

면역황금표지법에 의한 일록춘폐흡충의 발육단계별 항원성부위

김훈식¹⁾, 이옥린^{2)*}

대전 중앙내과의원¹⁾ 및 순천향대학교 의과대학 기생충학교실²⁾

국문초록: 일록춘폐흡충(*Paragonimus iloktsuenensis*)의 표피층, 장상피층 및 난황선의 조직항원성을 발육단계별로, 면역황금표지법(immunogold labeling method)으로 관찰하였다. 일록춘폐흡충으로 감염된 흰쥐(Sprague-Dawley)로 부터, 감염후 2주, 3주, 4주, 5주 및 33주에 적출한 총체를 항원으로 사용하였고, 감염 후 10주의 흰쥐혈청을 항체로 사용하였다. 조직항원성은 조직에 표지된 황금입자로 판정하였다. 표피층은 유약층으로부터 성층에 이르는 발육과정중 전반적으로 황금입자 표지가 많지 않았고, 총체가 성숙되어감에 따라서 황금입자 표지가 다소 드물어지는 경향이 있었으나, 총체 개체별 항원 강도에 차이가 많았다. 장상피층과 난황선은 총체의 발육단계에 관계없이 많은 수의 황금입자가 표지되어 강한 항원성을 나타내었다. 이 실험의 결과, 일록춘폐흡충의 표피층, 장상피층, 및 난황선은 중요한 조직항원 부위로 보이나, 표피층은 항원성이 낮은 편이고, 발육단계 및 개체별로 항원강도에 차이가 있었다. 장상피층 및 난황선도 개체별로 황금입자 표지강도에 다소의 차이는 있었으나 총체의 발육단계에 관계없이 계속해서 강한 항원성이 유지되는 조직부위로 보인다.

서 론

일록춘폐흡충은 인체감염이 보고된 예는 없으나 동물감염실험(Lee et al., 1989a)에 의해 인체감염의 가능성이 있다고 하며, 총란으로는 폐흡충과 감별이 쉽지않은 이충의 총체 추출물 항원은 폐흡충을 비롯한 폐흡충류들(*Paragonimus sp.*)과 많은 공통항원성 물질을 갖고 있고(Kojima et al., 1983), 교차면역반응도 보고되었다(Yoshimura et al., 1969; Lim et al., 1990). 폐흡충증 진단에 총란검출 이상으로 간접면역진단이 이용되어 온 것은 총란검출이 쉽지않은 반면 면역반응 감수성이 예민한 때문이라고 할 수 있겠다. 한국에서는 Walton and Chyu(1959)의 폐 및 간흡충의 피내반응을 최초로 폐흡충의 면역반응이 시작되었다. 초기에는 폐흡충의 추출물 또는 분비-배설물의 수용성 조항원이 사용되었고, 감수성도 높았으나(Chyu and Lee, 1961; Kim et al., 1982; Lee and Choi, 1983) 다른 기생충과 빈번한 교차면역반응으로, 보다 특이성이 있는 항원이 요구되어 왔다. 특이성을 찾기

위한 수용성 항원의 제조방법 및 면역반응 방법이 나왔으나(Chyu and Kim, 1965; Lee and Chang, 1986; Joo et al., 1989; Lee et al., 1991; Yong and Yeo, 1992) 특이성 증명에는 미흡하였다. 최근에는 면역전자현미경적 관찰에 의한 총체의 조직부위별 항원으로서, 수용성 항원의 유래를 규명하고자 시도되고 있다. Lee et al(1989b) 및 Kong et al(1992)은 폐흡충의 주된 항원성 물질은 장관 및 총란에서 유래되었을 것으로 지적한 바 있고, Kwon et al(1991) 및 Rim et al(1992)은 총체의 발육에 따라서 총체조직내 항원 분포의 변화를 보고한 바 있다. 흡충류의 조직 가운데, 표피층, 장상피층 및 난황선은 중요한 항원성부위로 보고된 바(Sung et al., 1988; Kwon et al., 1991; Ahn et al., 1991; Rim et al., 1992; Nam, 1994) 있다.

이 연구는 면역황금표지법(immunogold labeling method)에 의해서 일록춘폐흡충의 표피층, 장상피층 및 난황선의 조직 항원성을 총체의 발육단계별로 항원분포 및 항원강도 변화를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 일록춘폐흡충 감염

항원으로 사용한 일록춘폐흡충은 실험감염된 흰쥐(Sprague-Dawley)로 부터 얻었다. 경남 하동지

• 논문접수 1995년 10월 6일, 수정 후 게재 확정 11월 9일.

* 별책 요청 저자

역에서 채집한 말뚝게(*Sesarma dehaari*)로 부터 일록춘폐흡충의 피낭유충을 적출하여, 피낭유충의 탈낭직후의 유충을 체중 150-200그램 되는 흰쥐에 50마리씩 경구로 주입하여 감염시켰다.

2. 항 원

일록춘폐흡충의 유충을 흰쥐에 투입한 후, 2주, 3주, 4주, 5주 및 33주의 총체를 흰쥐의 폐장에서 적출하여 총체조직항원 재료로 사용하였다.

3. 감염혈청

탈낭직후의 유충을 흰쥐에 주입시킨 후 2주 간격으로 채혈하여 혈청을 분리하였고, 감염혈청 중에서 한천이중화산반응과 효소면역반응에 의한 예비실험에서, 일록춘폐흡충 총체 추출물 항원에 대한 강한 항체반응을 나타낸, 감염 후 10주의 혈청을 사용하였다. 예비실험에서, 단백질농도 21 mg/ml의 총체 추출물 항원과 감염 혈청의 한천이중화산반응에서는 강한 염색농도의 침강대를 만들었고, 1:200으로 희석한 혈청과 항원 10 ug/ml 및 1:10,000으로 희석한 anti-rat IgG peroxidase goat conjugate (Sigma, A9037)의 효소면역반응(ELISA)에서 OD 값(optical density value)은 1.6(양성 > 0.8)이었다. 건강한 정상 흰쥐의 혈청을 대조혈청으로 사용하였다.

4. 조직항원

전자현미경적 미세조직의 항원 부위를 관찰하기 위한 조직은 Aikawa and Atkinson(1990)의 방법에 따랐다. 0.2% glutaraldehyde와 1% paraformaldehyde를 혼합한 고정액(pH 7.4)으로, 총체의 크기에 따라서 4°C-6°C에서 2-3시간 고정한 후, 0.1 M phosphate buffer로 4°C-6°C에서 하루밤 세척하였다. -20°C에서 알콜탈수 과정을 통과한 후, 50% LR-White Resin에 넣어 4°C에서 2시간 동안 처리하고, LR-White Resin 원액(Polysciences, Inc. Cat 17411)에 넣어서 하루밤(4°C-6°C) 방치하였다. 총체는 LR-White Resin과 함께 겔라틴캡슐에 넣어서 일부는 40°C 부탄기에서 5일간 경과로 포매되었고, 일부의 조직캡슐은 -20°C에서 3-5일 동안 자외선 조사로 포매되었다. 포매된 총체는 ultramicrotome으로 70Å 두께로 조직박편을 만든 후 니켈그리드(200 mesh)에 부착시켰다.

