

단클론 항체를 이용하여 정제한 독소포자충 30 kDa 항원의 면역학적 특성

신대환*, 이영하, 노태진

충남대학교 의과대학 기생충학교실

초록: 독소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 다양한 항원을 가지고 있으며, 이들 항원의 분석은 세포매개성 면역반응 및 독소포자충종의 면역학적 진단방법의 연구에 매우 중요하다. 본 연구는 독소포자충의 여러 단백질종 대부분의 충주(strain)에 존재하는 분자량 30 kDa의 단백질을 단클론 항체를 이용하여 분리한 후, 30 kDa 항원의 면역학적 특성을 초음파 추출 조항원과 비교 평가하였다. 독소포자충의 세포막 항원으로 면역한 마우스 비장세포와 마우스 Sp2/0-Ag14 골수종세포를 융합하여 8개의 단클론 항체를 Western blot으로 확인하였다. 이들 단클론 항체는 높은 특이성을 보였으며, IgG_{2b}가 5개, IgG₁이 2개, IgG_{2a}가 1개였다. 간접형광항체법으로 총체내 위치를 관찰한 결과, 30 kDa 항원은 tachyzoite의 표면 세포막에 주로 분포하였다. 단클론 항체와 CNBr-activated Sepharose 4B를 coupling하여 만든 immunoaffinity chromatography를 이용하여 30 kDa 항원을 분리하였다. 분리한 30 kDa 항원으로 자극시킨 마우스 복강대식세포의 NO₂생산량은 초음파 추출 조항원 사용군에 비해 유의하게 증가하였으나, 대식세포의 탐식능은 유의한 차이가 없었다. 또한 ELISA로 독소포자충증을 진단시, 독소포자충 30 kDa 항원 사용군은 조항원 사용군에 비해 민감도의 변화는 없었으나 특이성은 증가하였다. 이상으로 보아 독소포자충 30 kDa 항원은 감염 방어 면역 효과가 있었으며 진단에 이용시 특이성을 더 높일 수 있었다.

서 론

독소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 우리 나라뿐만 아니라 전세계적으로 분포하고 있으며 사람을 비롯하여 포유동물, 조류에 이르기까지 숙주 특이성이 극히 낮은 세포내 기생원충의 일종이다. 미국에서는 지역에 따라 50세 이상 인구의 10-67%에서 혈청학적 양성반응을 나타내며(Kasper, 1994). 우리 나라에서도 전 인구의 1.9-7.2%가 항체를 보유하고 있는 것으로 보고하였다(Choi, 1990). 최근에는 인위적 면역억제의 증가 및 후천성 면역결핍증(AIDS)의 확산으로 인하여 본종의 발병이 증가될 것으로 예상되므로 이에 대한 연구가 더욱 요구된다(Kasper, 1994).

본충은 1종만이 존재하지만, 감염 충주의 종류 및 발육 단계, 숙주의 특성 및 감염 시기 등에 따라 다양한 항원성을 나타낸다(Ware and Kasper, 1987; Hafid et al., 1989). Handman et al.(1980)이 2차원적 전기영동과 단클론 항체를 이용하여 분자량 43, 35, 27, 14 kDa의 독소포자충 세포막 항원을 처음 동정한 이래, 여러 특이 항원의 면역화학적 성상이 알려져 있다(Omata et al., 1989; Gross et al., 1991). 또한 Kasper et al.(1983)은 분열하고 있는 tachyzoites에서 30 kDa의 세포막 항원을 분리하였고, 그후 이에 대한 연구가 활발히 이루어져, 30 kDa 항원이 HIV 감염환자에서 독소포자충증 재발의 지표로 유용하며(Lettillois et al., 1995), 이 항원에 대한 IgA 항체가 거의 모든 선천성 독소포자충 감염 환자에서 발견된다고 하였다(Decoster et al., 1992). 또한 30 kDa 항원에 대한 항체가 감염 방지 효과가 있으며(Mineo et al., 1993), 이 항원이 백신으로서의 가능성이 있다고 하였다(Godard et al., 1994).

본 연구는 독소포자충의 대부분의 충주에 존재하는 것으로 알려진 분자량 30,000 dalton의 세포막 항원(독소포자충 30 kDa 항원)을 단클론 항체를

*논문접수 1997년 1월 16일, 수정후 채택 1997년 2월 28일

*본 연구는 '93년도 한국과학재단에서 지원한 학술연구 조성비(핵심연구과제: 931-0700-024-2)의 지원에 의한 것임.

*책임 저자

이용하여 분리한 다음, 이 항원의 면역학적 반응 특히 세포매개성 면역반응 및 ELISA를 이용한 혈청학적 진단에의 이용 가능성을 총체의 초음파 추출 조항원과 비교 평가하였다.

