

Immunoblot법을 이용한 囊尾蟲症진단에 있어서 각종 抗原의 適用可能性 檢討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
高永泰 · 朱旻煥 · 鄭明淑 · 林漢鐘

Studies on the Applicability of Various Antigen Preparations in the Immunoblot Diagnosis of Cysticercosis

Young-Tae Koh, Kyoung-Hwan Joo
Myung-Sook Chung, and Han-Jong Rim

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

= ABSTRACT =

A systematic study was conducted to identify and isolate a serologically pertinent antigen with high specific activity and low cross reactivity from *Cysticercus* parenchymal antigen.

Differential centrifugation of the homogenate yield three particulate and one soluble fractions : the 480×G pellets(CyL₂), the 7650×G pellet(CyL₃), the 100000×G pellet(CyL₄), and 100000×G supernatant(CyL₆). We compared antigenicity of these antigens to that of cystic fluid antigens(CyF₁), saline extract of cystic wall(CyL₁), and n-butanol treated CyL₄ antigen (CyL₅) based on SDS-PAGE and immunoblot techniques.

The data obtained were as follows :

1) The ratio of O.D. value of ELISA against cysticercosis positive pool sera to that of negative pool sera was highest when using CyF₁ as antigen. However, the ratio was relatively low in case of CyL_{3,4} and CyL₅.

2) We have noted in previous paper that most strong antigenic activities are present in 63Kd band with low cross reactivities. An effective serologic reagent must contain components that are recognized by most of infected sera. 63Kd band met this criteria and could be considered as a reliable band for the diagnosis of cysticercosis. As far as 63Kd band concern, CyL₅ showed most strong activities without disturbance of cross reaction by EITB in spite of low applicability to microplate ELISA.

3) CyL₅ could detect the serum antibody of cysticercosis even in very low titers, around cut-off values of microplate ELISA, by immunoblot. It also could detect the cross reactivities

of *Echinococcus* species, which showed high absorbance value in micro plate ELISA and some sparganosis cases. Further purification of this antigen will be able to represents a antigen that can be used in the diagnosis of cysticercosis.

緒 論

유구낭미충증을 診斷하는데 있어서 免疫學的 診斷法의 이용은 이미 오래전 부터 여러 학자들에 의하여 연구되어 왔다. 특히 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)와 같은 극히 민감한 血清學的 診斷法이 보편화 됨에 따라 敏感度(sensitivity) 자체는 매우 높아졌으나 特異度(specificity)는 개선이 되지 않고 있다(Arambulo, et al., 1978¹⁾; Diwan, et al., 1982²⁾; Cho, et al., 1986³⁾) 이를 해결하기 위한 방법의 일환으로 抗原의 순수정제, 또는 부분정제를 위한 연구도 많이 진행되어 Flisser, et al. (1980)⁴⁾은 抗原性이 있는 8개의 分割을 囊尾蟲으로부터 추출하고 Antigen B가 神經系 囊尾蟲症患者血清에 공통적으로 반응한다고 하였으며, Choi, et al.(1986)⁵⁾도 囊尾蟲囊液抗原의 disc-PAGE를 통해 7개의 抗原帶를 분리하고 그 중 c-band라고 命名한 抗原部位가 Coomassie-brilliant blue염색에서 가장 진하게 염색되었다고 하였다. 그러나 이와 같이 分割을 구해 검사할 경우 特異度の 향상은 기대할 수 있으나 Antigen B와 같은 single antigen을 사용하여 ELISA를 시행하는데 있어서는 민감도가 저하되는 문제점이 있다(Pammenter 및 Rossouw, 1987)⁶⁾. 최근에는 SDS-PAGE의 강한 단백질 分解能力과 이를 blotting하는 방법(Towbin, et al., 1979)⁷⁾, 그리고 ELISA의 민감성을 이용한 enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB, western blot)을 사용하여 囊尾蟲症의 特異抗原帶 및 抗原의 特性을 알고자 하는 연구가 많이 시도되었다(Grogl, et al., 1985⁸⁾; Gottstein, et al., 1986⁹⁾; Larralde, et al., 1986¹⁰⁾; Cho, et al., 1987¹¹⁾; 朱들, 1987¹²⁾; 金 및 Yang, 1988¹³⁾; 許들, 1988¹⁴⁾; Kong, et al., 1989¹⁵⁾. 이들 연구의 대부분은 囊尾蟲에 의해 생기 抗體를 발견하는데 있어서 교차반응을 구별해 낼 수 있는 抗原帶의 발견, 즉 特異抗原帶의 모색을 전제로 연구를 수행하였으며 그 결과 63~64Kd, 26Kd 및 7~8Kd의 抗原帶들이 주목되었다. 이들 중 低分子량의 抗原

帶는 特異抗原帶로서의 기능은 충분히 인정되나 敏感度에 있어서는 그다지 높지 않은 것으로 생각되어진다. 著者들은 가능한 한 민감도에 영향을 주지 않는 범위내에서, microplate ELISA에서 양성으로 판정이 될 수 있는 것은 immunoblot에서도 양성으로 판정될 수 있는 시험방법을 사용하는 것을 원칙으로 하되 background 및 다른 抗原帶의 反應을 鈍化시켜 朱들(1987)¹²⁾ 許들(198)¹⁴⁾에 기재된 63 Kd 항원대를 뚜렷하게 반응시킬 수 있는 상태로 만들기 위한 목적과, 囊尾蟲 총체항원의 遠心分離에 따른 분획중 어느것이 가장 이러한 目的에 부합되는가를 알기 위한 연구의 일환으로 囊尾蟲抗原을 여러가지 분획으로 나누어 가장 우수한 것을 選擇해 보고자 본 연구를 실시하였다.