5. 조직항원의 면역반응

그리드에 부착된 일록춘폐흡충의 박편조직과 감염 흰쥐 혈청의 항원-항혈청반응은 Aikawa and Atkinson(1990)의 면역황금표지방법에 따라서 진행하였다. 조직은 phosphate buffer(pH 7.2)에 0.01% tween 20과 0.1% bovine serum albumin

이 포함된 PGB 용액에서 10분간씩 2회 통과시킨 후, 1:500으로 희석한 감염혈청으로 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 실온에서 PGB 용액으로 세척한 후, 1% anti-rat IgG goat gold conjugate(10 nm, Sigma G2522)로 37°C에서 1시간 동안 반응시켰고, 일부는 goat gold conjugate 대신 1% protein A gold colloidal particles(10 nm, Sigma P1039)을 사용하였다. 실온에서 PGB와 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 세척한 후, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 1% glutaraldehyde가 포함된 용액으로 10분간 실온에서 고정하였다. 0.1 M phosphate buffer와 증류수로 세척한 후 건조하여 전자현미경으로 관찰하였다.

실험성적

1. 전자현미경적 조직조건

일록춘폐흡충 감염 흰쥐로 부터 각각 2주, 3주, 4주, 5주 및 33주에 적출한 발육 단계별 총체 중 감염 후 4주 발육총체들은 총체 개체에 따라서 생식기가 거의 발육되지 않은 총체로 부터 성충으로 발육된 것 등으로 다양한 발육상태를 나타내고 있었다. 이 실험에서 사용한 4주 발육총체는 거의 성충과 유사한 총체들이었다. 이 실험에서 두가지 포매방법에 의한 박편조직의 뚜렷한 구조적 차이는 없었다.

1) 표피

표피층의 표면은 불규칙한 오철상의 굴곡을 나타내고 있었으며, 표피 합포체 내측으로 기저막이 있었고, 기저막 내측으로 환상근과 종주근층이 있었으며, 그 내측으로는 사립체를 많이 포함하고 있는 표피세포가 놓여 있었다(Fig. 1a & b). 표피 합포체(tegumental syncytium)의 세포질내에는 크기와 모양이 다양한 많은 사립체를 포함하고 있었으며 구형 또는 타원형의 전자밀도가 다른 분비과립들이 산재해 있었고, 분비과립과 사립체 주위에는 조면형질 내세막(rough endoplasmic reticulum)이 분포되어 있었다(Fig. 1c). 발육단계별로 표피합포체의 구조에 특별한 차이는 없었으나 2주 발육 총체의 표피 합포체내의 사립체들은 기저막까지 합포체 전체에 균일하게 분포되어 있었으나, 합포체의 면적이 넓은 성숙한 총체에서는 사립체는 기저막 부근에는 표피 표면에 비해 드물었다. 주로 표면 가까운 부위에 많이 분포되어 있었다.

2) 장상피층

장상피층의 세포질내에는 기저막 부근까지 풍부한 분비과립과 사립체, 조면형질 내세막을 포함하고 있었다. 주로 둥글고 크기가 다양한 분비과립들이 산재해 있었고, 주위에 있는 사립체 보다 큰 과립들이 많았고, 장내강으로 돌출되어 있는 세포질돌기(cytoplasmic protrusion)들은 모든 발육단계의 장상피조직에서 대체로 긴 돌기들을 만들고 있었다.

