

## 폐흡충 충체 부위별 항원성에 대한 면역 조직화학적 연구

서울대학교 의과대학 기생충학교실, 풍토병연구소 및 흥부의과학교실\*

이 순 형 · 성 숙 환\* · 채 증 일

**요 약** : 폐흡충 감염시 숙주 말초혈액에는 많은 항체가 생성되므로 각종 면역학적 진단에 이용되고 있다. 그러나 이들 항체가 폐흡충 충체 구성 요소 중 주로 어느 기관(또는 구조물)에 대한 항체인지에 대해서는 별로 연구된 바 없었다. 이 연구는 면역 조직화학적 방법을 이용하여 폐흡충 충체의 부위별 항원성을 파악하기 위한 것으로 충체 절편 표본에서 흡반, 표피, 피극, 난황선, 장, 자성 및 웅성 생식기, 총란 등의 항원성을 비교 관찰한 것이다.

충체 표본으로는 감염 11~20주 된 고양이의 폐조직에서 총낭(worm capsule)을 적출하여 포르말린 고정 및 파라핀 포매한 것을 4 $\mu$ m 두께로 깎아 사용하였고, 항혈청(1차 항체)으로 감염 11~20주 된 고양이 혈청을, 2차 항체로 peroxidase-conjugated goat anti-cat IgG를 사용하는 간접 면역 효소 염색법(indirect immunoperoxidase staining technique)을 이용하였고, 진한 황색 또는 황갈색으로 염색되면 양성으로 판정하였다. 항체의 희석 농도는 1차 항체 1:500~1:2,000, 2차 항체 1:200~1:500으로 하였고 10회 이상 반복 염색하였다.

실험 결과 장 상피의 표면(intestinal epithelial border), 장 내용물, 난황선(vitelline glands) 및 총낭 내의 총란(eggs in worm capsule) 등이 강한 양성 반응을 보였고 자궁 내 총란 및 충체 실질 조직 중 일부도 약하지만 양성 반응을 보였다. 한편 흡반(suckers), 표피(tegument), 피극(spines), 표피하 세포(subtegumental cells), 장 상피세포의 세포질, 웅성 생식기관 및 난소 등은 음성 반응을 나타내었다. 항원성의 강도를 순서대로 나열해보면 장 상피의 표면, 장 내용물, 총낭 내의 총란, 난황선, 자궁 내 총란, 충체 실질조직의 순이었다. 항원성이 강한 장 상피층 및 장 내용물은 1차 항체 1:4,000(2차 항체 1:200)에서도 양성 반응을 보였으나 충체 실질조직 중 일부는 1차 항체 1:500의 고농도(2차 항체 1:200)에서만 양성 반응을 보였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 폐흡충 감염시 나타나는 혈청의 항체 반응은 충체의 배설물과 총낭 주위에 산출된 총란에 의해 가장 강력히 유발되는 것이 아닌가 생각되며 이들이 총낭을 벗어나 숙주 조직으로 흡수되는 가장 중요한 항원성 물질이 아닌가 추측된다.

**Key words:** *Paragonimus westermani*, indirect immunoperoxidase stain, excretory antigen, egg antigen

### 서 론

인체나 동물의 폐에 기생하여 질환을 일으키는 폐흡충류(lung flukes)는 민물 게나 민물 가재를 통해 감염되며 우리 나라, 중국, 일본을 포함하여 세계 각국에 널리 분포하고 있다(Yokogawa, 1982). 이들 폐흡충류는 전 세계에 형태학적 또는 생물학적으로 서로 다른 31종(species) 이상이 보고되어 있으며(Yokogawa, 1982), 인체 감염을 일으킬 수 있는 것만도 12종류 이상이 되나(Beaver *et al.*, 1984), 매우 광범위한 지역에 분포하면서 인체 감염을 흔히 일으키고 있는 종류는 폐흡충(*Paragonimus westermani*)이라고 할 수 있다. 이 종은 우리 나라에서도 인체 폐흡충증의 중요한 원인이 되고 있다.

폐흡충증의 진단은 객담 또는 대변에서 특징적인 총란을 발견함으로써 확진이 가능하지만 총란이 검출되지 않는 진성 감염례가 많고(조 등, 1983), 특히 폐 이외의 장소에 병소가 있을 때에는 총란 검출이 거의 불가능하다. 따라서 폐흡충증의 진단에는 각종 면역 혈청학적 검사법이 널리 이용되어 왔던 바, 보체 결합반응(Yokogawa *et al.*, 1962), 면역 이중확산법(Yogore *et al.*, 1965; 최 및 이, 1981), 간접 형광항체법(Cho and Soh, 1976) 등이 과거에 사용되었고 최근에는 효소면역 측정법 즉, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)가 많이 이용되고 있으며 좋은 성적을 보이고 있다(Cho *et al.*, 1981; 조 등, 1983; Soh *et al.*, 1985; 최 등, 1986; Cho *et al.*, 1989).

그러나 이와 같은 혈청학적 진단법은 환자 혈청 내에 있는 폐흡충 특이-IgG 항체를 검출하는 것이므로

순수히 정제된 항원을 사용하지 않는다든가 항체 생성이 충분하지 않은 상황 하에서는 그 민감도가 낮을 수밖에 없으며 또, 다른 종류의 기생충 항원에 대하여 교차 반응을 보일 수도 있다는 점 등이 문제가 되고 있다. 따라서 민감도와 특이도를 모두 높이기 위해서는 반드시 항원을 순수하게 정제해야 할 필요가 있다.

