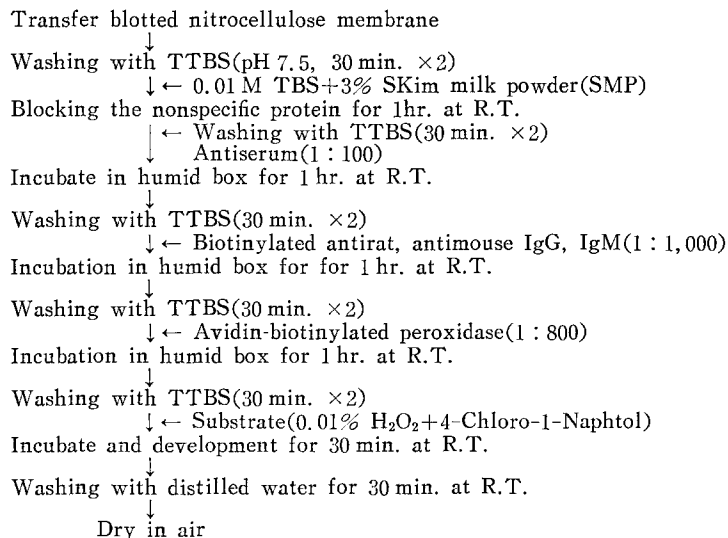


Fig. 4. Procedure of enzyme linked immunoassay(ABC immunoperoxidase method).

ssay 중 ABC 효소표지항체법으로 1차항혈청, biotin conjugated goat anti-mous IgG(Caltag laboratories, Inc.), biotin conjugated goat antirat IgG(Jackson Immunoresearch laboratories, Inc.), biotin rabbit antirat IgM(Zymed laboratories, Inc.), biotin goat antimouse IgM(Zymed Laboratories, Inc.) 기질 (H₂O₂, 4-chloro-1-naphthol)로 처리하였다.

결 과

1. IgG, IgM 항체를 유도하는 스파르가눔의 항원 성분의 분포

스파르가눔을 흰쥐와 흰생쥐에게 인공 구강감염을 시켜 감염 2주 후부터 숙주의 기생부위에서 총체와 함

께 둘레의 조직을 적출하여 동결절편을 만들고 이것을 ABC면역효소표지법과 IFA로 항원 성분의 분포와 그 추이를 추궁하였다.

흰쥐와 흰생쥐의 IgG 항체와 반응한 항원성분의 분포는 Fig. 5과 Fig. 6과 같다.

숙주인 흰쥐와 흰생쥐에서 적출한 스파르가눔과 그 둘레의 조직절편에서 IgG 항체를 유도하는 항원성분이 총체의 망상유조직과 근층의 주위에서 짙은 갈색의 양성반응이 관찰되었다. 총체 내의 유조직중에서도 수질보다 근층이 있는 피질층에서 강한 반응성이 나타났다.

그러나 근육조직 내에서는 반응이 나타나지 않았다. 이중에서도 Fig. 7에서와 같이 감염후 8주 경과된 총체에서는 석회소체를 중심으로 그 주위에 있는 세포에 강한 면역반응이 나타났을 뿐만 아니라 외피층의 표면과 외피층 내의 곳곳에서도 강한 반응성이 관찰되었다.

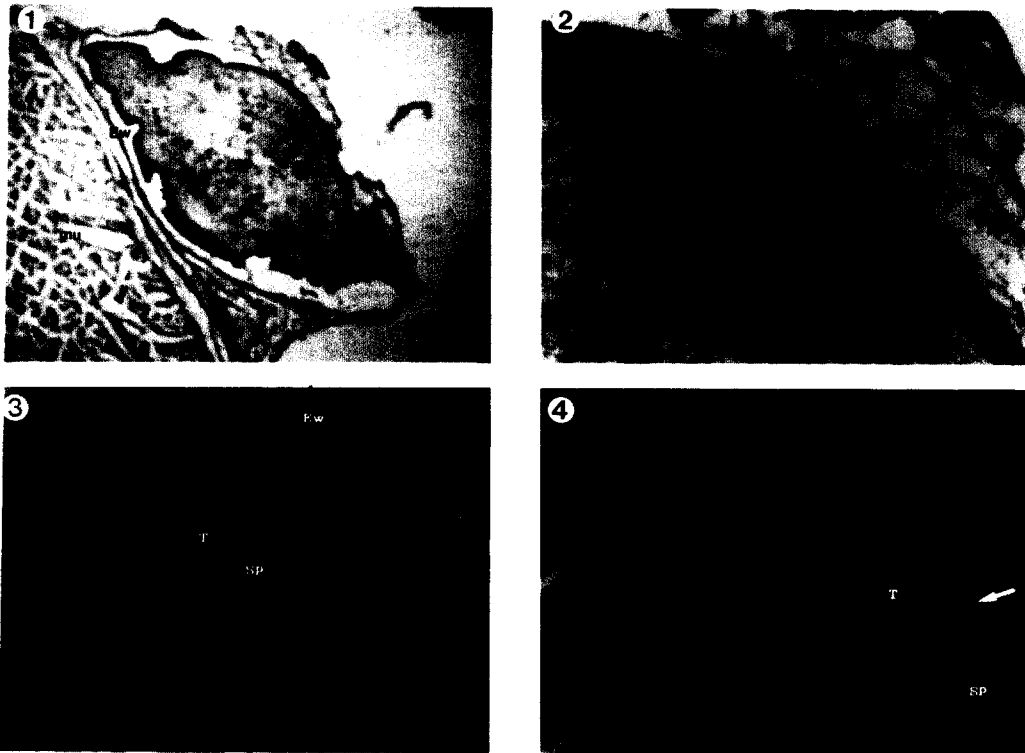


Fig. 5. Localization of antigenic components reacted with IgG antibody from rats by ABC immunoperoxidase assay and IFA. (Ew.: encyst wall, Mu.: muscle of host, T.: tegument, Sp.: sparganum, Etm.: epidermal transverse muscle, Elm.: epidermal longitudinal muscle, Pm.: parenchyme)

1. Antigenic components were demonstrated in parenchyma and subintegument in sparganum and host connective tissue by ABC immunoperoxidase assay($\times 20$). Chocolate brown color indicates positive immunoreaction. Background was stained with hematoxylin.
2. Higher magnification of a portion of No. 1 ($\times 40$).
3. By indirect immunofluorescent antibody assay, green color indicates positive immunoreaction and red negative immunoreaction($\times 20$).
4. Higher magnification of a portion No.
3. Positive reation was demonstrated in the host connective tissue($\times 40$).