재료 및 방법

1. 독소포자충 세포막 항원의 제조

마우스 복강에 감염시켜 얻은 독소포자충 RH주를 Percoll(Sigma, specific gravity: 1.04)을 이용하여 총체만을 비교적 순수하게 모았으며, Makioka *et al.*(1989)의 방법에 따라 독소포자충 세포막 항원을 만들었다. 단백질 농도는 혈청단백을 표준단백으로 Bradford법으로 측정하였고, 모든 조작은 4°C에서 시행하였다.

독소포자충 세포막 단백질 항원성 성분이 높은 분획을 얻기 위하여 세포막 항원을 Sephadex G-100 젤(Sigma)에 통과시킨 다음 각 분획의 단백질량을 측정하였다. 각 분획의 항원 역가는 독소포자충 면역 혈청을 부착시킨 ELISA plate를 이용하여 Voller *et al.*(1976)의 방법에 따라 ELISA를 시행하였다.

또한 몇 가지 다른 기생충의 항원을 이용하여 독소포자충 30 kDa 항원에 대한 단클론 항체의 특이성을 검증하였다.

2. 독소포자충 30 kDa 항원에 대한 단클론 항체 생산

BALB/c마우스에 독소포자충 세포막 항원을 동량의 Freund's incomplete adjuvant(Sigma)와 혼합 유평화시킨 후, 마우스당 40 µg의 항원을 2주, 5주, 8주에 복강내 주사하여 면역하였다. 최종 면역 후 immunodiffusion 및 ELISA로 혈청내 IgG 항체가 측정하였으며, 세포융합 3일전에 동일한 항원을 마우스 꼬리 정맥에 주사하였다.

면역 마우스의 비장을 무균적으로 적출한 다음, 적혈구를 용혈시킨 후, 비장세포를 Sp2/0-Ag14 골수종 세포와 융합시켰다. 96-well culture plate(Nunc)에 0.1 ml씩 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였으며, 항체의 생산 여부는 ELISA로 검색하였다. 세포배양은 IMDM배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, GibcoBRL)에 1 × HAT(Sigma), 10% fetal bovine serum, 1.5% antibiotic-antimycotics(GibcoBRL)를 첨가하여 사용하였다.

간흡충, 폐흡충, 스파르가눔, 유구낭미충 항원에는 반응하지 않고 독소포자충 세포막 항원에만 강하게 반응하는 well만을 선택하여 무한대 희석한 다음 37°C, 5% CO₂에서 배양하였으며, 각 well의 독소포자충 항원에 대한 항체생산 여부는 ELISA로 검색하였다. 또한 독소포자충 30 kDa 항

원에 대한 단클론 항체 생산은 Towbin *et al.*(1979)의 방법에 따라 Western blot으로 검색하였다. 전기영동이 끝난 젤을 nitrocellulose 종이 에 전이시킨 후 3% skim milk/PBS로 2시간 반응시킨 다음, 각각의 배양 상층액을 반응시켰다. 세척 후 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG whole molecule(Sigma)를 반응시킨 다음 alkaline phosphatase buffer(pH 7.5)에 nitro blue tetrazolium(Sigma)과 bromochloro-indolyl phosphate(Sigma)를 첨가하여 만든 기질 용액을 넣어 발색시켰다.

3. 독소포자충 30 kDa 항원의 분리

1) 단클론 항체의 정제 및 30 kDa 항원의 분리: HiTrap Protein G(Pharmacia Biotech)를 이용하여 단클론 항체에서 특이 IgG 항체를 정제한 다음, Kasper *et al.*(1983)의 방법에 따라 immunoaffinity chromatography법으로 30 kDa 항원을 분리하였다. CNBr-activated Sepharose 4B(Pharmacia)를 1N HCl로 활성화시킨 후, 정제된 단클론 항체 5 mg을 4°C에서 24시간 반응시켰다. 독소포자충 세포막 항원을 시간당 5 ml의 속도로 column에 통과시킨 후 0.5% cholic acid가 포함된 0.1 M diethylamine(pH 11.5)으로 용출하였다. 용출된 항원은 0.05% deoxycholic acid가 포함된 PBS로 투석한 다음 10% SDS 젤을 사용하여 전기영동 후, silver stain(Wako)하였다.

2) 단세포군 항체의 isotype: Mouse monoclonal antibody isotyping kit(Sigma ISO-1)를 이용하여 단클론 항체의 isotype을 결정하였다. Isotyping strip을 단클론 세포 배양액과 반응시킨 후, 1% BSA과 0.05% Tween 20이 함유된 PBS로 세척한 다음 biotin labelled anti-mouse immunoglobulin을 반응시켰다. 세척 후 extravidin-peroxidase로 반응시킨 다음 기질을 첨가하여 발색을 시켰다.

4. 간접형광항체법을 이용한 30 kDa 항원의 총체내 위치

독소포자충의 tachyzoite를 1 × 10⁵/ml의 농도로 만든 다음 slide glass에 0.2 ml를 떨어뜨린 후 실온에서 건조시켰다. 여기에 단클론 항체를 37°C에서 2시간 반응시킨 후 1% Evans blue가 함유된 FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin(Sigma)을 37°C에서 1시간 반응시키고 형광현미경(Reichert Jung)으로 관찰하였다.