폐흡충 항원의 정제는 여러 학자들에 의해 시도되어 각종 면역진단에 이용되어 왔고(Sadun *et al.*, 1959; Sawada *et al.*, 1964; 김 등, 1983; 이 및 장, 1986; 최 등, 1986; Joo *et al.*, 1989) 그 결과 정제된 항원이 조항원에 비해 민감도와 특이도에 있어서 모두 우수하다는 것이 입증되었다. 그러나 항체 생성을 가장 강력하게 유발하는 항원 물질이 폐흡충의 총체를 구성하는 기관이나 부위별로 보아 어디에 분포하고 있는지에 대하여는 별로 충분한 연구가 없었던 것 같다. 다만 몇몇 보고에 의하면 폐흡충의 분비 배설 항원(secretory-excretory antigen)이 ELISA에 유용했다던가(김 등, 1982), 총란 항원이 총체 항원에 비해 항원성이 미약하다던가(김 등, 1986) 하는 보고들이 있는 정도이다. 더구나 형태학적으로 총체의 어느 부위 또는 어느 기관이 높은 항원성을 나타내는지에 대하여는 최근 Sugiyama *et al.* (1987)의 보고를 제외하면 거의 연구된 바 없다.

이 연구는 폐흡충의 총체 부위별(또는 기관별) 항원성을 보다 상세히 비교 관찰하기 위한 것으로 폐흡충 감염 고양이의 폐조직 절편과 고양이 혈청, 2차 항체 등을 이용하여 간접 면역 조직화학적 방법으로 연구를 시행한 것이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 폐흡충 피낭유충의 획득

강원도 양양군 한북면에서 채집한 참가재(*Cambroides similis*) 200마리로부터 폐흡충 피낭유충 280여 개를 획득하여 실험에 사용하였다. 피낭유충의 분리 방법을 요약하면, 참가재를 마쇄한 후 생리식염수를 넣어 현탁액으로 만들고 거즈(gauze)로 2~3회 거른 다음 실온에 약 10~15분간 방치하였다가 침사를 입체 해부현미경으로 관찰하면서 피낭유충을 골라내는 방법을 이용하였다.

#### 2. 고양이의 폐흡충 실험감염 및 총란, 혈청 획득

체중 1.5~2kg의 고양이 8마리를 구입하여 4마리에는 폐흡충 피낭유충 70개씩을 감염시키고 각각 감염 10주, 11주, 12주 및 20주까지 사육한 후 희생시켰고 나머지 4마리는 비감염 대조군으로 사용하였다. 피낭유충의 감염은 통상 이용하는 위내 삽입법(intragastric inoculation)에 의하되 gavage needle을 통하여 피낭유충을 주입하였다.

폐흡충의 총란 및 총체 절편을 제작하기 위해 예정된 감염 기간이 경과한 후 고양이를 희생시키고 폐를

적출한 다음 폐흡충이 들어 있는 총낭을 고양이 1마리당 10개씩 떼어내었다. 떼어낸 총낭을 1cm×1cm×1cm 크기로 만든 다음 4μm 두께의 파라핀 절편 표본으로 깎아 면역 효소 염색(immunoperoxidase staining)에 이용하였다.

면역 효소 염색에 사용한 혈청은 각 고양이를 희생시킬 때 심장천자하여 약 20~30cc의 혈액을 뽑고 이로부터 혈청을 획득하였다. 감염 기간별로 감염 10주, 11주, 12주 및 20주 항혈청을 획득하였고 비감염 대조군의 혈청과 함께 각각 실험에 사용하였다.

#### 3. 면역 효소 염색법

간접 면역 효소 염색법(indirect immunoperoxidase staining technique)을 응용하되 구체적으로 De Lellis (1981)의 방법을 따랐다. 즉, 10% 중성 포르말린에 고정된 폐흡충 총낭(고양이 폐 조직)을 알코올 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매한 다음 4μm 두께로 깎은 절편을 항원으로 사용하였다. 이 절편들은 xylene, 알코올 등 파라핀 제거 과정을 거친 다음 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 덮고 5~10분간 실온에 둬으로써 총체나 총낭 조직에서 나오는 endogenous peroxidase activity를 제거하였다. 다음에 Tris buffer(pH7.6)로 씻은 다음 정상 염소 혈청(normal goat serum)을 1:10 농도로 20분간 덮어 나중에 효소 표시 2차 항체가 비특이적으로 결합할 수 있는 부위를 미리 제거함으로써 비특이적 발색반응을 없애고자 하였다.

절편 위에 덮혀 있는 정상 염소 혈청을 가볍게 여과지로 빨아내어 제거한 다음 폐흡충 감염 고양이 혈청을 반응시키되 1:50에서 1:10,000까지 단계적으로 Tris buffer에 희석한 것으로 20~30분간 실온에서 반응시켰다. 반응 후 다시 Tris buffer로 닦고 효소 표시-염소-항고양이-IgG(peroxidase-conjugated goat anti-cat IgG)를 1:100에서 1:2,000까지 희석하여 절편 위에 덮은 다음 20~30분간 실온에서 반응시켰다.