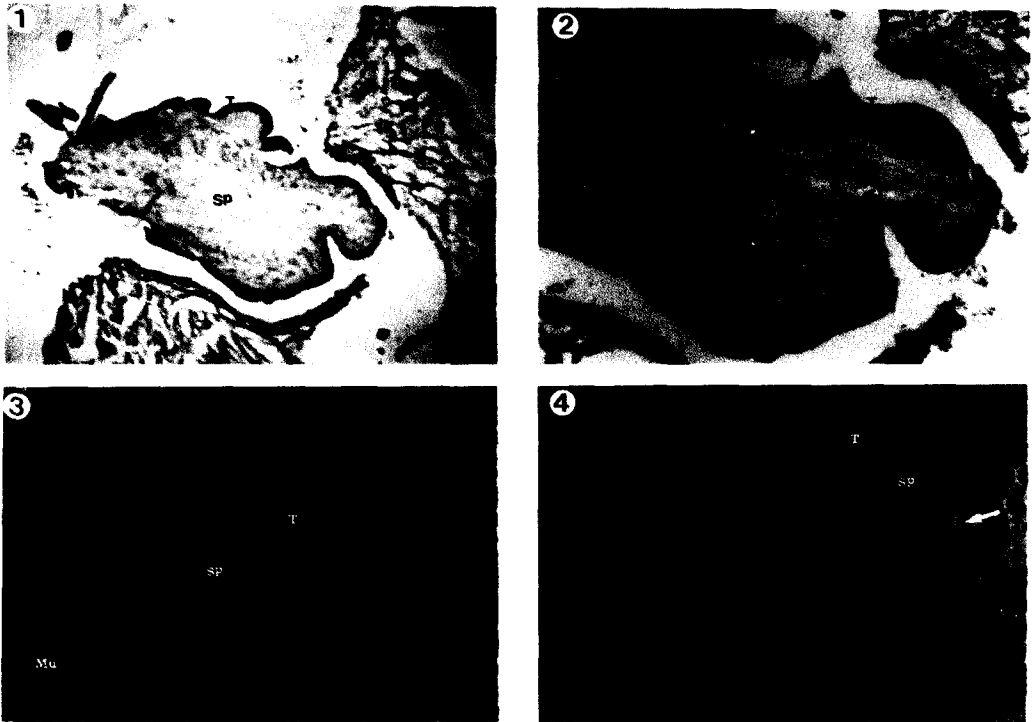


Fig. 6. Localization of antigenic components reacted with IgG antibody from the mouse by ABC immunoperoxidase assay and IFA. (Sp.: sparganum, T.: tegument, Mu: muscle of host)

1. Antigenic components were demonstrated in the parenchyme and subintegument of sparganum and host connective tissue around sparganum($\times 20$) by ABC immu noperoxidase assay. Chocolate brown color indicates positive immunoreaction, background was stained with hematoxylin.
2. Higher magnification of a portion of No. 1($\times 40$).
3. By indirect immunofluorescent antibody assay, green color indicates the positive immunoreaction and red negative immunoreaction($\times 20$).
4. Higher magnification of a portion No. 3. Positive reaction was demonstrated in the host connective tissue($\times 40$).

또 충체를 둘러싸고 있는 피낭의 내면과 피막 밖에 있는 섬유성 결합조직에서도 면역반응성이 나타나 항원 성분이 분포되어 있음이 인지되었다.

간접형광항체법에 의한 항원성분의 분포에서도 ABC 면역효소법에 의한 경우와 같이 충체의 유조직에서 면역반응을 볼 수 있으나 수질층보다도 피질층에서 녹색의 양성반응이 강하게 나타났다. 특히 외피층과 근육층에서는 적색의 음성반응이 나타났으며 또 충체를 둘러싸고 있는 숙주의 결합조직 사이에서도 녹색의 형광 양성반응이 나타났다.

숙주에 기생한 스파르가눔에서 생산된 항원성분이 기생한 부위에서 숙주의 체내로 확산된 범위를 추구하고 결과 Figs. 8 & 9와 같다.

ABC 효소표지방법에 의한 항원성분의 확산은 Fig. 8에서와 같이 감염 후 4주의 충체와 주위조직에서는 충체내에서 뿐만 아니라 충체를 둘러싸고 있는 피막내와 피막 밖의 결합조직 사이에서 양성반응이 나타났고 특

히 결합조직 사이에 분포된 소현관 둘레에 강한 양성반응이 나타났다(Fig. 8-2, 3).

또한 6주 조직에서는 충체의 둘레에 있는 근조직 사이에서도 양성반응이 관찰되었고 확산범위가 더 넓었다. Fig. 9는 간접형광항체법에 의한 항원성분의 확산 추이를 관찰한 것으로 생쥐(mouse)에 감염 후 4주된 조직(Fig. 9-1)에서 보다 6주된 조직(Fig. 9-4)에서 항원성분의 확산 이동 범위가 넓었다.

IgG 항체와 IgM 항체로 인지된 항원성분의 분포를 비교한 결과 Fig. 10과 같다.

IgM 항체와 반응하는 항원성분도 충체의 유조직층에서 강한 반응성이 나타났다. 또한 유조직층 중 수질층 보다도 피층에서 면역반응이 강한 것은 IgG 항체로 인지된 항원성분의 분포와 차이가 없다.