5. 독소포자충 30 kDa 항원으로 자극시킨 마우스 복강 대식세포의 세포 독성능

1) 복강 대식세포의 분리 및 배양: 정상 마우스와 9% proteose peptone(1 ml/mouse), 독소포

자충 조항원(100 µg/mouse) 및 독소포자충 30 kDa 항원(100 µg/ml)으로 4일 동안 자극한 마우스에서 복강대식세포를 다음과 같이 분리하였다. 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640으로 복강세포의 수를 5×10^6 /ml로 조정된 다음 16-well chamber slide(Nunc)의 각 well에 100 µl씩 분주 후 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양하였다. 부착되지 않은 복강세포를 37°C의 HBSS로 제거한 후 동일한 배지로 다시 3-4일 배양하여 대식세포 단세포층을 만들었다.

2) Nitrite(NO₂) 생산량 측정: 대식세포에서 분비되는 NO₂의 생산량은 standard Griess reaction법(Vincendeau and Daulouede, 1991)으로 측정하였다. 복강대식세포 단세포층에 새로운 배지를 110 µl씩 처치한 다음 24시간 배양하고 각 well의 배양 상층액 100 µl를 채취하였다. 상층액에 Griess reagent 600 µl를 혼합 후 암실에서 30분 반응시킨 다음 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 NaNO₃로 만들었으며, NO₂ 생산량은 µM/5 × 10⁵ cells/24 hrs으로 표시하였다.

3) 복강 대식세포의 탐식능: 복강 대식세포 단세포층에 5×10^6 개/ml의 독소포자충 tachyzoite를 각 well 당 100 µl씩 분주 후 2시간 배양한 다음, 동일 배양액으로 대식세포 주위에 남아있는 tachyzoite를 세척하였다. 동일 배양액을 가하여 18시간 더 배양한 다음 각 well을 100% methanol로 고정 후 Giemsa 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 대식세포의 탐식능은 세포내 독소포자충의 변화(FI; fold increase)로 나타냈다(Langerman et al., 1992).

6. 독소포자충 30 kDa 항원을 이용한 감염 마우스 혈청의 진단

독소포자충 초음파 추출 조항원 및 독소포자충 30 kDa 항원을 각각 ELISA plate에 부착시킨 후 정상마우스 혈청과 독소포자충 Beverley주에 감염된지 4주 이상된 마우스 혈청을 대상으로 ELISA를 시행하여 부착 항원에 따른 진단의 특이성 및 감수성을 평가하였다.

7. 통계 처리

실험 성적은 평균 ± 표준 편차(M ± S.D.)로 표시하였고 자료분석은 t-Test를 하였으며 유의 수준은 p < 0.05로 하였다.

실험성적

1. 단클론 항체의 특성 관찰

면역시킨 마우스 비장세포와 Sp2/0-Ag14 골수종 세포의 세포 융합 효율은 약 83%였으며, 융합

세포중 독소포자충 세포막 항원에 대해 흡광도 1.5 이상인 87개 well의 배양상층액을 간흡층, 폐흡층, 스파르가눔 및 유구낭미충 항원과 반응시킨 결과 융합세포의 대부분은 독소포자충 항원에 대한 특이 항체를 생산하였다(Table 1).

무한대 희석 후 각 well의 IgG 항체 생산을 ELISA로 측정한 결과, 세포가 성장한 well의 64%에서 항체를 생산하였으며, 흡광도 1.5 이상인 146개 well의 배양상층액을 Western blot으로 검색한 결과, 8개 well에서 30 kDa에 대한 단클론 항체를 생산하였다(Fig. 1A).

이 8개 well의 isotype는 IgG2b가 5개, IgG1이 2개 및 IgG2a가 1개이었다. 이 중 IgG2b subclass의 단클론 항체를 마우스의 복강에서 대량 생산한 후, Western blot으로 확인하였다(Fig. 1A). 또한 immunoaffinity chromatography하여 용출된 항원을 silver stain한 결과 분자량 30,000 daltons였다(Fig. 1B).

2. 간접 형광항체법을 이용한 독소포자충 30 kDa 항원의 총체내 위치

정상 마우스 혈청 처치시 총체내에서 형광반응이 전혀 나타나지 않았으며, 독소포자충 세포막 항원을 마우스에 주입한 후 얻은 면역혈청 처치군(양성 대조군)은 총체 전체에 강한 형광반응이 나타났다. 그러나 독소포자충 30 kDa 항원에 대한 단세포군 항체 처치군은 총체의 표면 세포막 부위에 강한 형광 반응을 보였고, 그 외의 부분은 형광반응이 없거나 약한 반응을 보였다(Fig. 2).