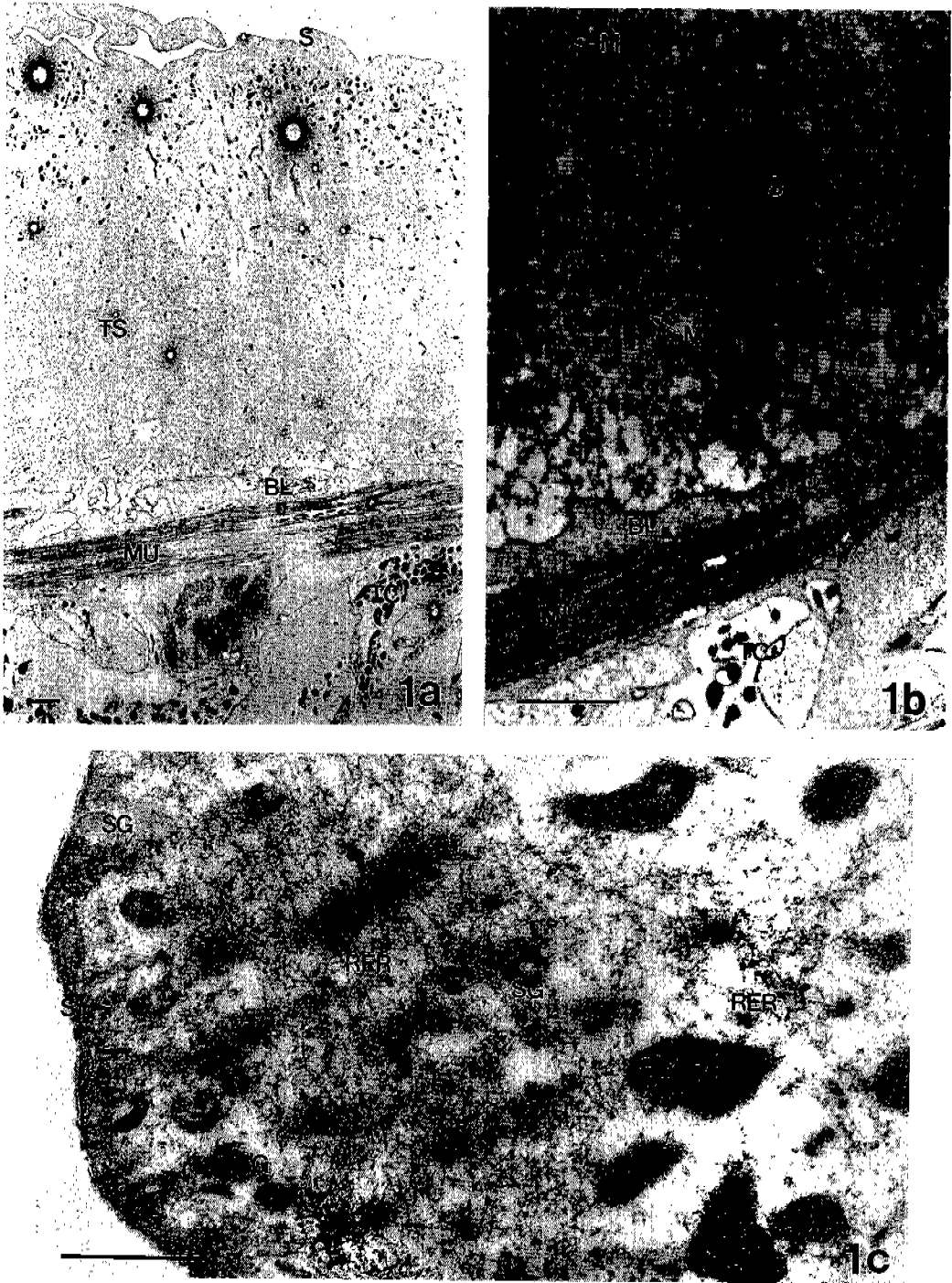


Fig. 1. Tegument of *Paragonimus iloktsuenensis* on electronmicrograph. **a:** Showing tegumental surface (S), tegumental syncytium (TS), basal lamina (BL), muscle (MU), tegumental cell (TC) in 33 weeks developmental worm. Bar = $0.5 \mu\text{m}$ ($\times 2,400$) **b:** Magnification of Fig. 1a. M: mitochondria bar = $0.5 \mu\text{m}$ ($\times 8,400$) **c:** Tegumental syncytium of 5 weeks developmental worm. Showing the numerous secretory granules (SG), mitochondria (M), and rough endoplasmic reticulum (RER). Bar = $2 \mu\text{m}$ ($\times 48,000$).

이들 세포질돌기의 형태의 차이는 총체의 발육단계와는 관계없는 것 같았고, 총체 개체 또는 조직부위의 차이로 보인다(Fig. 2).

3) 난황선

난황선은 3주 발육총체에서는 총체 개체에 따라서 드물게 볼 수 있었고, 4주 및 5주 발육 총체에서는 총체에 따라서 발달상태가 다양하였다. 잘 발달된 난황선의 난황소엽(vitelline lobule)들은 다양한 크기로 구성되어 있었고(Fig. 3a). 이들 각각의 난황소엽들은 일정하지 않은 발육상태로 일정하지 않은 수의 난황세포(vitelline cell)들의 집합체로 구성되어 있었다. 난황세포는 크고 뚜렷한 핵소체와 큰 핵을 가졌고, 핵 주위에는 조면형질내세망이 풍부하게 분포되어 있었다. 세포질내에는 다양한 분열상을 나타내고 있는 전자밀도가 높은 난황구(vitelline globule)들을 많이 포함하고 있었다. 조면형질내세망은 세포질 전체에 발달되어 있었다(Fig. 3b). 난황구들은 다양한 크기로, 다양한 수의 분열상태를 나타내고 있었다(Fig. 3c).

이상의 발육단계별로 표피층, 장상피층 및 난황선을 관찰한 결과를 종합하면 표피층의 구조는 전체적으로 발육단계별로 큰 차이가 없었으나 충분히 발육된 33주 발육총체에서는 표피층의 표면이 다소 두꺼웠고, 표피합포체내의 사립체는 2주 발육 총체에서는 합포체 전체에 균일하게 분포되어 있었으나 발육시기가 경과함에 따라서 사립체는 표면쪽에 비해서 기저막쪽에는 드물었다.

장상피조직의 구조는 발육단계별로 별 차이가 없었으며 모든 발육단계의 장상피 조직층에는 크고 작은 많은 분비과립이 있었고 장내강을 향해 가늘고 긴 세포질 돌기들이 돌출되어 있었다.

난황선은 2주 발육 총체에서는 거의 발달되지 않았고, 3주, 4주 및 5주 발육 총체의 난황선의 발육 정도는 다양하나 시일이 경과될수록 발달되어 있었으며 5주 발육 총체에서는 잘 발달된 난황선을 포함한 총체가 많았다. 33주 발육 총체의 난황선은 잘 발달되어 있었다.

2. 조직 부위별 항원성

일록춘폐흡충(*Paragonimus iloktsuenensis*)의 발육단계별 총체의 표피조직, 장상피조직 및 난황선의 조직항원성은 예비실험에서 항체가 높은 일록춘폐흡충 감염 10주의 항혈청과 면역황금표지법에 의해서 조직세포에 분포된 황금입자의 표지로 판정하였다. 두가지 conjugate를 사용한 이 실험에서 조직 항원성의 차이는 볼 수 없었으나 anti-rat IgG goat gold conjugate를 사용한 조직은 황금입자들이 집합적으로 관찰되는 예가 많았고(Fig. 13). 대조군에도 황금입자가 소수 부착되었으나, protein A gold colloidal particles를 사용한 조직에서는 황금입자가 개별적으로 조직에 부착되었고 대조군에서는

황금입자가 부착되지 않았다. 황금입자 표지는 조직 1 μm^2 당 황금입자 수치로 표시된 항원성의 강도가 비교되었다.

1) 표피

총체의 표피조직과 항혈청 반응에서는 주로 표피합포체에 황금입자가 표지되어 있었다. 표피합포체의 세포질내에도 소수의 황금입자가 표지되었다. 기저막과 근층에는 황금입자가 표지되지 않았거나 개체에 따라 드물게 보였고, 표피합포체와 표피세포가 연결된 세포질과 표피세포에는 황금입자가 드물게 표지되었다. 2주 발육총체의 표피합포체에는 3주 이후의 발육총체의 표피합포체에 비해서 다소 많은 황금입자가 표지되었고(4 ± 0.5), 주로 분비과립내에 표지된 이들 황금입자들은 표피표면쪽에 다소 많았다(Fig. 4).

감염후 3주, 4주 및 5주 발육총체의 표피합포체에는 1 μm^2 당 각각 2 ± 0.5 , 2 ± 0.5 , 2 ± 0.5 개로서, 2주 발육총체 보다 다소 드물게 황금입자가 표지되었고, 이들 황금입자의 표지강도는 차이가 없었다(Fig. 5, 6 & 7). 감염후 33주 발육총체의 표피합포체에는 3주, 4주 및 5주 발육총체에서 보다 분비과립에 드물게 황금입자가 표지된(0.6 ± 0.5) 개체(Fig. 8a)와 2주 발육총체의 표피조직과 유사하거나 보다 많은 황금입자가 표지된(5.0 ± 0.5) 개체가 있었다(Fig. 8b). 대체로 완전히 발육된 총체의 표피층에서는 유약층에서 보다 항원성이 다소 감소되었으나 총체 개체에 따라서 항원강도에 차이가 있었다.

2) 장상피

모든 발육단계의 장상피층은 감염된 원취 혈청반응에서 많은 수의 황금입자가 표지되어 비감염 혈청반응과 잘 구별되었다. 감염혈청과의 반응에서 장상피 세포내에 산재해 있는 다양한 크기를 가진 많은 원형 또는 타원형의 분비과립들에는 다수의 황금입자가 표지되었다. 1 μm^2 내 황금입자 표지수는 2주 17 ± 1 (Fig. 9), 3주 15 ± 1 (Fig. 10), 4주 18 ± 1 (Fig. 11), 5주 17 ± 1 (Fig. 12), 33주 17 ± 1 (Fig. 13)로 크기와 전자밀도가 다른 이들 분비과립들의 황금입자 표지강도에는 차이가 없었다. 장체강내의 내용물에도 황금입자가 표지되었다(Fig. 14).