2. 스파르가눔의 추출 조단백질과 배설분비 단백질의 SDS-PAGE

스파르가눔의 추출 조단백질 : 스파르가눔의 추출한

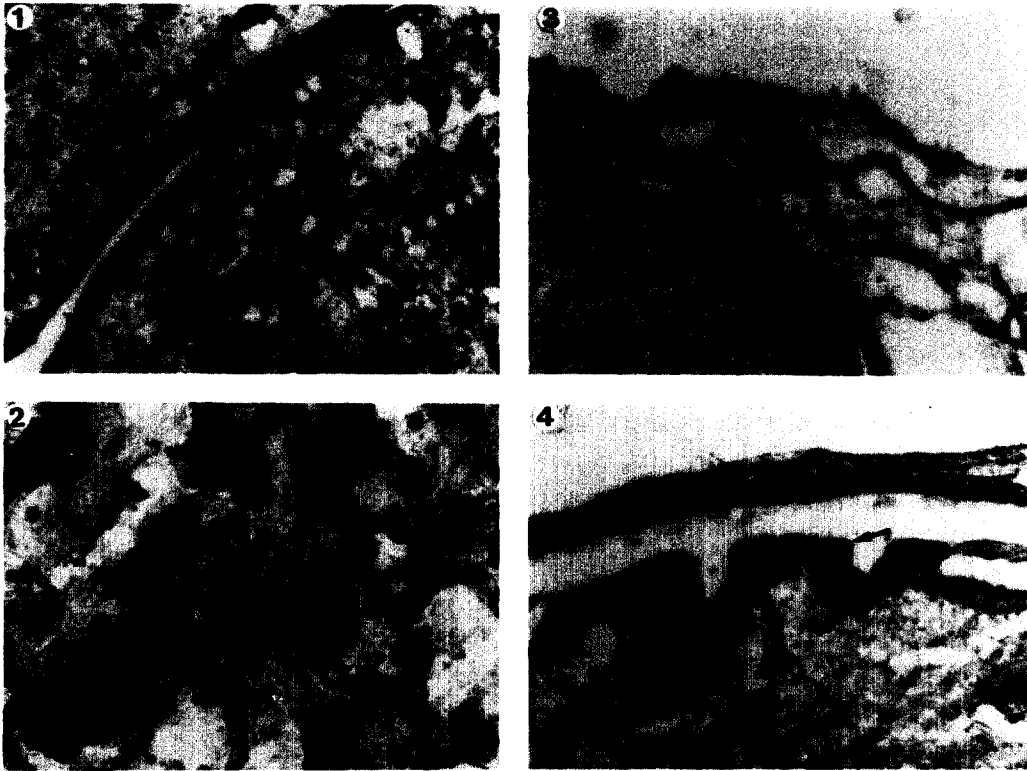


Fig. 7. Localization of antigen in the parenchyme and tegument of a sparganum in the rat by ABC immunoperoxidase assay. Chocolate brown is positive immunoreaction, counterstain hematoxylin. (T.: tegument, Elm.: epidermal longitudinal muscle, Pm.: parenchyme, Etm.: epidermal transverse muscle, Ew.: encyst wall, C.: calcareous corpuscle)
 1. Higher magnification of parenchyme of sparganum. An arrow indicates the immunoreacted cells($\times 100$).
 2. Higher magnification of a portion in the parenchyme($\times 200$).
 3, 4. Higher magnification of the portion of tegument of sparganum($\times 100$).

단백질 성분과 스파르가눔을 RPMI 1640에서 12시간 배양하여 얻은 배설분비물의 단백질 성분을 5~20% gradient SDS-PAGE로 영동한 후 Coomassie blue R 250과 silver stain을 한 결과 Fig. 11과 같다.

추출 조단백질 성분의 영동 분획은 316 kDa에서 14 kDa의 분자량을 가진 316, 273, 223, 204, 182, 174, 145, 125, 116, 101, 96, 90, 85, 77, 72, 68, 63, 58, 46, 42, 39, 36, 32, 28, 26, 23, 20, 16, 14 kDa 등의 29개 분획을 얻었으며 이중 182 kDa, 145 kDa, 72 kDa, 63 kDa, 16 kDa는 추출 조합원성분에서만 영동분획되었다. 배설분비 단백질 성분의 영동 분획에서는 316, 273, 223, 204, 174, 162, 116, 101, 96, 90, 85, 77, 68, 57, 46, 42, 39, 36, 32, 28, 26, 23, 20, 14, 13 kDa 등 25개의 분획이 분리되었다.

EITB에 의한 스파르가눔의 항원성분의 인지 : Nitrocellulose membrane에 영동 전이 시킨 항원성분에 흰 쥐, 흰생쥐에서 얻은 항혈청을 ABC 효소표지 항체법을

로 반응을 시켜 스파르가눔의 IgG 항체와 IgM 항체를 유도하는 항원성분을 추정한 결과 Fig. 12 CE와 13 CE와 같다.

흰쥐의 IgG, IgM 항체에 인지된 조합원성분 : 흰쥐의 IgG 항체에 의해 인지된 추출 조합원성분은 316, 273, 245, 223, 204, 182, 174, 145, 116, 96, 85, 72, 68, 58, 55, 36, 32, 28, 26, 23, 20, 16, 14 kDa 등 23개 이었으며 이중 316, 273, 182, 174, 96, 58, 28, 23 kDa의 분자량을 가진 항원성분에서 반응이 현저하였다.

흰쥐의 IgM 항체에 의해 인지된 추출 조합원성분은 316 kDa에서 39 kDa에 이르는 분자량을 가진 316, 273, 245, 223, 182, 174, 145, 116, 96, 77, 72, 68, 58, 55, 39 kDa 등 15개 성분중 316 kDa, 273 kDa, 116 kDa에서 반응이 현저하였다. 이중 316, 273, 245, 223, 204, 182, 174, 145, 116, 96, 72, 68, 66, 58, 55 kDa 등은 IgG 항체와 교차반응이 있었다. 77 kDa와 39 kDa

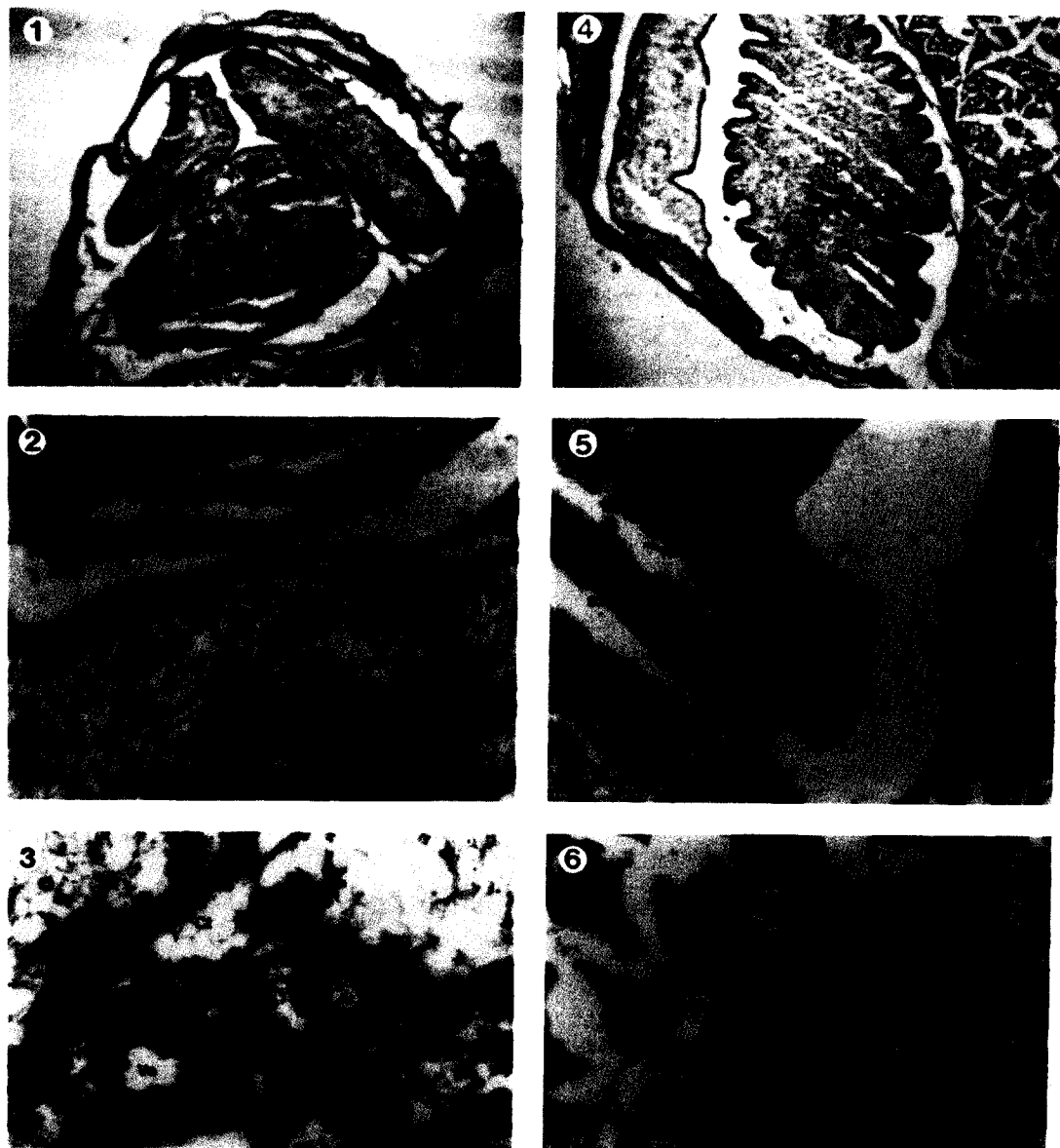


Fig. 8. Distribution of antigen reacted with IgG antibody from rats immunized with sparganum by ABC immunized with sparganum by ABC immunoperoxidase assay, counterstain hematoxylin. (Sp.: sparganum, Ct.: host connective tissue, Ew.: encyst wall, Elm.: epidermal longitudinal muscle, Ar.: arteriole, Mu.: host muscle tissue, Ve.:venule, T.: tegument)

