

肝吸蟲에 對한 抗體檢出을 위한 Thin Layer Immunoassay (TIA)

漢陽大學校 醫科大學 寄生蟲學教室

任 敬

서 론

간흡충증 환자의 혈청에서 수용성 항체를 검출하기 위한 많은 면역학적 방법이 소개되고 있다. 피내반응 (Sadun *et al.*, 1959; Sawada *et al.*, 1964), 보체결합 반응 (Sawada *et al.*, 1965), 면역확산법 (Sun and Gibson, 1969), 형광항체법 (任, 1974) 등이 알려져 있으나 항원 제조에 있어 문제점이 남아 있으며 감수성이나 특이성에 있어서도 장단점이 있어 이들 방법들의 실제 이용가치는 제한되어 있다. 최근 감수성이나 재현성에 있어 비교적 좋은 것으로 알려진 효소표식면역법 (ELISA)이 간흡충증의 진단에 효용성이 있다고 보고되고 있다 (李 등, 1981).

본 연구는 Thin Layer Immunoassay (TIA)를 이용하여 간흡충증 환자혈청에서 간흡충에 대한 항체를 정량적으로 검출하였으며, TIA에 의한 항체가와 간흡충 감염정도 또는 간기능 검사 결과와의 관계를 검토하였다.

실험재료 및 방법

간흡충에 감염된 가토 간장에서 채취한 성충을 사용하여 李 등 (1981)의 방법으로 생리식염수 추출물을 제조하여 항원으로 사용하였다. 단백질 함량은 2.87mg/ml 이었다.

간흡충 감염 여부는 Formalin-ether 원심침전법으로 확인하였으며, 분변을 각각 다른 날 세번 채취하여 Stoll씨 정량검사법을 각각 실시하여 그 EPG평균치로 감염정도를 표시하였다.

간흡충에 감염된 환자 60명을 대상으로 하였고 연령 분포는 8~56세였다. 건강한 사람 10명, 폐흡충증 환자 10명, 아메바증 환자 10명에서도 항체가를 측정하여 간흡충증 환자에서의 항체가 분포와 비교하였다.

간흡충증 환자의 성별, 연령별, EPG, 말초혈액중 호산구 수와 TIA에 의한 항체가와와의 관계를 검토하였으며, alkaline phosphatase, SGOT 및 SGPT 등 간기능 검사를 실시하여 그 결과와 항체가와와의 상호관계를 검토하였다.

Thin Layer Immunoassay는 Elwing *et al.* (1976)의 방법에 의하여 시행하였다. 그러나 agar 대신 agarose (BDH, England)를 사용하였다. Polystyrene 표면에 형성된 항원 항체 복합체는 water vapour condensation on surface visualization technique에 의하여 관찰하였으며 그 표현된 면적의 직경을 측정함으로써 항체의 양을 정량적으로 계산하였다.

실험 성적

1. TIA에 의한 항체가 분포

간흡충에 감염된 환자 60명의 혈청에서의 항체가는 $4.14\text{mm} \pm 0.16$ 로서 건강대조군 $1.45\text{mm} \pm 0.62$ 및 아메바증 환자 $0.80\text{mm} \pm 0.56$ 와 비교할 때 그 차이가 유의하였으나 ($p < 0.001$), 폐흡충증 환자에서의 항체가 $3.35\text{mm} \pm 0.69$ 와는 유의한 차를 인정할 수 없었다 ($0.2 < p < 0.5$) (Table 1 및 Fig. 1).

2. 간흡충증 환자에서의 항체가

TIA에 의한 항체가는 간흡충증 환자의 성별, 연령별 차가 없었다.

간흡충 감염정도를 알기 위하여 EPG를 조사하였는데 $2 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 으로 환자 개인별 차이가 심하였다. 그러나 항체가와 EPG사이에는 상관이 없음을 알 수 있었다 (Fig. 2).

