

肝吸蟲 感染 家兔의 免疫診斷에 대한 研究

2. 成蟲 粗抗原의 精製 및 發育段階別 抗原 分析

順天鄉大學 醫學部 寄生蟲學教室 및 延世大學校 醫科大學 寄生蟲學教室*

李 玉 蘭 · 鄭 坪 林* · 南 海 善

要 約 : 肝吸蟲(*Clonorchis sinensis*)의 粗抗原(WWA), 精製抗原(ABA)의 敏感度와 特異度를 비교해 보는 한편, 發育段階別로 蟲卵 抗原(EGA)―被囊幼蟲 抗原(MEA)―成蟲 抗原(WWA)의 蛋白質 구성물질의 차이를 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 관찰하고 이들 항원의 유용성을 酵素免疫反應(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)으로 비교하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

肝吸蟲의 粗抗原으로부터 精製된 抗原(ABA)은 抗體와 結合한 結合抗原(affinity-purified antibody[IgG] binding antigen:ABA)으로서 Ouchterlony 반응으로 肝吸蟲 感染 家兔血清과 4개의 沈降帶 (WWA는 7개)를 형성하였다. WWA의 major protein들은 분자량 16,300~18,500 및 28,000~29,000 dalton의 polypeptide band였고, ABA는 분자량 18,000~21,000 및 29,000~31,000 dalton의 단백질로 다소의 차이를 보였다. ELISA 시험에서 ABA는 WWA에 비해 현저히 민감도가 낮았다. WWA와 ABA에 대한 肺吸蟲 感染 家兔血清의 ELISA 검사에서 WWA는 Ouchterlony 陽性者 8例중 3例에서 交叉反應을 나타내었으나 ABA는 交叉反應을 나타내지 않았다.

肝吸蟲의 發育段階別 抗原 蛋白質의 分子량 범위는 WWA 11,000~80,000, MEA 15,000~100,000, EGA 15,000~200,000 dalton이었다. 粗抗原 蛋白質의 분자량은 EGA는 각각 36,600 (band No. 22), 38,500(No. 20), 64,000(No. 9), 62,000(No. 10), 54,500(No. 11), 53,000(No. 12) dalton, MEA는 각각 65,600(No. 3), 44,700 (No.7), 43,900(No. 8) dalton, WWA는 각각 16,300~18,500(No. 31-32), 28,000~29,000(No. 25), 11,000~13,000 (No. 35) 및 31,000(No. 24) dalton이었다. 즉, MEA와 EGA가 WWA보다 高分子의 단백질로 구성되어 있었다.

각 發育段階別 抗原의 抗原성은 ELISA 반응으로 볼 때 WWA가 가장 높았고, MEA는 弱한 抗原性만을 나타내었으며 EGA는 陰性이었다. WWA와 肝吸蟲 感染 家兔血清은 감염 4~6週에 OD 1.0, 12週 이후 抗體價의 plateau를 나타내었으나 MEA는 Ouchterlony 반응에서 EGA와 함께 陰性反應을 보였다. ELISA에서도 重感染群(12~20週)에서만 OD 0.6으로 微弱한 抗原성이 인정되었으며 輕感染群은 全감염기간중 OD 0.6을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 成蟲 抗原이 가장 강력한 항원성 물질을 포함하고 있음이 명백하다고 생각된다. 그러나 成蟲 粗抗原은 免疫診斷에 사용할 경우 他吸蟲과의 明白한 交叉反應이 예상되므로 민감도 및 特異도가 높은 精製 抗原물질을 分離하는 일이 중요하다고 생각된다.

Key words: *Clonorchis sinensis*, immunodiagnosis, antigen purification, SDS-PAGE, ELISA, Ouchterlony test

緒 論

한국에서 人體의 吸蟲症을 일으키는 2大 吸蟲類로서는 肺吸蟲(*Paragonimus westermani*)과 肝吸蟲(*Clon-*

orchis sinensis)이 있다. 그러나 現在까지 肝吸蟲에 對한 免疫學的 研究는 肺吸蟲에 비해 별로 활발하지 못하였다. 이는 肝吸蟲이 肺吸蟲에 비해 직접적인 진단이 쉽고 抗體 검출이 예민하지 못하기 때문이기도 하였다. 그러나 항체 검출이 예민한 방법의 등장과 함께 免疫시험이 단순히 陽性, 陰性을 판단하는 診斷的 가치 이외에도 抗原性 物質을 各각도로 分析 또는 精製하여 抗原 기능의 차이까지도 관찰하는데에 이용될 수

* 이 研究는 農科部 科學연구 조성비의 지원(1987~1988)으로 이루어졌으며 論文의 요지는 1988년도 대한기생충학회 춘계학회에서 발표되었음.

있게 되었다.

人體 感染 吸蟲類는 서로 共通 抗原性 物質을 갖고 있고 이들 공통적인 抗原들로 인하여 免疫 交叉反應을 나타낼 수 있다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다 (Christensen *et al.*, 1978; Chung *et al.*, 1955 & 1956; Hillyer *et al.*, 1977; Hillyer and Serrano, 1983; Tsuji, 1975). 특히 肺吸蟲과 肝吸蟲의 免疫 交叉反應은 皮內反應에서 빈번하다고 報告된 (Chung *et al.*, 1955 & 1956) 이래, 抗原의 精製로 交叉反應을 제거하기 위한 시도가 있었다 (Sadun *et al.*, 1959; Sawada *et al.*, 1964 & 1965; Wykoff, 1959). 蠕蟲類인 肝吸蟲의 抗原性 物質은 分離方法에 따라 多樣하게 분리되는 複合물질로 되어 있으므로 特異度和 敏感度를 동시에 높일 수 있는 항원만을 분리해내는 일은 쉽지 않을 것으로 생각된다.

Hayunga *et al.* (1979a & b)은 *Schistosoma*의 蟲體 抗原에서 主抗原 成分은 蟲體 表皮에 있으며 이는 곧 schistosomule에서 유래된 것이라고 보고한 바 있고 崔登(1981)의 肝吸蟲 蟲體의 發育段階別 抗原 成分分析에서도 表皮에 主抗原性 物質이 포함되어 있음을 암시한 바 있다. 한편 寄生蟲의 發育단계별로 항원성분, 항원 기능의 차이에 대한 報告(김등, 1986; Sun and Gibson, 1969; Sun, 1969)도 있다. 李 및 安(1987)은 肝吸蟲 感染 家兔血清과 간흡충 成蟲 抽出物 抗原과의 酵素免疫反應(ELISA)에 의해 抗原性 및 感染期間에 따른 抗體價의 變동을 관찰한 바 있다. 또한 肺吸蟲 成蟲 抽出 粗抗原을 affinity chromatography에 의해 抗體結合抗原을 精製하여 肺吸蟲 感染 고양이 血清과 ELISA에 의한 抗原-抗體 反應을 시도한 바 精製 抗原이 粗抗原에 비해 높은 감수성이 있음이 관찰된 바 있다(李 및 張, 1986).

이에 本 實驗은 肝吸蟲 成蟲-抽出 粗抗原, 精製된 抗體結合 抗原, 蟲卵 抗原, 被囊幼蟲 抗原의 구성단백 質을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 分割하여 그 分子量을 비교해 보는 한편, 이들 항원과 감염 家兔 血清의 ELISA를 시행하여 抗原性을 상호 비교해 보고자 시행하였다.