1. Antigen was demonstrated in the parenchyme of sparganum and host connective tissue around sparganum($\times 20$).
2. Higher magnification of a portion in the host connective tissue of 1($\times 40$).
3. Higher magnification of the portion of arteriole and venule of host($\times 100$).
4. Distribution of antigen reacted with IgG antibody from rats immunized for 4 weeks ($\times 20$).
5. Higher magnification of the portion of No. 4. An arrow indicates localization of the antigen($\times 100$).
6. Higher magnification of the portion of host muscle tissue($\times 100$).

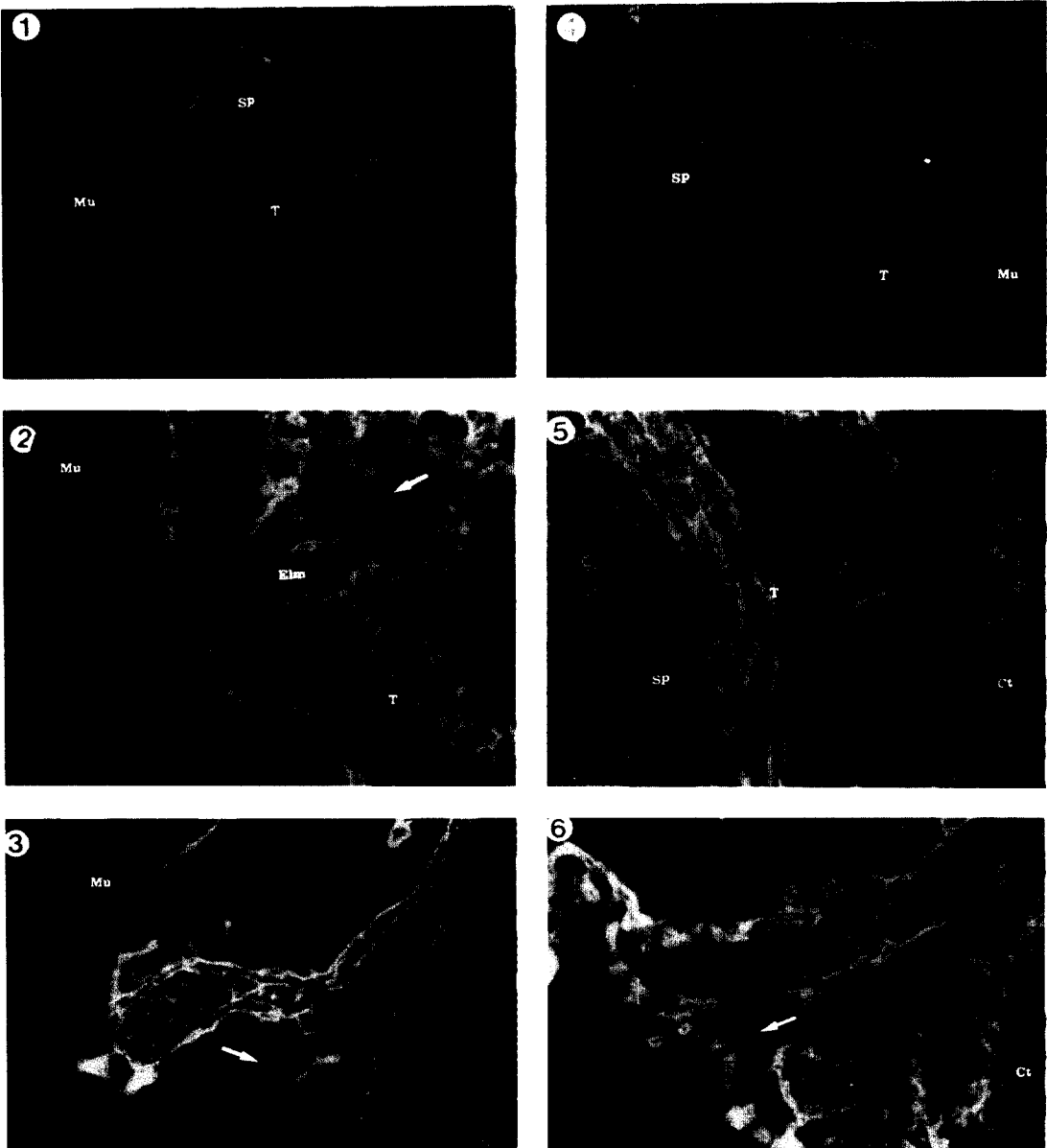


Fig. 9. Distribution of antigen reacted with IgG antisera from the mouse immunized with sparganum by immunofluorescent antibody assay (IFA). (Ct.: host connective tissue, Elm.: epidermal longitudinal muscle, Mu.: host muscle tissue, Sp.: sparganum, T.: tegument)

1. Localization of antigen reacted with antisera (IgG) from mouse post-infected for 2 weeks. Antigen was found in the parenchyme of sparganum and inside of eacyst wall. Green color indicates the positive immunoreaction and red negative immunoreaction ($\times 20$).
2. Hgher magnification of a part in sparganum and host connective tissue ($\times 100$).
3. Higher magnification of host connective tissue localized between the muscle ($\times 100$).
4. Localization of antigen in sparganum and host tissue infected for 4 weeks ($\times 20$).
5. Higher magnification of the portion of 4. ($\times 100$).
6. Higher magnification of a portion of 5. Antigen was located around the host connective tissue and muscle ($\times 100$).

