

## 폐흡충 피낭유충 조직에 있어서 특정항원성 단백질의 분포

김수진 · 노태훈\* · 주경환\* · 임한중\*  
한림대학교 자연과학대학 생물학과  
\*고려대학교 의과대학 기생충학교실

### The Localization of the Specific Antigenic Protein in the Tissue of *Paragonimus westermani* Metacercaria

Soo Jin Kim, Tae-Hoon Roh\*, Kyoung-Hwan Joo\* and Han-Jong Rim\*  
Department of Biology, College of Science Hallym University  
\*Department of Parasitology, College of Medicine Korea University  
(Received September 28, 1997)

#### ABSTRACT

In order to observe the localization of the specific antigenic protein in the tissue of *Paragonimus westermani* metacercaria, immunogoldlabeling method was applied using IgG of the dog which were infected with *Paragonimus westermani* metacercaria and IgG of rabbits which were immunized with purified 23 kDa protein from metacercaria of the *Paragonimus westermani*. The metacercaria worm tissues obtained from *Cambaroides similis* were embedded in Lowicryl HM20 medium, treated with infected and immunized IgG and protein A gold complex (particle size; 12 nm) and observed by electron microscope.

In the tissue antigen of *Paragonimus westermani* metacercaria, the content of excretory bladder which was highly dense electron density was constituted in the excretory bladder of the parenchymal tissue.

In the metacercaria tissues antigen reacted with IgG of infected dog. Labeled gold particles distributed on the interstitial matrix of parenchymal cells, fibrous granules of parenchymal tissue and the content of excretory bladder. High antigenicity was observed on content of excretory bladder. It was found to be specifically distributed at the tissue of *Paragonimus westermani* metacercaria.

In the tissues antigen reacted with IgG of immunized rabbit. Labeled gold particles randomly distributed on the interstitial matrix and fibrous granules of parenchymal tissue but in the content of excretory bladder of *Paragonimus westermani* metacercaria, gold particles were richly labeled. Therefore, the 23 kDa protein contained with *Paragonimus westermani* metacercaria was found protein which was specifically constituted at the content of excretory bladder of *Paragonimus westermani* metacercaria.

The 23 kDa protein was commonly contained from of *Paragonimus westermani* metacer-

caria to adult and showed strong antigenicity against the immunized and infected IgG.

**Key words** : *Paragonimus westermani* metacercaria, antigenicity, content of excretory bladder, 23 kDa protein

## 서 론

폐흡충(*Paragonimus westermani*)은 인체에 피낭 유충이 감염되어 폐조직에 치명적인 병변을 유발할 뿐만 아니라 폐조직 이외의 인체조직에 기생하여 병변을 유발할 경우 진단이 매우 어려운 것으로 알려졌다. 그러나 폐흡충들이 숙주의 조직에 기생하므로 숙주의 면역계를 자극하여 폐흡충에 대한 숙주의 면역항체가 쉽게 생성된다는 연구보고를 근거로 최근에는 면역학적 진단법이 많이 사용되고 있다(Yokogawa *et al.*, 1962; Yogore *et al.*, 1965; 崔·李, 1981; Cho *et al.*, 1981; 李·張, 1986; 이 등, 1989). 폐흡충에 감염되었을 때 생성되는 면역항체는 감염 기간별 면역 반응 활성도가 다소 상이하고, 비특이성 항원과 타흡충류의 항원들과 교차반응들이 나타나므로 완벽한 진단법으로는 다소 부족함이 있는 것으로 알려졌다(Kim *et al.*, 1986; 이 등, 1989; 주 등, 1989; 林 등, 1992). 뿐만 아니라 폐흡충 피낭유충이 감염된 후 면역항체 형성은 감염 후 3주부터 6주 사이에 면역항체가 생성되기 시작하여 12주에서 18주 사이에 최고치에 이른다고 보고된 바 있으며(Kim *et al.*, 1982; 최 등, 1986), 감염 후 1년 정도 이후부터는 항체형성이 다소 감소되는 경향이 있어 감염초기와 감염된 후 일정한 기간이 경과된 다음에 동일한 면역학적 진단법을 사용하기에는 정확도가 부족한 것으로 알려졌다(Tada, 1967; 李·張, 1986; 權 등, 1991).

폐흡충 피낭유충의 감염초기에 숙주의 면역항체 형성의 저조와 감염 후 일정기간이 지난 숙주에 있어서 면역항체 형성의 변화는 폐흡충 충체의 구조 단백질과 분비배설 단백질의 양적 감소로 인해 영향이 있을 것으로 보고된 바 있다(Yogore *et al.*, 1965; Ohara *et al.*, 1985; Fujino and Ishii, 1988).

최근에는 權 등(1991)과 林 등(1992) 및 Kong 등(1992)은 폐흡충에 감염된 실험동물의 IgG를 폐흡충

유약성충의 맹관조직에 반응시킨 결과 맹관상피의 막 구조물과 맹관 내용물이 숙주에 항원성을 나타내고 있었으며 충체의 유조직내 분비과립들은 폐흡충의 성숙도에 관계없이 항원성을 나타내는 물질을 포함하고 있는 것으로 보고한 바 있다. Sugiyama *et al.* (1987, 1988), 주 등(1989), Kang *et al.*(1991) 및 Kong *et al.*(1992)은 폐흡충 피낭유충이 감염되었을 때 숙주에게 항체를 형성하게 하는 단백질들은 폐흡충 충체조직내에 분자량이 13, 17, 19, 21, 23, 27, 35, 46, 48, 63, 67, 85, 91, 115, 203, 229, 440 kDa인 단백질 종류들로 폐흡충 유약성충 혹은 폐흡충 성충들의 충체 구성단백질과 분비단백질들이므로 보고하였다. Kang *et al.*(1991)은 폐흡충 성충의 분자량 23 kDa 단백질을 분리하여 단세포균 항체를 제작하여 단백질 분포 부위를 광학현미경으로 확인한 결과 총란 세포에서 강한 면역반응을 관찰했다고 하였으나, Kong *et al.*(1992)은 분자량 23 kDa 단백질을 분리하여 실험토끼에 감작시켜 얻은 면역항체로 폐흡충 충체내 23 kDa 단백질 분포를 광학현미경으로 확인한 결과 유조직층에서 관찰된다고 했다.

그러나 폐흡충 피낭유충을 구성하는 단백질들은 피낭유충 감염시에 숙주의 항체형성에 관여할 것으로 생각되었지만 현재까지 연구 보고된 바가 없었으며 폐흡충 피낭유충 충체조직내 존재하는 항원성 단백질 존재 부위도 연구 보고된 바 없었다. 또한 피낭유충 조직항원이 폐흡충에 감염된 숙주의 항체와 반응하는 항원으로 폐흡충증 진단에 사용될 수 있는지에 대하여도 보고된 바 없었다.

따라서 본 연구에서는 면역전자현미경법을 이용하여 폐흡충에 감염된 숙주의 항체와 반응하는 항원성 단백질을 피낭유충 조직내 존재하는 위치를 규명하고 피낭유충의 조직항원이 폐흡충증 진단에 조직항원으로 사용될 수 있는지를 알아보고자 하였다. 또한 폐흡충에 감염된 숙주의 항체와 반응하는 여러 종류의 단백질 중에서 폐흡충 피낭유충이 함유하고 있는 분자량 23

kDa 단백질을 폐흡충 피낭유충으로부터 분리하여 23 kDa 단백질이 피낭유충 총체내에 존재하는 부위와 생성되어 이동되는 경로를 규명하고 23 kDa 단백질을 여러가지 폐흡충진단의 면역학적 진단법에 항원으로 유용하게 사용될 가능성이 있는지를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

참가재 (*Cambaroides similis*)로부터 분리한 폐흡충 (*Paragonimus westermani*) 피낭유충 일부는 조직항원으로 사용하고, 약 20,000개는 마쇄하여 원심분리하고 전기영동법으로 23 kDa 단백질을 분리하여 항원으로 사용하였다.