材料 및 方法

1. 肝吸蟲 抗原

抗原 材料인 肝吸蟲 成蟲은 실험감염 시킨 家兔로부터 수집하였다. 즉, 낙동강에서 포획한 간흡충(피낭유충)-감염 참봉어(*Pseudorasbora parva*)를 일부의 家兔에는 참봉어채로 먹이고, 일부는 실험실에서 피낭유충을 분리한 후 감염시켰다. 成蟲 抽出物 粗抗原과 蟲卵 抗原의 材料는 피낭유충을 먹인 후 2~3개월된 家兔로부터 수집하였고 피낭유충항원 재료는 감염된 참봉어를 人工消化液으로 소화시켜 피낭유충만을 분리하여 사용하였다.

1) 全蟲體 抽出物 粗抗原(whole worm-saline homogenate crude antigen: WWA)

Tsuji(1975)의 方法을 기초로 하였다. 즉, 신선한 蟲體(약 2,000마리)를 生理食鹽水와 증류수로 세척하여 少量의 0.1% 食鹽水와 함께 凍結시켰다(-20°C). 동결상태에서 약질자로 총체를 부수고 용해시킨 후 再凍結시키는 凍結-融解 方法으로 成蟲의 homogenate를 만들었다. 이 homogenate를 원심분리(10,000 rpm /4°C/1 hr)한 다음 上清液을 粗抗原 原液으로 하였다. Lowry(1951)法에 의한 이 항원의 단백질 농도는 4 mg/ml이었다.

2) 被囊幼蟲 抗原(metacercarial antigen: MEA)

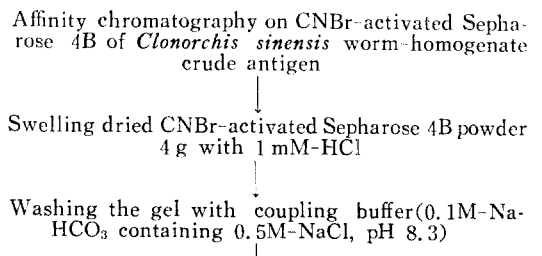
Hillyer and Serrano(1983) 方法의 變法으로 만들었다. 즉, 감염된 참봉어를 人工消化液으로 소화시킨 후 유리된 被囊幼蟲을 수집하였다. 약 50,000個의 피낭유충을 生理食鹽水와 증류수로 세척한 후 1% NP-40 용액(in PBS, pH 7.0) 1 ml에 넣어 tissue grinder에서 잘 부수고 1시간 동안 냉장고(4°C)에 방치하였다가 15,000 rpm(4°C)으로 90分間 원진한 다음 上清液을 被囊幼蟲 抗原 原液으로 사용하였다(단백질 농도 2 mg/ml).

3) 蟲卵 抗原(egg antigen: EGA)

肝吸蟲 成蟲으로부터 解剖원미경下에서 분리한 蟲卵을 모아 生理食鹽水와 증류수로 씻어 1% NP-40 용액(in PBS, pH 7.0)에 넣은 후 이하 被囊幼蟲 抗原 製造와 같은 방법으로 蟲卵 抗原을 만들었다(단백질 농도 2 mg/ml).

4) 精製 抗原(antibody-binding antigen: ABA)

肝吸蟲 粗抗原(WWA)으로부터 affinity chromatography에 의해 抗體結合 抗原(bound antigen)과 非結合 抗原(unbound antigen)을 분리하여 抗體 IgG와 결합한 항원 성분을 精製하였다. CNBr-activated Sepharose 4B (Sigma C9142)를 matrix로 하고 肝吸蟲 감염 家兔血清 IgG를 ligand로 하였다. CNBr-activated sepharose 4B affinity chromatography 방법은 Pharmacia Fine Chemicals에서 출판된 "Affinity Chromatography, Principles & Methods (1979)"를 참고하였다. 肝吸蟲 感染 家兔 血清 IgG는 감염 3개월된 家兔 血清으로부터 ammonium sulfate(40~45%) 沈澱法으로 分離하였다. CNBr-activated Sepharose 4B affinity chromatography의 方法은 다음과 같다.



↓

Coupling clonorchiasis rabbit IgG(5 mg protein/gel) to the gel on shaker overnight at 4°C

↓

Blocking the coupling gel with blocking buffer (0.1M-Tris/HCl containing 0.5M-NaCl, pH 8.0) for 2 hrs at room temperature on shaker

↓

Washing the gel excess adsorbed protein by sintered glass(G3) with coupling buffer(pH 8.3) and 0.1M-acetate buffer(containing 0.5M-NaCl, pH 4.0) alternately 5 times

↓

The gel is equilibrated with 0.04M-PBS(pH 7.2) and packed in column(1.2×15 cm)

↓

Applying *C. sinensis* crude antigen(WWA) 70 mg protein and incubation for 2 hrs at room temperature

↓

Running unbound antigen with PBS(pH 7.2) buffer as 1 drop/18 sec., 4 ml/tube until ≤0.002 of absorbance at 280nm

↓

Running bound antigen with 0.1M-glycine/HCl buffer(pH 2.8), the speed and received volume is equal to above, the elution pattern of affinity chromatographic separation is given in Fig. 2

↓

Pooling the bound antigen fractions(tube No. 13-17) of Fig. 2 and dialysis with d-H₂O

↓

Lyophilization and melting the lyophilized bound antigen in PBS(pH 7.2), and measurement of protein concentration by Lowry method

↓

Identification of antigenicity against homologous antiserum is made by Ouchterlony reaction, the result is given in Fig. 3

2. 抗血清

1) 肝吸蟲 抗血清

肝吸蟲 抗血清은 肝吸蟲의 被囊幼蟲을 家兎에 먹인 후 1週 간격으로 採血하여 分離하였다. 감염강도(蟲體數)에 따라 感染群을 나누기 위하여 감염된 家兎를 屠殺한 후 肝臟에서 蟲體를 回收하였고 蟲體數별로 家兎를 구분하였다. 各群의 家兎 番號와 回收된 蟲體數(괄호)는 다음과 같다. 第Ⅰ群: No. 11(4), 14(4), 1

Table 1. Numbers of worms recovered in each group of experimental rabbit clonorchiasis

Group	No. of rabbits(Rabbit Serial No.)	Range of No. worms recovered	Mean(±S.D) No. worms recovered
I	4(No. 11, 14, 15, 16)	4~10	6 (±2.8)
II	4(No. 27, 29, 32, 33)	115~136	120.8(±10.2)
III	4(No. 7, 19, 23, 26)	315~395	349.3(±34.9)
IV	4(No. 10, 17, 18, 24)	618~864	755 (±121.3)

5(10), 16(6); 第Ⅱ群: No. 27(115), 29(117), 32(115), 33(136); 第Ⅲ群: No. 7(315), 19(395), 23(356), 26(331); 第Ⅳ群: No. 10(850), 17(618), 18(864), 24(688). 各群別 回收蟲體數의 平均과 표준편차는 Table 1에 표시한 바와 같다.

2) 對照 血清

肝吸蟲의 被囊幼蟲을 家兎에 먹이기 前에 채취한 血清으로서 肝吸蟲 陽性 血清에 대한 陰性 對照 血清으로 사용하였다.