材料 및 方法

1. 抗原의 製造

囊尾蟲에 자연감염된 돼지의 근육에서 도살 후 근육이 붙지 않도록 조심하여 낭미충을 떼어낸 뒤 Phosphate buffered saline(PBS)으로 잘 세척하였다. 囊液은 26호 주사바늘로 뽑아 내어 100ul씩 나누어 -40°C에 보관하면서 필요에 따라 사용하였고 나머지 낭미충은 PBS로 洗滌한후 역시 -40°C에 보관하였다가 사용하였다.

1) 囊液抗原(cystic fluid antigen, CyF₁)

許들(1988)¹⁴⁾에 기재된 것과 마찬가지로 낭미충의 낭액을 아무런 처리 없이 사용하기 직전 0.45 μm의 filter membrane으로 여과하여 사용하였다. 단백질함량은 2.4mg/ml이었다.

2) 囊尾蟲 抗原(larval antigen, CyL₁)

朱들(1987)¹²⁾ 및 許들(1988)¹⁴⁾에서 사용한 抗原과 같다. 단백질함량은 3.7mg/ml이었다.

3) 遠心分離에 의한 抗遠製造

낭액을 제외한 낭미충을 Fig. 1과 같은 방법으로 원심분리하여 여러가지 분획의 항원을 얻어 사용하였다. 제조방법은 다음과 같다.

위의 2)에서와 같이 냉동보관하였던 낭미충을

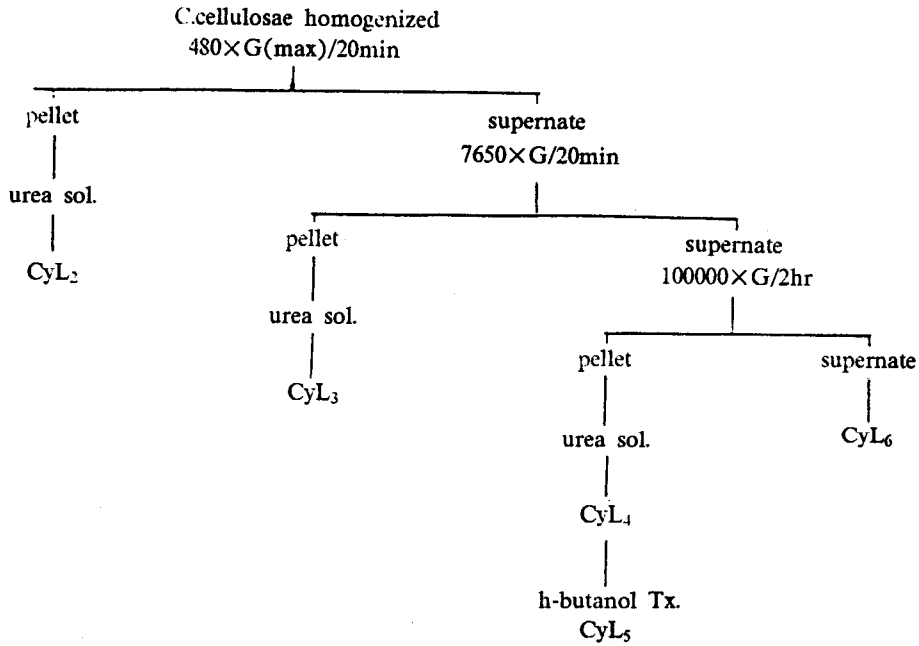


Fig. 1. Centrifugal fractionation scheme for *Cysticercus cellulosae* larval worm antigens.

사용하기 직전에 37°C에서 급히 녹인 후, 5vol. (1/5 w/v)의 cold(4°C) sucrose/HEPES buffer(0.05M HEPES-NaOH, 0.25M sucrose, 2.0mM EDTA, pH 7.2)로 옮겼다. 총체를 teflon coated glass homogenizer로 전기마쇄한 다음 부유액을 480×G(max)로 20분간 원심분리하였다. 상청액을 조심스럽게 분리한 뒤 7,650×G로 20분간 원심분리하였다. 480×G 침사물은 100ml의 sucrose/HEPES에 재부유시켜 다시 한번 480×G로 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 7,650×G 침사물 역시 같은 방법으로 재부유시켜 다시 원심분리하고 상청액은 모아서 100,000×G로 2시간 원심분리하였다. 이 때 생긴 소량의 지방층을 suction으로 제거한 다음 상청액은 더 이상의 처리없이 항원으로 사용하였다. 이를 CyL₆로 약칭하였다.

이 과정을 抗原性的 破壞를 가급적 줄이기 위해서 반드시 4°C, 또는 ice bath에서 실시하고 총 소요 시간을 4시간 이내가 되도록 조절하였다.

480×G, 7,650×G 및 100,000×G의 침사물은 각각, 50ml의 cold urea buffer(0.05 M Tris-HCl, 8M urea, pH 8.0)에 넣어 Pasteur 피펫으로 다시 부유시키고 Heat Systems sonicator model 370(Heat Systems,

Plain View, NY, USA), standard probe를 이용 5%~power 5분간 sonication하였다. Sonicate는 40000×G 30분간 각각 원심 분리하였고 상청액을 각각 CyL₂ (480×G pellet), CyL₃(7650×G pellet), CyL₄(100,000×G pellet)으로 약칭하였다.

CyL₄(100,000×G pellet) 50ml에 -20°C로 냉각시킨 n-butanol을 넣어 4°C에서 30분간 magnetic stirrer로 섞은 다음 40000×G로 15분간 원심분리하였다. 이때 밑으로 부터 침사물, 갈색의 水性層, gelatin상의 부유침사물, 그리고 맨 위에 맑은 n-butanol층으로 나뉘는데 이 중 갈색의 水性層을 주사 바늘로 뽑아 내어 항원으로 사용하고 CyL₅로 약칭하였다. CyL₅에 비해 lipid와 lipoprotein이 일부 제거된 것으로서 앞으로 더 정제할 수 있도록 粘度를 낮춘 것이다. 각각의 항원의 단백질함량은 bovine plasma gamma globulin(Sigma)을 표준으로 하여 Bio-Rad protein assay kit를 이용한 Bradford법¹⁶⁾으로 실시하였고 그 결과는 Table 1.과 같다.

