

# Immunoblot 법을 이용한 肝吸蟲抗原의 發育段階別 抗原性分析에 관한 研究

高麗大學校 醫科大學 寄生蟲學教室 및 熱帶風土病研究所  
李宣璟 · 朱旻煥 · 鄭明淑 · 林漢鐘

## Studies on the Immunoblot Characterization of *Clonorchis sinensis* Worm Antigens at Early Developmental Stages

Seon-Kyung Lee, Kyoung-Hwan Joo,  
Myung-Sook Chung, and Han-Jong Rim

Department of Parasitology and Institute for Tropical Endemic Diseases, College of  
Medicine, Korea University, Seoul 136-705, Korea

### = ABSTRACT =

Serodiagnosis of *Clonorchis sinensis* infections will probably be a first choice tool for screening of clonorchiasis in a future because of increasing difficulties in collection and examination of stools. The sensitive test such as ELISA can be used effectively. However there are some limitations in serological diagnosis for the detection of serum antibody. One of the major problems is the non-specificity of the antigens which produce cross reaction with other helminthic infection sera. To solve this problem, many investigators have tried to purify the antigens used.

In this study, we determined the antigenic profile of the crude saline extract antigen of *C. sinensis* at early developmental stage based on SDS-PAGE and immunoblotting techniques for the purpose of understanding the nature of *C. sinensis* worm antigen. The following results were obtained :

1) The SDS-PAGE showed many protein bands ranging from 10Kd to 91Kd relative molecular weight. Among them, 66, 46, 40, 33, 27, 24, 16, 14 and 10Kd bands were observed as a principle bands. The protein components of *C. sinensis* changed chronologically during their early developmental period. 44Kd band was stained unclearly in antigen of 2 weeks worm, but changed to concentrated state in antigen of 5 weeks worm. 35Kd band was found in antigen of 2 weeks worm, however this band was disappeared in antigen of 5 weeks worm. 22Kd band also lost its staining property gradually.

2) In spite of differences in antigenic profile, there was no differences in the data obtained

by microplate ELISA using each antigen preparation. Absorbance value began to rise in between 2 to 3 weeks after infection.

3) By EITB, serum antibody recognized major protein bands with molecular weight of 91, 85, 63, 46, 40, 33, 24, 14 and 10Kd band respectively. Among them 66, 33, 27 and 14Kd bands were observed as non-specific band because they reacted even in normal control sera. Generally, gradual increase of positive reactions were observed as the infection period of *C. sinensis* was prolonged.

In other hand, the reaction of 10Kd band did not occurred when 26<sup>th</sup> week sera was tested.

4) The positive reactions using antigens of 2 weeks worm, especially on 40 and 24Kd bands, were most strong and sharply demarcated compared to those of 3~5 weeks worm antigen.

## 서 론

간흡충증(clonorchiasis)은 우리나라에서 가장 중요한 풍토병의 하나로서 100만명 이상이 이환되어 있다고 추산된다<sup>1)2)</sup> 간흡충증의 진단에 있어서 임상증상과 동시에, 분변 또는 담즙에서 충란이 발견될 때는 진단이 용이하지만 간흡충의 감염이 경감염이거나 간흡충이 유약 또는 노화한 경우 및 총수담관의 폐쇄가 있을 때에는 간흡충란의 발견이 곤란함으로 간흡충증의 진단이 불가능할 때가 있다. 간흡충증의 궁극적 진단은 대변검사에서 특이한 충란을 발견해 내는 것이지만 개인을 상대로 하는 것이 아닌 집단을 대상으로 할 경우에 있어서도 대변을 수집하는데 따르는 어려움, 또는 검사의 문제등 난점이 많으므로 면역학적 진단법등 보다 손쉬운 선별검사가 필요한 것이 사실이다. 이와 같은 이유로 오래전부터 간흡충의 면역학적 진단에 관한 연구가 추구되어 왔다.

간흡충증의 진단을 위한 면역혈청학적 진단법의 적용에 관한 연구는 과거 1920대의 보체결합반응<sup>3)</sup> 으로부터 최근의 ELISA (李, 들, 1981)<sup>4)</sup>의 적용에 이르기까지 오랜 기간을 두고 발전해 왔다. 예를 들어 피내반응은 조작이 간단한관계로 집단검사와 역학조사에 널리 사용되어 왔으나 위양성, 위음성 및 다른 흡충류 감염과의 교차반응이 있어서 신빙성이 적고 구충후에도 10~20년간 양성반응을 나타내어 현증과 기왕력을 판정하는데 곤란하다<sup>5)</sup>.

이와 비교하여 보체결합반응은 조작은 복잡하나 충체사멸 후에는 빨리 음전되어 치료판정의 기준이 될 수 있다고 한다<sup>6)7)</sup>. 특히 ELISA법은 특이성이나 감수성 및 재현성이 다른 검사법보다 우수하여 그

효용성이 인정되고 있으며 기생충학 영역에서도 면역학적 진단법으로 널리 사용되고 있고, 이를 이용한 연구도 활발히 진행되고 있다(이들, 1981<sup>4)</sup>; 양들, 1983<sup>8)</sup>; 김들, 1985<sup>9)</sup>; 한들, 1986<sup>10)</sup>; 함들, 1984<sup>11)</sup>).