말초혈액중 호산구 수와 TIA에 의한 항체가 사이에도 상관이 없었다 (Fig. 3).

3. 항체가와 간기능검사 결과와의 관계

Table 1. Comparison of antibody titres examined by Thin Layer Immunoassay (TIA) in clonorchiasis and other parasitic diseases

Group	No. exam.	Antibody titres by TIA (mean \pm S.E.)	Remark
Clonorchiasis	60	4.14 ± 0.16	
Healthy	10	1.45 ± 0.62	$P < 0.001$
Paragonimiasis	10	3.35 ± 0.69	$0.2 < P < 0.5$
Amoebiasis	10	0.80 ± 0.56	$P < 0.001$

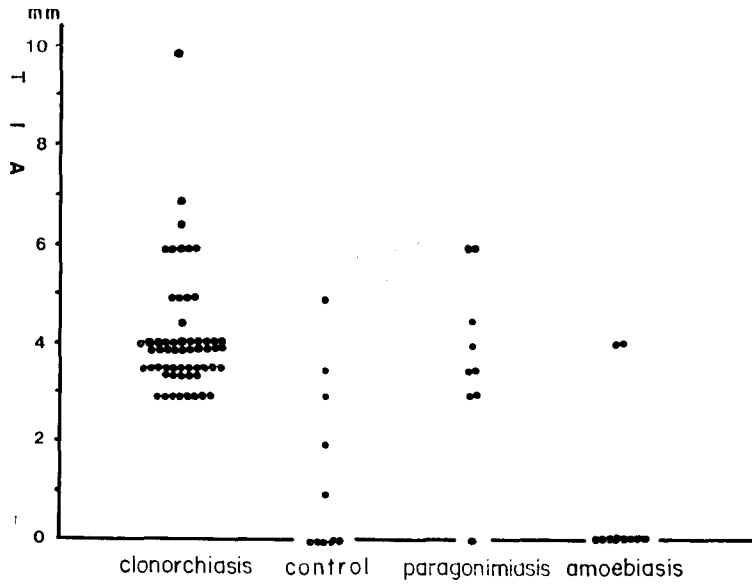


Fig. 1. Antibody titres distribution by TIA in 60 clonorchiasis, 10 healthy, 10 paragonimiasis and 10 amoebiasis cases.

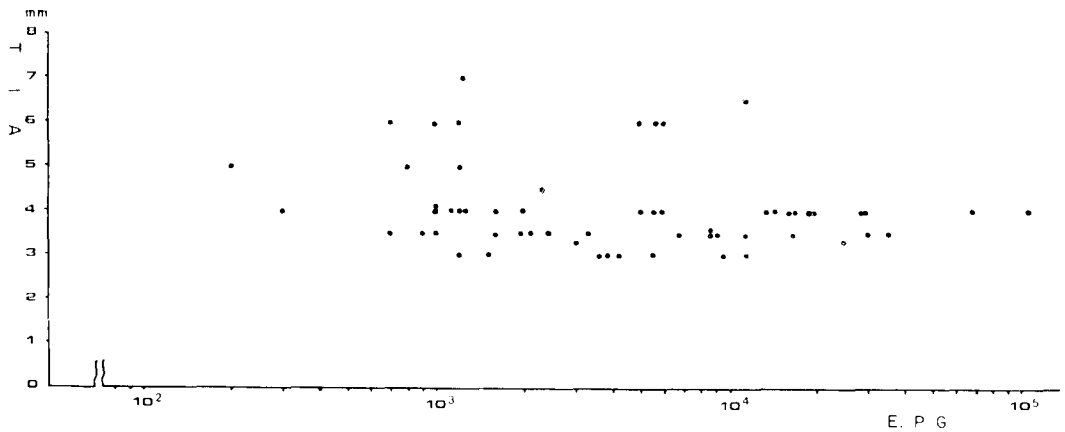


Fig. 2. Antibody titres by TIA in clonorchiasis cases by eggs per gram of feces (EPG).