2. 試驗血清

1) 囊尾蟲患者의 血清

1986년부터 수집된 25~61세 사이의 腦囊尾蟲症

Table 1. Protein contents of each antigen used

Antigen	Nature	Protein (mg/ml)	Yield (ml)
CyF ₁	Cystic fluid antigen	2.4	—
CyL ₁	Saline extract. larval Ag	3.7	—
CyL ₂	480×G pellet, urea soluble Ag	1.7	20
CyL ₃	7650×G pellet, urea soluble Ag	0.3	20
CyL ₄	100000×G pellet, urea soluble Ag	1.7	10
CyL ₅	n-butanol treated Ag of CyL ₄	1.2	10
CyL ₆	100000×G supernatant	1.8	30

환자의 血清 10예를 각각 사용하였고, 1980년부터 수집된 腦囊尾蟲症 및 皮膚囊尾蟲症 患者 24예의 血清을 一定量씩 만든 pool sera를 사용하였다.

2) 對照血清

5예의 유, 무구조중 감염자 혈청, 2예의 sparganosis 환자 혈청, 1예의 *Echinococcus* species, 3예의 광절열두조충 감염자 혈청, 그리고 3예의 非感染者 血清을 對照로 사용하였다. 일부 試驗에 있어서는 15예의 윤충류 非感染者 血清의 pool sera를 사용하였다. 이들 血清의 내용은 Table 3에 기재된 바와 같다.

3. ELISA

Voller et al.(1979)과 McLaren et al. (1978)의 방법에 준하되 혈청희석 배율을 1 : 400, 단백질함량은 2.5µg/ml가 되게 하여 사용하였다. Conjugate는 peroxidase conjugated affinity purified goat anti-human IgG, H & L Chain specific, Cappel 및 goat anti-human IgG, H & L Chain specific, Cappel 및 anti-rabbit IgG를 1 : 2000으로 희석하여 사용하였고 Dynatech Lab.의 microELISA reader로 488 nm에서 吸收光量을 측정하였다.

4. SDS-PAGE

SDS-PAGE(Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide gel electrophoresis)는 Tsang(1983)¹⁹⁾ 및 許들(1988)¹⁴⁾에 기재된 방법에 준하여 실시하였다. 요약하면 다음과 같다. 항원재료는 SDS의 최종농도를 pH8.0의 urea를 넣은 용액으로 희석하여 2.5%가 되게 한 다음 여기에 항원재료를 0.2/µg/µl가 되게 하여 사용하였고 재료는 3~20% linear gradient gel(160×200×0.8mm)과 3% stacking gel을 이용하여 tracking dye가 resolving gel의 맨 밑에 올 때까지 영동하였다. Sample application의 양은 10µl이면 염

색은 Merril(1981)²⁰⁾의 silver염색으로 하였다.

5. Immunoblot

SDS-PAGE로 분해된 단백질분획은 Tsang들(1983)¹⁹⁾의 방법에 따라 nitrocellulose paper에 blot시킨 다음 PBS-0.3% Tween 20액으로 1 : 200희석한 여러가지 혈청을 넣어 rotary shaker에서 overnight시켰다. 항원대와 부착한 항체는 ELISA법으로 확인하였으며 희석배율은 1 : 2000, chromogenic substrate는 3-3' diaminobenzidine(Sigma)으로 발색시켰다. Conjugate time은 90분, substrate time은 15분이었다.

試驗成績

1. 各 抗原의 ELISA成績

낭미충증에 감염된 사람들의 pool sera 3개와 1개의 음성 pool sera를 이용 각 抗原에 대한 ELISA성적을 보면 Table 2와 같다. 즉 ELISA에 있어서 우수한 결과를 보인다는 것은 양성혈청의 O.D.치가 높고 상대적으로 음성혈청의 O.D.치는

Table 2. Positive/negative ratio of ELISA absorbance value of each antigen preparations against pool sera of cysticercosis and normal healthy controls

	Pool(+)sera			Mean Pool(-)	
	A	B	C	control +/— ratio	
CyF ₁	1.867	1.343	1.130	1.447	0.136 10.6
CyL ₁	1.679	0.899	0.998	1.192	0.142 8.4
CyL ₂	1.630	1.187	1.271	1.363	0.147 9.3
CyL ₃	1.462	0.923	0.788	1.058	0.183 5.8
CyL ₄	1.509	1.094	0.843	1.149	0.221 5.2
CyL ₅	1.448	0.963	0.729	1.047	0.191 5.5
CyL ₆	1.579	0.864	0.943	1.129	0.143 7.9

Table 3. List of the cases and their serum activities against CvF₁ and CvL₅ by ELISA

Immunoblot No.	sex	age	Comparative diagnosis	ELISA	
				CvF ₁	CvL ₅
1	f	52	Dermal cysticercosis	0.378	0.325
2	m	61	Brain cysticercosis	0.514	0.375
3	m	39	Brain cysticercosis	1.487	0.554
4	m	59	Brain cysticercosis	1.059	0.597
5	m	42	Brain cysticercosis	0.899	0.624
6	m	57	Brain cysticercosis	1.595	1.096
7	f	49	Brain cysticercosis	1.397	0.825
8	m	39	Brain cysticercosis	0.679	0.443
9	f	39	Brain cysticercosis	0.569	0.383
10	m	45	Brain cysticercosis	1.442	0.779
11	m	43	<i>Taenia saginata</i>	0.125	0.270
12	f	34	<i>Taenia saginata</i>	0.170	0.393
13	f	19	<i>Taenia spp. unknown</i>	0.677	0.852
14	m	18	<i>Taenia solium</i>	0.174	0.178
15	m	47	<i>Taenia saginata</i>	0.147	0.196
16	f	38	<i>D. latum</i>	0.331	0.322
17	m	38	<i>D. latum</i>	0.174	0.302
18	m	35	<i>D. latum</i>	0.117	0.273
19	m	38	<i>E. multilocularis</i>	0.198	0.524
20	m	37	Sparganosis	0.240	0.290
21	f	42	Sparganosis	0.188	0.315
22	m	50	normal control	0.103	0.108
23	m	38	normal control	0.079	0.141
24	m	28	normal control	0.144	0.240
25			Phosphate buffered saline blank		