3. 독소포자충 30 kDa 항원으로 자극시킨 마우스 복강 대식세포의 세포 독성능

1) 복강 대식세포의 분리 및 NO₂ 생산량 측정
배양: 정상 마우스는 마우스당 평균 2.0×10^6 개의 복강세포가 수집되었으며, 9% proteose

Table 1. Results of IgG antibody titers against 5 different parasitic antigens in supernatants of hybridomas by enzyme-linked immunosorbent assay

Parasitic antigens	Absorbance value at 492 nm ^a
<i>Toxoplasma membrane</i>	1.772 ± 0.258
<i>Clonorchis sinensis</i>	0.309 ± 0.087
<i>Paragonimus westermani</i>	0.330 ± 0.120
Sparganum	0.219 ± 0.044
Cysticercus cellulosae	0.214 ± 0.046

^aMean ± standard deviation of 87 hybridomas secreting strong IgG antibody against *Toxoplasma membrane* antigen.

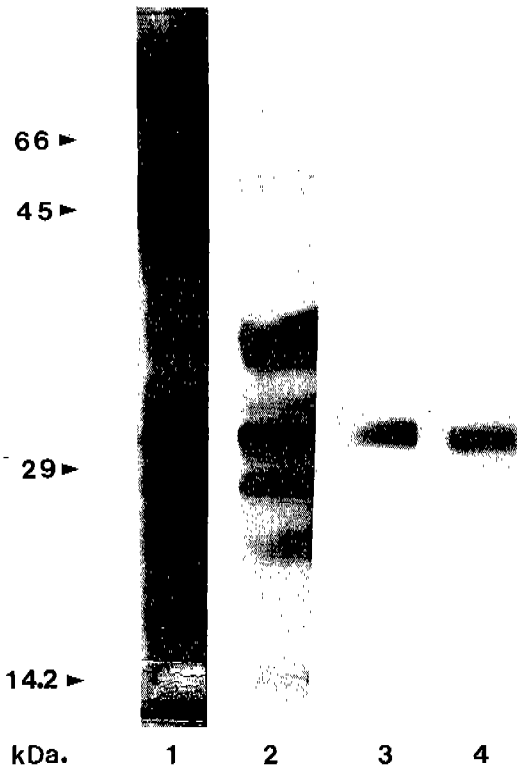


Fig. 1A. Western blot patterns of *Toxoplasma* crude antigen reacted with various kinds of antibodies. ① *Toxoplasma* antigens reacted with sera from mice infected with Beverley strain of *T. gondii* ② *Toxoplasma* antigens reacted with sera from mice immunized with *Toxoplasma* membrane antigen ③ *Toxoplasma* antigens reacted with culture supernatant secreting *Toxoplasma* 30 kDa monoclonal antibody ④ *Toxoplasma* antigens reacted with ascites secreting 30 kDa monoclonal antibody. Numbers represent molecular weight standards.

peptone, 독소포자충 조항원 및 30 kDa 항원으로 자극시킨 마우스는 각각 평균 5.5×10^6 , 3.7×10^6 및 4.0×10^6 개의 복강세포가 수집되어, 자극제 투여시 복강 세포가 1.5-3.4배 많이 수집되었다.

정상마우스 및 독소포자충 조항원으로 자극시킨 마우스로부터 분리한 복강대식세포의 NO_2 생산량은 $5.7 \pm 2.1 \mu M$ 및 $6.3 \pm 2.9 \mu M$ 였으며, 이들 사이에 유의한 차이가 없었다. 9% proteose peptone 및 독소포자충 30 kDa 항원으로 자극한 복강대식세포의 NO_2 생산량은 각각 $8.4 \pm 2.2 \mu M$ 및 $8.7 \pm 3.1 \mu M$ 로 정상 마우스 및 조항원 투여군보다 유의하게 증가되었다. 그러나 독소포자충 30 kDa 항원 투여군과 9% proteose peptone

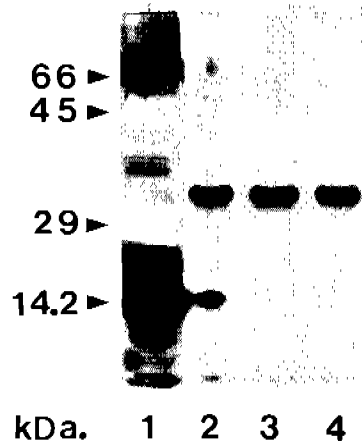


Fig. 1B. Silver stain pattern of SDS-polyacrylamide gel applied to the antigens eluted by immunoaffinity chromatography. ① Molecular weight marker ②, ③ and ④ represent antigenic fractions eluted by immunoaffinity chromatography, respectively. Number represent molecular weight standard: α -lactoalbumin (14,200), trypsin inhibitor (20,100), carbonic anhydrase (29,000), ovalumin (45,000), albumin (66,000).