폐흡충 성충과 감염후 형성되는 면역항체를 얻기 위하여 폐흡충 피낭유충을 체중 1kg의 실험 개 5마리에 100개씩 경구감염시키고 1주부터 12주까지 매주 혈액을 채취하고 12주 후에 개를 부검하여 폐조직에서 폐흡충을 얻었다.

### 2. 실험방법

#### 1) EITB법과 전기영동법을 위한 조항원

참가재 (*Cambaroides similis*) 1,000마리로부터 분리한 피낭유충 약 20,000개와 피낭유충을 감염시키고 12주 후에 개를 부검하여 얻은 폐흡충 총체들은 각각 조직분쇄기장치를 사용하여 분쇄하고, 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 분리된 상등액인 체액들은 Sorvall ultracentrifuge A 841 rotor를 사용하여 38,000 rpm으로 3시간동안 초원심분리시켜 침전물은 제거하고 상등액들을 수집하였다. 상등액들은 Bradford microassay method로 단백질을 정량분석하고 용액 1ml당 1mg의 단백질이 포함되게 제작하여 일부는 EITB법 (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method)에 조항원으로 사용하고 일부는 23 kDa 단백질 분리에 사용하였다.

#### 2) 23 kDa 단백질 분리

폐흡충 피낭유충과 감염후 12주 동안 성숙한 폐흡충을 각각 분쇄하고 초원심분리기로 원심분리하여 얻

은 단백질 용액을 4~20% gradient gel로 전기영동하였다. 전기영동후 분자량이 23 kDa 단백질 띠를 절단하고 단백질 전이장치 (protein transfer kit)를 이용하여 Gel로부터 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 단백질이 용액 1ml당 1mg의 단백질이 포함되게 제작하여 항원으로 사용하였다.

### 3) 면역항체

실험에 사용된 항체는 폐흡충을 감염시킨 후 12주에 실험 개로부터 각각 혈액을 채취한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 혈청에서 saturated ammonium sulfate와 ultracentrifuge를 이용하여 면역항체 (IgG)를 분리하여 폐흡충 감염 면역항체로 사용하였다. 분리된 23 kDa 단백질 용액은 Freund's adjuvant (complete)와 1:1로 혼합하여 실험토끼의 대퇴부에 주사하고 2주 후부터 2주 간격으로 단백질과 Freund's adjuvant (incomplete) 혼합액을 2회 주사한 다음 최종 주사후 1주 후에 토끼로부터 체혈을 하여 면역항체를 분리하였다. IEM법 (immune electron microscopy)은 직경 12 nm인 황금입자 (colloidal gold)가 표지된 protein A gold 복합용액을 면역반응에서 표지면역항체로 사용하였다.

### 4) 조직항원

참가재들로부터 분리한 일부의 폐흡충 피낭유충들과 피낭유충에 감염된 개의 폐에서 얻은 폐흡충 총체들은 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde 고정액 (pH 7.4)에 2시간 전고정하고 0.12 M cacodylate buffer (pH 7.4)에서 세척하였다. 전고정된 총체들은 2% osmium tetroxide 고정액으로 1시간 30분간 후고정하였고, alcohol 탈수후 Lowicryl HM 20 혼합액에 포매한 다음 60°C oven에서 24시간 중합반응 (polymerization)시켰다. 포매된 총체는 Reichert-Jung ultramicrotome으로 절편을 만들어 면역반응의 조직항원으로 사용하였다.

### 5) 면역전자현미경법

Roth (1982a & b), 朱 등 (1990), 權 등 (1991)과 林 등 (1992)의 방법에 따라 폐흡충 성충 및 피낭유충의 조직절편을 grid에 부착하여 saturated sodium metaperiodate에 처리한 다음 0.02 M tris buffer

(pH 8.2)로 세척하고, 폐흡충에 감염된 실험 개들의 면역항체들과 폐흡충 피낭유충의 23 kDa 단백질에 주사한 토끼의 면역항체를 각각 tris buffer와 1:100으로 희석하여 반응시켰다. 1차 면역항체들과 반응시킨 조직절편들은 protein A gold 복합용액에 반응시킨 후 0.02 M tris buffer (pH 8.2)와 증류수로 세척하고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후, Zeiss EM109 전자현미경으로 관찰하였으며, 면역항체에 따른 충체의 각 세포의 원형질에 부착된 황금입자의 수로 면역반응의 정도를 비교하였다.

## 결 과

참가재 (*Cambaroides similis*)로부터 분리한 폐흡충 피낭유충은 300  $\mu\text{m}$  크기의 피낭속중앙에 암갈색의 배설낭 함유물 (content of excretory bladder)을 포함하고 있음이 분명하게 관찰되었다 (Fig. 1). 피낭유충의 피낭표면은 주름진 세포층으로 구성되어 있으며 (Fig. 2), 37°C 생리식염수내에서 피낭을 파괴하고 돌출한 유충들은 구흡반과 복흡반이 뚜렷하였으며 구흡반과 복흡반 주위에는 감각유두 (sensory papillae)들이 잘 발달되어 있었다. 복부의 표피에도 일정한 간격을 두고 감각유두들이 산재해 있었으며, 등쪽에서는 감각유두가 복부와 비교하여 다소 적은 수가 관찰되었다 (Fig. 3). 광학현미경 관찰에서 피낭유충은 맹관과 배설낭이 잘 발달되었으며 특히 배설낭함유물이 배설낭에 충만하고 있음이 관찰 되었다 (Fig. 4).

### 1) 폐흡충 피낭유충 조직항원에 대한 대조군의 실험 개 및 실험 토끼의 면역항체반응

조직항원에 대조군의 면역혈청을 처리한 결과 황금입자의 표지는 관찰되지 않았으나 피낭유충 충체의 표피는 표피합포체와 중주근과 환상근 그리고 표피세포층이 발달되어 있었고 표피세포들 사이에는 세포간질 (interstitial matrix)로 채워져 있었으며 유조직 층에는 조면소포체가 잘 발달되어 있었다. 특히 조면소포체가 발달된 유조직 세포들에는 섬유성 과립들이 6~7  $\mu\text{m}$ 의 액포를 형성하고 있는 것이 관찰되었고, 유조직층에는 배설낭 함유물들의 전자밀도가 높게 나타나고 있었다.

### 2) 폐흡충 피낭유충 조직항원에 대한 폐흡충 감염 실험 개의 면역항체반응

조직항원에 감염 IgG를 반응시킨 결과 폐흡충 피낭유충의 표피는 표피용기, 小棘 (spine), 표피합포체 그리고 기저층이 폐흡충 성충과 동일하게 잘 발달되어 있었으며, 표피합포체에서부터 표피세포질 및 세포간질에 모두 황금입자가 표지되어 폐흡충에 감염된 실험 개의 면역항체에 대하여 항원성이 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5). 특히 세포간질에는 표피층보다 더욱 많은 수의 황금표지가 되었음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6). 피낭유충의 충체 중앙을 구성하고 피낭유충의 특성인 배설낭 함유물로 이루어진 유조직층의 배설낭 함유물은 황금입자가 높은 밀도로 표지되고 있었으며 유조직층 세포들의 세포간질 역시 항원성이 있는 것으로 관찰되었다. 유조직층의 화염세포의 주변부위를 구성하는 세포간질에도 황금입자가 높은 밀도로 표지되었다 (Fig. 6).

유조직층과 배설낭 함유물층 사이에는 조면소포체가 특히 발달되어 있었으며 이들 조면소포체에서부터 배설낭 함유물층에 이르기까지 황금입자가 표지되었으나 Golgi 복합체에서는 관찰되지 않았다. 따라서 조면소포체와 배설낭 함유물에 존재하는 항원성 단백질들은 단백질이 합성되어 이동되는 과정에서 조면소포체와는 연관이 있으나 Golgi 복합체와는 연관성이 적은 것으로 관찰되었다 (Figs. 7, 8).

피낭유충의 유조직층은 배설낭 함유물층 주위에 섬유성 과립들로 구성된 액포들이 섬유성 과립들로 채워져 있었고, 이들 섬유성 과립에 황금입자가 표지되어 섬유성 과립을 구성하는 단백질 역시 항원성이 있는 단백질인 것으로 관찰되었다 (Fig. 11).