3) 난황선

여러개의 난황세포들로 구성된 난황선의 난황소엽들에서는 난황세포질내에 산재해있는 분할상태가 다양한 난황구에 황금입자가 표지되었다. 난황세포의 세포질내에도 드물게 황금입자가 표지되었으나 주로 난황구의 분열구 사이의 원형질내에 많은 황금입자가 표지되었다. 발육단계별로 3주 발육 총체의 난황구(Fig. 15)에는 황금입자가 적게 표지되었으나(2 ± 1), 4주 9 ± 1 (Fig. 16), 5주 10 ± 1 (Fig. 17), 33주 9 ± 1 (Fig. 18)의 황금입자가 표지되

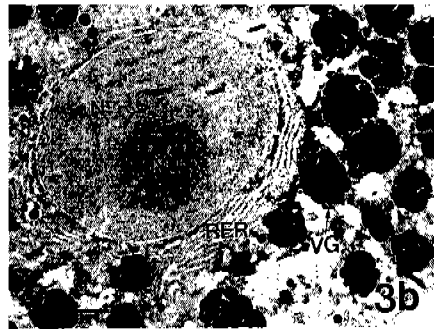
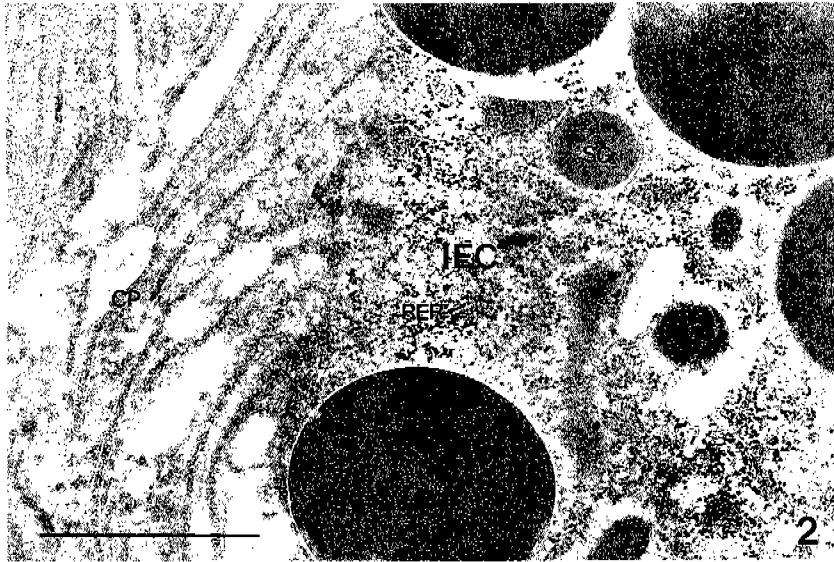
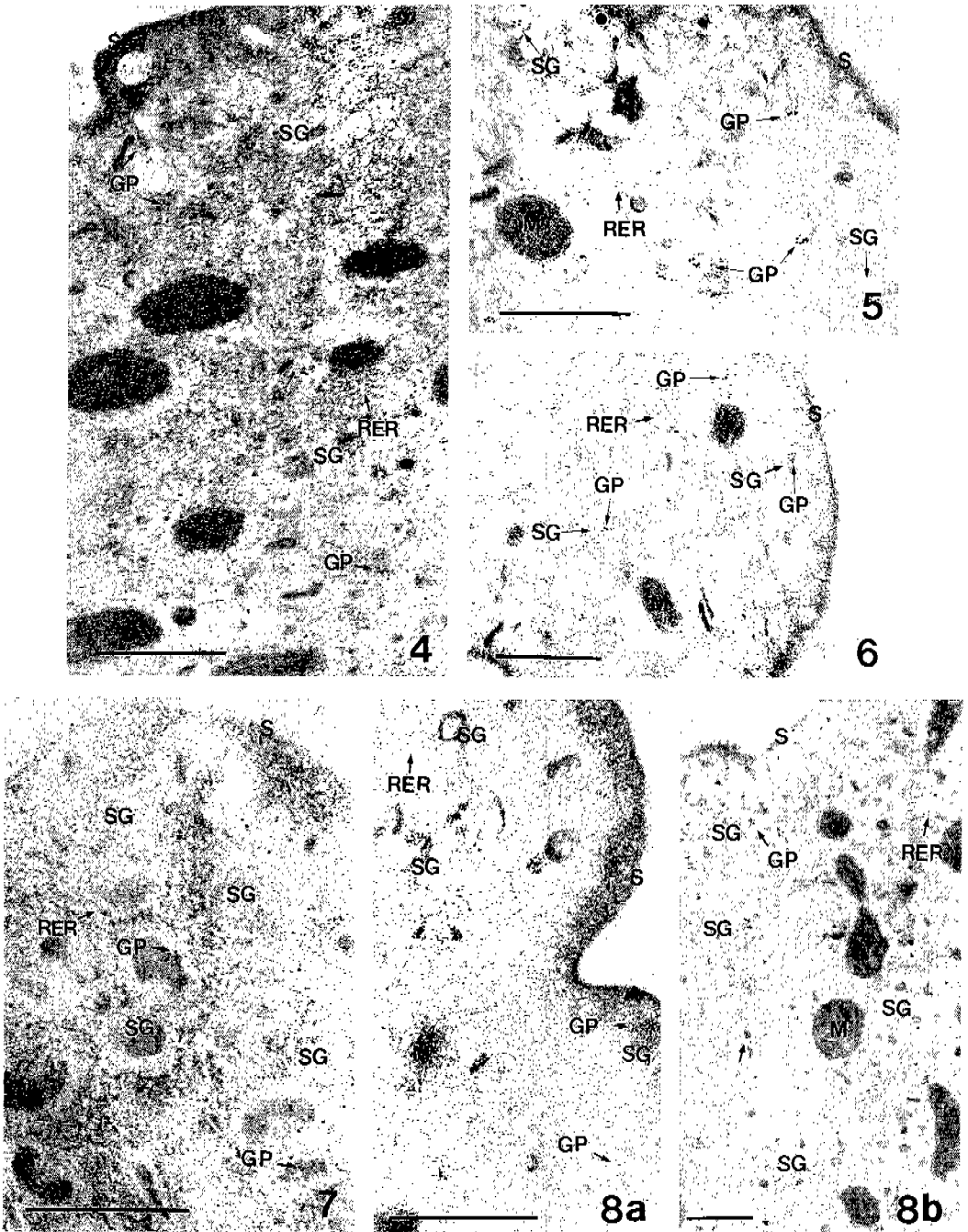
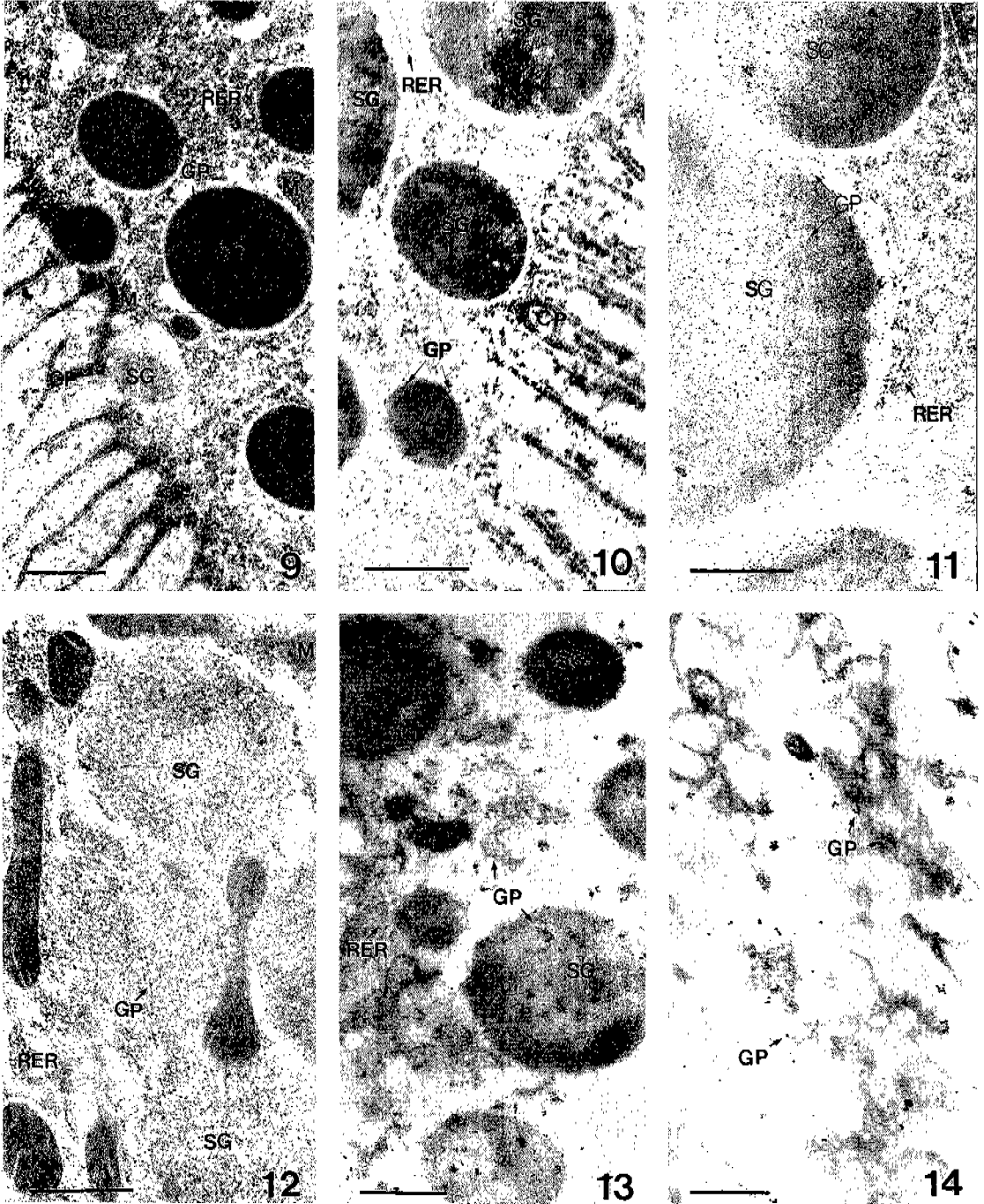