반응 후 다시 Tris buffer로 닦고 발색제인 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 반응시키되 DAB는 0.25mg/ml 농도로 buffer에 희석하고, 최종 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도가 0.025%가 되도록 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 첨가하였다. 이 용액은 사용 직전에 만들어 절편 위에 충분히 덮은 다음 5분 후 물로 깨끗이 씻었다. 물로 씻은 총낭 절편 위에 Harris hematoxylin액을 4~5방울씩 떨어뜨리고 탈색 및 탈수 과정을 거친 다음 발사에 봉입하고 관찰하였다.

발색 반응 양성, 음성의 판정은 광학 현미경으로 100~400배 배율로 관찰하여 진한 황갈색으로 나타났을 때「++」, 약한 황갈색일때「+」, 황색이 약간 보일 때「+」, 황색을 전혀 볼 수 없을 때에는「-」 등으로 등급을 두어 표시하였다. 연구 결과에 제시한 사진은 Photomax(Olympus) 현미경으로 Kodak color ASA 100 Nega 필립과 LB 100 blue filter를 사용하여 찍은 것이다.

**Table 1.** Checkerboard titration of primary and secondary antibodies for indirect immunoperoxidase staining of *P. westermanni*

Secondary antibody**	Stainability at primary antibody* dilutions			
	1 : 200	1 : 500	1 : 2,000	1 : 8,000
1 : 20	strong positive intense BG***	strong positive moderate BG	very good slight BG	very good no BG
1 : 80	very good moderate BG	very good slight BG	very good slight BG	very good no BG
1 : 200	very good slight BG	very good slight BG	good, no BG	pale, no BG
1 : 500	good, no BG	good, no BG	pale, no BG	pale, no BG
1 : 1,000	good, no BG	pale, no BG	pale, no BG	negative, no BG

\* cat serum infected with *P. westermanni*(11~20 weeks after infection)  
 \*\* peroxidase-conjugated goat anti-cat IgG  
 \*\*\* BG; background

## 연구성적

### 1. 적정 항혈청 희석 농도

먼저 간접 면역효소 염색법으로 폐흡충 및 충낭의 조직절편을 염색하는데에 있어서 가장 낮은 농도로 background(비특이 염색)를 줄이면서, 특이 염색만을 얻을 수 있는 항혈청의 적정 농도(checkerboard titration)를 알아보았다. 각 농도에서의 구체적인 염색상은 Table 1에 제시한 바와 같으며 1차 항체 1 : 500에서 1 : 2,000 사이, 2차 항체 1 : 200에서 1 : 500 사이가 적정 희석 농도인 것으로 나타났다. 이 결과를 얻은 후 더욱 적당한 농도를 얻기 위하여 다시 1차 항체 1 : 500, 1 : 1,000, 1 : 1,500 및 1 : 2,000 및 2차 항체 1 : 200, 1 : 300, 1 : 400 및 1 : 500으로 각각 4가지 희석 농도를 만들어 염색상을 비교, 관찰하였다. 그 결과 1차 항체는 1 : 1,000, 2차 항체는 1 : 200~1 : 500 모두에서 만족할 만한 염색상과 낮은 background를 나타내었다. 1차 항체 1 : 1,000에서 2차 항체를 생략한 대조군에서는 면역효소 염색 음성이었다 (Fig. 1).

### 2. 폐흡충 충체의 항원성 평가

제 2차 항체 희석 농도를 1 : 200으로 고정하고 제 1차 항혈청의 희석 농도를 1 : 500~1 : 2,000으로 하였을 때 각각 충체 부위(구성요소)별 염색 정도를 보아 각 부위의 항원성을 검토하였다. 그 결과는 Table 2 및 Fig. 2~6에 제시한 바와 같다.

제 2차 항체 1 : 200에서 1차 항체(폐흡충 항혈청) 희석 농도를 1 : 8,000으로 했을 때는 충체 각 부위 어디에서도 면역효소 염색 반응을 볼 수 없었다. 그러나 폐흡충 항혈청 농도를 1 : 4,000으로 했을 때는 충체의 장 상피세포 표면(epithelial lining border)과 장 내용물(intestinal content)이 미약하지만 양성 반응을 보였다. 항혈청 농도를 1 : 2,000으로 높이면 장 상피 및