낮아야 하며, 다른 질환에 대하여 교차반응이 적어야 한다. 이러한 관점에서 양성치/음성치의 비율을 각 항원에서 검토한 결과 CvF₁은 10.6으로 7개의 抗原중 가장 높았다. CvL₂ 및 CvL₁은 각각 9.3, 8.4로 비교적 높은 비율을 나타내었다. 그러나 CvL₃~5의 抗原, 즉 7650 및 100000×G 침사물의 urea soluble 항원과 100000×G 침사물의 n-butanol 처리 항원은 양성/음성의 비가 5.2~5.5로 나타나 매우 낮은 수치를 보였다. 실제 陽性血清의 O.D.치를 보아도 CvF₁ 이평균 1.447로 제일 높았으며 다음이 CvL₂로 1.363이었고, CvL₅는 1.047로 가장 낮았다. 陰性血清에 있어서도 CvL₁은 0.136으로 가장 낮은치를 보였으며 CvL₄ 및 CvL₅는 각각 0.221, 0.191로 다른 抗原에 비하여 상대적으로 높은 O.D.치를 나타내었다.

2. SDS-PAGE

SDS-PAGE와 silver stain으로 얻은 CvF₁ 및 CvL₁~6의 단백질분획은 Fig. 2에 제시된 바와 같다.

CvF₁ 및 CvL₁의 분획은 朱들(1987)¹²⁾에 기재된 바와 기본적으로 같은 것으로서 간단히 기술하면 다음과 같다. 즉 CvF₁은 116~200Kd사이의 한 항원대, 91Kd, 71, 63, 26, 21Kd등의 항원대가 나타나며 이중 63Kd의 항원대가 가장 강하게 착색되었다. CvL₁은 매우 복잡한 구성을 보이고 있어서 많은 항원대가 나타나나 그중 중요한 것은 106,97, 91,80,63,49,40,31Kd,14Kd등의 항원대이었다. 이 중 63Kd의 항원대가 역시 가장 강하게 착색되었다.

한편 CvL₂에서 CvL₆까지의 항원들은 근본적으로 CvL₁과 같은 것으로서 원래 함유하고 있는 단백질량이 각각 다르지만 각lane에 들어가는 양은 같게

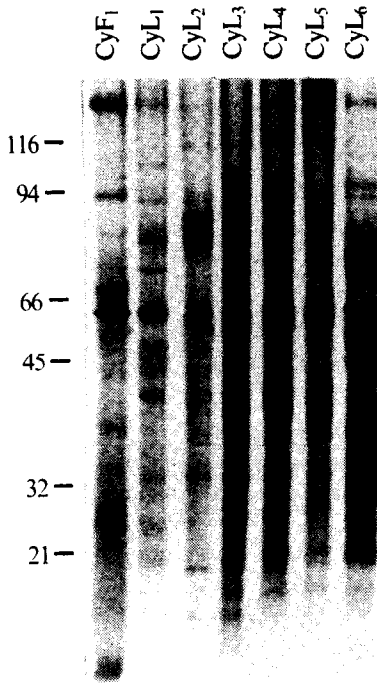


Fig. 2. SDS-PAGE findings of cystic fluid(CyF₁) and each fractionated *Cysticercus* larval worm antigens(CyL₁~CyL₆). 3~20% linear gradient gel with silver stain.

조절했으므로 이에 따라 어떤 항원대는 매우 진하게, 또 어떤 항원대는 사라져 없어지는 차이점을 나타내었다. 116~200Kd사이의 한 항원대는 CyF₁에 가장 강한 반응을 나타내나 CyL₁에서 CyL₃로 갈수록 약해지다가 CyL₅에서는 잘 보이지 않으며 CyL₆에서는 오히려 CyL₁보다도 강하게 착색되었다. 91Kd의 항원대는 전반적으로 나타나지만 CyF₁에서 가장 강하며 80Kd의 항원대는 CyF₁에서는 매우 약한 반면 CyL₁~CyL₆에서는 비교적 강하게 착색되었다. 91~80Kd사이의 항원대가 CyL₂에서 특별히 나타나고 있었다. 63Kd의 항원대는 朱들(1987)¹²⁾ 및 許들(1988)¹⁴⁾에서도 언급된 가장 강한 반응을 일으키는 항원대로서 CyF₁, CyL₁, CyL₂의 순으로 점차 약해지다가 CyL₃(7,650×G 침사물의 urea soluble antigen)에서 부터 강하게 착색되며 CyL₆에서도 뚜렷하게 염색되어 나타났다. 43Kd의 항원대는 CyF₁에는 없고 CyL₁부터는 63Kd의 항원대와 같은 반응을 나타내었다.

3. 각 抗原을 이용한 EITB成績

1) 陽性 및 陰性 pool sera의 반응

Fig. 3에 표시한 바와 같이 91Kd의 抗原帶는 CyL₁에서부터 CyL₆에 이르기까지 양성형청에 모두 반응을 하나 陰性對照血清에 대하여도 반응을 일으켰다. 반면 63Kd의 抗原帶는 CyF₁은 물론 CyL₁~CyL₆에 까지 모두 陽性血清에 반응하였으며 陰性血清에는 반응하지 않았다. Chromogenic substrate의 발색정도를 비교해보면 CyL₁보다는 CyL₂, CyL₃로 갈수록 점차 진해지다가 CyL₄에 이르러 발색의 정도가 그 어느 항원보다도 강하였다. CyL₄는 CyL_{1,2,3} 및 CyL₆에 비해 非特異反應이 나타나는 80~91Kd사이의 抗原帶들 및 116~200Kd사이의 抗原帶 등이 감소하였다. 한편 CyL₅는 CyL₄의 n-butanol처리항원으로서 CyL₄에서 나타나는 非特異的인 background의 발색이 감소되었으며 63Kd의 抗原帶가 가상 강하게 발색되었다. CyL₆는 CyL₁과 거의 유사한 반응을 나타내었다. 이상의 결과로 보아 CyL₃가 囊尾蟲囊液抗原과 더불어 囊尾蟲症에 관한 immunoblot진단과 연구에 활용될 수 있을 것으로 결론지을 수 있었다.