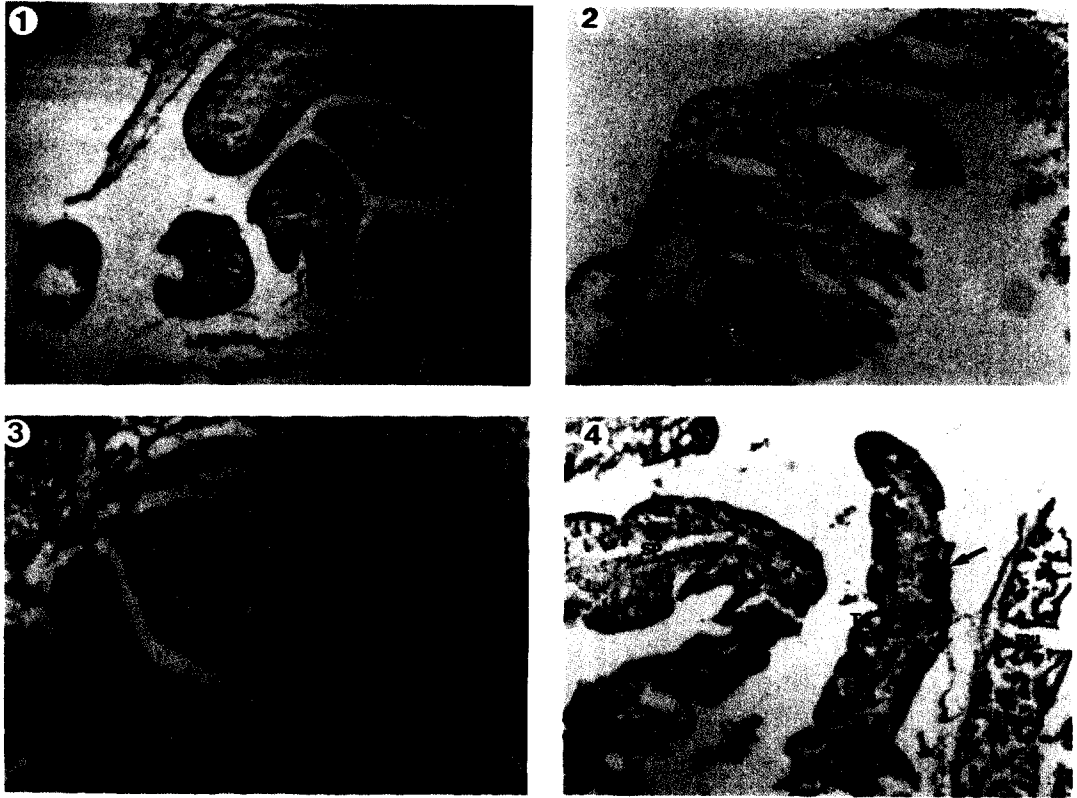


Fig. 10. Localization of antigenic components reacted with IgG antibodies by avidin-biotin complex immunoperoxidase method. (Ew.: encyst wall, Mu.: host muscle tissue, SP.: sparganum, T: tegument)

1. Distribution of antigen reacted with IgG antibody of rat immunized with sparganum($\times 20$).
2. Distribution of antigenic components reacted with IgM antibody of rat($\times 20$).
3. Distribution of antigenic components reacted with IgG antibody of mouse immunized with sparganum for 2 weeks ($\times 40$).
4. Distribution of antigenic components reacted with IgM antibody of mouse immunized for 2 weeks($\times 40$).

의 성분은 IgM 항체에에서만 인지된 항원성분이다(Fig. 12 CE).

흰생쥐의 IgG, IgM 항체에 인지된 조항원성분: 흰생쥐의 IgG 항체에 인지된 성분은 316 kDa에서 20 kDa의 범위에 있는 316, 273, 245, 223, 182, 174, 162, 116, 96, 85, 72, 68, 39, 28, 23, 20 kDa 등 16개 성분이 인지되었고 이중 316, 273, 223, 174, 116, 96 kDa의 성분에서 반응이 현저하였다.

IgM 항체에 인지된 성분은 316, 273, 245, 223, 182, 174, 162, 145, 116 kDa 등 9개로 이중 316, 273, 245, 223, 182, 174, 162, 116 kDa 등의 분자량을 가진 성분은 IgG 항체와도 교차반응이 있었다(Fig. 13 CE).

흰쥐와 흰생쥐의 IgG 항체에 인지된 항원성분중 316, 273, 245, 223, 182, 174, 145, 116, 96, 85, 72, 68, 28, 23, 20 kDa 등 15개 항원성분이 서로 교차반응을 하였다.

IgG, IgM 항체에 인지된 스파르가눔의 배설분비 항원성분: 스파르가눔을 RPMI 1640에서 배양하여 얻은 스파르가눔의 배설분비물을 항원으로 하여 흰쥐, 흰생쥐의 IgG, IgM 항체와 혈청반응으로 인지된 결과는 Fig. 12-ES, Fig. 13-ES와 같다.

흰쥐의 IgG, IgM 항체에 인지된 배설분비 항원성분: 흰쥐의 IgG 항체에 의해 인지된 항원성분은 273 kDa에서 16 kDa 범위의 분자량을 가진 316, 273, 223, 204, 174, 116, 101, 96, 90, 85, 72, 68, 62, 46, 39, 32, 28, 23, 20, 16 kDa 등 20개 성분이 인지되었으며 이중 273, 223, 174, 116, 96, 28, 23 kDa의 성분에서 반응이 현저하였고 IgM 항체에 의해 인지된 성분은 273, 223, 204, 90, 39 kDa 등의 분자량을 가진 5개의 성분으로 이들은 모두 IgG 항체와 교차반응이 일어났다(Fig. 12-ES).

흰생쥐의 IgG, IgM 항체에 인지된 배설분비 항원성

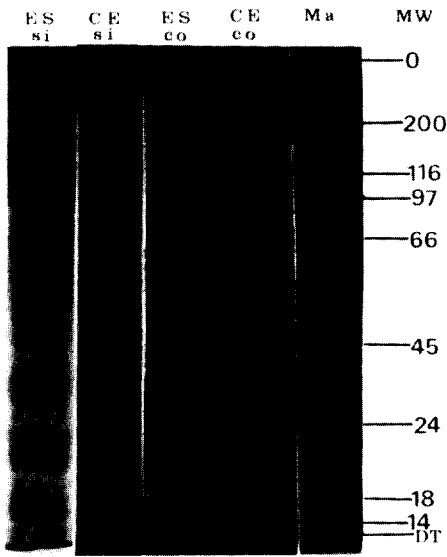


Fig. 11. Coomassie blue staining and silver staining of the crude extracts and excretory-secretory antigenic components from sparganum by 5~20% gradient SDS-PAGE. CE: crude extracts, ES: excretory-secretory, Co: Coomassie blue R 250, Si: silver stain.