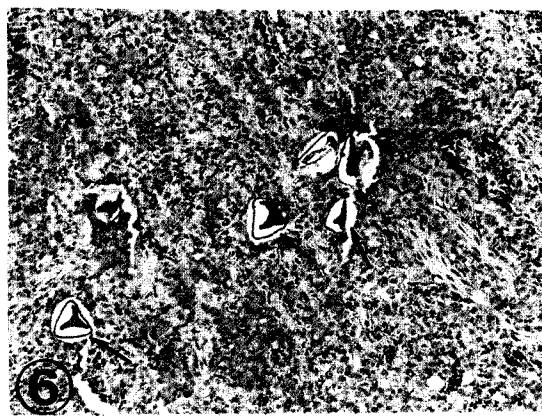
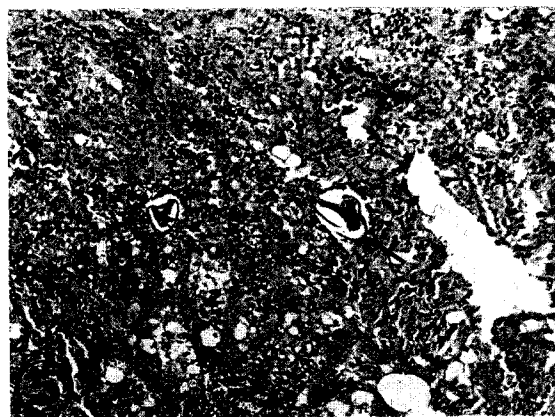
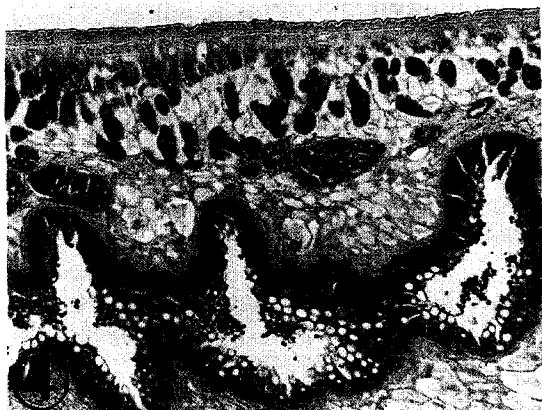
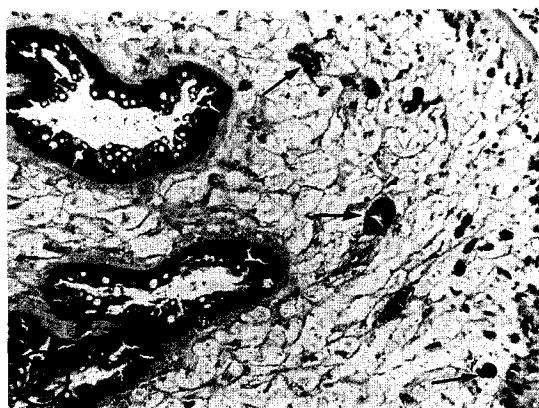
내용물 이외에도 충낭에 매몰되어 있는 충란이 양성 반응을 보이며 일부 충체 실질조직이 미약한 반응을 보일 때도 있었다. 면역효소 염색이 가장 여러 부위에서 양성으로 나타난 것은 항혈청 농도 1 : 1,000 또는 그 이하(1 : 500)에서였다(Figs. 2~6). 이 때에는 장상피층(Figs. 2, 3 & 4), 장 내용물(Figs. 3 & 4), 난황선(Figs. 2 & 3), 충낭 내의 충란(Figs. 5 & 6), 자궁 내 충란, 충체실질조직 등이 모두 양성반응을 보였다(Table 2). 한편, 여러 절편에서 관찰해 볼 때 구흡반 및 복흡반(oral and ventral suckers), 표피(tegument), 피극(spines), 표피하 세포(subtegumental cells), 장상피 세포 자체, 웅성 생식기관, 자성 생식기관(특히 난소) 등은 음성 반응을 보였다(Table 2).

이상의 결과를 종합하여 항원성의 강도가 강한 것부터 순서대로 나열해 보면 장 상피의 표면, 장 내용물(배설물), 충낭 내에 흩어져 있는 충란, 난황선, 자궁 내 충란, 충체 실질조직의 순이었다.

### 3. 음성 대조군에 있어서 면역효소 염색 결과

이 연구에서 관찰된 황색 또는 황갈색의 면역효소 염색이 반드시 폐흡충 특이 항체와의 결합에 의한 것인지를 확인하기 위하여 다음의 음성 대조 실험 중 실행 가능한 몇가지를 택하여 염색 반응을 관찰하였다.

- 1) Negative antibody control I(생리식염수 대조군) : 제 1차 항체(항혈청) 대신 생리식염수 처리
- 2) Negative antibody control II(비감염 대조군) : 제 1차 항체로서 비감염 대조군의 혈청 사용
- 3) Negative antibody control III(타종 감염 대조군) : 폐흡충 아닌 다른 기생충 또는 세균 등의 감염 혈청 사용
- 4) Negative antibody control IV(감염 전 혈청 대조군) : 폐흡충 감염 전에 채취한 혈청 사용
- 5) Negative antibody control V(항원 결합 항체 제거 후의 혈청 대조군) : 폐흡충 감염 항혈청을 항원과 1차 결합시켜 제거한 후의 혈청 사용



**Table 2.** Relative intensity of peroxidase staining at various compartments of sectioned *P. westermani*

Body compartment	Primary antibody dilution(*)				
	1 : 500	1 : 1,000	1 : 2,000	1 : 4,000	1 : 8,000
suckers	—	—	—	—	—
tegumental layer	—	—	—	—	—
spines	—	—	—	—	—
subtegumental cells	—	—	—	—	—
intestinal epithelial cell cytoplasm	—	—	—	—	—
epithelial border	‡	‡	‡	+	—
intestinal content	‡	‡	‡	+	—
male reproductive organs	—	—	—	—	—
ovary	—	—	—	—	—
vitelline glands	‡	+	—	—	—
uterine eggs	‡	±	—	—	—
eggs around worm capsule	‡	‡	+	—	—
parenchymatous portion	+	±	±	—	—

\* secondary antibody dilution was fixed at 1 : 200.