배설관 분비물에는 황금입자의 표지가 관찰되지 않았으나 배설관 상피 표피합포체와 배설낭상피 세포들의 세포간질에는 높은 밀도의 황금입자가 표지되었다 (Fig. 13).

따라서 감염혈청에 반응하는 폐흡충 피낭유충의 조직항원은 표피층, 유조직층 그리고 배설관 상피조직층의 세포간질과 유조직층의 섬유성 과립에 항원성이 있으며 피낭유충에 특징적으로 분포하는 유조직층을 구성하고 있는 배설낭 함유물에 항원성이 특징적으로 나타나는 것으로 관찰되었다.

### 3) 폐흡충 피낭유충 조직항원의 23 kDa 단백질에 대한 면역항체반응

전기영동법으로 폐흡충 피낭유충과 성충에서 공통으로 나타나고 (Fig. a), EITB법에서 폐흡충에 감염된 면역항체와 반응하는 23 kDa 단백질을 폐흡충 피낭유충으로 부터 분리하여 토끼에 감작시켜 얻은 면역항체는 폐흡충 피낭유충의 조직항원에 반응시킨 결과 표피합포체와 표피세포들의 세포간질에는 항원성이 미약한 것으로 관찰되었다. 그러나 유조직층과 배설낭 상피의 세포간질에 황금입자가 표지되었으며 유조직층의 섬유성 과립에 다수의 황금입자가 표지되었다 (Figs. 12, 14). 피낭유충의 유조직층을 구성하는 배설낭 함유물 주위에는 소포체가 발달되어 있고 소포체가 발달된 세포질의 배설낭 함유물에 높은 밀도의 황금입자가 표지되었다 (Fig. 9). 그리고 유조직층 세포들의 세포간질에도 다수의 황금입자가 표지되어 유조직 층의 세포간질에 단백질과 배설낭 함유물의 단백질들이 연관성이 있는 것으로 관찰되었다. 따라서 23 kDa 단백질은 폐흡충 피낭유충에서 유조직층 세포들과 배설관 상피층

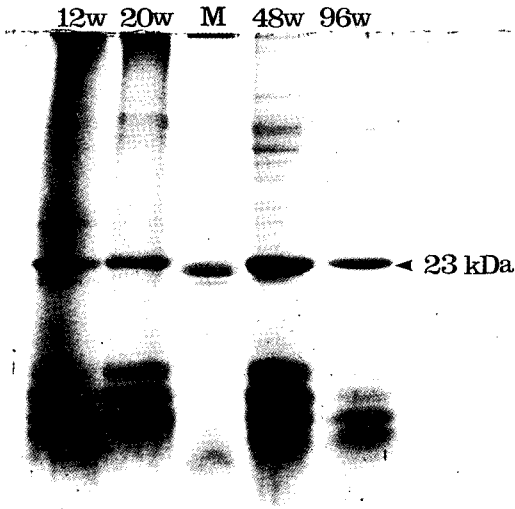


Fig. a. SDS-PAGE of body fluid protein of *P. westermani* in 4~20% gradient gel. (12w:protein prepared from *P. westermani* worm collected from the dog at 12 weeks after infection, 20w:at 20 weeks after infection, 48w:at 48 weeks after infection, 96w:at 96 weeks after infection, M:protein prepared from metacercaria)

세포들의 세포간질과 유조직층의 배설낭 함유물에 분포하는 단백질인 것으로 관찰되었다.

폐흡충 피낭유충이 감염되었을때는 피낭유충의 세포간질과 유조직층의 섬유성 과립 그리고 배설낭 함유물에 존재하는 단백질이 숙주의 면역계를 자극하는 단백질인 것으로 확인되었으며 이들은 세포간질과 배설낭 함유물들에 포함된 분자량이 23 kDa 단백질은 숙주의 면역계를 자극하여 면역항체를 형성하게 하는 여러 종류의 단백질 중의 일종인 것으로 확인되었다. 특히 폐흡충 피낭유충에서 배설낭함유물에 많은 양의 23 kDa 단백질이 포함된 것으로 생각되었다.

## 고 찰

폐흡충의 피낭유충은 *Paragonimus peruvianus*의 피낭유충과 같이 (Miyazaki, 1971) 피낭의 중앙에 전자밀도가 높은 배설낭 함유물이 관찰되었다. 피낭속의 유충이 탈낭시에는 Seed 등(1966)과 曲 등(1982)이 보고한 폐흡충 성충의 형태학적 특징과 동일한 외부형태학적 특징을 나타내고 있음을 관찰할 수 있었다. 朱 등(1990), 權 등(1991), 林 등(1992)은 폐흡충이 감염된 면역항체들과 폐흡충 유약성충과 성충의 조직항원을 반응시킨 결과 감염후 4주된 유약성충은 표피합포체에 항원성이 많이 나타나며 성충이 되면 맹관의 상피, 배설낭의 상피들에서 항원성이 나타난다고 하였다. 특히 유조직층의 맹관주위에 분비세포의 분비과립은 유약성충에서부터 성충에 이르기까지 항원성이 지속적으로 나타나는 것으로 보고한 바 있다.

본 실험에서 폐흡충 피낭유충 조직의 표피합포체에는 면역반응이 미약한 것으로 관찰되었으며 맹관의 상피, 배설낭의 상피, 표피 및 상피세포들의 세포질보다 이들 세포들의 사이 세포간질에 면역반응이 나타나 항원성 물질이 존재하는 것으로 관찰되었다. 세포간질의 항원성은 成 등(1988)이 간흡충 (*Clonorchis sinensis*)의 조직항원이 실험동물의 감염혈청에 대하여 증체의 세포간질에서 면역반응이 나타났음을 보고한 바와 같은 결과를 얻었다.

따라서 폐흡충 피낭유충의 조직항원은 폐흡충 유약성충과 성충의 조직항원과는 다소 상이한 항원성 부위를 나타내며 특히 조직세포의 세포질보다 세포와 세포

사이의 세포간질을 구성하는 단백질들이 간흡충에서와 같이 항원으로 작용하는 것으로 생각되었다.

林 등(1992)에 의하면 폐흡충의 유조직층 분비세포의 분비과립들은 폐흡충의 성숙단계에 상관없이 항원성을 나타낸다고 했으나 피낭유충의 경우에는 분비과립을 포함하는 분비세포가 관찰되지 않았으며 반면에 피낭유충의 총체 유조직층을 구성하는 전자밀도가 높은 배설낭 함유물은 폐흡충 감염 면역항체에 대한 항원성을 나타내고 있었다. 폐흡충 성충이 분비과립을 포함하고 있는 세포들의 집단이 유조직층에서 관찰되며 맹관의 주변에 분포하고 피낭유충의 배설낭 함유물은 피낭유충의 유조직층에 세포내용물로서 존재가 아니라 여러 종류의 물질로 구성된 조직부위로 관찰되는 상이한 점은 있으나 피낭유충의 기관분화과정에서 맹관과 유조직층의 형성과 연관성이 있는 것으로 생각되었고, 林 등(1992)이 보고한 폐흡충 성충의 분비과립과 동일하게 면역항체에 대한 항원성이 관찰되어 배설낭 함유물과 분비과립은 공통적인 항원성을 나타내는 단백질을 포함하고 있는 것으로 생각되었다. 따라서 폐흡충 피낭유충의 배설낭 함유물은 피낭유충 조직의 특성이며 폐흡충 감염항체에 대한 항원성이 특이하게 관찰되는 조직부위인 것으로 사료된다.

폐흡충 성충의 경우 많은 종류의 단백질들이 면역학적 진단법에서 항원성을 나타내고 있으며 분자량 23 kDa 단백질 역시 많은 종류의 항원성 단백질중의 한 종류로 알려졌다(Imai and Nawa, 1988; 주 등, 1989; Kang *et al.*, 1991; Kong, 1992). 주 등(1989)과 Zihao 등(1991)은 폐흡충의 발육단계별 특이항원대가 있으며 감염기간에 따라 형성된 면역항체에 대하여 특이하게 반응하는 항원대가 있음을 보고한 바가 있다. Kang 등(1991)은 폐흡충 성충의 분자량 23 kDa 단백질은 폐흡충 감염혈청에 대하여 강한 항원성을 나타낸다고 하였다.