2) 感染者血清에 대한 CyL₅抗原의 반응

63Kd의 抗原帶를 위주하여 검토할 때, CyL₅는 10예의 囊尾蟲感染者 모두에게서 陽性反應을 나타내었다(Fig. 4). 이 예들은 Table 2.에 표시된 바와 같이 ELISA에서 0.325~1.096의 범위에 있었으며 case #1만이 cut-off value와 같은 수준을 나타내었고 나머지는 모두 陽性範圍에 있는 血清이었다. 對照群은(#22~24)은 63Kd은 물론 어느 항원대에서도 양성반응을 나타내지는 않았다. 5예의 *Taenia* 조충류 感染者血清등 2예는 ELISA가 陽性範圍에 있었으며 immunoblot상에서도 역시 미약한 반응을 보였다. 다만 #13은 ELISA값이 0.852로서 낭미충감염혈청의 #7(0.825)과 유사하였으나 immunoblot에서는 63Kd항원대는 아주 미약하고 21, 14Kd의 抗原帶와 63Kd 이상에서 非特異的인 background의 증가만 나타났다. #12 역시 낭미충증이 #2 및 #9와 비슷한 ELISA값을 보이고 있으나 63Kd抗原帶의 반응정도는 훨씬 미약하게 나타나고 있었다. 광절열두조충 감염자혈청은 91,116, 80Kd

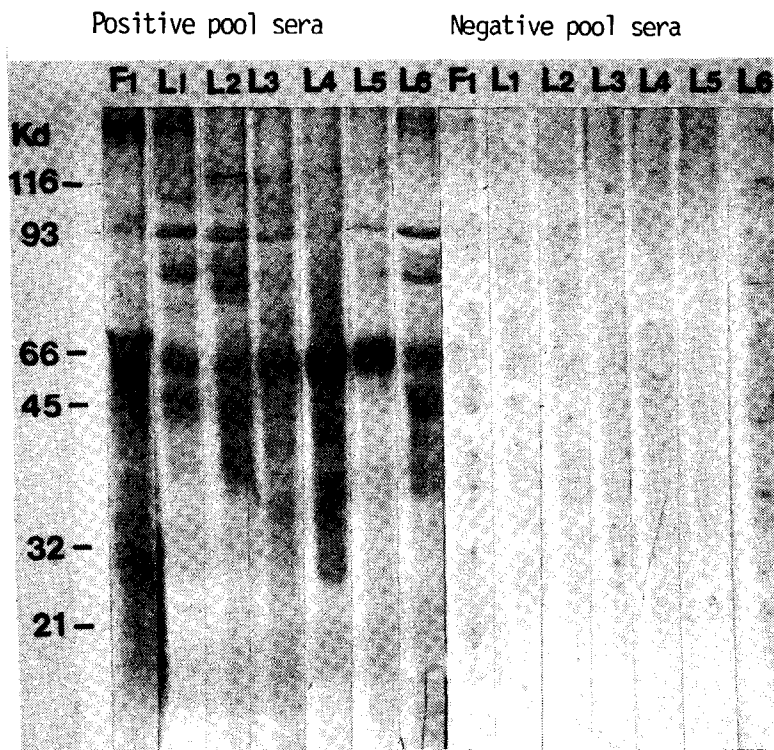


Fig. 3. Immunoblot findings to various antigen preparations in positive and negative pool sera of cysticercosis.

등에서의 반응이 있으나 63Kd의 항원대는 반응하지 않았으며, #19의 *Echinococcus*의 예에 있어서는 ELISA로서는 양성 반응을 보임에도 불구하고 116Kd 이상에서의 非特異反應만이 관찰되었다. Sparganosis 2예 역시 116Kd이상의 非特異反應만이 觀察되었다.

3) 感染者 血清에 대한 CyF₁의 반응

#13은 *Taenia* 조충류 unknown의 예로서 囊尾蟲感染血清과 완벽하게 같은 반응을 나타내었다. 더구나 ELISA값이 0.677로 囊尾蟲感染例의 #5, 또는 #8과 비슷한 수치임에도 불구하고 실제 immunoblot상의 반응은 훨씬 강하게 나타나고 있었다. 이것은 CyF₅의 #13에서의 반응과는 매우 큰 차이를 갖는 것으로서 CyL₅의 경우에 있어서는 63 Kd의 반응이 매우 미약했었다(Fig. 5).

考 察

본 研究의 결과 ELISA의 成績과 immunoblot에서

얻을 수 있는 효용성이 서로 일치하지만은 않는다는 것이 다시 확인되었다. 즉, microplate ELISA에 의한 ELISA치는 陽性和 陰性的의 比를 基準으로 볼 때 CyL₁이 CyL₄나 CyL₅보다, 그리고 CyL₆조차도 이들보다 우수한 것으로 나타나고 있으나 SDS-PAGE 또는 immunoblot법에서는 가장 강한 抗原帶들중의 하나인 63Kd을 중심으로 볼 때 囊尾蟲體의 抗原중 그 어느것 보다도 강한 反應을 보이고 있다(Table 2 및 Fig. 2). 이 결과가 의미하는 것은 microplate ELISA에서 陽性反應, 즉 O.D.치를 올리는 因子들이 CyL₄나 CyL₅의 경우 63Kd의 抗原帶에 거의 의존하고 있고 그 밖의 抗原들은 여타의 다른 항원대에 의존하는 경향이 많은 것이 아닌가 하는 생각을 갖게한다. 이러한 생각은 Fig. 2의 SDS-PAGE를 볼 때, CyL₁이나 CyL₂에 비해 CyL₅에서 볼 수 있는 항원대가 비교적 단순하다는 점과, CyL₆에 비해서는 훨씬 더 단순하며 상대적으로 63Kd의 抗原帶는 강하게 착색되는 점에서 보완될 수 있으며 Fig. 4의 immunoblot에서 보듯이 다른 항원대는 거의 囊尾