3) 肺吸蟲 感染 환자 血清

肺吸蟲 粗抗原과 Ouchterlony 반응으로 침강반응을 나타낸 肺吸蟲 陽性者의 血清이다. 肝吸蟲 抗原과의 交叉 免疫反應을 보기 위한 對照 血清으로 사용하였다

3. SDS-PAGE

Laemmli(1970)의 方法에 準하였다. 즉, 10% acrylamide slab gel에 抗原 농도 35μg씩을 浸어 15mA로 3~4시간 동안 電氣泳動시켰다. 전기영동 후 gel은 Coomassie blue로 염색하고 脫色시킨 후 silver stain으로 再染色하였다. Gel上에서 分子量의 차이로 분리된 蛋白質 分割(polypeptide fractions[=bands])의 分子量 測定은 같은 gel에서 전기영동된 표지 단백질(marker protein)의 protein bands의 relative mobility(Rf)(Table 2)에 의한 표준곡선(Fig. 1)에 各 抗原의 polypeptide bands의 Rf值(Table 3)를 대응시켜 산출하였다.

4. 酵素免疫反應(ELISA)

Voller *et al.* (1976)의 方法을 기초로 하였다. 즉, 抗原을 coating buffer(carbonate buffer, pH 9.6)로 처리하여 단백질 농도가 5μg/ml이 되게 하여 micro-ELISA polystyrene plate 各 well에 100μl씩 넣은 후 plate를 4°C에서 12~16시간 방치하였다. 그 후 washing buffer(PBS-Tween buffer, pH 7.4)로 plate를 4회 씻은 후 blocking buffer(1% BSA 포함된 carbonate buffer, pH 9.6)를 各 well에 200μl씩 넣어 1시간(37°C)동안 반응시켰다. 다시 diluent buffer(1% BSA 포함된 PBS-Tween buffer, pH 7.4)로 100배 희석한 血

Table 2. Molecular weight of standard protein and relative mobility (Rf)

Standard protein (Markers)	Molecular weight (MW)	Relative mobility (Rf)
myosin	200,000	0.022
β-galactosidase	116,250	0.088
phosphorylase B	92,500	0.125
bovine serum albumin(BSA)	66,200	0.206
ovalbumin	45,000	0.353
carbonic anhydrase	31,000	0.588
soybean trypsin inhibitor	21,500	0.779
lysozyme	14,400	0.941

Table 3. Polypeptide band numbers and relative mobility(Rf) of *C. sinensis* antigens(WWA, ABA, MEA, EGA) on 10% acrylamide gels(SDS-PAGE)

*WWA		*ABA		*MEA		*EGA	
Band No.	Rf	Band No.	Rf	Band No.	Rf	Band No.	Rf
3	0.202	2	0.224	1	0.121	4	0.110
7	0.272	5	0.279	3	0.200	8	0.200
11	0.346	6	0.463	4	0.228	9~10	0.221~0.235
12	0.368	8	0.537	6	0.279~0.301	11~12	0.287~0.298
16	0.434	9	0.551	7	0.357	16	0.379
17	0.452	10	0.585~0.592	8	0.371	20	0.463
22	0.533	11	0.603~0.610	9~14	0.419~0.5	22	0.493
24	0.588	17	0.801~0.816	15~18	0.574~0.632	23	0.540
25	0.621~0.632	18	0.824~0.846	19	0.904	25	0.603
27	0.669	22	0.985~1	20	0.926	30	0.794
30	0.779	---	---	---	---	32	0.890~0.904
32	0.875~0.897	---	---	---	---	---	---
35	0.978~1	---	---	---	---	---	---

* WWA: whole worm-saline homogenate crude antigen, ABA: affinity-purified antibody-binding antigen, MEA: metacercaria NP-40 extract antigen, EGA: egg NP-40 extract antigen

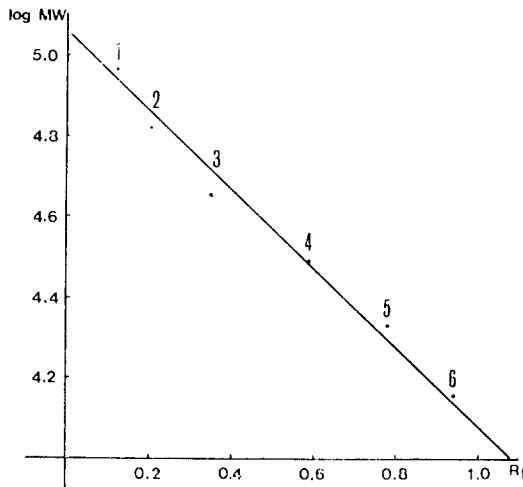


Fig. 1. Standard curve for the determination of molecular weight of polypeptide fractions. [1: phosphorylase, 2: bovine serum albumin (BSA), 3: ovalbumin, 4: carbonic anhydrase, 5: soybean trypsin inhibitor, 6: lysozyme.]

清을 100 μ l씩 well에 넣어 2시간(37 $^{\circ}$ C)동안 반응시킨 후 plate를 씻었다. 그후 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG(Sigma A8025)를 1 μ l/ml의 농도로 각 well에 100 μ l씩 넣고 3시간(37 $^{\circ}$ C) 동안 반응시킨 후 plate를 씻었다. 基質인 p-nitrophenyl phosphate를 1mg/ml의 농도로 하여 각 well에 100 μ l씩 넣고 暗所(室溫)에서 1時間동안 반응시킨 후 spectropho-

tometer의 광원 파장을 410nm로 하여 optical density (OD) 値를 측정하였다. 成蟲 粗抗原(WWA)은 Table 1에 기술되어 있는대로 全家兔血清과 반응시켰고, 精製 抗原(ABA), 被囊幼蟲 抗原(MEA), 蟲卵 抗原(EGA)과는 各 群에서 2마리의 家兔, 즉 I 群: No. 11, 15; II 群: No. 27, 29; III 群: No. 19, 23; IV 群: No. 18, 24의 家兔 血清에 대하여 ELISA를 실시하였다. 肝吸蟲 抗原과 肺吸蟲 陽性 血清의 ELISA에서는 感作 酵素로서 peroxidase를 사용하였다. 즉, peroxidase-conjugated anti-human IgG와 기질로서는 ortho-phenylenediamine(OPD)을 사용하였다.

本 實驗의 ELISA의 OD값에 의한 抗體 陽性 기준은 酵素 alkaline phosphatase를 사용한 실험에서는 輕 感染(II 群)된 3週의 OD값(0.55)을 기준으로 하여 OD \geq 0.6을 陽性 기준値로 하였다. 한편 李 및 張(1986)의 실험에서 感作 酵素 alkaline phosphatase와 peroxidase를 사용했을 경우의 OD값의 差異를 減小하여 交叉反應을 보기 위해 酵素 peroxidase를 사용한 肺吸蟲症 환자 血清에 대한 ELISA의 양성 OD値는 OD \geq 0.9로 하였다.