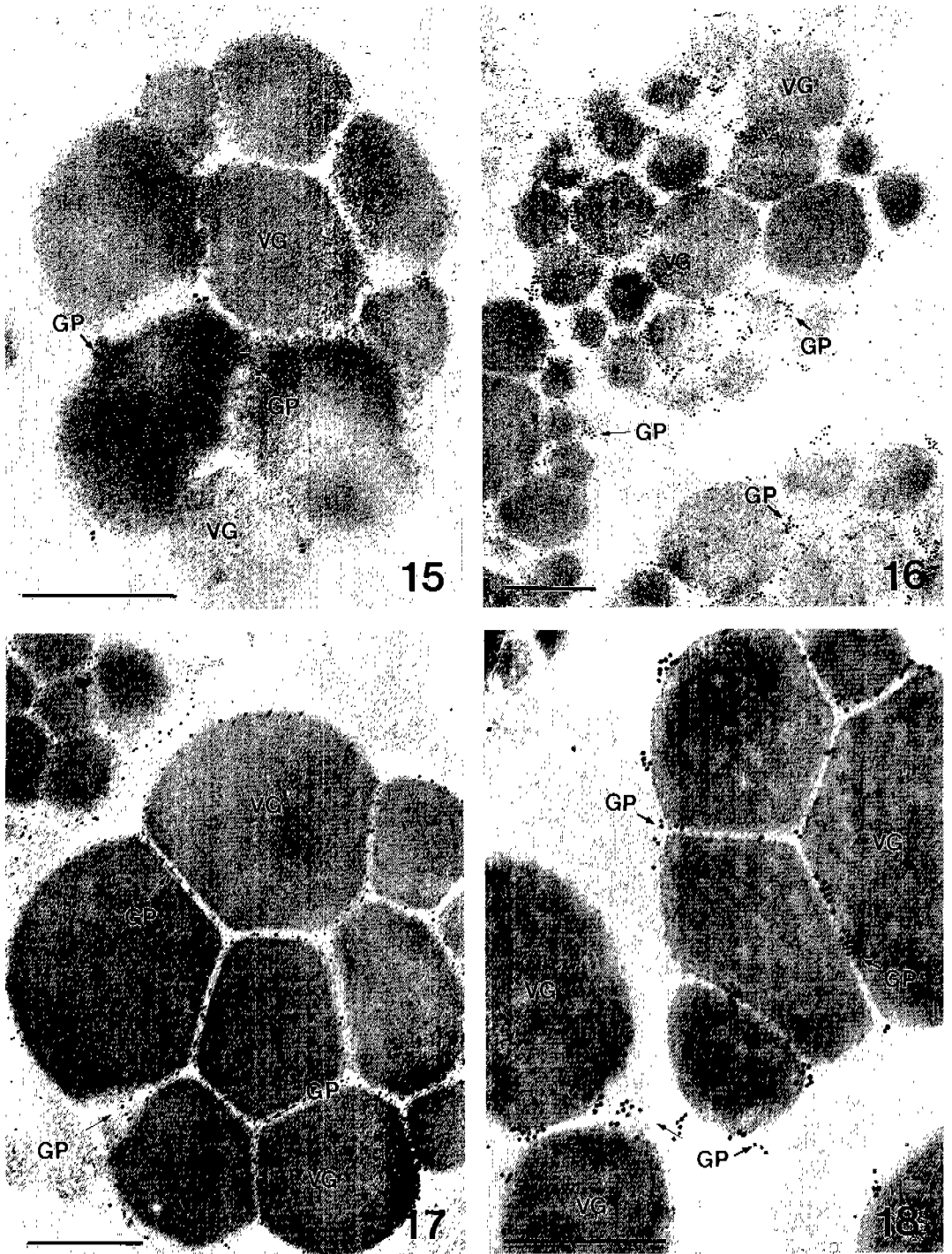
Fig. 2. Intestinal epithelium of *P. iloktsuenensis* on electronmicrograph. Numerous secretory granules of several size are located in the cytoplasm of intestinal epithelial cell (IEC), and long slender cytoplasmic protrusion (CP) is projected toward intestinal lumen, the RER is well developed. 5 weeks developmental worm. Bar = 1 μm (\times 39,000). **Fig. 3.** Vitelline gland of *P. iloktsuenensis* on electronmicrograph. **a:** Vitelline lobules (VL) of 33 weeks developmental worm. Each vitelline lobules is composed of vitelline cells (VC) of various developmental stage. Bar = 0.5 μm (\times 6,000). **b:** Vitelline cell (VC) of 33 weeks developmental worm. In well developed vitelline cell, numerous vitelline globules (VG) are located in cytoplasm, and a large amount of RER are surrounded nucleus (N). NU: nucleolus. Bar = 1 μm (\times 12,000). **c:** Vitelline globules (VG) of 33 weeks developmental worm. Showing the cleaved vitelline globules. Bar = 1 μm (\times 24,000).