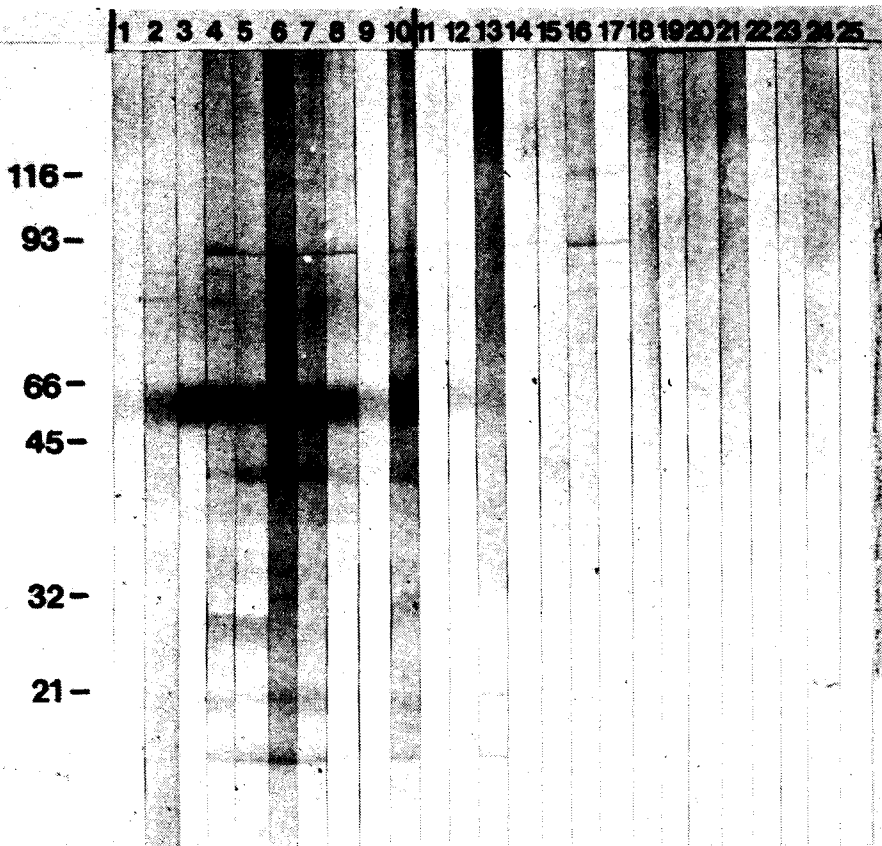


Fig. 4. Immunoblot findings of CyL₅ against various serum preparations.

1~ : Cysticercosis, 11~15 : Taeniasis,

16~ : Diphyllbothriasis, 19 : echinococcosis,

20~21 : sparganosis, 22~24 : negative controls 25 : PBS blank list of the cases and their ELISA results were presented in Table 3.

蟲感染者血清과의 反應이 認知되지 않는 반면 63 Kd의 抗原帶가 가장 강하게 노출되는 등의 결과로 더욱 뒷받침된다. 다만 CyL₄~5의 抗原이 다른 抗原에 比하여 볼 때 陰性對照血清의 microplate ELISA의 O.D.치가 약간 높게 나옴을 알 수 있는 바 이와 같은 현상은 immunoblot로 볼 때 어떤 특별한 抗原帶의 反應보다는 전반적인 background의 非特異反應에 의한 것으로 간주될 수 있다. Tsang et al.(1985)²¹⁾에 따르면 background의 반응은 ①nitrocellulose membrane의 전반적인 非特異反應, ②제 1抗體의 교차반응, 또는 impurity에 따른 抗原帶의 착색, ③제 2항체나 확인시약에 의한 항원대의 착색등에 의해 나타난다고 한 바, 본 실험에 나타나는 background의 착색이 어떤 범주에 들어

가는지는 확실하지 않지만 이 문제를 해결하는 것이 CyL₄나 CyL₅의 면역학적 이용에 있어서 사용가능성 여부를 가늠하게 될 것으로 생각한다.

63Kd의 항원대가 과연 교차반응이나 비특이반응을 일으키지 않는 항원대인가 하는 문제도 좀 더 검토되어야 한다. 朱들(1987)¹²⁾의 연구에 있어서는 microplate ELISA에서 陽性反應을 보인 예들에 대하여 囊尾蟲囊液抗原과 충체의 식염수추출항원을 이용한 immunoblot검사를 통해 63Kd, 14Kd의 항원대가 특이하게 반응하며 이중 63Kd의 항원대는 囊液抗原인 충체抗原을 막론하고 가장 강한 反應을 나타낸다고 하였다. 許들(1988)¹⁴⁾은 microplate ELISA로 교차반응이 일어나는 血清들을 immunoblot법상 63Kd의 抗原帶로 감별해 내면서, 동시에