結 果

1. 肝吸蟲 全蟲體 抽出物 粗抗原의 精製(Immuno-affinity purification of *C. sinensis* whole worm-homogenate antigen: WWA)

肝吸蟲 粗抗原(WWA)을 affinity chromatography에 의해 분리한 결합 항원의 chromatogram은 Fig. 2에 시와 같다. 精製된 결합항원(bound Ag. [ABA])은

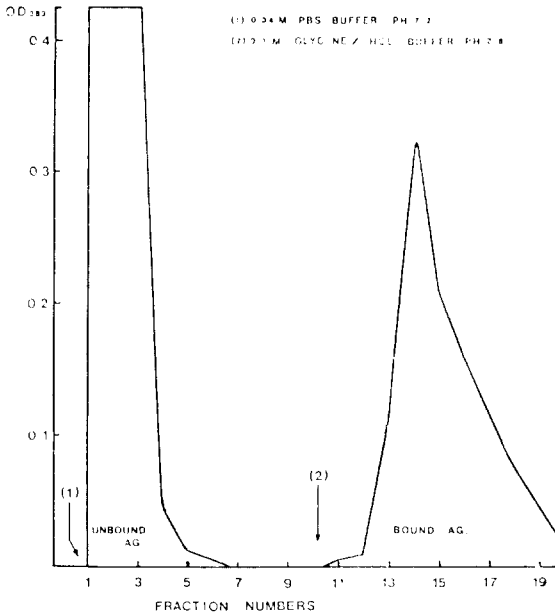


Fig. 2. Affinity chromatography of *C. sinensis* worm homogenate crude antigen(WWA) on CNBr-activated Sepharose 4B. WWA of 70mg protein was loaded onto the column and eluted with 0.04M-PBS buffer(pH 7.2) for unbound Ag., and eluted with 0.1M-glycine/HCl buffer(pH 2.8) in 1 drop/18 sec. (4 ml/tube).

肝吸蟲 抗血清에 대한 抗原性을 보기 위하여 Ouchterlony 반응으로 沈降帶의 有無를 확인하였다. 肝吸蟲 감염 家兔 血清과 粗抗原(WWA)은 7개의 沈降帶 (precipitin bands)를 만들었고 精製抗原(ABA)은 4개의 沈降帶를 만들었다(Fig. 3).

WWA와 ABA의 SDS-PAGE에 의한 抗原 蛋白質의 蛋白質 分劃像은 Fig. 4에 나타나 있고 polypeptide bands의 densitometric tracing은 Fig. 5와 같다. WWA와 ABA는 同一한 蛋白質 濃도(35 μ g/gel)로 電氣 泳動하였으나 ABA는 WWA보다 蛋白質量이 전반적으로 현저히 낮다는 것은 Fig. 4에서 두 抗原의 分離된 polypeptide bands의 染色濃도에 의해 육안적으로 확인할 수 있었다. WWA의 polypeptide band는 分子量 11,000~80,000 dalton의 범위에서 35개가 관찰되었다. 또, ABA는 分子量 11,800~70,000 dalton의 범위에서 20여개의 band를 나타내고 있었다. WWA의 major protein(主蛋白質)은 가장 泳動농도가 높은 band No. 32(16,300~17,000 dalton)를 포함한 분자량 16,300~18,500 (No. 41-32), 28,000~29,000(No. 25), 11,800~13,000(No. 35), 31,000(No. 24) dalton의 順으로 蛋白質量이 많았다. ABA의 major poly-

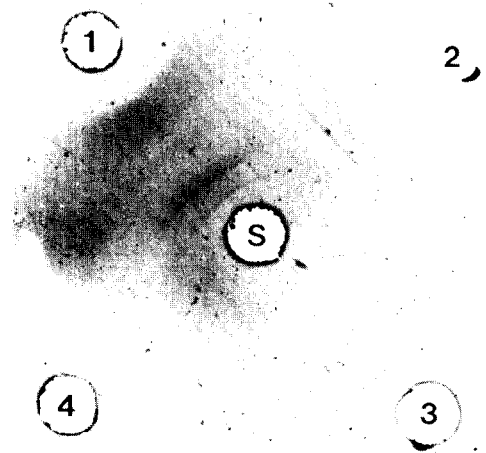


Fig. 3. Agar-gel immunodiffusion analysis(Ouchterlony reaction) of *C. sinensis* antigen. [center well: *C. sinensis* anti-rabbit serum (S), outer wells: 1. whole worm-saline homogenate crude antigen(WWA), 2. affinity-purified antibody-binding antigen(ABA), 3. metacercaria antigen(MEA), and 4. egg antigen(EGA)]

peptide band는 分子量 18,000~21,000(No. 17-18), 29,000~31,000(No. 10-11) dalton의 蛋白質이었으며, minor band로는 分子量 63,600(No. 2), 55,500(No. 5), 38,400(No. 6), 36,200 (No. 7), 32,000~34,000 (No. 8-9) dalton의 泳動성이 뚜렷한 分劃들을 얻을 수 있었다. 분자량 18,000~29,000 사이에 있는 ABA의 分劃들은 확산되어 불분명하게 나타나 있었다.

WWA와 ABA의 酵素免疫反應(ELISA)에 의한 반응도는 WWA가 현저히 예민하게 나타났다(Fig. 6). 즉, WWA는 輕感染群인 第I群에서 6週에 OD값 1.0을 넘었고, II-IV群은 4週에 OD 1.0 이상을 나타냈으나 ABA는 全群 全感染期間 동안 平均 OD값 1.0을 넘지 못하였다. 第III群의 24週의 CD값은 0.950 \pm 0.067 이었고 I-II群은 全 감염기간중 陽性기준치인 OD 0.6에 미치지 못하였다.

2. 肝吸蟲 蟲卵-被囊幼蟲-成蟲 抗原의 電氣 泳動에서 蛋白質 分劃 比較(Comparison of polypeptide fractions of *C. sinensis* egg-metacercaria-adult antigens by electrophoresis)

1) 肝吸蟲 全蟲體 抽出物 粗抗原(WWA)

SDS-PAGE로 分子量에 의해 분리된 WWA의 分劃들(polypeptide bands)은 結果 1에서 나타낸 바와 같이 분자량 11,000~80,000 dalton의 범위에서 35개의 polypeptide band가 관찰되었다. 被囊幼蟲 抗原(MEA)과 蟲卵 抗原(EGA)은 WWA에 비해 전반적으로