연구대상 간흡충증 환자에서 alkaline phosphatase, SGOT 및 SGPT치를 측정하였다. 이들 간기능 검사 결과와 TIA에 의한 항체가 사이에는 모두 상관 없음을 알 수 있었다(Fig. 4, 5 및 6).

고 찰

이 연구의 목적은 TIA에 의해 간흡충 환자 혈청에서 항체를 검출하고 이를 기초로 간흡충증에 있어 TIA의 감수성을 알아 보고자 하였다.

TIA에 의해 검출되는 항체 측정치는 항체의 농도와

비례한다고 밝혀져 있으므로(Elwing *et al.*, 1976), 환자 혈청내 항체를 정량적으로 측정할 수 있다. 이 방법에 의하면 항체의 정량은 polystyrene 표면에 부착된 항원항체결합체에 의해 형성되는 hydrophilic zone의 크기에 좌우된다. 이의 기전에 대하여는 알려져 있지 않고 항원항체결합체가 있는 부위는 비교적 큰 수증기 방울이 형성되어 주위의 작은 수증기 방울에 구별된다. 이러한 misting effect(煙霧효과)에 의하여 항체를 정량적으로 측정하는 The water vapour condensation on surface(VCS) visualization technique이외에도 수증기대신 plastic particle을 사용하는 The particle

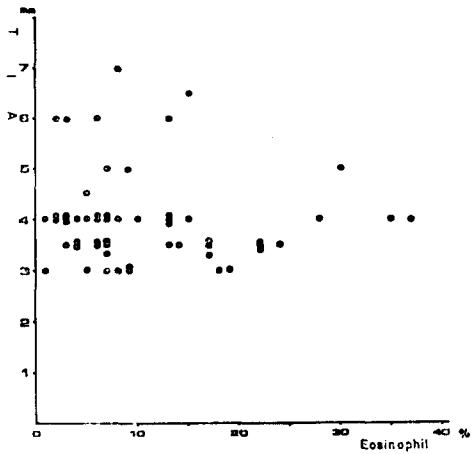


Fig. 3. Antibody titres in clonorchiasis by percentage of eosinophilic leukocyte.

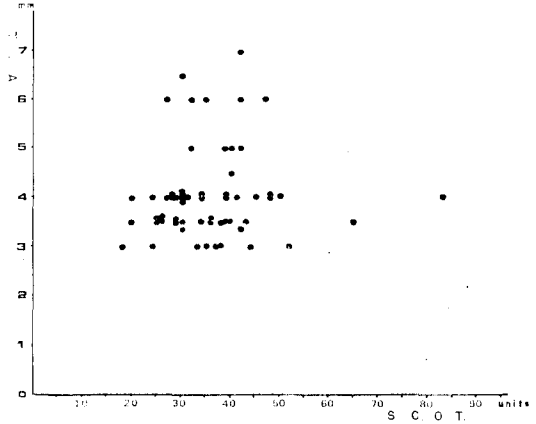


Fig. 5. Antibody titres by TIA with reference to S.G.O.T. in clonorchiasis cases.

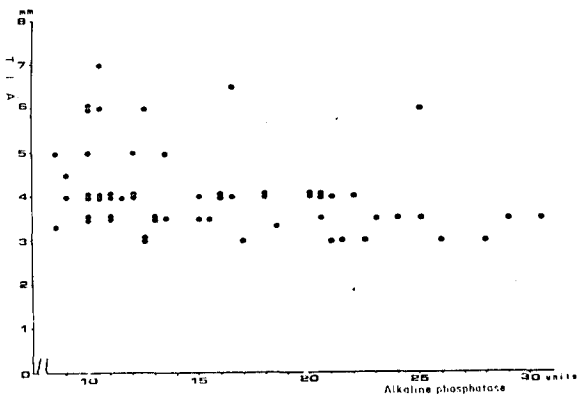


Fig. 4. Antibody titres by alkaline phosphatase activity in serum of clonorchiasis cases.