Figs. 4-8. Tegumental syncytium in several developmental stages of *P. iloktsuenensis* on electronmicrograph by immunogold labeling method using *P. iloktsuenensis* infected rat serum. Gold particles (GP) are labeled mostly on the secretory granules (SG) in cytoplasm. Bar = 2 μ m. **Fig. 4.** 2 weeks worm ($\times 48,000$). **Fig. 5.** 3 weeks worm ($\times 48,000$). **Fig. 6.** 4 weeks worm ($\times 39,000$). **Fig. 7.** 5 weeks worm ($\times 60,000$). **Fig. 8a.** 33 weeks worm ($\times 54,000$). **Fig. 8b.** 33 weeks worm ($\times 24,000$). *a and b are different worms. In the b worm, a number of gold particles are labeled in similar density with those in the 2 weeks worm.



Figs. 9-14. Intestinal epithelium in different developmental stages of *P. iloktsuenensis* on electronmicrograph by immunogold labeling method using *P. iloktsuenensis* infected rat serum. Gold particles are abundantly labeled on secretory granules, and on cytoplasmic protrusions (CP). Bar = 2 μ m. **Fig. 9.** 2 weeks worm ($\times 30,000$). **Fig. 10.** 3 weeks worm ($\times 39,000$). **Fig. 11.** 4 weeks worm ($\times 39,000$). **Fig. 12.** 5 weeks worm ($\times 39,000$). **Fig. 13.** 33 weeks worm ($\times 33,000$). **Fig. 14.** Intestinal luminal contents of 33 weeks developmental worm. Gold particles in vitelline globules were concentrated in protoplasm among cleavaged globules.



Figs. 15-18. Vitelline globules in different developmental stages of *P. iloktsuenensis* on electronmicrograph by immunogold labeling method using *P. iloktsuenensis* infected rat serum. Gold particles are labeled on the protoplasm between vitelline globules. Bar = 3 μ m. **Fig. 15.** 3 weeks worm (\times 84,000). **Fig. 16.** 4 weeks worm (\times 48,000). **Fig. 17.** 5 weeks worm (\times 60,000). **Fig. 18.** 33 weeks worm (\times 84,000).

어, 4주 이후 발육충체의 난황구들에는 많은 수의 황금입자가 표지되었다. 4주 이후 발육단계별로 황금입자표지 강도에 큰 차이가 없었다.

고 찰

일록촌폐흡충(*Paragonimus iloktsuenensis*)의 총체추출물항원은 폐흡충(*P. westermani*)과 많은 공통항원성 물질을 갖고 있다(Kojima et al., 1983; Lim et al., 1990). Yoshimura(1969)는 종류가 다른 수종의 폐흡충 총체추출물을 전기영동방법으로 비교하여 많은 동일분자량의 단백질을 관찰하였다. Tsuji(1975)는 기생원충류들의 총체추출물 항원의 면역동물실험으로 분류학적으로 가까운수록 공통적인 항원을 많이 갖고 있었고, 문(phylum)이 다른 종류들에서도 소수의 공통항원이 있다고 하였다.

이 실험에서는 폐흡충의 총체조직 중에서 발육단계별로 항원성의 변화가 제기되고 있는 총체표피층과 강한 항원성이 인정되고 있는 장상피조직층 및 난황선에 대해서 일록촌폐흡충의 발육단계별로 감염 혈청과의 반응으로, 이들 조직의 항원성을 관찰한 바, 표피층은 발육단계 및 총체의 개체에 따라 항원성에 차이를 나타내고 있었다. Lim et al. (1990)은 일록촌폐흡충 감염 흰쥐 혈청과 총체 추출물 항원의 효소면역반응에서 항체가는 계속 상승하여 10주 이후 비등한 항체가를 유지한다고 한바, 대체로 일록촌폐흡충의 항체는 흰쥐에서는 감염 10주면 최고치의 항체가를 나타낸다고 볼 수 있겠다. Fujino et al.(1989)은 오히라폐흡충(*P. ohirai*)의 숙주내에서의 발육과정중 피낭유충 및 유약충의 세포막에는 면역황금입자가 표지되나 성충의 표피층에 황금입자가 드물게 표지되는 것은, 유약충의 표피에서는 항원과 연합된 glyocalyx의 전원이 가장 활발하게 일어나기 때문이며 낭(cyst)내에 갇히게 된 성충의 표피에서는 항원 분비가 감소되거나 정지되기 때문이라고 한바 있다. 앞서 보고된 폐흡충의 표피항원 분포에서도 유약충에서는 항원성이 강하나 성충에서는 항원성이 크게 약화되거나 없는 것으로 보고되어(Lee et al., 1989b; Kwon et al., 1991; Kong et al., 1992; Rim et al., 1992). Fujino et al.(1989)의 주장과 일치하였다.