투여군의 NO_2 생산량은 서로 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

2) 복강대식세포의 탐식능: 정상마우스 복강대식세포에 독소포자충의 tachyzoite를 첨가 후 2시간 배양시 평균 72%의 대식세포가 독소포자충에 감염되었으며, 감염되지 않은 충체를 제거한 후 다시 18시간 배양시 평균 73%가 감염되어 1.01 FI를 나타냈다. 9% proteose peptone 투여군은 0.78 FI, 독소포자충 조항원 투여군은 0.87 FI, 독소포자충 30 kDa 항원 투여군은 0.84 FI를 나타내 정상 마우스에 비해 증가된 탐식능을 보였으나($p < 0.05$), 자극제 투여군 상호간에는 유의한 차이가 없었다(Table 2).

4. 독소포자충 30 kDa 항원을 이용한 감염 마우스 혈청의 진단

독소포자충 조항원을 이용하여 IgG 항체를 측정 한 결과, 정상 마우스 혈청의 흡광도는 $0.336 \pm 0.102(0.214-0.657)$ 였으며, 독소포자충 감염 마우스 혈청의 흡광도는 $1.178 \pm 0.293(0.486-1.786)$ 였다. 정상 마우스 혈청의 평균 흡광도에 표준 편차를 2배하여 더한 흡광도, 즉 위음성을 제거할 수 있는 흡광도 0.540 이상을 양성으로 판정하였다. 독소포자충 조항원으로 ELISA를 시행시 정상 마우스 혈청의 85.7%가 음성 범위에 포함되었으며, 독소포자충 감염 혈청의 92.3%가 양성 범위에 포함되었다. 그렇지만 독소포자충 30 kDa 항원

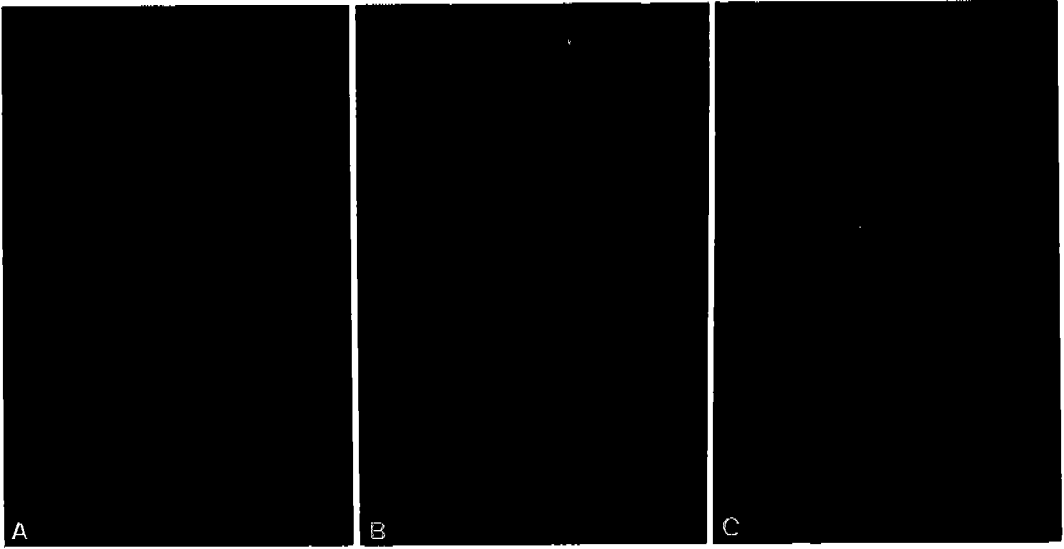


Fig. 2. Distribution of *Toxoplasma* 30 kDa antigen reacted with monoclonal antibody stained by indirect immunofluorescent antibody technique. **A**, RH strain of *T. gondii* reacted with normal mouse serum, there was no immunofluorescence; **B**, RH strain of *T. gondii* reacted with immune mouse serum as a positive control. *Toxoplasma* surface showed fluorescent entirely; **C**, RH strain of *T. gondii* reacted with *Toxoplasma* 30 kDa monoclonal antibody showed strong positive reaction on the surface membrane.

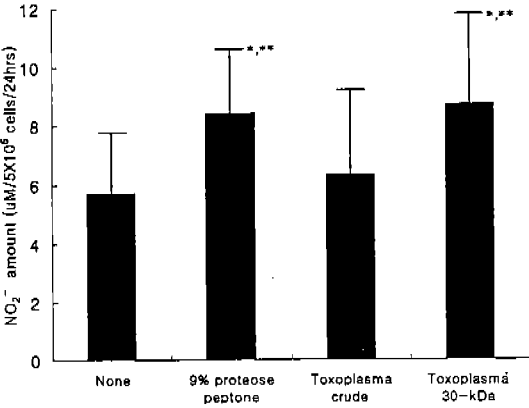


Fig. 3. Amounts of NO₂⁻ production by peritoneal macrophages from normal and activator-inoculated mice. Data shown are the mean ± standard deviation of 5 cases.
*p < 0.05 compared to the normal mice.
***p < 0.05 compared to the *Toxoplasma* crude antigen-treated group

으로 ELISA를 시행시 정상 마우스 혈청의 IgG 항체가 0.128-0.486 범위로 모든 피검 혈청이 흡광도 0.540 미만의 음성 범위에 포함되어 100%의 특이성을 보였다. 따라서 독소포자충 30 kDa 항원 사용시 더 높은 특이성을 보였다. 또한 30 kDa의

로 ELISA 시행시 감염 마우스 혈청의 흡광도는 0.486-1.343 범위로 92.3%에서 양성 범위에 포함되어 조항원 투여시와 동일한 양성율을 나타내 감수성의 차이는 없었다(Fig. 4).