본 실험에서도 폐흡충 피낭유충이 숙주에 감염후 성숙기간에 상관없이 23 kDa 단백질을 분리할 수 있었으며 특히 피낭유충에도 분자량이 23 kDa 단백질은 분리할 수 있었다. 따라서 폐흡충 피낭유충에서 성충에 이르기까지 분리될 수 있는 분자량 23 kDa 단백질은 성숙기간에 상관없이 공통적으로 포함된 단백질로 생각되었으며 감염 면역항체에 대하여 반응하는 공통

단백질 띠로 생각되었다.

Kang 등(1991)은 폐흡충 성충의 분자량 23 kDa 단백질을 분리하여 단세포균 항체를 제작하여 단백질 분포부위를 광학현미경으로 확인한 결과 충란의 세포에서 강한 면역반응을 관찰했다고 하였으나, Kong 등(1992)은 분자량 23 kDa 단백질을 분리하여 실험토끼에 감작시켜 얻은 면역항체로 폐흡충 총체내 23 kDa 단백질 분포를 광학현미경으로 확인한 결과 유조직층에서 관찰된다고 했다.

본 실험에서도 폐흡충의 각 성숙시기마다 공통으로 포함된 23 kDa 단백질을 분리하여 각각 실험토끼에 감작시키고 6주후에 얻은 면역항체를 피낭유충의 조직항원에 반응시켜 전자현미경으로 관찰한 결과 조직세포들 사이 세포간질에 다소의 항원성이 관찰되어 세포간질을 구성하는 단백질로 인정되었으며 특히 피낭유충의 유조직층에 대부분을 차지하는 배설낭 함유물에 높은 항원성을 관찰할 수 있었다.

따라서 폐흡충의 분자량 23 kDa 단백질은 피낭유충의 형태학적 특성인 피낭유충 배설낭 함유물에 풍부하게 포함되어 있는 단백질로 생각되었다.

폐흡충 성충을 조직항원으로 사용하여 폐흡충 감염 여부를 면역전자현미경으로 관찰함에 있어서 林 등(1992)은 유약성충의 조직항원은 표피합포체에서 높은 밀도의 황금입자가 표지되어 표피합포체가 항원성이 높은 것으로 보고하였다. Joo 등(1993)은 성충의 조직항원은 성숙정도에 상관없이 분비과립 즉 zymogen granule에 높은 밀도의 황금입자가 표지되어 유조직층의 분비세포내 분비과립에 항원성이 높은 것으로 보고하였으며 분비과립은 맹관의 상피층 세포들 사이에서 맹관의 분비효소들과 연관이 있는 것으로 보고한 바 있으나 폐흡충의 피낭유충을 조직항원으로 사용하여 감염여부를 진단하고자 할때는 피낭유충의 배설낭 함유물을 관찰함이 타당할 것으로 생각되었다.

폐흡충 조항원을 이용하여 ELISA법과 EITB법으로 폐흡충 감염여부를 진단할때는 주 등(1989)과 Kong 등(1992)에 의하여 보고된 많은 종류의 단백질 띠에 면역반응여부를 확인할 수 있으나 폐흡충 피낭유충의 경우에는 23 kDa 단백질 띠에 면역반응을 확인함이 효율적일 것으로 생각되었다. 따라서 폐흡충의 피낭유충을 면역학적 조직항원으로 사용할때는 세포간질과

배설낭 함유물의 면역반응을 관찰함이 타당하며 피낭 유충의 배설낭 함유물에 가장 많이 포함된 23 kDa 단백질을 분리하여 면역학적 진단에 항원으로 사용함은 진단의 정확도를 높일 수 있을 것으로 생각되어 간단한 진단기구제작도 가능한 것으로 사료된다.

## 결 론

참가재 (*Cambaroides similis*)로부터 분리한 폐흡충 피낭유충을 조직항원으로 제작하고 폐흡충 피낭유충 총체로부터 분자량 23 kDa 단백질을 분리하여 면역전자현미경법으로 폐흡충 피낭유충 조직에서 폐흡충 감염 면역항체에 대한 항원성 부위와 피낭유충 총체 조직세포내 23 kDa 단백질의 분포를 확인한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

폐흡충 피낭유충은 총체의 유조직층에 전자밀도가 높은 배설낭 함유물이 유조직층의 배설낭을 메우고 대부분을 구성하고 있었다.

폐흡충 피낭유충의 조직항원중 조직세포들의 세포간질과 유조직층의 배설낭 함유물에 폐흡충 감염 면역항체에 대한 항원성을 나타내는 단백질들이 포함되어 있었다.

유조직층의 배설낭 함유물은 폐흡충 성충에서 관찰되지 않는 피낭유충 조직의 특성으로 관찰되며 폐흡충 감염 면역항체에 대한 항원성이 특이하게 나타나는 부위였다.

폐흡충 피낭유충의 23 kDa 단백질은 피낭유충에서 성충에 이르기까지 폐흡충들이 공통으로 포함하고 있는 단백질로 폐흡충 감염에 의한 면역항체에 대하여 항원성이 높은 단백질인 것으로 확인되었다.

폐흡충 피낭유충 총체가 포함하고 있는 분자량 23 kDa 단백질은 피낭유충의 유조직층의 배설낭 함유물을 구성하는 단백질의 일종으로 확인되었다.

따라서 폐흡충 피낭유충을 면역학적 진단에 조직항원으로 사용할때는 세포간질과 배설낭 함유물의 면역반응을 관찰함이 타당하며 피낭유충의 배설낭 함유물에 가장 많이 포함된 23 kDa 단백질을 분리하여 면역학적 진단에 항원으로 사용하면 진단의 정확도를 높일 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

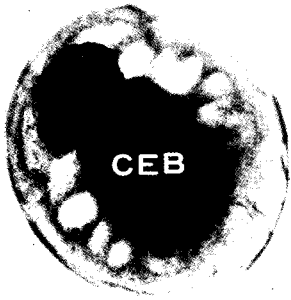
- Cho SY, Hong ST, Roh YH, Choi S, Han YC, 1981. Application of micro-ELISA in serodiagnosis of human paragonimiasis, Korean J. Parasit. 19(2), 151-156
- 崔源永, 李玉蘭, 1981. 實驗的 肺吸蟲症의 寒天沈降反應, 寄生蟲학잡지 19(2), 101-108
- 최원형, 유재을, 남호우, 최형락, 1986. 페디스토마 (*Paragonimus westermani*) 감염 고양어 혈청에 대한 ELISA 항체가의 의의, 寄生蟲학잡지 4(2), 177-186
- 曲華星, 金洙鎮, 林漢鍾, 1982. Praziquantel이 肺吸蟲에 미치는 영향에 관한 電子顯微鏡的 研究, 高麗醫大論文集 19, 617-630
- Fujino T, Ishii Y, 1988. Cytochemical studies on the effects of starvation the gastrodermis of the lung fluke *Paragonimus ohirai*, Jpn. J. Parasitol. 37(3), 147-155
- Imai JI, Nawa Y, 1988. Immunochemical characterization major antigenic components of *Paragonimus westermani* (triploid type) adult worms, Jpn. J. Parasitol. 37(6), 398-404
- 주경환, 홍성철, 정명숙, 임한중, 1989. Immunoblot technique을 이용한 폐흡충의 발육단계별 항원 특이성 분석, 寄生蟲학잡지 27(1), 1-7
- Joo KH, Kim SJ, Kim KS, Chung MS, Rim HJ, 1993. Characterization and localization of the antigenic protein of the liver, lung and intestinal flukes, Korean J. Electron Microscopy 23(3), 1-15
- 朱鳳德, 林漢鍾, 金洙鎮, 1990. 免疫黃金標識法을 이용한 肺吸蟲의 體液 抗原에 관한 연구, 寄生蟲학잡지 28(1), 11-23
- Kang SY, Kong Y, Cho SY, 1991. Component proteins in crude extract of adult *Paragonimus westermani* purified by immunoaffinity chromatography using monoclonal antibodies, Korean J. Parasit. 29(4), 363-369
- Kim SI, Ko EK, Kang SY, Cho SY, 1986. Antigenicity of the soluble egg antigen of *Paragonimus westermani*, Korean J. Parasit. 24, 49-54
- Kim DC, Lee OY, Lee JS, Ahn SA, 1982. Stud-