이 실험에서는 3주 이후 발육된 일록촌폐흡충의 표피층에 비해서 2주 발육 총체의 표피에서 다소 많은 황금입자가 표지되어, 앞서의 보고들과 부분적으로는 일치되나, 개체에 따라서는 감염기간이 오래된 감염 33주 성충체의 표피층에서 유약충과 유사하거나 보다 강한 항원성을 나타내어, 일록촌폐흡충 표피층의 항원성은 발육단계에 의한 차이외에 총체 개체가 있는 것으로 보인다. Mckerrow and Doenhoff(1989)는 주혈흡충은 숙주체내에서 발육하는 동안 그들의 다기능적인 효소는 발육단계에 따

라서 필요한 효소(항원으로서)를 방출하며, 이들 항원은 항상 총체를 자극할 만큼만 존재한다고 한 바 있다. 항원생산은 숙주체내에서 총체가 처한 상황에 따라 어느 정도 증감이 가능한 것으로 보인다. 일록촌폐흡충의 흰쥐 폐장에서의 감염양상은 고양이 및 개에 감염된 폐흡충과 같이 잘 발달된 낭벽(cyst caepute)을 가진 총낭은 많지 않았고, 많은 총낭의 낭벽은 얇거나 총낭을 열기 전에 빠져 나온 총체들을 흔히 볼 수 있었다. 폐흡충 성충표피층의 항원성의 약화가 낭벽때문이라면 이 실험에서 관찰된 것과 같이 충분히 발육된 성충의 표피층의 항원성이 유약충의 표피에서와 유사하게 나타난 것은 숙주체내에서의 총체의 위치 또는 노출상태에 따른 차이가 아닌가 생각된다. Sung et al.(1988) 및 Chu et al. (1990)은 간흡충의 성충 표피층에서 강한 항원성을 관찰하였고, Ahn et al.(1991)은 오꼬가와 흡충의 성충 표피층에서 강한 항원성을 보고한 바 있다. 피낭에 들어있지 않은 이들 흡충의 성충 표피는 강한 항원성을 나타낸 것을 보면, 숙주조직으로 형성된 폐흡충의 총낭내의 총체는 숙주의 항체로부터 상당히 격리되나 총낭에 들어있지 않은 성충 또는 총낭에서 탈출된 총체 표피층의 항원성은 총체 표피와는 다를 것으로 생각된다.

수 종류 흡충의 장상피층의 항원성은 강한 것으로 보고된바 있다(Sugiyama et al., 1987; Lee et al., 1989b; Chu et al., 1990; Kwon et al., 1991; Ahn et al., 1991; Kong et al., 1992; Rim et al., 1992; Nam, 1994). Erasmus(1977)는 이생흡충아강(Digenean trematoda)의 장은 표피와 함께 숙주환경에서 기생충과 숙주의 생리적 변화를 조절하는 역할을 한다고 지적한 바 있다. 이 실험에서 장상피조직의 구조와 항원성의 강도는 발육단계별로 차이를 발견하지 못하였고, 발육과정에 관계없이 강한 항원성을 나타내고 있었다. 일록촌폐흡충의 장은 감염초기의 유약충으로부터 성충이 된 후에도 계속해서 활발하게 항원을 분비하는 조직부위로 생각된다. Lee et al.(1989b), Kong et al.(1992), Rim et al.(1992) 및 Sugiyama et al.(1987)은 폐흡충의 장상피층과 장내용물에 강한 항원성을 보고하였고, Nam(1994)은 일록촌폐흡충의 장상피층과 장내용물에 강한 항원성을 보고한 바 있다. Kwon et al.(1991)은 폐흡충 유약충의 장관에서는 항원성이 약한 것으로 보고하였다. 이 실험에서는 장상피층의 항원성은 발육단계별로 항원강도에 차이가 없었다. Fujino and Ishii(1990)는 숙주체내에서 오히라폐흡충의 발육과정중 피낭유충으로 감염된 후 5일째에 장상피세포내에 분비과립 형성이 시작되고, 감염 후 15일이면 성충의 상피와 거의 같은 모양의 구조와 생리기능을 갖게 된다고 하였다. 일록촌폐흡충의 장상피층의 발육단계별로 항원강도에 큰 차이를 볼 수 없었고 총체 또는 조직개체에 따라서 다소

항원장도의 차이가 있는 것으로 관찰되었다. Fujino(1993)는 폐흡충류(*Paragonimus* sp.) 및 간질 속(*Fasciola* sp.)에 소속된 흡충의 장상피는 주기적으로 분비와 흡수의 과정을 수행하며, 분비기에는 분비과립 생성이 활발하나 흡수기에는 분비과립이 드물고, 또한 장 상부 또는 장 하부에 따라서 장상피 세포의 모양과 구조의 차이를 언급한 바 있다. 일록춘폐흡충도 장조직 부위에 따라서 분비와 흡수기능에 의한 항원성의 차이가 있을 것으로 본다. 장조직의 강한 항원성은 이생아강흡충에서 공통적으로 나타나는 것으로 보인다. 간흡충 및 요꼬가와흡충의 장조직에서도 강한 항원성이 나타나고 있다. 흡충류의 장상피층에서는 충체가 숙주체내에 머무는 동안 계속해서 활발하게 항원을 분비하는 것으로 보인다.

일록춘폐흡충의 난황선은 장조직과 같이 항원성이 강한 조직부위로 나타났다. 드물게 난황선이 발견된 3주 발육충체를 제외한 4주 발육 충체 이후의 난황선은 발육단계에 관계없이 분할된 난황구 사이 원형질에 황금입자가 특이적으로 표지되었다. Lee et al.(1989b), Rim et al.(1992) 및 Kwon et al.(1991)은 폐흡충의 난황선에서 강한 항원성을 보고하였고, Chu et al.(1990)은 간흡충의 난황선에서, Ahn et al.(1991)은 요꼬가와흡충의 난황선에서 강한 항원성을 보고한바 있다. 흡충류의 난황선은 전반적으로 항원성이 강하게 나타나고 있다. 일록춘폐흡충에서도 난황선이 형성된 초기(감염 3주)에 항원성이 약하게 나타났으나 4주 이후 충체의 난황선은 충체의 발육단계나 난황선의 발육정도에 관계없이 계속해서 강한 항원성을 나타내었다.

총괄적으로, 일록춘폐흡충의 표피층은 대체로 유약층에서 항원성이 활발하고 성충에서는 다소 약화되는 경향이 있으나 충체 개체별로 차이가 많다고 본다. 장조직 및 난황선은 숙주체내에서 발육하는 동안 발육단계에 관계없이 강한 항원성을 나타내는 조직부위로 보인다.

감사문

이 연구를 진행하는 동안 수고해 주신 순천향의대 전자현미경실의 이정현 선생님과 기생충학교실의 이선화 기사에게 감사한다.