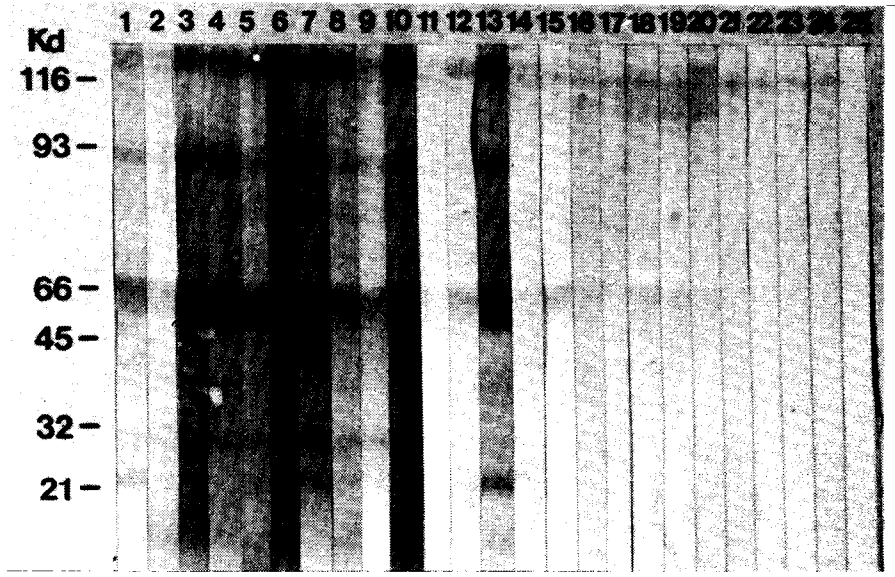


Fig. 5. Immunoblot findings of CyF₁ against various serum preparations.

1~ : Cysticercosis, 11~15 : Taeniasis,
 16~ ; Diphyllbothriasis, 19 : echinococcosis,
 20~21 : sparganosis, 22~24 : negative controls 25 : PBS blank
 list of the cases and their ELISA results were presented in Table 3.

microplate ELISA보다 민감도도 상승됨을 보고하였다. 그러나 Gottstein et al.(1986)⁹⁾이나 Kong, et al.(1989)¹⁵⁾에 의하면 *Echinococcus* species와의 교차반응이 이 항원대에서도 일어남을 보고하고 있고, 김 및 Yang(1988)¹³⁾ 도포충증 7예중 2예에서 양성반응이 일어남을 보고하였다. 따라서 63Kd의 항원대는 두 기생충간의 共通抗原인 것은 틀림이 없을 것이다. 다만 microplate ELISA의 O.D.치가 매우 높은데도 불구하고 63Kd에 있어서 *Echinococcus* 감염혈청이 보이는 발색이 매우 약하다는 점을 Kong et al.(1989)¹⁵⁾에서 확인할 수 있으며 본 연구에서의 *Echinococcus* 感染血清 역시 0.5이상의 높은 O.D.치를 보임에도 불구하고(Table 3.) 63 Kd과는 반응하지 않는 점에서 볼때(Fig. 4 case #19) 최소량의 항원을 사용하는 본 연구와 같은 방법에서는 공통항원에 의해 생긴 항체가 확인되지 않을 가능성도 있다고 하겠으며 이에 대하여는 좀더 주시하여야 될 것으로 생각한다. 문제는 Larralde

(1989)²²⁾의 지적대로 낭미충증과 포충증의 감별 진단을 하는데 있어서 특이도와 민감도를 고루 갖춘 single protein을 이용하기는 어렵다는데에 있는 것 같다. 가령 囊尾蟲囊液抗原의 7Kd抗原은 species-specific하다고 보고 되었으나(Gottstein, et al., 1986⁹⁾; Cho, et al., 1987¹¹⁾) 민감도는 비교적 낮아서 양성자의 2/3에서만 반응한다(Cho, et al., 1987)¹¹⁾인데에 문제가 뒤따른다. 물론, immunoblot법은 primary diagnosticuse 보다는 2차적인 confirmative diagnosis의 도구로 이해할 수 있겠지만 그 경우에도 좀 더 높은 민감도를 요구하게 되는 것은 틀림이 없다.

이러한 문제에 있어서 抗原은 결국 총체나 총체대사산물에서 얻을 수 밖에 없는 것이므로 가장 강한 항원성을 보이는 항원 부위를 찾고자 하는 것은 필연적일 수 밖에 없다. 이에 접근해 가는 방법으로 螢光抗體法이 기술을 기초로 한 각종 組織化學的研究方法이 있을 수 있고 본 연구와 같은

형식의 fractionation을 통해 가장 민감성, 특이성이 있는 抗原fraction을 찾는 방법이 있을 수 있겠다. 이와 같은 방법을 통해 총체의 각 fraction을 비교하고 가장 강한 fraction을 찾아내어 보다 발전된 연구방법에 적용시킬 수 있다. 연구결과 immunoblot에서 63Kd의 항원대가 가장 강하게 나타난 CyL₅는 100000×G 침사물의 urea soluble 抗原으로서 一般的인 subcellular organism의 centrifugal fractionation법에 의하면 microsomal fraction에 해당하나 본 연구의 추출물이 과연 microsomal fraction인지의 여부는 아직 불분명하다. 이에 관하여는 앞으로 좀 더 연구가 진행되어야 할 필요가 있다고 본다. 여하튼 囊尾蟲囊液을 위시해서 모든 총체fraction에서 抗原성이 發見되는 것은 確實하며 그 중 63Kd항원대가 CyL₅에 농축되어 있는 것이므로 63Kd항원대의 유용성이 재검토되고 나서야 이 항원의 유용성에 관한 것도 평가할 수 있을 것 같다.

結 論

SDS-PAGE 및 EITB를 이용하여 유구낭미충증 진단에 있어서 여러가지 抗原의 효용성을 검토할 목적으로 囊尾蟲의 囊液抗原(CyF₁), 囊液을 제외한 幼蟲抗原(CyL₁), 그리고 幼蟲부유액의 480×G 침사물(CyL₂), 7,650×G 침사물(CyL₃), 100,000×G 침사물의 urea soluble 抗原(CyL₄), CyL₄의 n-butanol 처리抗原(CyL₅) 및 100,000×G 上層液(CyL₆)에 대한 囊尾蟲感染血清 및 기타 윤충류 감염혈청의 반응을 對照血清과 比較檢討하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 각 抗原에 대한 ELISA檢査에 있어서 CyF₁은 양성혈청/음성혈청의 O.D.치 비가 10.6으로 7개 抗原중에서 가장 높았으며 CyL₃~5의 抗原은 5.2~5.5로 매우 낮았다.
2. 가장 민감한 항원대인 63Kd抗原帶를 중심으로 볼 때, SDS-PAGE에서 CyL₄ 및 CyL₅는 CyL₁~3 및 CyL₆에 비해서 강한 착색을 하여 구성단백분획중 63Kd의 항원대가 차지하는 비율이 가장 높음을 알 수 있었다.
3. EITB결과 CyL₄~5의 63Kd 항원대는 다른 항원에

비해 낭미충감염혈청에 대해 가장 강하게 반응하였다.