(—; no staining, ±; pale staining, +; positive staining, ‡; strong positive staining)

6) Blocking antibody control(동일 항원에 대한 타 종 숙주 항혈청 대조군) : 폐흡충 감염 개, 토끼 등의 혈청 처리 후 1차 항체(고양이) 사용

7) Substrate control(DAB 대조군) : 제 1 차 및 제 2 차 항혈청을 모두 생략하고 DAB 사용

8) Biological negative control(타 충체 대조군 : 폐흡충이 아닌 다른 충체 절편을 항원으로 사용

이 연구에서는 음성 대조 실험 1), 2), 3), 7), 8)의 5 가지에 대하여 각각 양성 대조군(positive control)과 동시에 간접 면역효소 염색법을 시행하였던 바 3)과 8)을 제외한 3가지는 모두 음성 반응을 보였다. 그러나 대조군 3) 즉, *Spirometra* sp.(조충류의 일종 : 스파르가눔의 성충) 감염 고양이 혈청(1 : 500)에서 미약하

나마 폐흡충 장 내용물에 대하여 양성 반응을 보였고, 대조군 8) 즉, 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 충체 절편에 대한 반응에서도 고양이의 항 폐흡충 혈청(1 : 500)이 미약한 양성 반응을 보였다. 그러나 이들 비특이적 양성 반응은 1차 항체 농도를 1 : 1,000 또는 1 : 2,000 등으로 희석함에 따라 완전히 소실되었다.

### 고 찰

폐흡충 충체의 항원성을 알아보기 위하여 면역조직 화학적 방법으로 폐흡충 조직 절편을 관찰하였던 바 충체의 장상피 표면, 장 내용물, 그리고 충낭 내의 충란 등이 가장 강력한 항원성 물질(구조)인 것으로 나

(←)

**Fig. 1.** Negative control immunoperoxidase(IP) staining of *P. westermani*(×100). The peroxidase-conjugated goat anti-cat IgG (secondary antibody) step was omitted for this slide. The eggs (arrows) outside of the worm consist of yellowish egg shell and blue-stained yolk or germ cell. **Fig. 2.** Strong positive(‡) IP stain of intestinal luminal border of *P. westermani* (×100). Infected cat serum (11 wk infection) diluted to 1 : 1,000 and peroxidase-conjugated goat anti-cat IgG to 1 : 200, 30 minutes incubation each. Vitelline follicles (arrows) also show positive stain. **Fig. 3.** Another strong positive(‡) stain (×100). Infected cat serum (11 wk) diluted to 1 : 1,000 and peroxidase-conjugated goat anti-cat IgG to 1 : 200, 30 minutes incubation each. Note positive stain of intestinal content, lining epithelial border, and vitelline glands(arrows). Ovary (OV) shows negative stain. **Fig. 4.** An oblique section of *P. westermani* showing positive(‡) IP staining of the intestine (×100). The same group as in Fig. 3. Positive and negative stains, however, are not so sharply demarcated at the epithelial lining portion of the intestine. **Fig. 5.** Positive IP staining of *P. westermani* eggs (arrows) in a worm capsule of a cat lung (×100). Infected cat serum (12 wk) diluted to 1 : 1,000 and peroxidase-conjugated goat anti-cat IgG to 1 : 200, 30 minutes incubation each. **Fig. 6.** Positive IP staining of *P. westermani* eggs (arrows) in another section (×100). Infected cat serum (11 wk) diluted to 1 : 500 and peroxidase-conjugated goat anti-cat IgG to 1 : 200, 30 minutes incubation each,

타났다. 즉 폐흡충의 배설물이나 충란 등이 강력한 항원임을 의미하는 셈이다. 이 연구의 결과는 폐흡충의 장 내용물이나 장 상피 표면에 항원성 물질이 존재한다는 것을 면역효소 염색법으로 제시한 Sugiyama *et al.* (1987)의 결과와 잘 부합하였다. 그러나 이 연구에서 충낭 내의 충란이 강한 항원성을 보인다는 점은 선 연구자들이 발견하지 못하였고 이 연구에서 처음 증명된 것이다.

각종 면역 진단에 사용해 왔던 폐흡충 충체의 항원에 대해서는 조항원(crude antigen)을 그대로 사용한 경우에서부터(Hunter *et al.*, 1958; Sadun *et al.*, 1959; 주 및 김, 1965; 윤 및 최, 1973; Hillyer and Serrano, 1983; 이 및 최, 1983; 최 등, 1986; Cho *et al.*, 1989) 조항원을 화학적으로 정제(부분정제)하여 정제 항원(purified antigen)으로 만든 다음 사용한 경우(Sawada *et al.*, 1964; Imai, 1979; 김 등, 1983; Joo *et al.*, 1989; 주 등, 1989) 등 다양하다. 또, 폐흡충 조항원의 단백질 구성 성분을 여러가지 방법으로 분석한 논문도 발표되었다(Yogore *et al.*, 1965; 이 및 장, 1986; 김 등, 1983 & 1986; Kim *et al.*, 1988; Joo *et al.*, 1989; 주 등, 1989). 그러나, 이상의 연구에서는 대체로 생화학적인 의미에서의 항원성 물질, 즉 구성 단백질의 정상 자체가 주 연구 대상이 되었고, 충체의 해부학적인 구성 부위나 요소 또는 생생해 내는 물질 중 무엇이 가장 강한 항원성을 나타내는지에 대해서는 그다지 활발히 연구되지 않았던 것 같다. 따라서 이 연구의 결과와 직접 비교 검토하기는 어려울 것 같다.