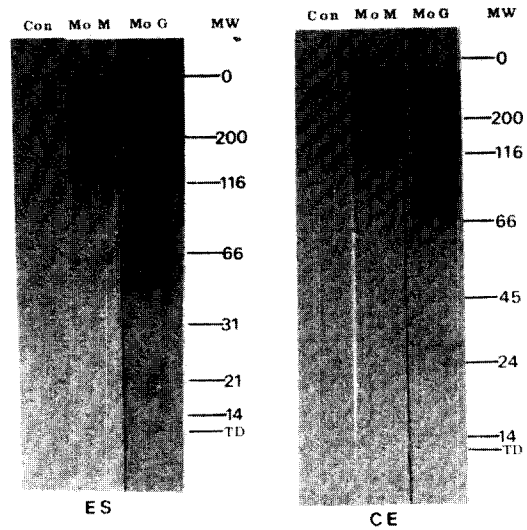


Fig. 13. EITB of crude extracts and excretory-secretory antigenic components from sparganum reacted with antimouse sera immunized with crude extracts and with sparganum. Mo G: antimouse IgG, Mo M: antimouse IgM, Co: control, CE: crude extracts, ES: excretory-secretory

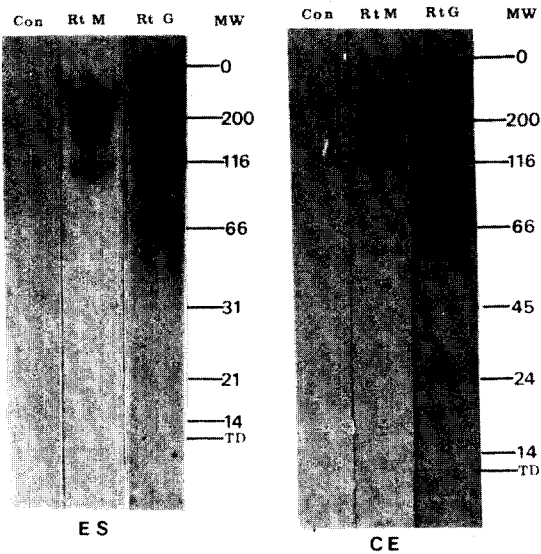


Fig. 12. EITB of crude extracts and excretory-secretory antigenic components from sparganum reacted with antirat sera immunized with crude extracts and with sparganum. Rt G: antirat IgG, Rt M: antirat IgM, Co: control, CE: crude extracts, ES: excretory-secretory

분: 흰생쥐의 IgG 항체에 의해 인지된 항원성분은 316 kDa에서 13 kDa의 분자량을 가진 316, 273, 223, 204, 174, 162, 116, 101, 90, 85, 58, 46, 42, 39, 23, 20, 14, 13 kDa 등 18개 성분이 인지되었고 이중 223, 174, 162, 116, 101, 58, 46, 41, 23 kDa의 성분에서 반응이 현저하였다. IgM 항체에 인지된 항원성분은 316, 273, 223, 174, 162, 116, 101, 90, 85, 58, 42 kDa 등 11개 성분으로 IgG 항체와 모두 교차반응이 일어났으며 162, 46, 42, 14, 13 kDa 등은 배설분비 항원성분에서만 인지되었다(Fig. 13-ES).

또한 흰쥐와 흰생쥐의 IgG 항체에 의해 인지된 배설분비 항원성분에서 316, 273, 223, 204, 174, 116, 101, 90, 85, 46, 39, 23, 20 kDa 등 13개 항원성분에서 서로 교차반응이 있었다.

고 찰

*Spirometra erinacei*의 유충인 스파르가눔에서 추출한 조항원성분을 EITB를 이용하여 고충증(sparganosis), 낭미충증(cysticercosis)과 포충증(hydatidosis) 등의 환자의 IgG 항체와의 혈청학적 반응으로 인지된 조항원성분의 특이성과 교차반응을 일으키는 항원성분을 보고한 바 있다(Kim and Yang, 1989). 이번 실험에서는 스파르가눔(sparganum)에서 추출한 조항원성분과 배설분비 항원성분들 중 IgG 항체와 IgM 항체를

유도하는 항원성분의 총체내 소재와 대기 숙주인 흰쥐와 흰생쥐의 항혈청을 사용하여 IgG, IgM 항체를 유도하는 항원성분을 추구하고 있다.

IgG 항체를 유도하는 항원성분의 소재에 대하여 Fig. 5, 6에서와 같이 총체의 유조직층 중 수질층보다 피질층에서 강한 반응이 있는 것으로 보아 피질층에 많은 항원성분이 소재되어 있다. 이것은 IFA 방법을 이용하여 스파르가눔 조직 중 유조직층과 근육조직에서 강한 특이 형광반응이 있었다는 Ishi(1973)의 보고와 유사하였으나, Ohnish *et al.* (1986)이 보고한 바와 같이 총체의 외피나 근육조직에서는 형광반응이 없었고, 망상유조직에서 형광반응이 있었다는 사실과 더 일치하였다. 그러나 ABC 효소표지법에 의한 항원성분의 소재를 조사한 결과(Fig. 7)는 망상유조직중에서 석회소체 주변 뿐만 아니라 외피(tegument)의 외면막에서도 반응이 나타났다. 또한 석회소체(calcareous corpuscles) 주변의 강한 항원성이 있는 것이 Ohnish 등 (1986)의 보고와 같았다. 이 석회소체 주변의 강한 항원성은 총체내에서 생산된 배설분비항원성분이 체외로 배출되기 전에 이 석회소체를 중심으로하여 모여지는 것으로 추정되며 외피의 외면막에서의 반응은 유조직층에 있는 생산세포에서 생성된 항원성분이 외피를 통해 체외로 배출되어 외면막에 부착되어 반응한 것으로 생각된다.

Furuya *et al.* (1989)은 포충(hydatid cyst)에서 항원성분이 외피하의 배층(germinal layer), 번식포(brood capsule)와 미성숙 원두절(immature protoscoleces) 등 비교적 세포중식이 이루어지는 부위에 소재되어 있다고 보고하였다. 그런데 Laclette(1987)은 *Taenia solium*의 metacestode(cysticercus)에서 형광면역반응이 특히 방광벽의 외피성세포체(tegumentary cyton)과 합입된 두절의 나선관 내강(lumen of the spiral canal)에서 더 강한 반응이 나타났다고 보고하였다. 흡충류 중 폐흡충(*Paragonimus westermani*)을 재료로 하여 immunoperoxidase 염색법으로 항원소재를 조사한 결과 소화관 상피의 표면과 구강의 내용물(luminal contents)에 소재되어 있다고 Sugiyama *et al.* (1987)이 보고하였으며 Takahashi *et al.* (1988)은 immunoperoxidase와 면역형광법으로 선충류 중 선모충(*Trichinella spiralis*)의 유충(muscle larva)에서 항원물질 소재를 추구하고 stichocyte granule, 대상구조(banded structure), 식도와 중장이 있는 곳에 항원성분이 소재되었다고 보고하였다. 이와같이 내장기관의 분화가 된 선충류와 흡충류의 총체에서는 주로 외부와 통할 수 있는 기관에 항원성분이 분포되고 있으나 기관이 미분화되어 있는 조충류의 유충에서는 항원성분이 유조직내에 산재되어 있는 것이 다르다. IgM 항체를 유도하는 항원성분도 IgG 항체를 유도하는 항원성분과 차이가 없이 유조직층에 소재되어 있는 것은 Ohnish *et al.* (1986)이 보고한 결과와 같다.

스파르가눔의 조단백질성분을 12% SDS-PAGE에서

25개의 분획이 분리되었다는 Kim *et al.* (1989)의 보고보다 본 실험에서 사용한 5~20% SDS-PAGE에서는 28개의 분획이 또 배설분비 단백질에서는 23개의 분획이 분리되었다. 또한 Choi *et al.* (1988), Cho *et al.* (1990)은 스파르가눔 추출물을 10~15% SDS-PAGE에서 30개의 분획이 분리된 것을 보고하여 분획된 수의 차이가 있으나 이것은 gel의 농도의 차이에서 오는 것으로 생각된다.