고 찰

독소포자충 항원은 크게 세포막 항원과 분비 항원으로 분류되며, 이들 항원의 분석은 면역학 분야 특히 세포매개성 면역반응의 연구 및 독소포자충증의 면역학적 진단법 연구에 매우 중요하다. 지금까지 단클론 항체를 이용하여 규명한 주요 독소포자충 세포막 항원은 분자량 43, 35, 30-31, 27, 21-22, 14 kDa 등이 보고되었으며(Handman et al., 1980; Kasper et al., 1983; Gross et al., 1991). 이중 30 kDa 항원은 총체 전체 단백질의 약 3-5%로, 환원 겔에서는 30,000-35,000 dalton의 분자량을, 비환원 겔에서는 27,000-28,000 dalton의 분자량을 갖는다(Kasper and Khan, 1993). 본 실험에서는 투입한 세포막 단백질의 약 6%, 즉 총체 전체 단백질의 약 0.9%가 30 kDa 항원으로 분리되어 Kasper et al.(1983)보다 낮은 획득율을 보였다. 이는 30 kDa 항원 분리시 총체 단백을 모두 사용하지 않고 먼저 세포막 항원을 분리한 후 30 kDa 항원을 정제하였기 때문에 이 과정에서 특이 항원의 손실이 있는 것으로 생각된다. 지금까지 보고된 30 kDa 항원은 여러가지가

Table 2. Toxoplasmacidal activity of peritoneal macrophages from normal and activator-inoculated mice

Activators	% Macrophages infected ^{a)}		Fold increase (FI) ^{b)}
	2 hours	18 hours	
Medium	72 ± 10	73 ± 12	1.01 ± 0.24
9% proteose peptone	59 ± 9	46 ± 8	0.78 ± 0.21 ^{c)}
<i>Toxoplasma</i> crude antigen	63 ± 8	55 ± 6	0.87 ± 0.25 ^{c)}
<i>Toxoplasma</i> 30 kDa antigen	61 ± 8	51 ± 8	0.84 ± 0.24 ^{c)}

^{a)}Mean ± standard deviation of 5 cases,

No. of macrophages infected with *T. gondii*

$$\% \text{ Macrophages infected} = \frac{\text{No. of macrophages infected with } T. \text{ gondii}}{100 \text{ macrophages}} \times 100$$

$$\text{b)FI} = \frac{\text{mean No. of } T. \text{ gondii per 100 macrophages after 18 hrs of incubation}}{\text{mean No. of } T. \text{ gondii per 100 macrophages after 2 hrs of incubation}}$$

^{c)}p < 0.05 compared to the normal mice.

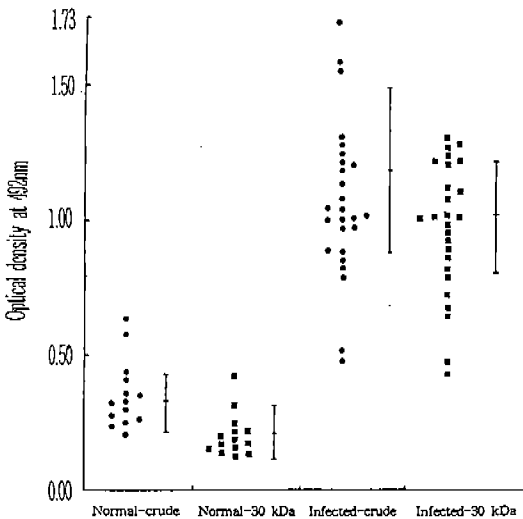


Fig. 4. Distribution of absorbance values of the sera from normal mice and *Toxoplasma* infected mice measured by ELISA. Sera from normal mice were reacted with *Toxoplasma* crude antigen (Normal-crude) or reacted with *Toxoplasma* 30 kDa antigen (Normal-30 kDa). Sera from *Toxoplasma*-infected mice were reacted with *Toxoplasma* crude antigen (Infected-crude) or reacted with 30 kDa antigen (Infected-30 kDa). Each dot means one case, and each bar means mean ± standard deviation of each group.