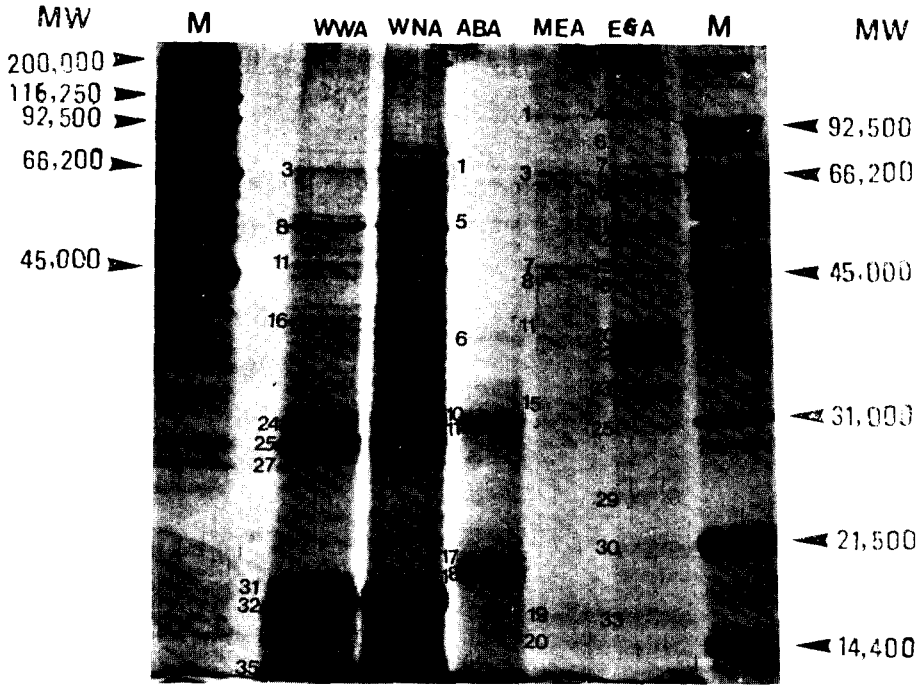


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of *C. sinensis* antigens. [WWA: whole worm-saline homogenate crude antigen, WNA: whole worm NP-40 extract crude antigen, ABA: affinity-purified antibody-binding antigen, MEA: metacercaria NP-40 extract antigen, EGA: egg NP-40 extract antigen, M: marker protein]

단백질량이 현저히 적었다. 동결-融解방법으로 만들어진 saline homogenate인 WWA와 NP 40 extract인 MEA, EGA의 항원 제조방법의 차이를 全蟲體 NP-40 추출항원(WNA; Fig. 4 참조)으로 보인하여 비교하여 보았다. WNA는 WWA보다 단백질 농도가 더 높고(染色상으로) 확산된 band를 나타냈으나 대체로는 WWA와 거의 일치하는 pattern(Fig. 7)이었다. WNA는 분자량 80,000~200,000 dalton 범위에 7~8개의 극히 微細한 minor band 들이 존재하였다. WWA의 major band들은 결과 2에서 나타난 바와 같이 분자량 31,000 dalton 이하에 분포되었고 MEA, EGA보다 단백질량이 현저히 많은 WWA는 major band들을 제외한 분자량 31,000~80,000 dalton 범위에 있는 20개 이상의 band 중 15개가 MEA-EGA의 major band와 染色 농도가 같거나 더 높았다.

2) 被囊幼蟲 抗原(MEA) :

SDS-PAGE로 분리된 MEA의 polypeptide band는 분자량 15,000~100,000 dalton 범위에서 육안적으로 20여개의 band가 관찰되었고(Fig. 4), densitometer로는 좀 더 분리되었다. Band의 數는 육안적으로 보이는 것에 한하였다. 전반적으로 WWA에 비해 단백질량이 현저히 적게(염색농도로) 나타났다(Fig. 4 & 8),

Major polypeptide band는 분자량 44,700(No. 7), 43,900(No. 8), 65,600(No. 3) dalton의 단백질들이었고 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 WWA의 minor band에 해당되는 염색농도를 나타내고 있었다.

3) 蟲卵 抗原(EGA) :

SDS-PAGE에 의해 분리된 EGA의 polypeptide band는 분자량 15,000~200,000 dalton 범위에서 33~35개가 관찰되었다. WWA에 비해 전반적으로 단백질농도(염색농도)가 낮게 나타났다(Fig. 4 & 8). 분자량 36,600(No. 22) dalton의 polypeptide band가 가장 단백질량이 많았고 major protein에 속하는 band들은 분자량 38,500(No. 20), 64,000(No. 9), 62,000(No. 10), 54,500(No. 11), 53,000(No. 12) dalton이었다. 분자량 30,000 dalton 이하에서는 염색성이 낮은 확산된 band들로 나타나 있었다.

4) WWA-MEA-EGA의 polypeptide band 比較 :

各 抗原은 電氣泳動된 전체 단백질량에 차이가 있으므로 抗原間의 직접적인 단백질량을 비교할 수는 없지만 各 抗原 자체의 量的 관계를 파악한 후 말숙단계별 항원間의 단백질의 増減을 비교하였다. WWA의 major protein은 분자량 31,000 dalton 이하에 주로 분포되어 있는 반면, MEA는 분자량 65,600(No.3), 44,700(No.

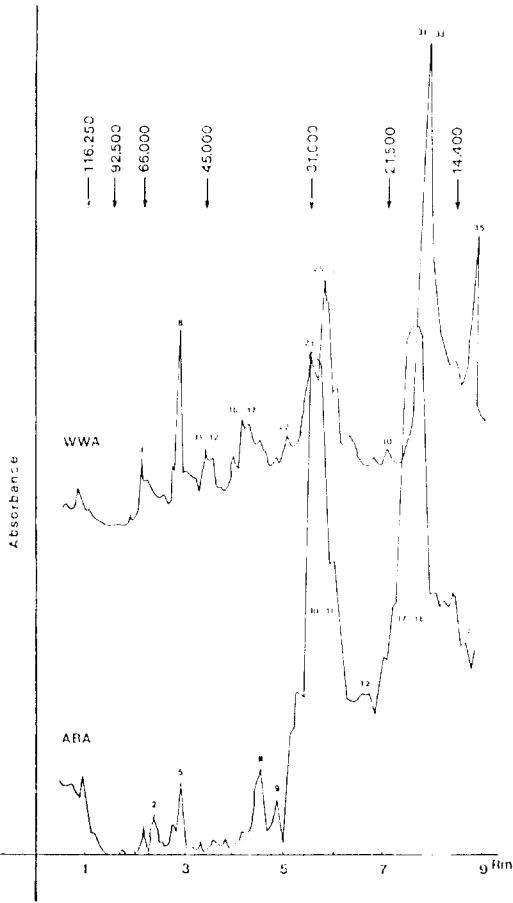


Fig. 5. Absorbance scan of SDS-PAGE gels(10% acrylamide) loaded with *C. sinensis* WWA and ABA(stained with silver). [Rm: electrophoretic mobility of fractions (—bands)]

7), 43,900(No. 8) dalton 범위에서 단백질량이 많았으며 EGA는 분자량 36,600(No. 22), 38,500(No. 20), 64,000(No. 9), 62,000(No. 10), 54,500(No. 11), 53,000(No. 12) dalton의 band들이 뚜렷한 염색반응을 보였다. WWA의 No. 3(분자량 67,000)과 MEA의 No. 3(분자량 66,000), EGA의 No. 8(분자량 66,000)은 동일한 단백질로 보이며 蟲卵 抗原에서는 많이 적었으나 被囊幼蟲과 成蟲 抗原에서는 증가한 것으로 보였다. 또한 동일한 단백질로 보이는 분자량 36,200~36,600 dalton의 polypeptide bands(WWA-No. 20, MEA-No. 14, EGA-No. 22)는 WWA와 MEA에서는 많이 적었으나 EGA에서는 가장 염색농도가 높은 major protein이었다. 분자량 54,500~55,500 dalton(WWA-No. 8, MEA-No. 6, EGA-No. 11)의 단백질은 세 항원에서 상당한 염색농도를 나타내는 poly-

peptide bands로 發育段階에 따라 큰 量的 변동 없이 나타나는 단백질로 관찰되었다. MEA의 분자량 100,200 dalton(No. 1)과 EGA의 107,400 dalton(No. 4)의 band들은 WWA에서는 분수 없었으나 WNA에서는 극히 微細한 minor bands로 나타났다. 분자량 31,000, 28,000~29,000, 11,000~18,500 dalton 범위의 단백질은 成蟲 抗原인 WWA에서는 major protein으로 나타나나 MEA와 EGA에서는 극히 적거나 결여되어 있었다(Fig. 4 & 8).