항원으로 사용하는 기생충의 추출물, 즉 조항원은 분류학적으로 유사한 기생충과 서로 공유하고 있는 공통항원 때문에 교차 반응을 일으키는 경우가 많다 (Hunter et al., 1958<sup>12)</sup>; Sadun et al., 1959<sup>13)</sup>; Phillipson et al., 1962<sup>14)</sup>). 그 결과 혈청학적 검사법의 특이도가 낮아지고 위양성 반응의 빈도가 많아져 검사의 신뢰도를 낮추는 원인이 되어 왔다.

이를 개선하기 위하여 항원을 정제하여 감수성과 특이성이 모두 높은 간흡충 항원을 분리해 내려는 연구가 여러학자들에 의해 시도되었으나(Sadun et al., 1959<sup>13)</sup>; Pacheco et al., 1960<sup>15)</sup>; Kim and Blackwell, 1963<sup>16)</sup>; Sun and Gibson, 1969<sup>17)</sup>; 이 및 최, 1874<sup>18)</sup>) 충체를 구성하고 있는 단백질의 조성이 매우 복잡하여 특이 항원만을 완벽하게 분리한다는 것이 불가능하였다. 대체로 부분정제된 항원의 가장 큰 문제점은 항원성 자체는 비교적 높으나 복잡한 정제과정을 거치는 동안 항원가는 점차 저하되고 다량의 조항원을 사용하여 극히 미량의 항원만 남기 때문에 실용성도 없다는 데에 있다.

이와 같은 항원 정제상의 문제점을 보완할 수 있는 방법의 하나로 immunoblot법을 들 수 있다.

Immunoblot법은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)의 탁월한 분획능과 이의 blotting(Towbin들, 1979<sup>19)</sup>) 그리고 ELISA를 이용한 enzyme-linked immunoelectro-transferblot는 항원 중 가장 특이하게 항원성을 보이는

분획을 확인하고 교차반응 부위 및 비교차반응 부위를 식별하여 나아가서는 비특이성 반응까지도 구별해낼 수 있는 방법으로서 각종 질환의 면역학적 진단 및 연구에 많이 사용되고 있다(Tsang 등, 1983<sup>20</sup>; Carlos 및 Hillyer, 1985<sup>21</sup>).

흡충 성충의 추출물이 면역학적 연구에 항원으로 많이 이용되어 왔으나 아직까지 이들 성충이나 유충의 총체성분에 대한 생화학적 연구가 활발한 것 같지 않다. 또한 흡충성충의 분비물중에도 흡충의 감염혈정에 대한 항원성이 있고 항체형성은 이들 분비물이 숙주에 흡수되어 항원의 역할을 한다고 Sun 및 Gibson(1969)<sup>17</sup>이 보고한 바 있다. 또 이와 최(1974)<sup>18</sup>는 Sephadex G-100을 이용하여 항원의 정제를 시도한 바 있으나 간흡충 총체의 어느 성분이 항원의 주역할을 하는지에 관하여는 충분히 구명하지 못하였다. 최(1981)역시 간흡충의 발육단계별 단백질성분을 분석하고 Ouchterlony법으로 항원성을 관찰한 바 있다.

본 연구는 간흡충의 초기 발육시기별 항원의 단백질 성분을 SDS-PAGE로 비교하고 EITB를 통해 항원성을 관찰하고자 시도 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 항 원

참붕어(*Pseudorasbora parva*)의 근육에서 자연 감염된 피낭유충을 인공소화법으로 분리하여 300마리씩 토끼에 경구 투여하고 2, 3, 4주 및 5주에 부검하여 발육단계별로 간흡충을 회수하였다.

이들 각각의 총체를 생리식염수와 증류수로 여러 차례 세척하여 냉동 건조시켰다. 냉동 건조된 총체 0.3g을 인산완충액(pH 7.2) 10ml당 SBTI(soybean trypsin inhibitor) 10mg이 함유된 인산 완충액 5ml에 녹여 glass homogenizer에 넣은 다음 마쇄하였다. 마쇄된 액을 10,000rpm에서 60분간 원심분리한 다음 상청액을 얻어 항원으로 사용하였다.

단백질 함량은 2주, 3주, 4주 및 5주된 항원에 있어서 각각 0.613 mg/ml, 1.45 mg/ml, 0.86 mg/ml 및 1.34 mg/ml이었다.

### 2) 혈 청

간흡충 감염혈청을 얻기 위하여 토끼 10마리에 각각 100마리씩의 간흡충피낭유충을 경구감염시킨 다음 시기별로 채혈하여 혈청 pool을 만들고 -40℃에 보관하면서 필요에 따라 사용하였다. 채혈은 감염전 및 감염후 1~9주까지는 매주마다, 그리고 26주에 실시하였다. 토끼는 부검하여 약 50마리씩의 간흡충이 감염된 것을 확인하였다.

### 2. 방 법

위의 항원과 혈청을 재료로 하여 우선 각 시기별 항원의 SDS PAGE를 통해 항원대의 출현시기 및 소멸상태를 조사하였고, 다음 각 항원에 대한 시기별 감염혈청의 ELISA 및 EITB반응을 검토하였다. 사용된 방법들을 요약하면 다음과 같다.