- ies on control of paragonimiasis by ELISA using secretory-excretory antigen, Rep. NIH Korea 19, 109-114
- Kong Y, Park CY, Kang SY, Cho SY, 1992. Tissue origin of soluble component proteins in saline extract of adult *Paragonimus westermani*, Korean J. Parasit. 30(2), 91-100
- 權五成, 李駿商, 林漢鍾, 金洙鎮, 1991. 免疫黃金標識法을 이용한 肺吸蟲의 幼若成蟲 組織內 抗原性 部位에 관한 研究, 寄生蟲학잡지 29(1), 31-41
- 林漢鍾, 金洙鎮, 宣一珠, 李駿商, 1992. 免疫黃金標識法을 이용한 肺吸蟲의 發育段階別 蟲體組織 內 抗原性 部位에 관한 研究, 寄生蟲학잡지 30(1), 1-14
- 이순형, 성숙환, 채종일, 1989. 폐흡충 충체 부위별 항원성에 대한 면역조직화학적 연구, 寄生蟲학잡지 27(2), 109-117
- 李玉蘭, 張在景, 1986. 肺吸蟲의 粗抗原과 精製抗原에 의한 肺吸蟲感染 고양이혈청의 免疫酵素反應, 寄生蟲학잡지 24(2), 187-193
- Miyazaki I, 1971. Studies on the Metacercaria of *Paragonimus peruvianus* (Trematoda: Troglotrematidae), Jap. J. Parasit. 20(5), 425-430
- Ohara H, Ikeda T, Oikawa Y, Tani S, 1985. Studies on antibody response in rats infected with *Paragonimus ohirai* by immunofluorescent staining method, Jpn. J. Parasitol. 34, 245-252
- Roth J, 1982a. The preparation of protein A-gold complexes with 3 nm and 5 nm gold particles and their use in labeling multiple antigens on ultrathin sections, Jpn. Histochem. J. 14, 791-798
- Roth J, 1982b. Applications of immunocolloids light microscopy. Preparation of protein A-silver and protein A-gold complexes and their application for localization of single and multiple antigens in paraffin sections, J. Histochem Cytochem. 30, 691-696
- Seed JR, Sogandares-Bernal F, Mills RR, 1966. Studies on American Paragonimiasis. II. Serological observation of infected cats, J. Parasit. 52(2), 358-320
- 成大林, 金洙鎮, 嚴基善, 林漢鍾, 1988. 間接螢光抗體法 및 免疫黃金標識法을 이용한 肝吸蟲 항원성부위에 관한 연구, 高麗醫大論文集 25(3), 813-827
- Sugiyama H, Horiuchi T, Tomimura T, 1988. Antigenic characteristics of larval *Paragonimus westermani*, Jpn. J. Vet. Sci. 50(1), 169-174
- Sugiyama H, Sugimoto M, Akasaka K, Horiuchi T, Tomimura T, 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
- Tada I, 1967. Physiological and serological studies of *Paragonimus miyazaki* infection in rats, J. Parasit. 53, 292-297
- Yogore MG, Lewert RM, Madraso ED, 1965. Immunodiffusion studies in paragonimiasis, Am. J. Trop. Med. Hyg. 14, 586-591
- Yokogawa M, Tsuji M, Okura T, 1962. Studies on the complement fixation test for paragonimiasis as the method of criterion of cure, Jpn. J. Parasitol. 11(2), 117-122
- Zihao Z, Yiping S, Piessens WF, 1991. Characterization of stage-specific antigens of *Paragonimus westermani*, Am. J. Trop. Med. Hyg. 44(1), 108-115



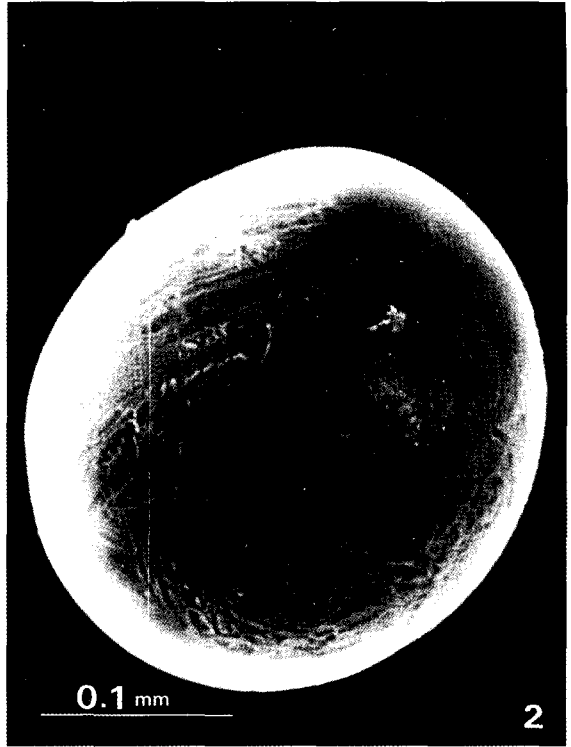
**FIGURE LEGENDS**

- Fig. 1.** Light photograph of the *Paragonimus westermani* metacercaria. It showed the content of excretory bladder (CEB). Bar=0.1 mm ( $\times 150$ ).
- Fig. 2.** Scanning electron micrograph of the *Paragonimus westermani* metacercaria. Bar=0.1 mm ( $\times 270$ ).
- Fig. 3.** Scanning electron micrograph of the immature *Paragonimus westermani*. It showed the oral sucker (OS) and ventral sucker (VS). Bar=0.1 mm ( $\times 290$ ).
- Fig. 4.** Light photograph of the *Paragonimus westermani* metacercaria. It showed well developed the oral sucker (OS), intestine (I) and excretory bladder (EB). Bar=1 mm ( $\times 10$ ).
- Figs. 5-14.** Electron micrographs of the *Paragonimus westermani* metacercaria.
- Fig. 5.** The tegument of metacercaria which was reacted with sera from dogs after infection showed the tegumental syncytium (TS), basal layer (BL), circular muscle (CM) layer, tegumental cell nucleus (TCN), interstitial matrix (IM) and content of excretory bladder (CEB). Gold particle was labeled on the tegumental syncytium, interstitial matrix and content of excretory bladder (CEB). Bar=1  $\mu\text{m}$  ( $\times 10,000$ )
- Fig. 6.** The parenchymal tissue of metacercaria which reacted with sera from dogs at 12 weeks after infection. Gold particles were specifically labeled in the interstitial matrix (IM) and around flame cell (FC) and nucleus (FCN). Bar=1  $\mu\text{m}$  ( $\times 24,000$ )
- Figs. 7, 8.** The parenchymal tissues of metacercaria which reacted with sera from dogs at 12 weeks after infection. Gold particles were specifically labeled in the interstitial matrix and content of excretory bladder (CEB). Bar=0.5  $\mu\text{m}$  ( $\times 24,000$ )
- Fig. 9.** The parenchymal tissue of metacercaria which reacted with sera from rabbits at 6 weeks after immunization with 23 kDa protein. Gold particles were slightly labeled in the interstitial matrix, and specifically labeled on the content of excretory bladder (CEB). Bar=0.5  $\mu\text{m}$  ( $\times 41,000$ )
- Fig. 10.** The parenchymal tissue of metacercaria which reacted with sera from noninfected control showed well developed fibrous granules and endoplasmic reticulums. Gold particle was not labeled on the fibrous granules. Bar=0.5  $\mu\text{m}$  ( $\times 41,000$ )
- Fig. 11.** The fibrous granules of metacercaria which reacted with sera from rabbits at 6 weeks after infection. Gold particles were specifically labeled on the fibrous granules. Bar=0.5  $\mu\text{m}$  ( $\times 41,000$ )
- Fig. 12.** The fibrous granule of metacercaria which reacted with sera from rabbits at 6 weeks after immunization with 23 kDa protein. Gold particles were predominately labeled on the fibrous granule (FG). Bar=0.5  $\mu\text{m}$  ( $\times 41,000$ )
- Fig. 13.** The excretory epithelium (EE) of metacercaria which reacted with sera from dogs at 12 weeks after infection. Gold particles were specifically labeled in the interstitial matrix (IM) of the epithelium. Bar=0.5  $\mu\text{m}$  ( $\times 41,000$ )
- Fig. 14.** The excretory epithelium of metacercaria which reacted with sera from rabbits at 6 weeks after immunization with 23 kDa protein. Gold particles were very slightly labeled in the interstitial matrix of epithelium. Bar=0.5  $\mu\text{m}$  ( $\times 30,000$ )