3. 肝吸蟲 抗原(蟲卵-被囊幼蟲-成蟲)과 感染 家兔血清의 酵素免疫反應 (ELISA of *C. sinensis* antigens and rabbit antisera)

1) 肝吸蟲 粗抗原(WWA)을 이용한 ELISA:

輕感染群(4~10마리 감염)인 第 I 群의 감염 家兔血清과 WWA의 ELISA 성적은 감염 후 3週에 對照群에 비해 OD값이 유의한 차이로 ($p < 0.05$) 상승되었다. 감염 6週에는 對照群에 비해 $p < 0.001$ 의 有意한 差異로 平均 OD값이 1.0 이상(1.013 ± 0.322)으로 되었다. 감염 6週 이후 12週까지는 有意한 差異 없이 OD값이 상승되어 10週 이후 18週까지 OD값 1.390~1.415로 그대프상에서 高平部(plateau)를 유지하였다. 家兔 個體別로는 감염 후 6週(No. 14), 10週(No. 11), 12週(No. 15, 16)까지 OD값이 상승되고 20週 이후 다소 떨어졌으나 有意한 差는 없었다(Fig. 9).

第 II 群은 감염 4週에 平均 OD값이 1.0 이상으로 상승되어 對照群에 비해 $p < 0.05$ 의 有意한 差로 높았으며, 12週 이후 OD값은 1.624~1.836으로 plateau를 유지하였다. 家兔 個體別로는(No. 29) 감염 6週 이후 OD값 2이상을 나타낸 후 24週(관찰기간)까지 계속 같은 OD값을 유지하였다.

第 III 群은 감염 3週에 對照群과 有意한 差로($p < 0.05$) OD값(0.835 ± 0.243)이 상승되어 12週 이후 OD값 1.625~1.707로 plateau를 유지하였다. 家兔 個體別로는 8週(No. 26), 12週(No. 23), 14週(No. 19) 이후 plateau를 유지하였다.

第 IV 群은 감염 후 3週에 對照群에 비해($p < 0.001$) 平均 OD값이 1.011 ± 0.197 로 상승되어 계속 20週까지 상승되었다(OD 1.976 ± 0.041).

各 群의 平均 OD값을 비교해 보면 III~IV 群의 감염 3週 各各의 平均 OD값은 0.835 ± 0.243 과 1.011 ± 0.193 으로 I 群의 3週值 OD 0.086 ± 0.048 보다 각각 $p < 0.05$, $p < 0.001$ 의 有意差로 높아졌으며, I 群의 4週值 OD 1.069 ± 0.411 은 I 群의 3週值 OD 0.357 ± 0.224 보다 $p < 0.002$ 의 有意差로 OD값이 높았다. 各 群의 6週 이후의 OD값은 I 群의 12週 OD값(1.390 ± 0.153)이 IV 群의 12週 OD값 1.695 ± 0.149 보다 낮은($p < 0.05$) 이외에는 各 群間의 有意한 差는 없었다(Fig. 9).

肝吸蟲 抗原과 8例의 肺吸蟲 感染 家兔血清(肺吸蟲 抗原

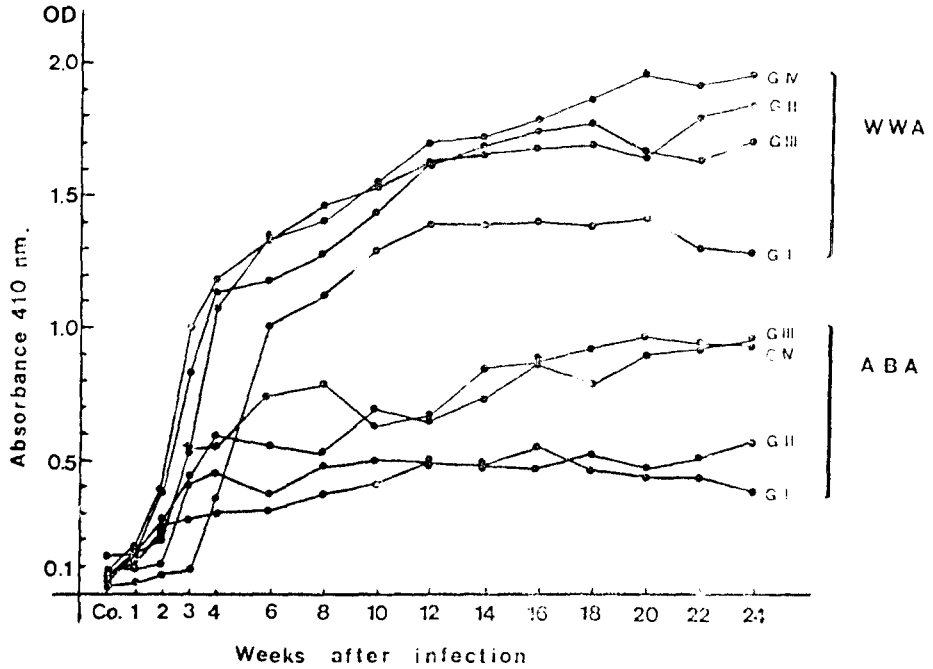


Fig. 6. Optical density(O.D.) values obtained by *C. sinensis* crude antigen(WWA) and affinity-purified antigen(ABA), detected by ELISA with rabbit sera, from preinfection (control: Co.) to the 24th week of infection, in different worm burden groups (I-IV).

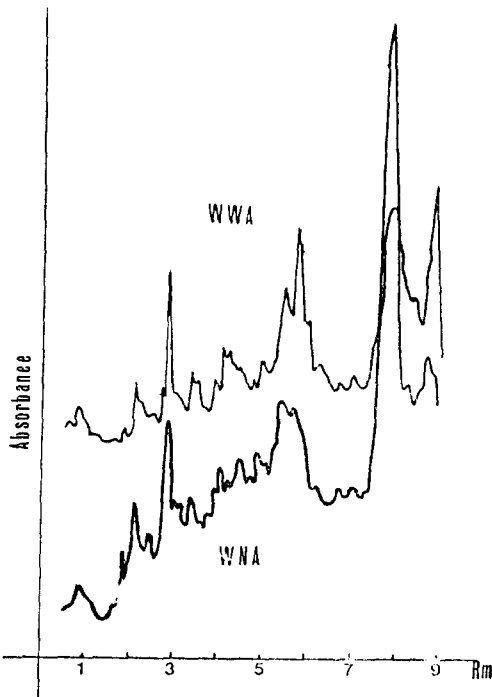


Fig. 7. Absorbance scan of SDS-PAGE gels(10% acrylamide) loaded with *C. sinensis* WWA and WNA(stained with silver).

과 Ouchterlony 양성반응자)과의 交叉反應을 보기 위하여 ELISA를 실시한바 肝吸蟲 粗抗原(WWA)은 肺吸蟲 陽性 환자血清 8例중 6例에서 $OD > 0.6$ 을 나타내었고 $OD > 0.9$ 는 4例에서, $OD > 1.0$ 은 2例, $OD > 2.0$ 이 1例로 2~4例에서 免疫 交叉反應을 나타내었다(Fig. 10).