#### 1) ELISA

Voller et al.(1979)<sup>22</sup>과 McLaren et al.(1978)<sup>23</sup>의 방법을 약간 수정한 양들(1983)<sup>8</sup>의 방법을 사용하였다. 혈청 희석배율은 1 : 200, 항원의 단백질 함량은 2.5 ug/ml이 되게 하여 사용하였다. Conjugate는 peroxidase-conjugated IgG fraction goat anti-rabbit IgG(Cappel)을 1 : 2,000으로 희석하여 사용하였고 Dynatech Lab.의 micro-ELISA reader로 흡수 광량을 측정하였다.

#### 2) SDS-PAGE

SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)는 Tsang et al.(1983)<sup>20</sup>과 같은 방법으로 실시하였다. Gel은 Pharmacia Fine Chemicals의 160×220×0.8mm의 vertical system을 사용하였다.

항원 재료는 pH 8.0의 urea를 넣은 Tris 완충용액으로 희석하여 SDS의 최종 농도를 2.5% 되게 한 다음 여기에 각 항원 재료를 0.4 ug/ul 되게 하여 사용하였고 sample application 직전에 65℃ 항온 수조에서 30분간 denature시켰다. Tracking dye로는 bromophenol blue를 재료 200 ul당 10 ul가 되게 하였다. 재료는 3.0~20.0%의 linear gradient gel(40% T, 1% C)과 3% stacking gel을 이용하여 stacking gel에서는 10 mA, resolving gel에서는 20 mA로 하여 tracking dye가 모두 resolving gel의 맨 밑에 올 때까지

약 2.5~3시간 전기영동하였다. Sample application의 양은 10 ug/lane이 되게 하였으며 염색은 Merrill et al(1981)<sup>24)</sup>의 silver stain법으로 하였다. 전 과정에서 molecular weight marker는 Bio-Rad Lab.의 high and low molecular weight SDS-PAGE marker와 Bethesda Research Lab.의 pre-stained marker를 사용하였다.

### 3) EITB

SDS-PAGE로 분리된 단백 분획을 Tsang et al. (1983)<sup>20)</sup>의 방법에 따라 nitrocellulose paper(NC paper)에 blot 시켰다. 이를 요약하면 다음과 같다.

SDS-PAGE로 분해된 단백 분획의 EITB(enzyme-linked immunoelectrotransfer blot)는 Bio-Rad Lab.의 transblot cell을 이용하여 250Vdc constant(current=0.5~2.0A)로 1시간 동안 실시하였다. NC paper는 0.5cm 간격으로 잘라서 Bio-Rad Lab.의 slotted incubation tray에 넣고 PBS-3% Tween 20액으로 1:100 희석한 토끼실험 혈청을 넣어 rotary shaker에서 overnight시켰다. 항원대와 부착한 항체는 ELISA법으로 확인하였으며 이 과정에서 conjugate는 peroxidase-conjugated IgG fraction goat anti-rabbit IgG (Cappel)를 1:2,000으로 희석하여 사용하였고 부착된 peroxidase는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣은 침전성 chromogenic substrate인 3-3'-diaminobenzidine(Sigma)으로 발색시켰다.

## 실험성적

### 1. 발육단계별 간흡충 조항원의 단백 분획

각 항원의 공통된 항원대는 46, 33, 27, 24, 16, 14, 10Kd등의 항원분획이었으며, 그 밖에 미세한 작은 분획도 관찰되었다. 각 항원은 서로 약간의 차이를 나타내고 있어서 40Kd의 항원대는 초기 2주간흡충 항원에서는 매우 미약하나 발육함에 따라

진하게 염색되었으며 반면 22Kd의 항원대는 2~3주 된 간흡충 항원에서는 진하게 염색되나 시간이 지나면서 점차 약해졌다. 35Kd의 항원대는 2~3주에서 약하게 나타나나 4~5주 된 간흡충 항원에서는 소멸되었고 36Kd의 항원대는 2~3주 항원에서는 없으나 4~5주의 간흡충 항원에서는 나타나는 특징을 보였다.

### 2. ELISA 성적

발육단계별 간흡충항원에 대하여 감염 1~9주 및 26주 된 토끼 혈청의 반응은 ELISA로 살펴보면 Table 1과 같다. 즉, 약 50마리의 간흡충에 감염된

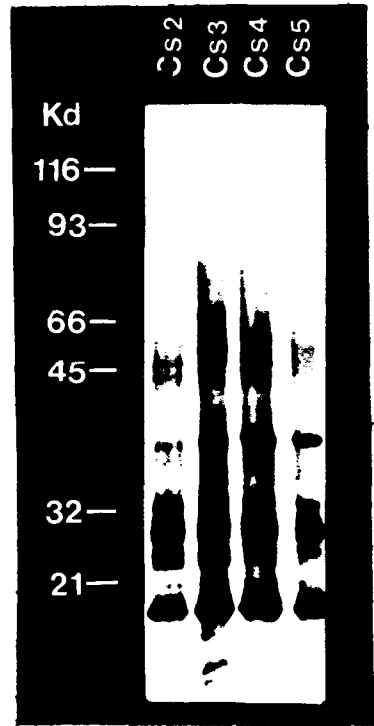


Fig. 1. Silver-stained SDS-PAGE of saline extract crude antigen of *C. sinensis* (Cs<sub>2</sub>, Cs<sub>3</sub>, Cs<sub>4</sub>, Cs<sub>5</sub>; antigen prepared from the worm collected at 2, 3, 4, 5 weeks after infection).