있으며, 이들 사이에는 약간의 구조적, 면역학적 차이가 있는 것으로 되어 있다(Burg *et al.*, 1989; Bonhomme *et al.*, 1994). 본 실험에서 톡소포자충 이외의 항원으로 항체의 특이성을 조사한 결과 몇개 well에서는 간흡충, 폐흡충, 유구낭미충 항원

에 대해 높은 흡광도를 나타냈다. 이는 톡소포자충 항원의 일부가 이들 항원과 공통 항원을 가지고 있거나, 융합세포의 장기 배양으로 인한 배양 상청액의 변성때문으로 생각되며, 앞으로 보다 많은 종류의 다른 항원들을 확보하여 교차반응 여부를 확인하는 것이 필요하겠다. 또한 면역전자 현미경법을 이용하여 30 kDa 항원의 분포를 조사한 결과 tachyzoite의 세포막, parasitophorous vacuole 및 rhoptry에 주로 분포한다(Makioka *et al.*, 1989; Boulanger *et al.*, 1991). 본 실험에서는 간접형광항체법으로 조사한 결과 30 kDa 항원은 총체의 세포질에는 미약하게 반응하고 세포막에 주로 분포하여, 위의 보고와 동일한 결과를 보였다.

톡소포자충 감염시 세포매개성 면역반응을 보면 T 림프구에 톡소포자충 30 kDa 항원 처치시 세포 독성이 증가하였으며(Khan *et al.*, 1988), 이 항원이 대식세포를 활성화시켜 총체를 탐식하는데 중요한 역할을 한다고 하였다(Makioka and Kobayashi, 1991). 본 실험에서 톡소포자충 30 kDa 항원으로 자극시킨 복강대식세포는 정상마우스 대식세포에 비하여 NO₂ 및 탐식능이 유의하게 증가하였다. 이는 30 kDa 항원이 톡소포자충의 감염 방어면역에 중요함을 나타내는 것으로, Gordard *et al.*(1994)은 30 kDa 항원이 백신으로서의 가능성이 있다고 하였다. 그렇지만 30 kDa 항원 투여군의 NO₂ 생산량은 조항원 투여군보다 유의하게 증가하였으나, 탐식능은 서로 유의한 차이가 없었다. 이는 NO₂ 생산 기전 및 탐식능을 나타내는 기전이 완전히 일치하지 않음 나타내는 것으로 이에 대한 연구가 앞으로 요구된다.

톡소포자충 감염시 여러 가지 면역학적 방법이 본증의 진단에 중요한 수단으로 인정되고 있으며, 그중 ELISA는 고도의 감수성을 나타내며 경제적이어서 많은 보고자들이 진단에 이용하여 왔다. 그렇지만 대부분은 초음파 추출 항원을 사용하여 항체

를 측정했기 때문에 비특이적인 반응 및 교차반응이 많다. 근래에는 특이 항원을 분리한 후 이를 진단에 응용하고 있다. Sabin-Feldman 색소시험법으로 톡소포자충증을 진단시 30 kDa 항원이 중요한 역할을 하며(Makioka *et al.*, 1989). 이에 대한 항체가 본충 감염의 임상적, 혈청학적 증거가 없는 경우에도 발견된다고 한다(Kasper and Khan, 1993). 또한 Lettillois *et al.*(1995)은 후천성 면역결핍증 환자에서 30 kDa 항원이 톡소포자충증의 재발을 나타내는 지표로서 의의가 있다고 하였다. 본 실험에서는 30 kDa 항원과 조항원의 사용에 따른 ELISA 성적을 비교한 결과 감수성의 차이는 없었는데, 이는 대부분의 톡소포자충 감염 혈청은 30 kDa 항원 결정기를 가지고 있으므로 조항원 사용시와 유사한 감수성을 보인 것으로 생각된다. 그렇지만 특이성은 조항원 사용할 때보다 증가되어 30 kDa 항원은 톡소포자충에서 발견되는 특이 항원임을 간접적으로 알 수 있었다.

이상의 성적으로 보아 톡소포자충증의 면역학적 진단이나 역학 조사 등에 톡소포자충 30 kDa 항원을 이용시 기존의 초음파 추출 조항원 사용할 때보다 감수성을 감소시키지 않으면서 특이성을 높일 수 있었다. 또한 30 kDa 항원으로 활성화시킨 복강대식세포의 세포독성능이 정상 마우스 복강대식세포에 비해 증가되어 감염 방어 효과가 있었다. 앞으로 톡소포자충 30 kDa 항원 이외의 다른 항원 결정기에 대한 면역학적 연구 및 감염 방어 면역에 대한 연구가 계속되었으면 한다.