2) 被囊幼蟲 抗原(MEA)과 蟲卵 抗原(EGA)을 이용한 ELISA :

感染 家兔血清의 MEA에 대한 ELISA 성적은 全群의 感染血清과의 反應에서 抗原性を 인정할 수 없을 정도로 낮은 OD값을 나타내었다. 全 감염群의 OD값은 4~6週 이후 다소 상승되었으나 I~III群은 全 감염기간중 OD값의 最高值가 0.6을 넘지 못하였다. 全群의 全 감염기간중 平均 OD값이 0.702로 나타난 IV群에서 12週에 最高의 OD값을 나타냈을 뿐 微弱한 陽性 OD值를 나타내었다(Fig. 9).

感染 家兔血清과 EGA의 ELISA 成績(OD값)은 對照群과 같은 陰性 反應을 나타내었다.

肺吸蟲 陽性 환자 血清 8例에 대한 MEA와 EGA의 ELISA 성적은 OD값 0.1 미만으로 陰性反應을 나타내었다.

考 察

항체에 대한 민감도 및 특이도가 높은 抗原 成分을 분리하기 위해 精製한 肝吸蟲 精製抗原(affinity-purified

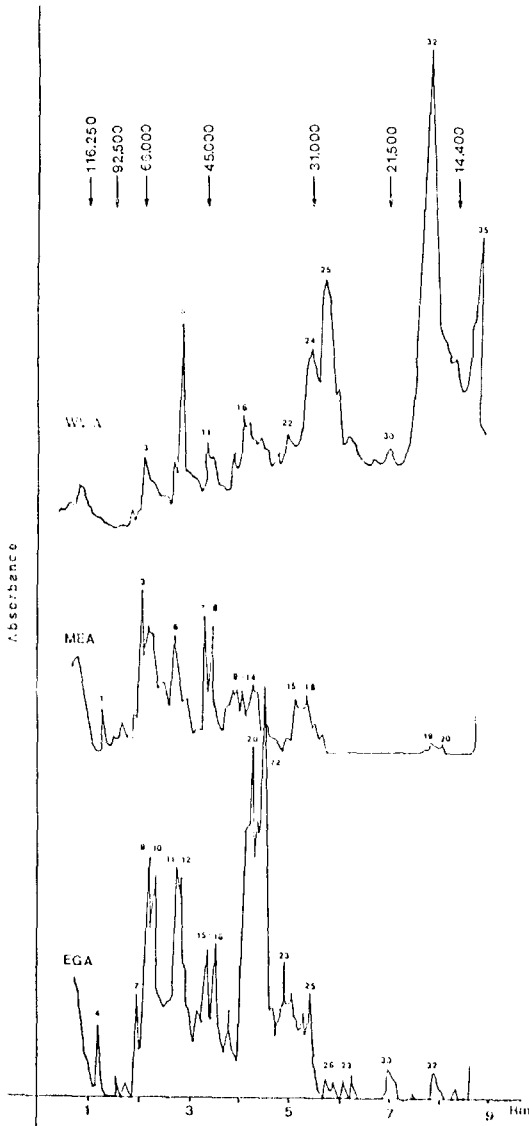


Fig. 8. Absorbance scan of SDS-PAGE gels(10% acrylamide) loaded with *C. sinensis* WWA, MEA and EGA (stained with silver).

antibody binding antigen: ABA)은 肝吸蟲 感染家兔血清과 Ouchterlony 반응으로 沈降反應을 보여 抗原성이 인정되었으나 粗抗原(WWA)에 비해 민감도가 낮았다. ABA는 Ouchterlony 반응으로 4개의 沈降帶를 보였고 WWA는 7개의 沈降帶를 만들었다. ABA는 酵素免疫反應(ELISA)에서 WWA에 비해 현저히 낮은 반응도를 나타내고 있었다(Fig. 6). Carter and Colley(1979)는 con A-Sepharose chromatography로 *Schistosoma*의 soluble egg antigen을 精製하는 과정에서 最少한 화

실한 항원성분 2개씩이 con A와 결합되었거나 또는 결합되지 않았음을 보고한 바 있다. 이로써 精製과정에서 잃어버리는 抗原成分이 있다는 것을 알 수 있겠으나 本實驗과 같은 방법으로 精製된 李 및 張(1986)의 肺吸蟲 精製抗原은 粗抗原에 비해 예민한 반응을 나타내어 本 실험과 相異한 결과를 나타내고 있다. 또한 李 및 張(1986)의 SDS-PAGE 실험에서 肺吸蟲 抗原은 粗抗原의 major protein(主단백질)과 精製抗原의 major protein의 분자량이 일치하였으나 本 실험에서는 WWA의 major protein중 분자량 16,300~18,500, 28,000~29,000 dalton의 polypeptide와 同一한 것으로 보이는 ABA의 major polypeptide bands는 18,000~21,000, 29,000~31,000 dalton의 분자량으로 다소 어긋난 감이 있다. 精製과정중 항원성분이 변질되지 않았나 생각된다. 또한 이유는 알 수 없으나 같은 단백질 농도로 電氣泳動된 SDS-PAGE에서(Fig. 4), 精製抗原(ABA)은 粗抗原(WWA)에 비해 전반적으로 단백질 농도가 현저히 낮게 나타났음을 육안적(염색농도)으로도 알 수 있었다. 이런 要因들이 抗原성을 低下시킨 원인이 되지 않았나 생각되나 精確한 항원성 低下 要因은 후후 검토해 보아야 할 것으로 생각된다.

肺吸蟲과 肝吸蟲의 경우 皮內反應과 抗原注射에 의한 免疫血清反應에서 交叉反應이 빈번하다는 것은 이미 報告된 바 있으나(Chung et al., 1955 & 1956; Tsuji, 1975), 本 실험에서 肺吸蟲 感染血清에 대한 肝吸蟲 粗抗原(WWA)의 ELISA에 의한 免疫交叉反應은 예상보다 훨씬 빈번하다는 것을 나타내고 있었다. 肺吸蟲 抗血清에 대해 肝吸蟲 精製抗原(ABA)으로는 1例(粗抗原으로 OD>2를 나타낸 例)에서 OD 0.32를 나타내고 나머지 7例에서 OD<0.2을 나타내어 免疫交叉反應이 없는 것으로 나타났으나 ABA는 肝吸蟲 抗血清에 대한 반응도가 粗抗原에 비해 현저히 낮았으므로 ELISA의 OD값 陰性만으로 粗抗原보다 特異성이 높다고 단정할 수는 없었다. 本 실험에 의해 粗抗原으로는 빈번한 免疫交叉反應을 일으킬 수 있다는 것을 확인함으로써 特異抗原 精製가 더욱 필요하다고 생각된다.