Table 1. Comparison of ELISA results of chronologically prepared *C. sinensis* worm antigen against homologous serum antibody obtained from experimentally infected rabbit

Ag\Ab	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	26 weeks
2	0.323	0.291	0.397	1.086	1.387	1.571	1.742	1.780	1.837	1.848	1.844
3	0.321	0.309	0.323	1.129	1.182	1.687	1.818	1.868	1.931	1.922	1.924
4	0.324	0.309	0.347	1.262	1.368	1.708	1.976	1.971	1.953	1.976	1.874
5w	0.309	0.321	0.351	1.023	1.175	1.646	1.885	1.872	1.923	1.963	1.955

토기혈청내 항체는 감염 2주에 있어서는 대조혈청과 별다른 차이가 없었으나 3주 혈청의 경우 급격히 상승되었다. 각 항원에 대한 혈청반응은 감염시기별로 보면 별다른 차이를 발견할 수 없었다. 항체가 가는 적어도 9주까지는 계속 상승되는 현상을 나타내었다.

### 3. EITB 성적

발육단계별 항원의 주항원대에 대한 각 감염시기별 혈청항체의 EITB 성적을 보면 Fig. 2~3와 같다. 앞서 언급한 SDS-PAGE상의 항원대중 66Kd, 33Kd, 27Kd 및 14Kd, 항원대는 혈청항체와 관계없이 반응하는 비특이항원대이었다. 감염후 가장 먼저 반응을 보이는 항원대는 전반적으로 보아 46Kd 및 10Kd항원대가 감염 3주부터 반응을 나타내기 시작하였으나 4주 항원이나 5주 항원을 사용한 경우 10Kd의 항원대는 감염 7주에 이르러서야 처음 반응을 나타내었다.

2주 항원에 대하여 각 시기별 혈청은 10Kd 항원이 3주에, 46Kd 항원이 4주에 반응을 보이기 시작하였으며 26주 혈청에 91, 85, 63, 46, 40, 33, 24, 14Kd의 항원대가 반응하기까지 점차 강하게 반응하였다. 10Kd의 항원대에 있어서는 9주까지는 점차 반응이 강해지나 26주 혈청 pool은 전혀 반응하지 않는 특징을 보였다. 3주 항원은 2주 항원과 특별히 주목할 만한 차이점이 발견되지 않았다(Fig. 2).

4주 항원에 대한 각 시기별 혈청의 반응을 보면 비특이하게 반응하는 66, 33, 27, 14Kd를 제외하면 46Kd의 항원대가 3주에 반응하기 시작하나 14Kd의 항원대는 7주 및 9주 혈청에만 반응하였다. 2~3주 항원과 비교할 때 91Kd의 항원대는 26주 혈청에 이르기까지, 4주 항원 부터는 반응하지 않았으며 2~3주 항원과 마찬가지로 85, 63, 46, 40, 24Kd의 항원대는 착색정도가 더욱 강해졌다(Fig. 3).

각 항원에 대한 9주 감염혈청과 26주 혈청과의

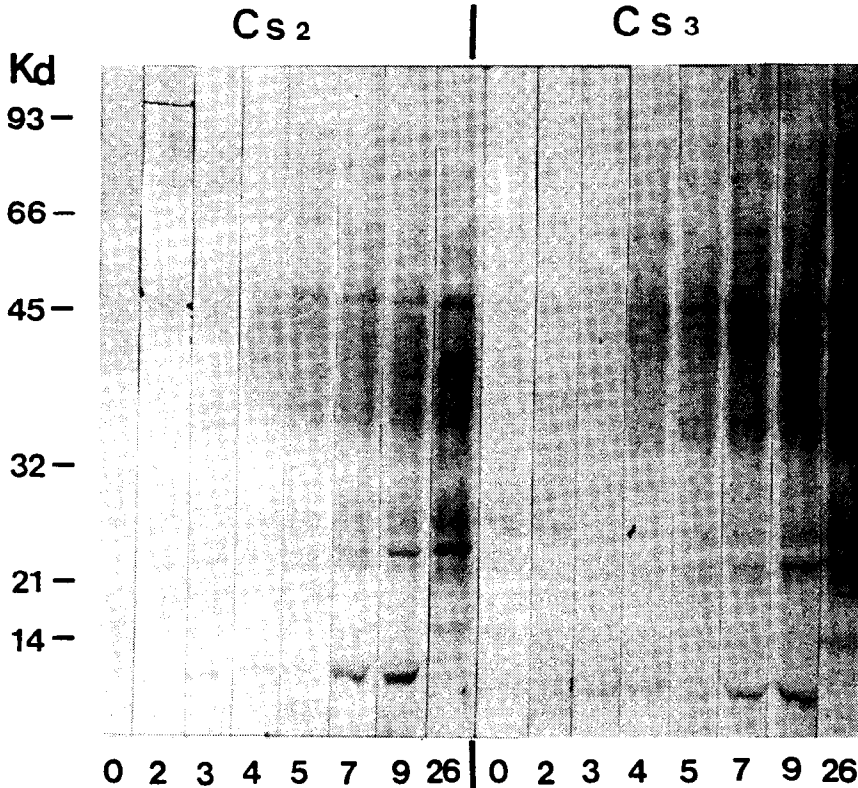


Fig. 2. Antigen-antibody binding patterns of sera from experimental rabbits against crude *C. sinensis* antigens( $Cs_2$ ,  $Cs_3$  : antigen prepared from the worm collected at 2, 3 weeks after infection).