IgG 항체를 유도하는 스파르가눔의 항원성분에 대하여 Kim *et al.* (1989)은 스파르가눔의 항원성분 중 고충환자의 IgG 항체에 16개의 항원성분이 인지되었다고 보고하였으며 Choi *et al.* (1988)은 6~19개의 항원성분이 고충환자의 IgG 항체에 인지되었다고 보고하였다. 흰쥐의 IgG 항체에 인지된 항원성분은 23개이었으며 흰생쥐에서는 16개 성분이 인지되어 차이가 있었다. 이를 인지한 성분 중에는 서로 분자량이 같은 것도 있었다. 같은 총체에서 유래한 항원임에도 불구하고 감염기간에 따라서 그 전기영동 유형이 달라지는 것을 확인하였다.

Fig. 12에서와 같이 IgG 항체나 IgM 항체에 의해 인지된 항원성분 중 116 kDa 이상의 분자량이 큰 성분에서 비교적 강한 반응이 나타났으며 Cho *et al.* (1990)이 스파르가눔의 특이 항원성분으로 보고한 36, 29 kDa은 흰쥐의 IgG 항체에 의해서 추출 조항원성분에서 인지되었으나 흰생쥐에는 인지되지 않았다. 또한 흰쥐나 흰생쥐의 배설분비 항원성분에서도 인지되지 않았다. 그러나 이와 분자량이 가까운 조항원성분과 배설분비 항원성분 중 39 kDa의 성분이 흰쥐와 흰생쥐의 IgG 항체에서 모두 인지되었다. 또한 29 kDa의 항원성분과는 다른 조항원성분 중 28 kDa의 성분이 흰쥐와 흰생쥐에서 인지되었고 배설분비 항원성분에서는 흰쥐에서만 인지되었다. Dobson *et al.* (1988)은 IgG와 IgM 항체에 의해 인지된 매독균(*Treponema pallidum*)의 항원성분중 이들이 모두 같은 분자량을 가진 항원성분이라고 보고한 것과 같이 본 실험에서도 IgG 항체와 IgM 항체에 인지된 항원성분이 같은 분자량을 가진 항원성분이었고 서로 교차반응이 있었다.

이용문헌 및 특허

Anders, K., Foly, K. Stern E., and Brown, W.J. (1984) Intracranial sparganosis; an uncommon infection-case report. *J. Neurosurg.*, 60:1282-1286.

Araki, J. and Nakazato, H. (1976) Two cases of sparganosis mansonii presumption of the parasitism under pericardium and the movement of parasite during seven years. *Jpn. J. Parasit.*, 25(5):1-7.

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.
- Burnette, 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, J.R., Salgado, P., Gutierrez, R., Escobar, A., Araffo, C. and Palaioc, E. (1983) The acute excephalitic phase of neurocysticercosis; Computed tomographic manifestations. *Am. J. Neuroradiol.*, **4**:51-55.
- Chan, S.T., Tse, C.H., Chan, Y.S. and Fong, D.S. (1987) Sparganosis of the brain. *J. Neurosurg.*, **67**:931-934.
- Chang, K.H., Cho, S.Y., Chi, J.G., Kim, M.C., Kim, C.W., Myung, H.J. and Choi, K.S. (1987) Cerebral sparganosis: C.T. characteristics. *Radio-logy*, **165**:505-510.
- Chi, J.G., Chi, H.S. and Lee, S.H. (1980) Histopathologic study on human sparganosis. *Korean J. Parasit.*, **18**:15-23.
- Cho, S.Y., Bae, J.H., Seo, B.S. and Lee, S.H. 1975. Some aspects of human sparganosis in Korea. *Korean J. Parasit.*, **13**:60-77.
- Cho, S.Y., Kim, S.I., Kang, S.Y., Choi, D.Y., Suk, J.S., Choi, K.S., Ha, Y.S., Chung, C.S. and Myung, H. (1986) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in serological diagnosis of human neurocysticercosis using paired samples of of serum and cerebrospinal fluid. *Korean J. Parasit.*, **24**(1):25-41.
- Cho, S.Y., Kang, S.Y. and Kong, Y. (1990) Purification of antigenic protein of sparganum by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Korean J. Parasit.*, **28**(3):135-142.
- Choi, S.H., Kang, S.Y., Kong, Y. and Cho, S.Y. (1988) Antigenic protein fractions reacting with sera of sparganosis patients. *Korean J. Parasit.*, **26**(3):163-167.
- Coker-van, M., Brown, P. and Gajdusck, C. (1984) Serodiagnosis of human cysticercosis using a chromatofocused antigenic preparation of *Taenia solium* cysticerci in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**: 492-496.
- Da Costa Castro, J.M., Deschamps, F., Benbachir, M., Henrichsen, J., Volle, P.J. and Guinet, R.M. F. (1987) Highly sensitive biotin-avidin sandwich ELISA for the rapid detection of pneumococcal capsular polysaccharide antigens. *J. Immunol. Method*, **104**:265-270.
- Dohson Simon, R.M., Taber, L.H. and Baughn, R.E. (1988) Recognition of *Treponema pallidum* antigens by IgM and IgG antibodies in congenitally infected newborns and their mothers. *J. Inf. Disease*, **157**(5):903-910.
- Fan, K.J. and Pezeshkpour, G.H. (1986) Cerebral sparganosis. *Neurology*, **36**:1249-1251.
- Freund, J., Thomson, K.J., Hough, H.B., Sommer, H.E. and Pisai, T.M. (1984) Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvant. *J. Immunol.*, **60**:393-398.
- Furuya, K., Sasaki, S., Honma, H., Kunagai, M., Sato, N., Takahashi, M. and Uchino, J. (1989) Serologic investigations of human alveolar hydatid disease by western blotting and indirect histo-immunoperoxidase techniques. *Jpn. J. Parasitol.*, **38**(4):184-193.
- Gershoni, M.J. (1983) Review: Protein blotting. Principles and applications. *Anal. Biochem.*, **131**:1-15.
- Grogl, M., Estrada, J.J., Macdonald, G. and Kuhn, R.E. (1985) Antigen-antibody analysis in neurocysticercosis. *J. Parasit.*, **71**(4):433-442.
- Guesdon, J., Ternlynch, T. and Avrameas, S. (1979) The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymation techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, **27**(8):1131-1139.
- Horii, Y., Owhashi, M., Ishii, A., Bandou, K. and Usui, M. (1984) Leukocytes accumulation in sparganosis: Demonstration of eosinophil and neurotrophil chemotactic factor from the plerocercoid of *Spirometra erinacei* in vivo and in vitro. *Am. Trop. Med. Hyg.*, **33**(1):138-143.
- Hosoi, T. (1969) Studies on *Toxocara canis* 1. ES antigen from adult worms. *Jap. J. Parasitol.*, **18** (2):149-158.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) Use of avidinbiotinperoxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**:577-580.
- Ishii, A., Matsuda, H., Kamiya, M. and Kobayashi, J. (1969) Cotton fluorescent antibody technique in the filarial infection in the rat, *Sigmodon hispidus* with the frozen section of various stages of *Litomosoides carinii*. *Jap. J. Parasitol.*, **18**(1):1-7.
- Iwata, S. and Matsuda, S. (1967) Adult Mansonii's tapeworm(*Diphyllobothrium erinacei*) parasitized