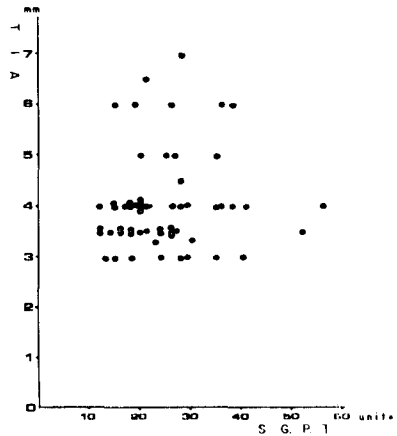


Fig. 6. Antibody titres by TIA with reference to S.G.P.T. in clonorchiasis cases.

adsorption on surface(PAS) visualization technique 또는 2% chicken erythrocytes 부유액을 사용하는 The mixed hemadsorption(MHA) visualization technique 등이 있다.

또한 환자 시험현청을 작용시킨 후 antihuman immunoglobulin을 처리하면 hydrophilic zone이 더욱 더 명확히 나타남을 본 실험에서도 관찰하였다. 그러나 본 실험에서 검출되는 항체는 IgG인지 IgM인지는 확인하지 못하였다. 그러나 이 두가지 immunoglobulin 중 어느 것에 의하여 증강되든지 간에 양자간에는 서로 상관이 있다고 한다(Nilsson *et al.*, 1980a).

폐흡충증과 교차반응이 있음이 관찰되었다. 이는 간흡충과 폐흡충이 동시 감염에 의하여 일어날 수 있겠으나 확인할 수 없었고, 또한 공통항원성에 의한 것인지 아니면 항원성이 유사하므로 이러한 교차반응이 생길 수 있다고 생각된다. 간흡충증과 폐흡충증과의 교

차반응은 피내반응에서도 흔히 관찰된다. Nilsson등(1980b)은 TIA를 실시하였는데 주원흡충과 다른 기생충들과 교차반응이 있음을 보고하였으나, Ismail등(1979)은 주원흡충증 환자를 대상으로 조사하였는데, 다른 종류의 기생충에 의해 야기될 수 있는 의양성은 소수에서 관찰되었다고 하였다. 또한 TIA와 ELISA(효소표시면역법)는 감수성에 있어 거의 같고 서로 상관성이 매우 좋다고 하였다. Nilsson등(1980a)은 아메바증에 있어서도 TIA는 간접원구응집반응이나 면역확산법에 의한 결과와 잘 일치한다고 하였다.

TIA결과에 따른 임상적 의의는 아직 그결론을 얻을 수 없었다. TIA에 사용되는 항원량은 다른 면역학적 방법에 비하여 많이 쓰이는 단점이 있으나 그 방법이 간단하고, 특별한 실험기구가 필요없으며, 실험성의 편정도 어렵지 않고 신속히 얻을 수 있고, 비용이 적게 들어 대단위 집단 검사에 사용될 수 있는 좋

은 방법이라고 생각된다.

본실험에서 crude항원인 간흡충 성충의 생리식염수 추출물을 사용했음에도 그 성적은 비교적 좋았으며, 주혈흡충 성충으로 제조된 식염수추출물을 사용한 Ismail 등(1979)의 성적도 좋았다고 보고되고 있다. 그러나 간흡충은 여러 발육시기가 있으며 그 시기에 따라 항원성이 다르므로 항원의 제조방법에 따라 그 결과도 매우 다른 성적을 얻을 것으로 생각되나 특이항원을 찾아내어 이를 사용하던 감수성과 특이성이 좋은 TIA를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

간흡충증 환자로부터 현액을 채취하여 그 현액에서 간흡충에 대한 항체를 Thin Layer Immunoassay(TIA)에 의하여 검출하였다. TIA는 Elwing *et al.*(1976)이 기술한 방법에 의하여 시행하였고, 항원은 이등(1981)의 방법으로 제조된 간흡충 성충 생리식염수 추출물을 사용하였으며 그 단백질 함량은 2.87mg/ml이었다.