반응을 보면 Fig. 4와 같은 바 46Kd의 항원대는 9주보다 26주에 보다 강하게 반응하며 46, 33, 27, 24, 14Kd 등 대부분은 26주 혈청이 9주 혈청에 비해 강하게 반응하였다. 그러나 10Kd의 항원대는 9주 혈청에서는 반응이 나타나나 26주 혈청에서는 반응이 소멸되는 양상을 보였다.

항원별로 볼 때 9주 및 26주 혈청 공히 2주 항원을 사용하는 것이 더욱 섬세하고 강한 반응을 대부분의 항원대에서 나타내고 있다. 46Kd의 항원대는 26주 혈청의 반응을 기준으로 볼 때 점차 반응을 보이고 있다. 28Kd의 항원대는 26주 혈청에서만 2주 및 3주 항원을 사용할 때 나타났으며 4주 항원 및 5주 항원을 사용할 경우에는 관찰되지 않았다. 24Kd의 항원대는 2주 항원에서부터 점차 반응이 약화되어 나가며 14Kd의 항원대 역시 그러한 반응을 보였다. 10Kd의 항원대는 9주 혈청에서는 관찰되는 반면 26주 혈청에서는 반응이 관찰되지 않는다는 것을

앞서도 기술한 바 있으나 항원에 있어서도 2주 항원에서는 뚜렷이 증명되는 반면 4~5주 항원으로 갈수록 약화되었다(Fig. 4).

## 고 찰

SDS를 이용한 전기영동법은 두가지 특징을 갖고 있다. 첫째는 총체성분이 잘 용해된다는 점이며, 둘째는 분자량을 결정함으로써 각 단백질의 성격을 피상적으로라도 판단할 수 있다는 것이다. 본 실험에서 사용한 전기영동법의 단백질 해상 능력을 고려해 보면 근육이나 막 혹은 리보솜같은 큰 것들만이 분리되었을 것이다. 또한 발육단계에 따라서 형태학적으로 또는 구조적으로 나타나는 차이점이 전기영동에서 나타나는 것은 발육단계에 따라서 차이를 나타내는 단백질의 양이 일정량에 도달하였을 때만 되는 것이므로 한정된 량 이하의 것은

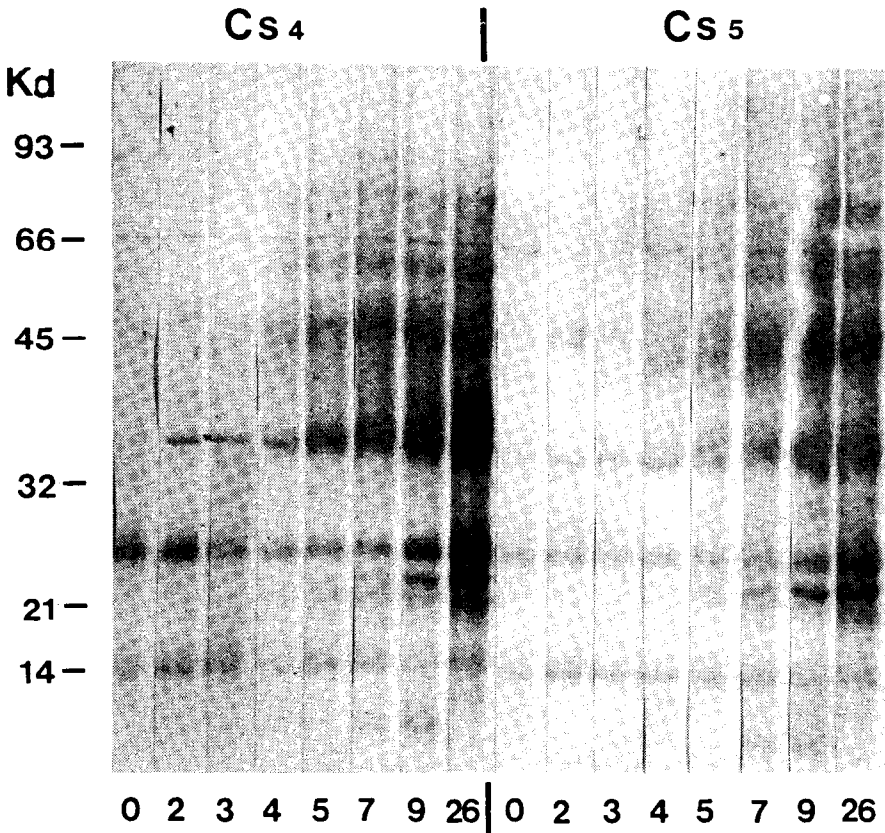


Fig. 3. Antigen-antibody binding patterns of sera from experimental rabbits against crude *C. sinensis* antigen(Cs<sub>4</sub>, Cs<sub>5</sub>: antigen prepared from the worm collected at 4, 5 weeks after infection).