그러나 폐흡충 항원으로서 충체의 분비(secretory) 또는 배설(excretory) 항원의 중요성이 언급된 논문들은 여러 편이 있으며(Yogore *et al.*, 1965; 김 등, 1982; 김 등, 1983) 이는 이 연구 결과와 일맥 상통하는 점이 있어 매우 흥미로운 일이다. Yogore *et al.* (1965)은 폐흡충 충체의 생리식염수 추출 항원과 충체 분비 배설물 항원을 사용하여 이중 면역확산법과 면역 전기영동법을 시행한 결과 분비 배설물 항원의 항원성이 높으며 이 항원이 숙주에 흡수되어 항체 생성을 유발할 것이라고 하였다. 한편 김 등(1982)은 폐흡충의 분비 배설물을 항원으로 하여 폐흡충 환자에 대한 ELISA 검사를 시행한 결과 우수한 성적을 얻었다고 하였고 따라서 분비 배설물이 특히 항체 생성을 가장 강력히 유도할 것이라는 점을 제시하기도 하였다. 간 담도에 기생하는 간흡충의 경우에도 대사산물(metabolite), 즉 분비 배설물의 항원성이 가장 강하다는 점이 알려져 있다(Sun and Gibson, 1969). 또 김 등(1983)은 폐흡충의 주항원, 분비 배설 항원 및 체항원(somatic antigen; 분비 배설물 제거 후의 충체로 제작)을 Sephadex G-200 젤 여과법으로 분석한 바 분비 배설 항원은 조항원의 일부로 생각된다고 하였고, 특히 분비 배설 항원 제 1분획(PwSEC Fr.1)은 ELISA 검사에서

특히 IgG 항체와 가장 잘 반응하는 것이 관찰되었다고 한다. 그러나 분비 배설 항원 제 1분획이 충체의 표피에서 유래한 분비물인지, 장관 내용물 또는 충란이나 기타 배설물에서 유래한 것인지, 아니면 이들에 공통적으로 포함되는 것인지에 대해서는 앞으로 연구할 과제라고 하였다. 또 최 등(1986)은 ammonium sulfate를 이용하여 폐흡충 항원을 여러 가지 분획으로 세분한 결과 주요 항원으로서 분자량이 큰 분획과 작은 분획들을 얻었으며 큰 것은 폐흡충의 대사와 관계 있는 분비 배설 항원으로, 작은 것은 체항원으로 생각된다고 하였다. 이 연구 결과를 보면 폐흡충 분비 배설 항원 중 가장 중요한 요소는 역시 장 내용물 및 충란이 아닌가 생각된다. 흡충류의 장 내용물이 강력한 항원이 된다는 것은 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)에서도 면역 형광 항체 염색법을 통하여 제시된 바 있고(Nash, 1974; Lichtenberg *et al.*, 1974), 폐흡충에서도 이 연구와 Sugiyama *et al.* (1987)의 결과에 의해 입증된 셈이다. 그러나 장 내용물의 구성 성분이 구체적으로 무엇인지에 대해서는 현단계로서는 명확히 제시하기 어렵다. 이 점에 대해서는 앞으로 추후할 필요가 있다고 생각된다.

기생충의 충란이 강한 항원성을 나타내는 대표적인 예로 주혈흡충(schistosomes)을 들 수 있다. 주혈흡충의 경우에는 충란 항원이 무엇보다도 가장 강력한 항원성 물질이라는 것이 입증되어 있고(Pelly *et al.*, 1976; Matsuda *et al.*, 1984), 그 성분, 분자량 등에 관한 성상이 연구되고 있다(Demonneville *et al.*, 1984; Kobayashi *et al.*, 1985). 그러나 폐흡충의 경우에는 충란의 항원성에 대하여 이 연구와는 다소 다른 결과가 보고되었다. 즉, Ohara *et al.* (1985)은 쥐의 폐흡충인 *P. ohirai*를 대상으로 하여 형광항체법으로 몇 종류 항원에 대한 항체 간의 변동 양상을 관찰하였던 바 충란 항원은 충체 항원이나 배설 장관 항원에 비해 항원성이 약해서 IgG 항체 상승 시기가 늦게 나타나며 항체가도 낮았다고 하였다. 또 김 등(1986)은 *P. westermani*의 충란을 모아 수용성 항원으로 만든 폐흡충에 실험 감염된 개의 혈청에 대하여 ELISA 반응을 관찰하였던 바 충체 항원에 비하여 미약한 항원성을 나타내었다고 하였다. 이 점에 대하여 그들은 주혈흡충의 충란 항원성이 큰 것은 폐흡충 충란과는 달리 충란 내에 이미 미라시디움이 성숙되어 있기 때문일지도 모르므로 성숙한 미라시디움을 가진 폐흡충 충란을 만들어 항원성에 대하여 검토할 필요가 있다고 하였다.

어쨌든 이 연구에서는 충낭 주위에 흩어져 있는 충란이 면역효소 염색 양성 반응을 보였고, 충체 장관 내의 충란도 약하지만 양성 반응을 보였다. 또 비교적 표피 근처에 분포하는 난황선도 약하지만 양성 반응을 나타내는 것으로 보아 충란을 구성하는 요소, 특히 난황(yolk)이 항원성을 나타내지 않을까 생각된다. 그러나 김 등(1986)이 제의한 바와 같이 충란의 성숙도에

따라 항원성이 다른 것인지는 추구해야 할 필요가 있다고 생각된다.