- in man. *Jap. J. Parasitol.*, **16**:568.
- Kamiya, H. and Kamiya, M. (1980) Preliminary application of a formalin fixed tissue section to the indirect fluorescent antibody test and intraovarial precipitation reaction for the diagnosis of *Schistosoma japonicum*. *Jap. J. Vet. Res.*, **28**:155-160.
- Kim, C.H. and Yang, J. (1989) Immunological characterization of antigen from cysticercus and sparganum, and their application to the development of immunodiagnostic system. 2. Immunological characterization of crude antigenic components from sparganum. *Korean J. Zool.*, **32**(4):429-440.
- Kim, H., Kim, S.I. and Cho, S.Y. (1984) Serological diagnosis of human sparganosis by means of micro-ELISA. *Korean J. Parasit.*, **22**(2):222-228.
- Kim, S.C., Kim, H.D. and Shim, J.H. (1981) A case of sparganum mansonii in the intracerebral region. *J. Korean Neurosurg.*, **10**:589-591.
- Kondo, K., Akao, N., Konishi, Y. and Yoshimura, H. (1984) Experimental studies on visceral larva migrans. 4. Examinations of immunoglobulins in sera of infected rabbits with *Toxocara canis* by means of indirect fluorescent antibody (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assay. *Jpn. J. Parasitol.*, **33**(2):99-104.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**:680-685.
- Laclette, Q.P., Merchant, M.T. and Willms, K. (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacystode of *Taenia solium*. *J. Parasit.*, **73**(1):121-129.
- Lee, S.H., Chai, J.-Y., Seo, B.S. and Cho, S.Y. (1984) Two cases of human infection by adult of *Spirometra erinacei*. *Korean J. Parasit.*, **22**(1):66-71.
- Maeno, Y., Sano, A., Nagase, K., Totani, T., Abe, T., Suzuki, S. and Torikai, K. (1986) A case of human infection with adult *Diphyllobothrium erinacei*. *Jpn. J. Parasitol.*, **35**(2):Suppl., 11(13).
- Merrill, R.C., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid protein. *Science*, **211**(27):1437-1438.
- Mineura, K. and Mori, T. (1980) Sparganosis of the brain. Case report. *J. Neurosurg.*, **52**:588-590.
- Miller, R.C., Goldberg, M.A., Heiner, D.G., Myers, A. and Goldber, A. (1984) A new immunologic test for CNS cysticercosis. *Neurology*, **34**:695.
- Morrissey, H.J. (1981) Silver stain for proteins in sensitivity. A modified procedure with enhanced uniform polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **117**:307-310.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detection of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **105**:361-363.
- Ohnishi, Y., Takakura, Y., Yoshimura, H. and Tsubota, N. (1986) Antibody production in experimental sparganosis of rabbits: Agglutination and indirect fluorescent antibody techniques. *Jpn. J. Parasitol.*, **35**(1):25-33.
- Pack, S.H., Rhee, J.D., Kang, S.K. and Kim, J.K. (1972) A case of report of *Sparganum mansonii* in the spinal canal. *J. Korean Neurosurg. Asso.*, **1**:204-207.
- Parsons, J.C., Bowman, D.D. and Grive, R.B. (1986) Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocarosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**(5):974-981.
- Schantz, M.P., Shanks, D. and Wilson, M. (1980) Serologic cross reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**:609-612.
- Sugiyama, H., Sugimoto, M., Akasaka, K., Horiuchi, T., Tomimura, T. and Kozaki, S. (1987) Characterization and localization of *Paragonimus westermani* antigen stimulating antibody formation in both the infected cat and rat. *J. Parasit.*, **73**(2):363-367.
- Suzuki, N., Kumazawa, H., Hosogi, H. and Nakagawa, O. (1982) A case of human infection with the adult of *Spirometra erinacei*. *Jap. J. Parasitol.*, **31**(1):23-26.
- Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Suzuki, H., Yagi, J. and Araki, T. (1988). Immunohistochemical localization of antigenic substance in *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Jpn. J. Parasitol.*, **37**(6):435-440.
- Tansurat, P. (1971) Sparganosis in "Pathology of protozoal and helminthic disease" (ed. Marcial-Rojas, P.A.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore USA. pp.585-591.
- Towbin, H. and Gordon, J. (1984) Immunoblotting and dot method. Immunobinding-Current status and outlook. *J. Immunol. Method.*, **72**:313-340.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from poly-

- acrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**(9):4350-4354.
- Tsang, C.W.V., Peralta, J.M. and Simon, A.R. (1983) Studying enzyme-linked immunoelectro-transfer blot techniques(EITB) for the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Method in Enzymology*, **92**:377-391.
- Weinstein, P.P., Krawczyk, H.J. and Peers, J.H. (1954) Sparganosis in Korea. *Am. J. Trop. Med.*, **3**:112-124.

=Abstract=

Immunohistochemical Observation on the Antigens Inducing IgG and IgM Antibodies against Sparganum

Chang Hwan Kim and Wan Sung Choi*

Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Dept. of Anatomy, College of Medicine,
Gyeongsang National University Chinju, Kyongsangnam-do 660-701, Korea*

Localization and characterization of the antigenic components of sparganum which induced IgG and IgM antibodies in the host were studied by immunohistochemical techniques and SDS-PAGE and Western blotting.

The antigen recognized by IgG antibody of rats or mice which were immunized by infection or injection of crude extracts of metacestodes of *Spirometra erinacei*, was located in the parenchyme of sparganum, especially at the cortex and around the calcareous corpuscles. The immunoreaction was demonstrated not only in the encysted fibrous wall of host but around the arterioles or venules in the connective tissue of host.

The antigen recognized by IgM antibody of rats or mice was also observed in the parenchyme of sparganum and in the connective tissue of host.

By 5~20% gradient SDS-PAGE and EIBT, we detected antigenic components by IgG and IgM antibodies of the rat or mouse immunized by infection or injection of crude extract of spargana.

Twenty-three antigenic bands from crude extracts of spargana were recognized by IgG antibody and 15 components by IgM antibody of immunized rats. Out of the bands recognized by IgG and IgM antibodies, 15 were cross-reacted each other. Twenty components of excretory-secretory proteins from spargana were recognized by IgG, and 5 components by IgM antibody of immunized rats.

By IgG and IgM antibodies of immunized mice, 16 components of crude extracts were recognized by IgG antibody and 9 components by IgM antibody. Twenty components of excretory-secretory preparation were recognized by IgG antibody and 5 components by IgM antibody.

Thirteen components of crude extracts were cross-reacted by IgG antibody of rats and mice.

[*Korean J. Parasit.*, **29**(4):339-353, December 1991]