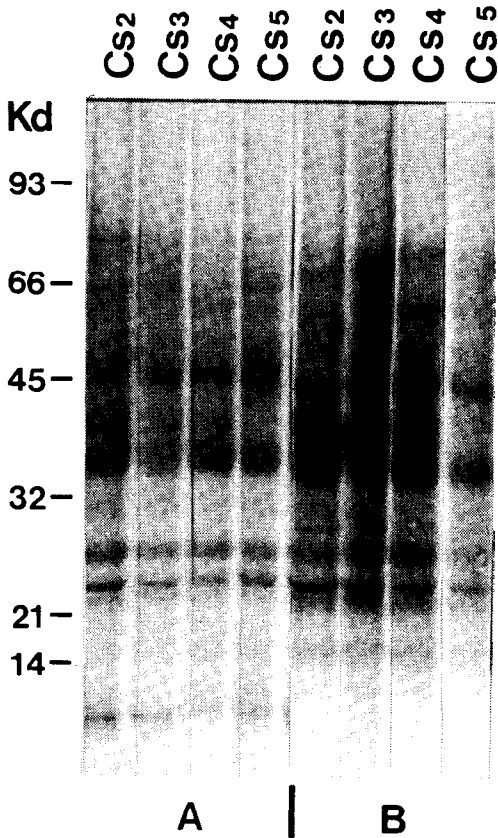


Fig. 4. Antigen-antibody binding patterns of sera from experimental rabbits against chronologically prepped *C. sinensis* antigen (Sera were collected at A : 9 weeks after infection, B : 26 weeks after infection)

밝혀낼 수 없다(Ruppel and Coli, 1977)<sup>25</sup>. 또한 발육단계에 따라서 가지고 있던 단백질성이 없거나 또는 새로운 단백질성이 나타나는 변화가 SDS-PAGE상에서 분석이 가능한 경우에 있어서도 분자량이 다른 단백질의 분자량과 비슷한 경우에는 비슷한 분자량을 가진 다른 단백질의 양이 증가하였거나 또는 감소한 것으로 나타난다.

본 실험에서 EITB 상 비교적 강한 반응을 나타내는 항원대는 46, 40, 27, 24, 14 및 16Kd의 항원대들이다. 이 중 24Kd의 항원대는 崔들 (1981)<sup>26</sup>의 SDS-PAGE에 의하면 감염후 7일째의 총체부터 나타나기 시작하며 18일 후에는 그 양이 증가하는 특징을 갖고 있다고 하였다. 이 결과는 본 연구의 결과에 의하면 이 항원대가 2주로부터 5주가 될 때까지 별다른 차이점을 보이지 않아 일치되지는

않았다. 24Kd의 항원대는 감염혈청과 반응하는 주요항원대의 하나로서 2주항원에서 감염혈청과 가장 강하게 반응하는 등 5주까지의 모든 항원과 반응하고 있다. 한편, 30~40Kd 사이의 항원대에 대하여 崔들 (1981)<sup>26</sup>은 탈낭유충에서는 35Kd의 분자량을 가진 분획이, 7일된 총체에서는 30Kd의 분획이 가장 많으나 18일 후에는 30 및 35Kd의 분획이 양이 비슷해진다고 한 바 있다. 본 연구에 의하면 이 분획군은 2주 항원에 이미 나타나고 있으며 35Kd의 항원대기 3주에서는 약하게 나타나고 5주 총체에서는 소멸됨으로써 탈낭유충에서 가장 많은 비중을 차지하고 있던 35Kd 항원대가 점차 총체발육에 따라 소멸되어 가는 것을 뒷받침하였다. 한편, 이 항원대는 Fig. 3에서 보는 것처럼 감염전 혈청과도 일부 비특이 반응을 나타내는 것을 알 수 있으나 감염 2주 혈청과의 반응이 정상혈청과의 반응보다 강하게 나타나므로 어떤 면에서는 감염후 제일 먼저 반응을 보이는 항원대로 평가할 수도 있을 듯하다. 이에 관하여는 학술적인 면에서 좀더 추시할 필요가 있을 것으로 생각된다.

崔들 (1981)<sup>26</sup>은 또한 감염 18일 이후 총체에서는 분자량 15,000~20,000, 25,000, 30,000~40,000 사이, 그리고 50,000~65,000사이에 주로 항원대가 있다고 하면서 이 사실은 이와 최 (1974)<sup>18</sup>가 간흡충의 90일된 성충을 Sephadex G-100으로 분리하여 얻은 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> 및 A<sub>4</sub> 분획과 일치함을 밝히고 이 중 A<sub>2</sub> 분획이 23,000~25,000 또는 30,000~35,000의 분자량을 갖는 단백질성인 것 같다고 한 바 본 연구의 결과는 이 의견과 완전히 일치되는 것이었으며 다만 이 중 33Kd의 것은 정상대조혈청에서도 약간의 비특이 반응이 있음을 추가한다. 또한 崔들 (1981)<sup>26</sup>은 15,000의 항원대는 전체의 약 1/2을 차지하는 큰 단백질 분획이고 표피에는 없는 분비물에서 기인한 항원이라고 한 바, 이 항원대 역시 본 연구에서도 마찬가지로 다량 검출되나 EITB결과 항원성자체는 극히 미미한 것으로 확인되었다. Sun과 Gibson(1969)<sup>17</sup>은 간흡충성충의 분비물이 좋은 항원이며 항체의 생성은 숙주가 담즙을 재흡수할 때에 담관내에 존재하는 총체분비물이 함께 흡수되어 숙주를 자극하기 때문이라고 하였는 바 총체분비물을 항원으로 하여 immunoblot법을 적용시켜 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