간흡충증 환자 60명의 현액에서의 항체가는 긴강대조군 및 이질아메바 감염자에서의 항체가와 비교할 때 그 차이가 유의하였으나, 폐흡충증 환자와의 차이는 유의하지 않았다.

간흡충증 환자의 성별이나 연령과 TIA에 의한 항체가 사이에 상관 관계가 없었다. 환자의 분변내 EPG, 말초혈액내 호산구의 수와도 상관성이 없었다. TIA에 의한 항체가와 간기능 검사 결과와의 관계를 보면 alkaline phosphatase, SGOT 및 SGPT 측정치와 모두 상관성이 없음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

Elwing, H., Nilsson, L.-Å. and Ouchterlony, Ö. (1976) Visualization principles in Thin-Layer Immunoassays (TIA) on plastic surfaces. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, 51:757-762.

任敬一(1974) 형광항체법을 이용한 간디스토마 감염의

면역진단에 관한 실험적연구. 연세의대논문집, 7 (1):194-205.

Ismail, M., Draper, C., Ouchterlony, Ö., Nilsson, L.-Å. and Terry, R. (1979) A comparison between a new serological method, thin layer immunoassay (TIA), and the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibodies in schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 1:251-258.

李重根, 閔得映, 任敬一, 李根泰, 蘇鎮卓(1981) 간흡충 감염진단을 위한 ELISA법의 효용성에 관한 연구. 연세의대논문집, 14:133-147.

Nilsson, L.-Å., Petchclai, B. and Elwing, H.(1980a) Application of thin layer immunoassay (TIA) for demonstration of antibodies against *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29:524-529.

Nilsson, L.-Å., Björck, L., Capron, A., Elwing, H. and Ouchterlony, Ö. (1980b) Application of thin layer immunoassay(TIA) as a serodiagnostic tool in schistosomiasis. A preliminary report. *Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74:201-204.

Sadun, E.H., Walton, B.C., Buck, A.A. and Lee, B.K. (1959) The use of purified antigens in the diagnosis of *Clonorchis* by means of intradermal and complement fixation tests. *J. Parasit.*, 45:129-134.

Sawada, T., Nagata, Y., Takei, K. and Sato, S. (1964) Studies on the substance responsible for the skin tests on clonorchiasis. *Jap. J. Exp. Med.*, 34:315-322.

Sawada, T., Takei, K., Williams, J.E. and Moose, J.W. (1965) Isolation and purification of antigen from adult *Clonorchis sinensis* for complement fixation and precipitin tests. *Exp. Parasitol.*, 17:340.

Sun, T. and Gibson, J.B. (1969) Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18:241-252.

==Abstract==

**Thin Layer Immunoassay (TIA) for circulating antibody
detection in clonorchiasis**

Kyung-Il Im

*Department of Parasitology, College of Medicine,
Hanyang University, Seoul, Korea*

Thin layer immunoassay was carried out to demonstrate antibodies against *Clonorchis sinensis* in sera from clonorchiasis patients. Saline extract of adult worm was used as antigen. TIA technique was performed as described earlier by Elwing *et al.* (1976), but agarose was used instead of agar. The antibody titres of sera in 60 clonorchiasis cases were higher than that of 10 healthy and 10 amoebiasis cases, but not different comparing with that of 10 paragonimiasis cases. Antibody titres in clonorchiasis gave no differences according to the age, sex, EPG in feces, eosinophilia degree of blood, level of alkaline phosphatase and transaminase (SGOT, SGPT) in sera.

It is suggested that, after evaluation, the TIA might supplement or be used as an alternative to other immunodiagnostic tests already in use for the diagnosis of clonorchiasis.