한편, 이 연구에서 간흡충의 총체 등과 미약하지만 교차 양성 반응을 보인 점은 여러 의미에서 매우 흥미 있는 일이다. 이 점은 폐흡충이나 간흡충 등 비교적 근연 관계에 있는 총체들 사이에 장 내용물 또는 총란 등에 공통 항원(common antigen)이 존재하고 있을 것이라는 가설을 뒷받침하는 셈이 되기 때문이다. 실제로 폐흡충과 만손주혈흡충, 그리고 간질(*Fasciola hepatica*) 사이에 공통 항원이 있어 Ouchterlony 반응이나 ELISA 검사에서 서로 교차 양성으로 나타난다는 것은 이미 알려져 있다(Hillyer and Serrano, 1983). 이 점에 대해서도 추사가 필요하다고 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Beaver, P.C., Jung, R.C. and Cupp, E.W.(1984) Clinical Parasitology(9th ed.). pp.464-471. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Cho, K.M. and Soh, C.T.(1976) Indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of paragonimiasis and clonorchiasis. *Yonsei Rep. Trop. Med.*, 7:26-39.
- Cho S.Y., Hong, S.T., Rho, Y.H., Choi, S. and Han, Y.C. (1981) Application of micro-ELISA in serodiagnosis of human paragonimiasis. *Korean J. Parasit.*, 19(2):151-156.
- Cho, S.Y., Kim, S.I., Kang, S.Y., Kong, Y., Han, S.K., Shim, Y.S. and Han, Y.C. (1989) Antibody changes in paragonimiasis patients after praziquantel treatment as observed by ELISA and immunoblot. *Korean J. Parasit.*, 27(1):15-21.
- 조승열 · 이동근 · 강신영 · 김석일(1983) 면역효소진단법을 이용한 폐흡충증 유행의 역학조사. *기생충학잡지*, 21(2):246-256.
- 최원영 · 이옥란(1981) 실험적 폐흡충증의 한천 침강 반응. *기생충학잡지*, 19(2):101-108.
- 최원영 · 유재을 · 남호우 · 최형락(1986) 페디스토마(*Paragonimus westermani*) 감염 고양이 혈청에 대한 ELISA 항체가의 의의. *기생충학잡지*, 24(2):177-186.
- 주 일 · 김기승(1965) 디스토마 항원의 정제에 관한 연구. 제 1 보. 페디스토마 항원의 정제. 가톨릭대학 의학부 논문집, 9:153-158.
- Damonville, M., Pierce, R.J., Verwaerde, C. and Capron, A.(1984) Allergens of *Schistosoma mansoni* II. Fractionation and characterization of *S. mansoni* egg allergens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, 73:248-255.
- De Lellis, R.A.(1981) Basic techniques of immunohistochemistry. In Diagnostic immunohistochemistry, R.A. De Lellis(ed.). Masson Pub., New York, pp.7-16.
- Hillyer, G.V. and Serrano, A.E.(1983) The antigens of *Paragonimus westermani*, *Schistosoma mansoni*, and *Fasciola hepatica* adult worms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32(2):350-358.
- Hunter G.W. III, Ritchie, L.S. and Pan, C.(1958) Immunological studies II. Intradermal tests and their application in the field for the detection of schistosomiasis japonica, paragonimiasis and clonorchiasis. *Military Med.*, 122(2):85-96.
- Imai, J.(1979) Studies on the antigenic analysis in *Paragonimus westermani* 2. Observations on antibody response against fractionated antigens from adult worm extract. *Trop. Med.*, 21(2):45-55(in Japanese).
- Joo K.H., Ahn, H., Chung, M.S. and Rim, H.J. (1989) Demonstration of species-specific and cross reactive components of *Paragonimus westermani* crude worm antigen by EITB. *Korean J. Parasit.*, 27(1):9-14.
- 주경환 · 홍성철 · 정명숙 · 임한중(1989) Immunoblot technique을 이용한 폐흡충의 발육단계별 항원 특이성 분석. *기생충학잡지*, 27(1):1-7.
- 김동찬 · 이온영 · 이종수 · 안순애(1982) 페디스토마증의 관리에 관한 연구 II. 폐흡충의 면역진단: 분비 배설 항원에 의한 ELISA 시험. 국립보건연구원보, 19:109-114.
- Kim, S.H., Kong, Y., Kim, S.I., Kang, S.Y. and Cho, S.Y. (1988) Immunoblot observation of antigenic protein fractions in *Paragonimus westermani* reacting with human patients sera. *Korean J. Parasit.*, 26(4):239-243.
- 김석일 · 강신영 · 조승열(1983) 부분정제 폐흡충 항원의 유용성 검토. *기생충학잡지*, 21(2):257-264.
- 김석일 · 고응구 · 강신영 · 조승열(1986) 폐흡충 총란 항원의 항원성 평가. *기생충학잡지*, 24(1):49-54.
- Kobayashi, F., Iijima, T., Mori, T. and Matsui, T.(1985) Immunological and biochemical characterization of the antigens from hatch fluid of *Schistosoma japonicum* eggs. *Jpn. J. Parasitol.*, 34(4):253-260.
- 이옥란 · 장재경(1986) 폐흡충의 조항원과 정제항원에 의한 폐흡충 감염 고양이 혈청의 면역효소 반응. *기생충학잡지*, 24(2):187-193.
- 이옥란 · 최원영(1983) 폐흡충 피내반응 양성자에 대한 agar-gel diffusion, counterimmunoelectrophoresis 및 enzyme-linked immunosorbent assay의 비교. *기생충학잡지*, 21(2):270-280.