감염후 항원대가 처음 반응을 나타내는 시기는 조사된 바가 없었으며 ELISA로는 면역혈청의 경우 3주부터 (陳들, 1983)<sup>27)</sup> 양성치 이상으로 나타났으며 대체로 2~3주 사이에 급격히 증가한 것으로 나타나고 있고 추 (1971)<sup>28)</sup>는 토끼에 있어서의 간흡충항원에 의한 반복면역에 따른 항체의 생산은 간흡충 0.1% NaCl추출항원으로 매주 면역시켜 2주간격으로 채혈된 계열적인 항혈청에서 Ouchterlony법에 있어서 2주째부터 침강대를 보이기 시작하였다고 했으나 본 실험에서는 면역이 아닌 감염에 의한 것이므로 정확한 비교는 어려울 것으로 생각한다. 또한 추들 (1981)<sup>4)</sup>은 간흡충증 환자에 있어서 대변내 총란수에 따른 ELISA치는 EPG의 다소와는 관계가 없다고 하였으며尹들 (1972)<sup>29)</sup>도 토끼에서 간흡충 피낭유충 투여수에 따른 Ouchterlony법에 의한 침강대수의 상관관계는 차이가 없었다고 하였다. 추들 (1973)<sup>30)</sup>도 Ouchterlony법으로 일부의 토끼군에서 감염 3주후에 침강대가 출현하기 시작하여 4주후에 1~3개의 침강대가 있었고 일부는 5주 후에 나타나는 예도 있었으나 간흡충 총체감염수에 따른 침강대의 수는 뚜렷하지 않았다고 하였다. 따라서 본 실험에서 사용한 100마리의 피낭유충 투여 혈청에 있어서 감염된 총체수의 다소가 실험결과에 어떤 영향을 미치지 않았을 것으로 보아진다. 본 연구에서 항원성이 높다고 관찰된 24Kd, 또는 46Kd의 항원대, 14Kd의 항원대중 종특이한 항원대가 어떤 것인지에 대해서는 이번 연구에서는 조사가 되지 않았으나 이들중 어느 항원대가 종특이할 것으로 생각되며 앞으로 초기 발육단계 항원중에서는 immunoblot상 가장 우수한 것으로 보이는 2주 총체항원과 피낭유충항원, 분비물항원등에 대해서도 다각적인 검토가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

초기 발육단계별로 간흡충으로부터 만든 조항원을 SDS-PAGE로 전기영동한 다음 EITB를 이용하여 항원대별 항원성을 조사하고 감염시기별로 채취한 토끼혈청에 대한 반응대를 관찰하였다. 실험에 사용한 항원은 실험적으로 토끼에 감염시켜 2, 3, 4, 5주의 초기 발육단계에서 얻은 간흡충 식염수추출

액이며 3~20% linear gradient gel에서 SDS-PAGE 하였다. Silver stain한 결과 간흡충 조항원은 66, 46, 33, 27, 24, 16, 14, 10Kd등의 분획으로 구성되어 있었으며 단계별로는 40Kd 항원이 2주 항원에서는 약하나 점차 강하게 염색되었으며 2주 항원에서 관찰되는 35Kd의 항원대는 5주 항원에서는 소멸되었으며 2, 3주 항원에서 진하게 염색되는 22Kd의 항원대는 5주 항원에서는 약하게 염색되는 등의 차이를 나타내었다. 그러나 microplate ELISA로는 2주 총체항원과 5주 총체항원 사이에 아무런 차이를 발견할 수 없었으며 모든 항원에서 항체가는 3주에 급격히 상승하여 9주까지는 계속 올라가는 양상을 나타내었다.

EITB결과 66, 33, 27 및 14Kd의 항원대는 정상 대조혈청과도 반응하는 것이 확인 되었으며 10Kd 및 46Kd의 항원대가 3주에 반응을 나타내기 시작하였다. 2주 항원에 대하여 반응하는 항원대는 91, 85, 63, 46, 40, 33, 24, 14Kd 및 10Kd의 항원대등인바 대부분은 감염시기가 오래된 혈청일 수록 반응이 강하게 나타나나 10Kd의 항원대는 26주 혈청에서는 반응이 없어지는 특성을 보였다. 4, 5주 항원에 있어서의 주요 항원대의 EITB반응은 9주 및 26주 혈청을 갖고 조사해 보았을 때 2주 항원을 사용하는 것보다 반응이 약해지고 있어서 immunoblot에서는 초기 항원 중에서는 2주 항원을 사용하는 것이 보다 효과적일 것으로 판단되었다.