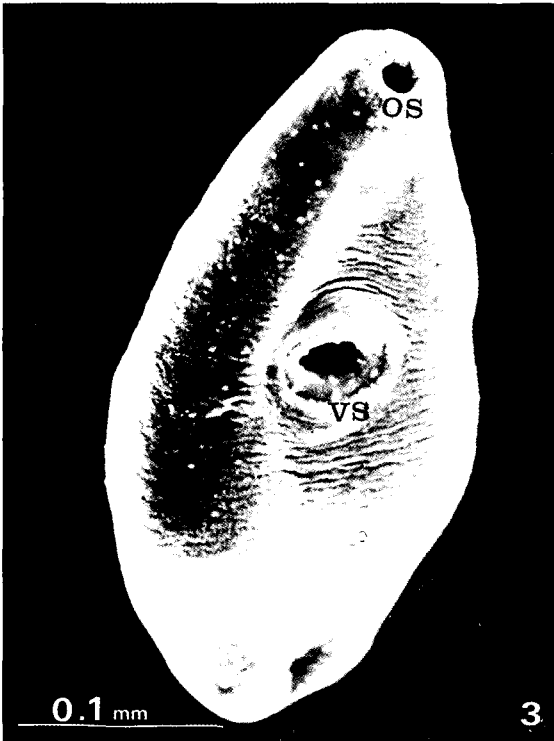
0.1mm

1



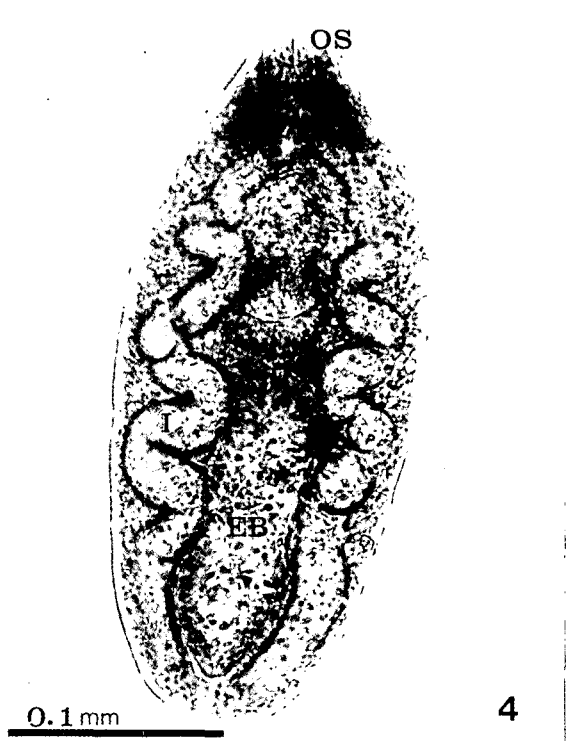
0.1 mm

2



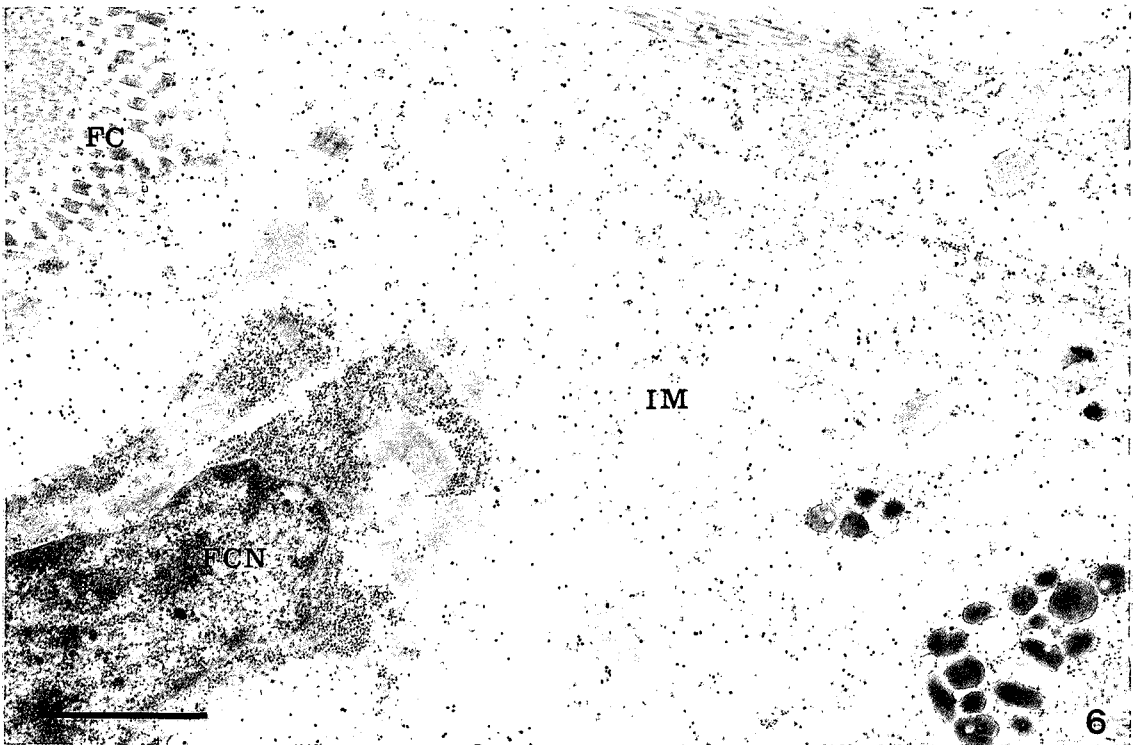
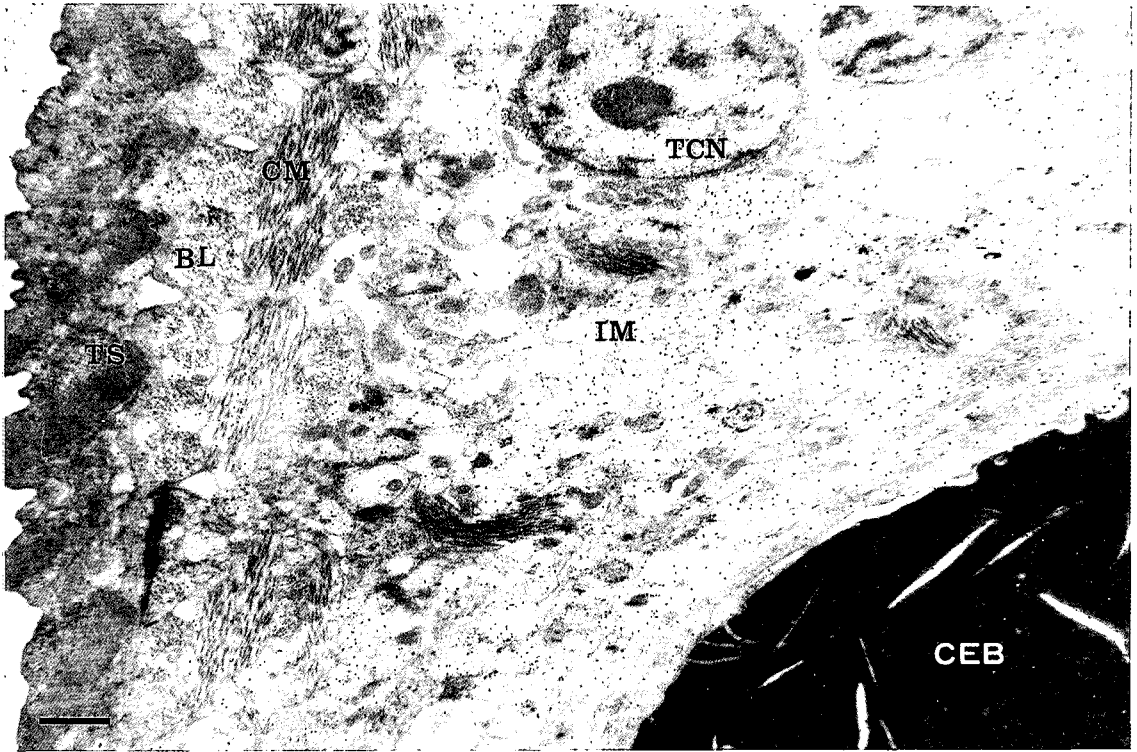
0.1 mm