REFERENCES

Ahn H, Rim HJ, Kim SJ (1991) Antigenic localities in the tissues of *Metagonimus yokogawai* observed by immunogold labeling method. *Korean J Parasitol* **29**(3): 217-225 (in Korean).
 Aikawa M and Atkinson CT (1990) Immunoelectron microscopy of parasites. In "Advances in Parasitology" edited by Baker JR and

Muller R, Vol 29 p151-214, Academic Press.
 Chu BD, Rim HJ, Kim SJ (1990) A study on the body fluid antigen of *Clonorchis sinensis* using immunogold labeling method. *Korean J Parasitol* **28**(1): 11-23 (in Korean).
 Chyu I, Lee OY (1961) The complement fixation test of paragonimiasis. *Bulletin of N.I.H.* **4**(1): 1-6 (in Korean).
 Chyu I, Kim KS (1965) Studies on the purification of fluke antigens. *Theses of Catholic Medi Coll* **9**: 153-158 (in Korean).
 Erasmus DA (1977) The host-parasite interface of trematodes. In "Advances in Parasitology" edited by Dawes B, Vol 15 p201-242, Academic Press.
 Fujino T, Ikeda T, Oikawa Y, Fukuda K, Ishii Y (1989) Expression of tegumental antigen during the development of *Paragonimus ohirai*. *Jpn J Parasitol* **33**: 263-270.
 Fujino T, Ishii Y (1990) *Paragonimus ohirai* juveniles: ultrastructural, cytochemical and autoradiographic studies on the development of the gastrodermal epithelium, *Jpn J Parasitol* **39**: 186-197.
 Fujino T (1993) Ultrastructure and function of alimentary systems in parasitic helminths. *Jpn J Parasitol* **42**: 277-294 (in Japanese).
 Joo KH, Hong SC, Chung MS, Rim HJ (1989) Analysis of antigenic specifications of *Paragonimus westermani* developmental stages using immunoblot technique. *Korean J Parasitol* **27**(1): 1-7 (in Korean).
 Kim DC, Lee OY, Lee JS, Ahn SA (1982) Studies on control of paragonimiasis II. Immunodiagnosis of human paragonimiasis by ELISA using secretory-excretory antigen. *Report NIH* **19**: 109-114 (in Korean).
 Kojima S, Kobayashi M, Yokogawa M (1983) Demonstration of the crossreactivity among antigens extracted from four species of *Paragonimus* and its utilization for the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn J Parasitol* **32**: 413-418.
 Kong Y, Park CY, Kang SY, Cho SY (1992) Tissue origin of soluble component proteins in saline extract of adult *Paragonimus westermani*. *Korean J Parasitol* **30**: 91-100.
 Kwon OS, Lee JS, Rim HJ, Kim SJ (1991) Antigenic localities in the tissues of the young adult worm of *Paragonimus westermani* using immunogold labeling method. *Korean J Parasitol* **29**(1): 31-41 (in Korean).
 Lee OR, Choi WY (1983) Comparison of agar-gel diffusion test, counterimmunoelectrophoresis

- and enzyme-linked immunosorbent assay in the sera of skin test positive for paragonimiasis. *Korean J Parasitol* **21**(2): 270-280 (in Korean).
- Lee OR, Chang JK (1986) ELISA of paragonimiasis in cat by crude and purified antigens of *Paragonimus westermani*. *Korean J Parasitol* **24**(2): 187-193 (in Korean).
- Lee SH, Koo KH, Chai JY, Hong ST, Sohn WM (1989a) Experimental infection of *Paragonimus iloktsuenensis* to albino rats, dogs and cats. *Korean J Parasitol* **27**(3): 197-202 (in Korean).
- Lee SH, Sung SH, Chai JY (1989b) Immunohistochemical study on the antigenicity of body compartments of *Paragonimus westermani*. *Korean J Parasitol* **27**(2): 109-117 (in Korean).
- Lee OY, Lee JS, Kim TS, In TS, Choi KH, Kim DC (1991) Studies on the immuno-diagnosis of paragonimiasis I. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to *Paragonimus westermani* excretory-secretory antigen. *Report NIH* **28**(1): 122-131 (in Korean).
- Lim BK, Lee OR, Nam HS (1990) ELISA of rat sera infected with *Paragonimus iloktsuenensis*. *Korean J Parasitol* **28**(4): 207-212 (in Korean).
- Mckerrow JH, Doenhoff MJ (1988) Schistosome proteases. *Parasitology Today* **4**: 334-340.
- Nam HS (1994) Ultrastructural localization of antigenic sites in *Paragonimus iloktsuenensis*. *Soonchunhyang Univ* **17**(4): 1427-1441 (in Korean).
- Rim HJ, Kim SJ, Sun IJ, Lee JS (1992) Antigenic localities in the tissues of *Paragonimus westermani* by developmental stages using immunogold labeling method. *Korean J Parasitol* **30**(1): 1-14 (in Korean).
- 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 Parasitol* **7**: 363-367.
- Sung DR, Kim SJ, Eom KS, Rim HJ (1988) Antigenic localities in the tissues of *Clonorchis sinensis* using indirect fluorescent antibody test and immunogold labeling method. *Korea Univ Med J* **25**(3): 813-821 (in Korean).
- Tsuji M (1975) Comparative studies on the antigenic structure of several helminths by immunoelectrophoresis. *Jpn J Parasitol* **24**: 227-236 (In Japanese).
- Yong TS, Yeo IS (1992) Characterization of *Paragonimus westermani* antigen and immunodiagnosis of paragonimiasis using a monoclonal antibody. *Yonsei Rep Trop Med* **23**: 15-26.
- Yoshimura K (1969) *Paragonimus westermani*, *P. ohirai* and *P. miyazakii*: Electrophoretic comparison of whole body proteins. *Exp Parasitol* **25**: 118-130.
- Walton BC, Chyu I (1959) A survey of prevalence of clonorchiasis and paragonimiasis in Republic of Korea. *Jonghap Med* **4**(9): 1133-1139 (in Korean).

=Abstracts=

Ultrastructural antigenic localization in *Paragonimus iloktsuenensis* during developmental stage by immunogold labeling method

Hoon Sik KIM¹⁾ and Ok Ran LEE^{2)*}

Choongang Internal Medicine Clinic¹⁾, Taejeon City 303-301, and *Department of Parasitology²⁾, Soonchunhyang University College of Medicine, Chonan 330-090, Korea

Antigenic localization in *Paragonimus iloktsuenensis* worm tissues (tegument, intestine and vitelline gland) in different developmental stages of 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks, 5 weeks and 33 weeks from albino rats (Sprague-Dawley) infected with *P. iloktsuenensis* was observed by electron microscopy. These worm tissues of different developmental stage of *P. iloktsuenensis* was observed on electromicrograph by immunogold labeling method using *P. iloktsuenensis* infected rat serum of 10 weeks. Antigenic localization was demonstrated as labeling of gold particles in tissues on electronmicrograph. In tegument, gold particles were labeled on tegumental tissue, generally more numerous on secretory granules in tegumental syncytium 2 weeks than those on the other elder developmental stages, but there was a little variation in antigenicity according to individual worm tissue. In general, antigenicity in tegumental tissue was not strong (gold particles: 0.1-5/1 μm^2). In intestine, a large number of gold particles (15-18/1 μm^2) were labeled in intestinal epithelium. Gold particles were concentrated especially on secretory granules in cytoplasm, and gold particles were labeled not only in cytoplasmic protrusions, but also in intestinal luminal contents. Intensity of labeling of gold particles was not correlated with developmental stage of worms. In vitelline gland, a large number of gold particles were labeled on vitelline globules. The gold particles in vitelline globules (8-11/1 μm^2) were concentrated in protoplasm among segmental globules.

Key words: *Paragonimus iloktsuenensis*, immunogold labeling method, tissue antigen ultrastructure.

[Korean J. Parasitol., 33(4): 365-376, December 1995]

*Corresponding author