## References

- 1) Seo BS, Lee SH, Cho SY, Chai JY, Hong ST, Han IS, Sohn JS, Cho BH, Ahn SR, Lee SK, Chung SC, Kang KS, Shim HS and Hwang IS : *An epidemiologic study on clonorchiasis and metagonimiasis in riverside areas in Korea. Korean J Parasit* 19(2) : 137, 1981
- 2) 林漢鍾 : 吸蟲類感染의 化學療法에 關한 研究 高麗醫大論集 12 : 425, 1975
- 3) Ryoji S : *Diagnostic value of complement fixation test for clonorchiasis. Okayama Igakkai Zasshi* 384 : 1, 1922(in Japanese)
- 4) 李重根 · 閔得映 · 任敬一 · 李根泰 · 蘇鎮璋 : 肝吸蟲症 感染診斷을 위한 ELISA법의 效用性에 關한 研究 延世醫大論文集 14 : 133, 1981
- 5) Yokogawa M : *Intradermal test for paragonimiasis.*



- I, II. *Jpn J Parasit* 4 : 276, 1955
- 6) 横川宗雄·栗野林 : 肝吸蟲症 保體結合反應. 日本醫事新報 1703 : 27, 1956
  - 7) 朱 一·李溫永 : 肝디스토마의 保體結合反應. 國立防疫研究所報 4 : 1, 1961
  - 8) 양정성·이준상·임한중 : 간흡충증 진단에 있어서 *ELISA*법의 응용에 관한 연구. 고의대논집 20 : 201, 1983
  - 9) 김영용·이준상·임한중 : 간흡충증에 있어서 노를 이용한 면역학적 진단에 관한 연구. 고의대논집 22(3) : 65, 1985
  - 10) 함정희·이준상·임한중 : 간흡충증에 있어서 형광항체법을 이용한 진단에 관한 연구. 고의대논집 21(3) : 69, 1984
  - 11) 한주환·엄기선·임한중 : 간흡충증에 있어서 혈청 및 여지흡착 혈액을 이용한 효소면역측정법 (*ELISA*)에 관한 연구. 고의대논집 23 : 13, 1986
  - 12) Hunter GW III, Ritchie LS and Pan C : *Immunological studies, II. Intradermal tests and their application in the field for the detection of schistosomiasis japonica, paragonimiasis, and clonorchiasis.* *Military Medicine* 122(2) : 85, 1958
  - 13) Sadun EH, Buck AA and Walton BC : *The diagnosis of paragonimiasis westermanni using purified antigens in intradermal and complement fixation tests.* *Military Medicine* 124 : 187, 1959
  - 14) Phillipson RF, McFadzean JA : *Clonorchis, Opisthorchis and Paragonimus gel diffusion studies.* *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 56 : 13, 1962
  - 15) Pacheco G, Wykoff DE and Jung RC : *Trial of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of infections with Clonorchis sinensis.* *Am J Trop Med Hyg* 9 : 367, 1960
  - 16) Kim JH and Blackwell RQ : *Purification of the Clonorchis antigen using a Dimethyl amino ethyl-sephadex A 50 column.* *Yonsei Med J* 4 : 43, 1963
  - 17) Sun T and Gibson JB : *Antigens of Clonorchis sinensis in experimental and human infections.* *Am J Trop Med Hyg* 6 : 1061, 1969
  - 18) 이규면·최원영 : 간디스토마의 면역혈청화저 진단법. 가톨릭대학 의학부 논문집 27 : 431, 1974
  - 19) Towbin H, Staehelin T and Gordon J : *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications.* *Proc Nat'l Acad Sci USA* 76 : 4350, 1979
  - 20) Tsang VCW, Peralta JM, Simons AR : *Enzyme linked immunoelectrotransfer blot techniques(ELITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis.* *Methods enzymol* 92 : 377, 1983
  - 21) Carlos ARM and Hillyer GV : *Isolation and partial characterization of shared antigens of Biomphalaria glabrata and Schistosoma mansoni and their evaluation by the ELISA and ELITB.* *J Parasit* 71(5) : 547, 1985
  - 22) Voller A, Bidwell DE, Bartlett A : *The enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). An guide with abstract of microplate applications.* *Dynatech Europe(ed)* 1979
  - 23) McLaren M, Draper CC, Roberts JM, Minter-Goedbloed E, Lig GS, Teesdale CH, Amin MA, Omer AHS, Bartlette A, Voller A : *Studies on the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) test for Schistosoma mansoni infections.* *Ann Trop Med & Parasit* 72 : 243, 1978
  - 24) Merrill CR, Goldman D, Sedman SA and Ebert MH : *Science* 211 : 1437, 1981
  - 25) Ruppel A and Cidi D : *A comparative analysis of various developmental stages of Schistosoma mansoni with respect to their protein composition.* *Parasitology* 75 : 39, 1977
  - 26) 최원영·진영관·이옥란·김운규 : 간디스토마의 발육단계별 단백질성의 분석. 기생충학잡지 19(1) : 8, 1981
  - 27) 진성원·이준상·임한중 : 간흡충 및 폐흡충증에 있어서 면역동물 혈청을 이용한 *ELISA*법과 *Ouchterlony*법의 비교연구. 고의대논집 20 : 191, 1983
  - 28) 이은영 : 간흡충증의 면역혈청학적 연구 ; 가토면역 및 감염혈청에 있어서의 항체생산경향과 항체측정. 국립보건연구원보 8 : 167, 1971
  - 29) 윤백현·이옥란·최원영 : 흡충류의 면역전기영동법과 한천이중확산법(초록) : 기생충학잡지 10 : 121, 1972
  - 30) 이옥란·이원구·이규면·최원영 : 실험적 간디스토마증의 혈청반응(초록) : 기생충학잡지 11 : 119, 1973