- Lichtenberg, F.V., Bawden, M.P. and Sealey, S.H. (1974) Origin of circulating antigen from the schistosome gut. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23(6): 1088-1091.
- Matsuda, H., Nakao, M., Morita, M. and Tanaka, H. (1984) Sequential occurrence of IgM and IgG antibodies against egg and adult worm antigens in rabbits infected with *Schistosoma japonicum* observed by ELISA and changes after treatment with praziquantel. *Jpn. J. Parasitol.*, 33(3):163-170.
- Nash, T.E. (1974) Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23(6):1085-1087.
- Ohara, H., Ikeda, T., Oikawa, Y. and Yani, S. (1985) Studies on antibody response in rats infected with *Paragonimus ohirai* by immunofluorescent staining method. *Jpn. J. Parasitol.*, 34(4):245-252.
- Pelley, R.P., Pelley, R.J., Hamburger, J., Peters, P.A. and Warren, K.S. (1976) *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens, and the employment of radioimmunoassay for their further characterization. *J. Immunol.*, 117(5):1553-1560.
- Sadun, E.H., Buck, A.A. and Walton, B.C. (1959) The diagnosis of paragonimiasis westermani using purified antigens in intradermal and complement fixation tests. *Military Med.*, 124:187-195.
- Sawada, T., Takei, K. and Yoneyama, K. (1964) Studies on the immunodiagnosis of paragonimiasis I. The precipitin reaction with crude and fractionated antigens. *J. Infect. Dis.*, 114:311-314.
- Soh, C.T., Min, D.Y., Ryu, J.S. and Yong, T.S. (1985) Study on the reproducibility of ELISA technique for the diagnosis of clonorchiasis and paragonimiasis. *Yonsei Rep. Trop. Med.*, 16(1): 1-10.
- 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. Parasitol.*, 73(2):363-367.
- Sun, T. and Gibson, J.B. (1969) Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infections. An analysis by gel-diffusion technique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18(2):241-252.
- Yogore, M.G., Lewert, R.M. and Madraso, E.D. (1965) Immunodiffusion studies on paragonimiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14(4):586-591.
- Yokogawa, M. (1982) Paragonimiasis. In CRC Handbook Series in Zoonosis. (Section C) Parasitic Zoonoses, Vol. III, 123-142. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Yokogawa, M., Tsuji, M. and 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.
- 윤백현 · 최원영 (1973) 페디스토마의 혈청학적 연구. 가톨릭대학 의학부 논문집, 25:163-176.



=Abstract=

### **Immunohistochemical study on the antigenicity of body compartments of *Paragonimus westermani***

Soon-Hyung Lee, Sook-Hwan Sung\* and Jong-Yil Chai

*Department of Parasitology and Institute of Endemic Diseases, Department of Thoracic Surgery\*, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea*

Production of circulating specific antibodies to the lung fluke (*Paragonimus westermani*) by its host is well known and used in various kinds of immunodiagnostic methods. However, it has not been well documented which compartments (or structures) of the lung fluke are most responsible for the production of specific antibodies. The present immunohistochemical study was undertaken to demonstrate the antigenicity of each body compartment of *P. westermani* such as suckers, tegument, spines, vitelline glands, intestine, reproductive organs (male and female), and eggs.

Indirect immunoperoxidase (IP) stain technique was applied, using formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues of *P. westermani*-infected cats sectioned in 4  $\mu\text{m}$  thickness as the antigen and cat antisera (11~20 weeks of infection) as the primary antibody. Peroxidase-conjugated goat anti-cat IgG was used as the secondary antibody and diaminobenzidine (DAB) as the coloring agent. Strong yellow or yellowish brown staining was regarded positive. The primary and secondary antibody dilutions were made at 1 : 500~1 : 2,000 and 1 : 200~1 : 500 respectively, and IP stain was repeated 10 times for each dilution.

A consistent result obtained was that the intestinal epithelial border, intestinal content, vitelline glands, and eggs scattered around the worm capsule showed strong positive staining, while uterine eggs and some parenchymal portions showed weak positive reaction. On the other hand, the suckers, tegument, spines, subtegumental cells, cytoplasm of intestinal epithelial cells, male reproductive organs, and ovary revealed negative staining. The body compartments showing higher antigenicity were, in the decreasing order, the intestinal epithelial border, intestinal content, eggs in the worm capsule, vitelline glands, uterine eggs, and parenchymatous portions. The intestinal epithelial border and luminal contents revealed positive staining even at a low concentration of 1 : 4,000 primary antibody (secondary ab., 1 : 200) whereas the parenchymatous portion showed positive reaction only at higher concentrations than 1 : 500 (secondary ab., 1 : 200).

The results suggest that the specific antibody responses of the host to *P. westermani* occur most strongly upon the excretes from the intestinal epithelium of the worm and eggs produced around the worm capsule.