REFERENCES

Bonhomme A, Thirion C, Boulanger F, Charton F, Hurllet H, Pinon JM, Alix AJP (1994) *Toxoplasma gondii*-structure variations of the antigen P30. *Parasitology* **108**: 281-287.
 Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC (1988) Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **41**: 3584-3591.
 Boulanger F, Bonhomme A, Lebonvallet S, Bonnet N, Pluot M, Pinon JM (1991) Quantitative immunolocalization of four immunodominant antigens of *Toxoplasma gondii*. *Biol Cell* **73**: 89-97.
 Choi WY (1990) Diagnosis and epidemiology of toxoplasmosis in Korea. *Korean J Parasitol* **28**(Suppl): 41-44.
 Decoster A, Darcy F, Caron A, Vinatier D, Houze de L'ulnoit D, Vittu G, Niel G, Heyer F, Lecolier B, Decroix M (1992) Anti-P30 IgA antibodies as prenatal marker of congenital

toxoplasma infection. *Clin Exp Immunol* **87**: 310-315.
 Godard I, Estaquier J, Zenner L, Bossus M, Aurialt C, Darcy F, Gras-Masse H, Capron A (1994) Antigenicity and immunogenicity of P30-derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. *Molecul Immunol* **31**: 1353-1363.
 Gross U, Muller WA, Knapp S, Heesemann J (1991) Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. *Infect Immun* **59**: 4511-4516.
 Hafid J, Tran Manh Sung R, Raberin H (1989) Antigenic analysis of *Toxoplasma gondii* by chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis and immunoprecipitation. *Ann Soc Belge Med Trop* **69**: 41-48.
 Handman E, Goding JW, Remington JS (1980) Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **124**: 2578-2583.
 Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkorn ER (1983) Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J Immunol* **130**: 2407-2412.
 Kasper LH, Khan IA (1993) Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *T. gondii* infection. *Res Immunol* **144**: 45-48.
 Kasper LH (1994) *Toxoplasma infection and toxoplasmosis*. In Harrison's principles of internal medicine. pp903-908, 13ed. McGraw-Hill, New York.
 Khan IA, Smith KA, Kasper LH (1988) Induction of antigen-specific parasitocidal cyto-toxic T cell splenocytes by a major membrane protein (p30) of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **141**: 3600-3605.
 Langermans JAM, vander Hulst MEB, Nibbering PH, Hiermatra PS, Franssen L, van Furth R (1992) IFN- γ -induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages in mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . *J Immunol* **148**: 568-574.
 Lettillois MF, Laigle V, Santoro F, Micoud M, Chumpitazi BF (1995) *Toxoplasma gondii* surface antigen-1 in sera of HIV-infected patients as an indicator of reactivated toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **14**: 899-903.
 Makioka A, Kobayashi A, Hiraoka KI (1989) A 30kDa surface protein of *Toxoplasma gondii*

- as a major antigen for Sabin Feldman's dye test. *Jpn J Parasitol* **38**: 61-67.
- Makioka A, Kobayashi A (1991) Toxoplasma-cidal activity of macrophages activated by recombinant major surface antigen (p30) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **59**: 2851-2852.
- Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH (1993) Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol* **150**: 3951-64.
- Omata Y, Igarashi M, Ramos MI, Nakabayashi T (1989) *Toxoplasma gondii*: Antigenic differences between endozoites and cystozoites defined by monoclonal antibodies. *Parasitol Res* **75**: 189-193.
- Rodriguez C, Afchain D, Capron A, Dissous C, Santoro F (1985) Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur J Immunol* **15**: 747-749.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* **76**: 4350-4354.
- Vincendeau P, Daulouede S (1991) Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma muscicola* involves an L-arginine-dependent mechanism. *J Immunol* **146**: 4338-4343.
- Voller A, Bidwell DE, Barlett A (1976) Enzyme immunoassay in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull WHO* **53**: 55-65.
- Ware PL, Kasper LH (1987) Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **55**: 778-783.

=Abstract=

Immunological properties of the 30 kDa antigen of *Toxoplasma gondii*

Dae-Whan SHIN*, Young-Ha LEE and Tae-Jin RHO

Department of Parasitology, College of Medicine Chungnam National University Taejeon, Korea

The molecular weight 30 kDa membrane protein of *Toxoplasma gondii* (30 kDa) apparently conserved in most strains of *T. gondii* and sera of infected hosts. The present study aimed to elucidate *Toxoplasma* 30 kDa as a useful diagnostic antigen for serodiagnosis of toxoplasmosis by ELISA and for induction of protective immunity. Murine spleen cells immunized with the membrane antigen of *T. gondii* were fused with mouse Sp2/0-Ag14 myeloma cells. Out of 8 clones selected, five were IgG_{2b}, the others belonged to IgG₁ and IgG_{2a}. The 30 kDa antigen was distributed mainly on the surface membrane of tachyzoites by indirect fluorescence method. Murine peritoneal macrophages which were activated by 30 kDa antigen produced more amounts of NO₂ compared with crude antigen-treated group, however there were no significant differences in toxoplasma-cidal activity between the two groups. Higher specificity of *Toxoplasma* 30 kDa antigen was recognized for serodiagnosis of toxoplasmosis than the crude antigen. From these results, *Toxoplasma* 30 kDa antigen enhances the cytotoxic effect of macrophages as well as a more reliable means for the serodiagnosis of toxoplasmosis by ELISA.

Key words: *Toxoplasma gondii*, 30 kDa antigen (p30), mouse, serodiagnosis, macrophage, cytotoxicity.

[Korean J. Parasitol. 35(1): 55-62, March 1997]

*Corresponding author