또한 CyL₅는 다른 항원에 비해 非特異反應이 나타나는 80~91Kd 및 116~200Kd 항원대의 반응이 감소되었다.

4. ELISA에서의 양성/음성혈청의 ELISA값의 비가 낮음에도 불구하고 CyL₅는 immunoblot상 ELISA의 cut-off value에 있는 혈청을 양성으로 판정할 수 있었으며 또한 僞陽性處理된 광절열두조충, 스파기눔 및 포자충감염혈청을 감별진단해 낼 수 있었다.

이상의 결과로 보아 CyL₅는 CyF₁과 더불어 囊尾蟲症의 immunoblot진단에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

References

- 1) Arambulo PV, Walls K, Bullock S and Kagan IG : *Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)*. *Acta Tropica* 15 : 63, 1978
- 2) Diwan AR, Cocker-Vann M, Brown P, Subianto DB, Yolken R, Desowitz R, Escobar A, Gibbs CJ and Gajdusek DC : *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of Taenia solium*. *Am J Trop Med Hyg* 31(2) : 364, 1982
- 3) Cho SY, Kim SI, Kang SY, Choi DY, Suk JS, Choi KS, Ha YS, Chung CS and Myung H : *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in serological diagnosis of human neurocysticercosis using samples of serum and cerebrospinal fluid* *Korean J Parasit* 24 : 25, 1986
- 4) Flisser A, Perez-Mounfort R and Larralde C : *The immunology of human and animal cysticercosis. A review*. *Bull WHO* 57(5) : 839, 1979
- 5) Choi BK, Kim SI, Kang SY and Cho SY : *Evaluation of antigens from different parts of Cysticercus cellulosae in serological diagnosis of human cysticercosis*. *Chung-Ang J Med* 11 : 135, 1986
- 6) Panuntemer, MD, and Rossouw EJ : *The value of an antigenic fraction of Cysticercus cellulosae in the*

- serodiagnosis of cysticercosis. *Ann Trop Med Parasit* 81(2) : 117, 1987
- 7) Towbin H, Staehelin T and Gordon J : *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl Acad Sci USA* 76 : 4350, 1979
 - 8) Grogl M, Estrada JJ, MacDonald, G and Kuhn RE : *antigen antibody analysis in neurocysticercosis. J Parasit* 71(4) : 433, 1985
 - 9) Gottstein B, Tsang VCW, Schantz, PM : *Demonstration of species specific and Cross reactive components of Taenia solium metacestodes antigens. Am J Trop Med Hyg* 35(2) : 308, 1986
 - 10) Larralde C, Lacleste JP, Owen CS, Madrazo I, Sandoval M, Boualil R, Sciutto E, Contreras L, Arzate J, Diaz AL, Govezensky T, Montoya RM, and Good-said F : *Reliable serology of Taenia solium cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid : ELISA and Hemagglutination test. Am J Trop Med Hyg* 35(5) : 965, 1986
 - 11) Cho SY, Kang SY and Kim SI : *Analysis of antigen specificity using monoclonal and polyclonal antibodies to Cysticercus cellulosae by enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques. Korean J Parasit* 25(2) : 159, 1987
 - 12) 朱昞煥 · 姜星鎬 · 李駿商 · 林漢鐘 : 유구낭미충증 진단에 있어서 특이항원내의 증명에 관한 연구. *高醫大論集* 24(3) : 139, 1987
 - 13) 김창환, James Yang : 낭미충(Cysticercus)과 스파가눔(Sparganum)에서 추출한 조항원의 면역학적 특성 및 면역진단에의 응용. I. 낭미충에서 추출한 조항원 성분의 면역학적 특성. *기생충학잡지*, 26(4) : 245, 1988
 - 14) 許南鎮 · 朱昞煥 · 林漢鐘 : 유구낭미충증의 血清學的 診斷에 있어서 酵素免疫電氣泳動blot법의 有效性에 관한 연구. *高醫大論集* 25(1) : 375, 1988
 - 15) Kong Y, Kang SY, Cho SY and Min DY : *Cross reacting and specific components in cystic fluid from metacestodes of Echinococcus granulosus and Taenia solium. Korean J Parasit* 27(2) : 131, 1989
 - 16) Bradford MM : *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem* 72 : 248, 1976
 - 17) Voller A, Bidwell DE and Bartlett A : *The enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe (ed.). 1979*
 - 18) McLaren M, Draper CC, Roberts JM, Minter-Goedbloed E, Lightart, GS, Teesdale, CH, Amin MA, Omer AHS, Bartlette A and Voller A : *Studies on the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) test for Schistosoma mansoni infections. Ann Trop Med Parasit* 72 : 243, 1978
 - 19) Tsang VCW, Peralta JM and Simons, AR : *Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques(EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by electrophoresis. Methods enzymol*, 92 : 377, 1983
 - 20) Merrill, CR, Goldman D, Sedman SA and Eber^MH : *Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gel shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins. Science* 211 : 1437, 1981
 - 21) Tsang VCW, Bers GE and Hancock K : *Enzyme-linkedimmunoec trotransfer blot(EITB) in Enzyme-mediated immuno assay Ed, TT Ngo and HM Lenhoff, Plenum publishing Corporation 1985*
 - 22) Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Diaz ML, Govezensky T and Coltorti E : *Deciphering western blots of tapeworm antigens(Taenia solium, Echinococcus granulosus and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am J Trop Med Hyg* 40 : 282, 1989