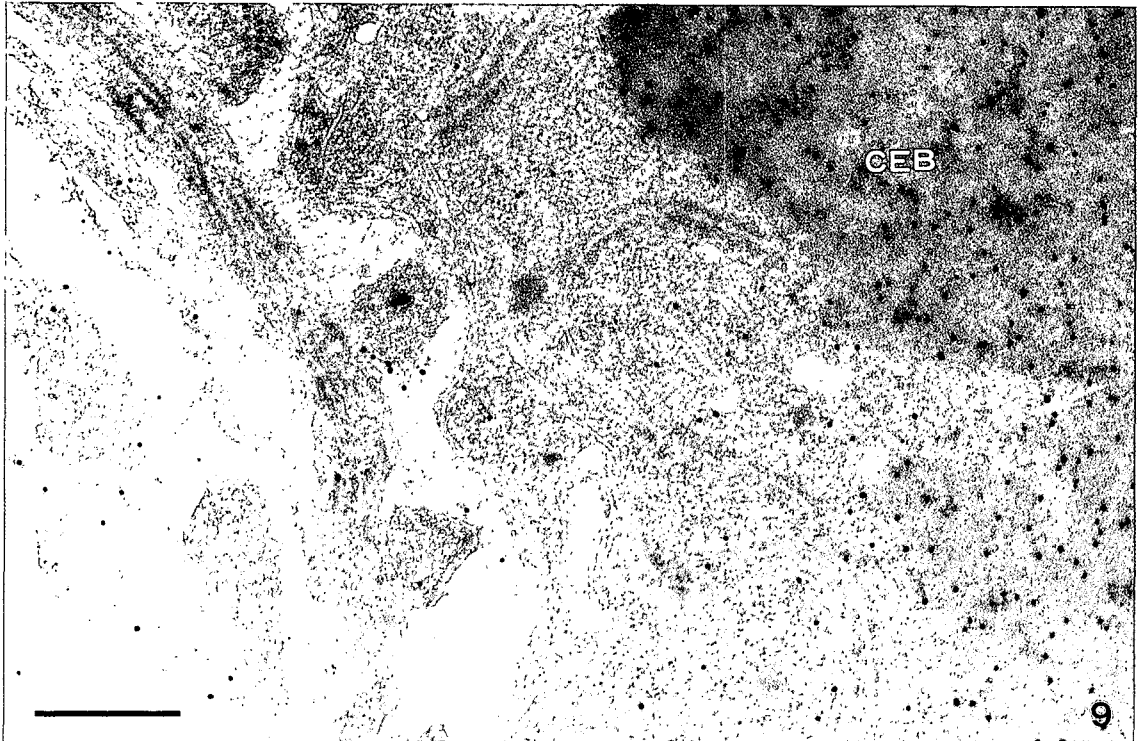
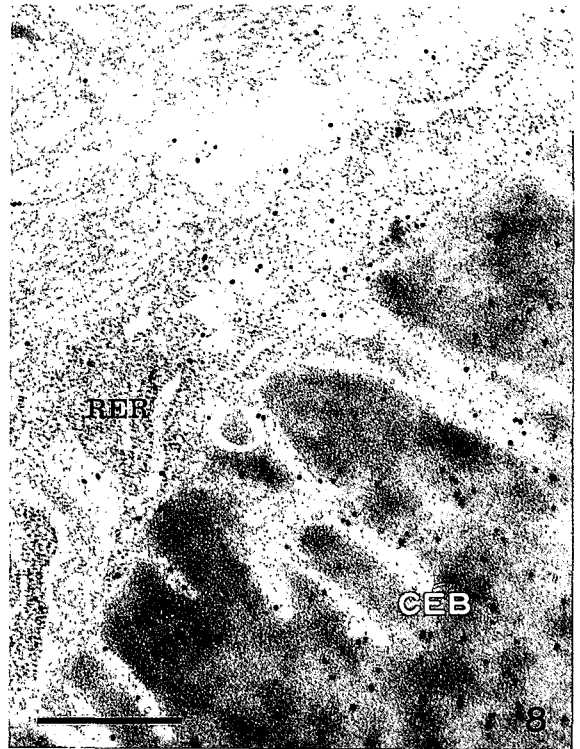
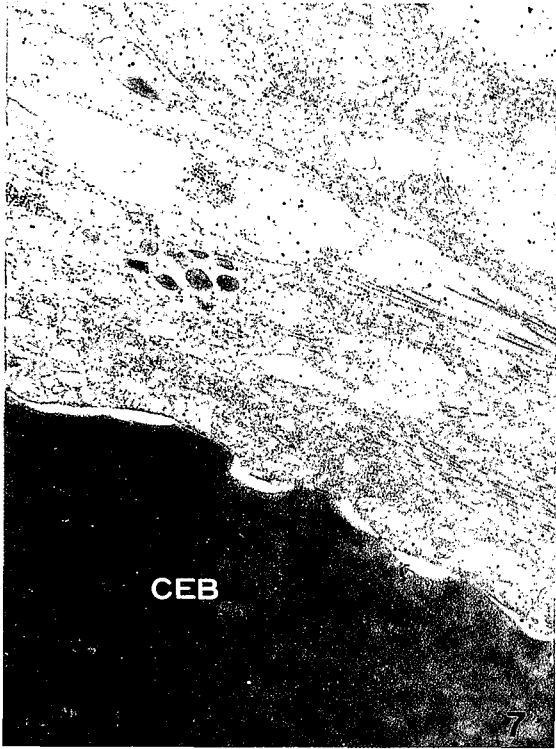
3

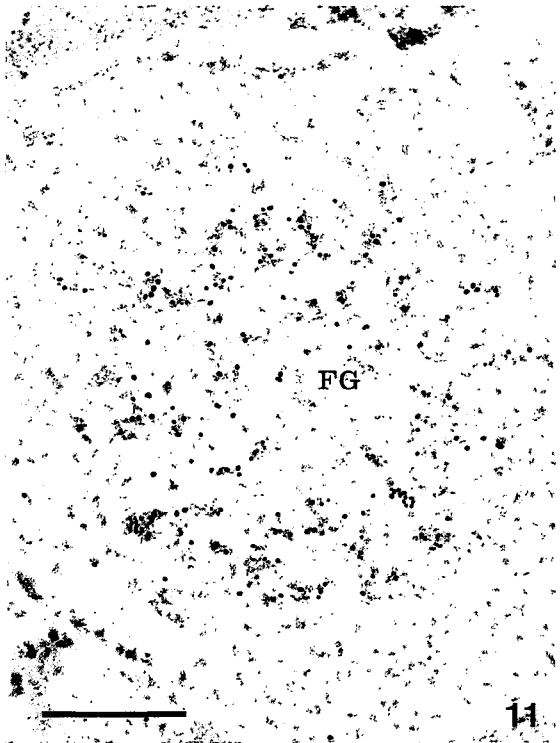
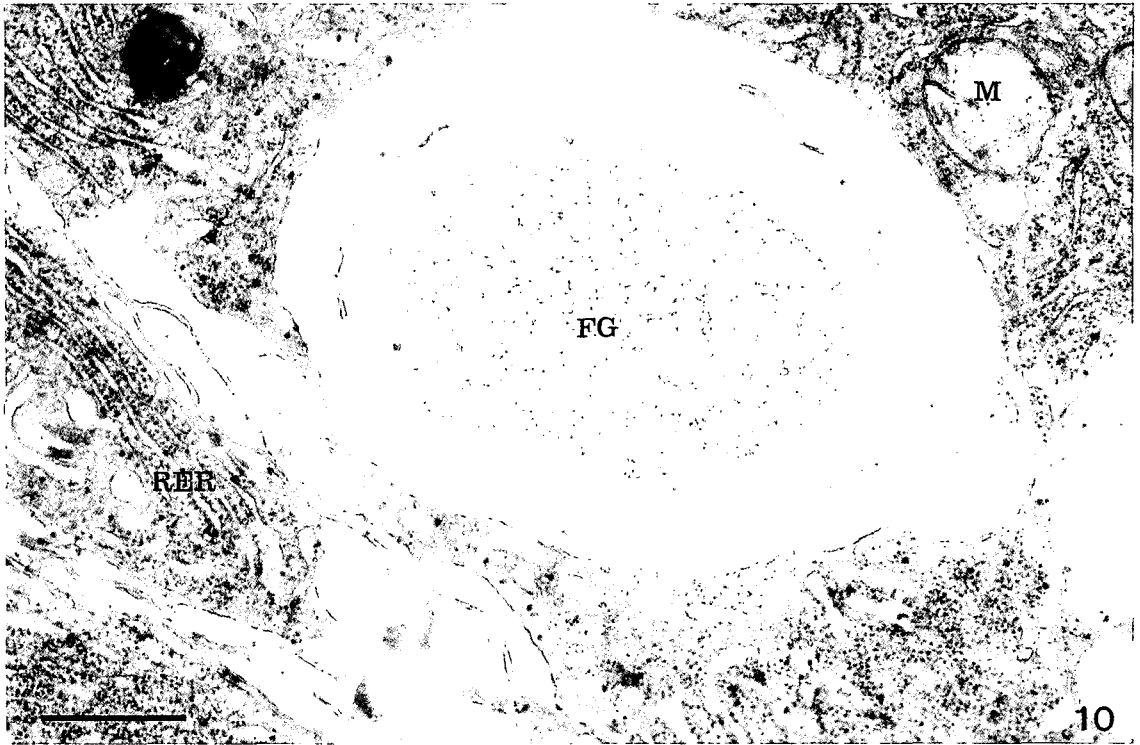


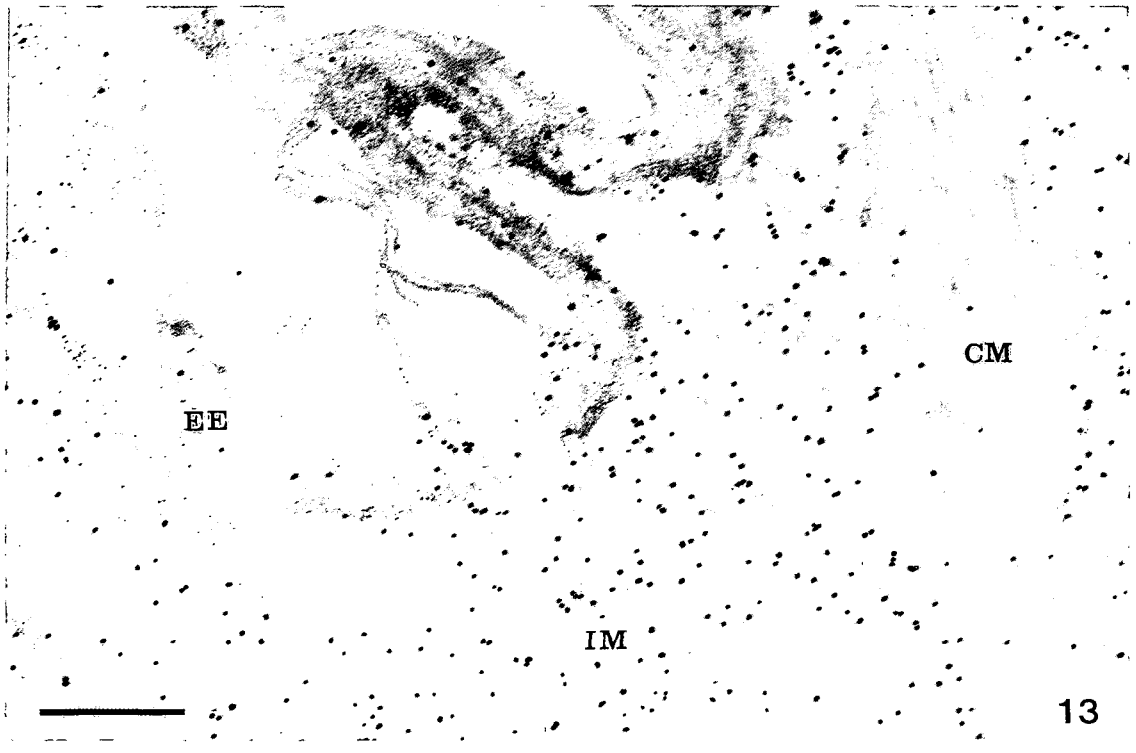
0.1 mm

4

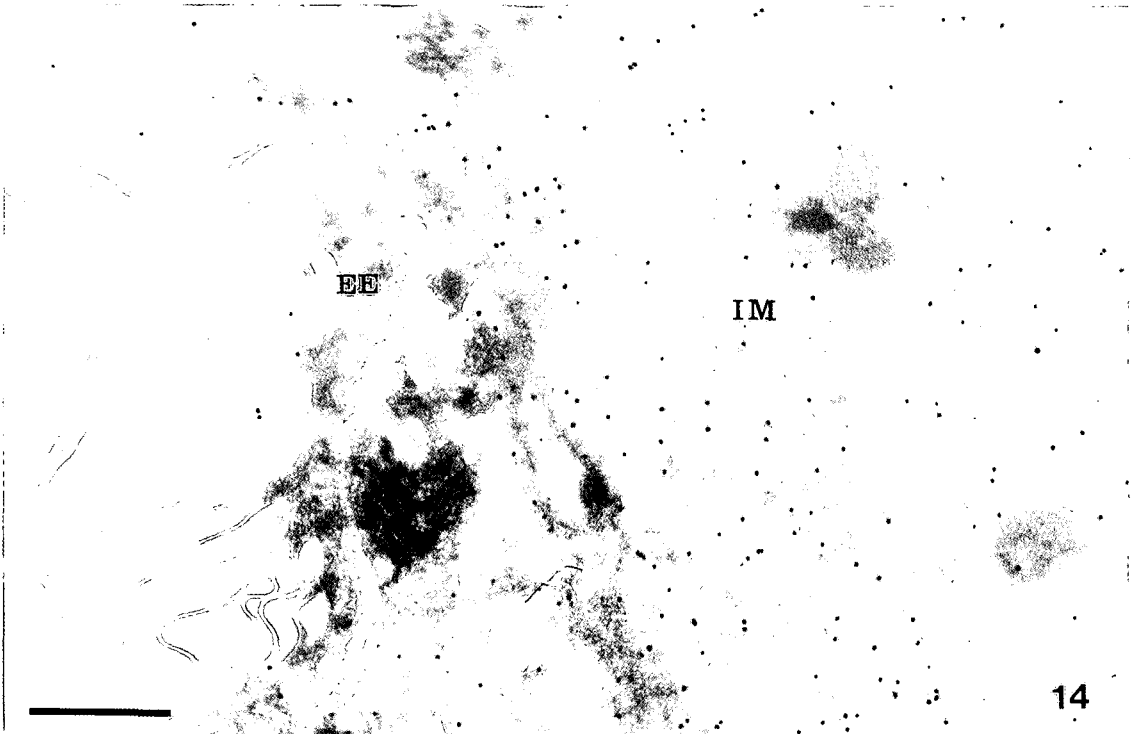








13



14