肝吸蟲의 發育段階別 항원성분의 단백질 구성성분은 WWA가 주로 분자량 31,000 dalton 이하에 major protein이 분포되어 있는 반면, MEA와 EGA는 분자량 36,000~40,000 dalton 이상에 분포되어 있었다. 뿐만 아니라 세 항원은 같은 단백질 농도(35μg/gel)로 전기영동하였으나 WWA에 비해 EGA, MEA가 전체적으로 현저히 단백질 농도(염색농도)가 낮았다. MEA와 EGA의 major protein bands는 WWA의 minor bands에 해당하는 단백질 농도를 나타내고 있었다. 즉 전기영동된 각 항원의 全體 단백질량에 차이를 나타냈을 뿐만 아니라 영동된 WWA의 전체 단백질량은 MEA-EGA에 비해 육안적으로도 현저히 높았다. 따라서 各 抗原間의 직접적인 단백질량을 비교할 수는 없었

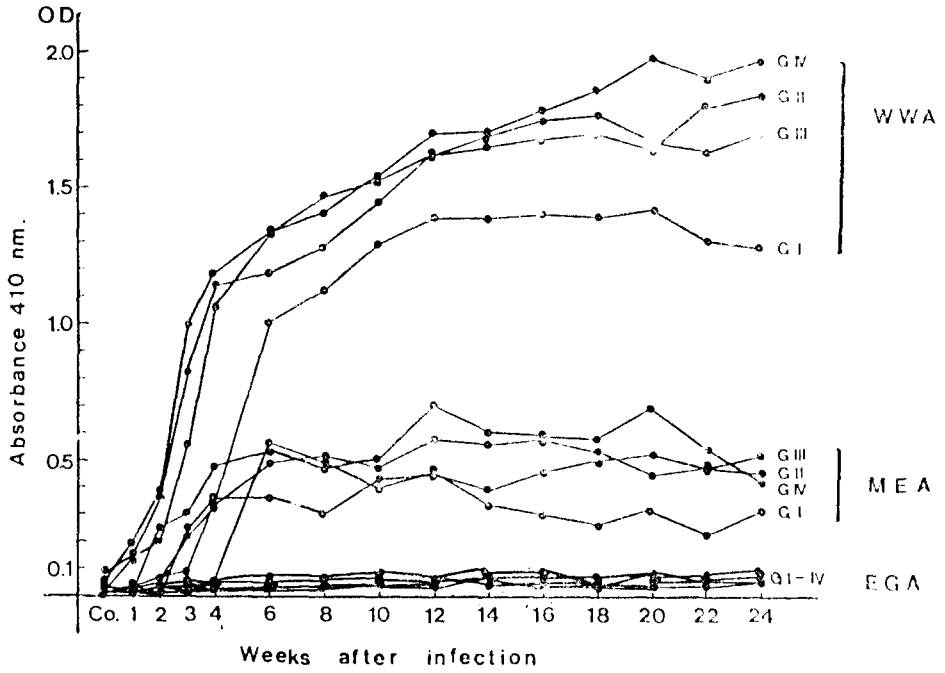


Fig. 9. Optical density (O.D.) values obtained by *C. sinensis* crude antigen (WWA), metacercaria antigen (MEA) and egg antigen (EGA), detected by ELISA rabbit sera, from preinfection (control: Co) to the 24th week of infection in different worm burden groups (I-IV).

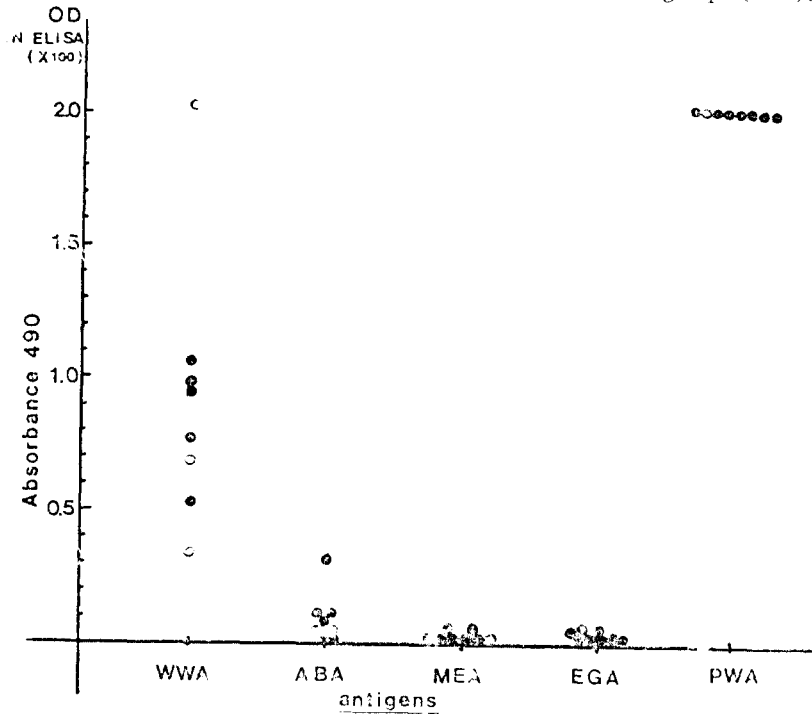


Fig. 10. Optical density (O.D.) distributions by ELISA of eight paragonimiasis human sera to *P. westermani* antigen (PWA) and various *C. sinensis* antigens.

고 각 抗原의 상대적인 bands의 量的 差異(염색농도)로 發育단계별 항원 단백질의 増減을 비교할 수 있었다.

MEA의 major protein은 band No.3, 7, 8로 분자량 43,900~65,600 dalton의 범위에 있었다. EGA의 major protein은 가장 염색농도가 높은 band No.22를 포함하여 No.20, 9, 10, 11, 12 등이며 분자량 36,600~69,700 dalton의 범위에 있었다. 분자량 36,200~36,600 dalton의 단백질은 EGA에서는 가장 단백질량이 많은 band로 나타났으나 MEA와 WWA에서는 감소된 양상을 나타내었고, 반면 분자량 66,000~67,000 dalton의 단백질은 EGA에서는 적었으나 발육함에 따라 점차 증가한 양상을 나타내고 있었다. 분자량 54,500~55,500 dalton의 단백질은 WWA에서는 분자량 31,000 dalton이상의 band중 단백질량이 가장 많은 polypeptide band로 발육 초기에 나타나서 발육단계에 따라 큰 변동없이 나타나는 단백질로 보인다.

EGA와 MEA에서는 없거나 染色性이 약한 확산된 band로 나타나는 단백질 분획중 WWA의 major protein에 해당되는 분자량 11,000~18,500 dalton의 band는 成蟲에서 현저히 증가된 단백질로 생각된다 (Fig. 4 & 9). 崔 등(1981)은 脫囊된 被囊幼蟲의 抗原에서 分子量 23,000~25,000 dalton의 단백질은 존재하지 않았음을 보고한 바 있다. 본 실험의 MEA에서는 분자량 16,100~28,000 dalton 범위의 단백질 분획은 관찰할 수 없었다. 崔 등(1981)의 脫囊幼蟲에서 點이 많았으나 14日 發育蟲體에서 소실되었다고 했던 분자량 44,000 dalton의 단백질은 본 실험에서는 量的으로 감소되었지만 成蟲 抗原인 WWA에서 관찰되었다. 분자량 63,000 dalton의 단백질은 발육과정에서 감소되는 경향이비 이는 崔 등(1981)의 결과와 일치하였다. 崔 등(1981)이 발육과정에서 점차 증가하여 가장 많은 단백질을 나타낸다는 분자량 15,000 dalton의 band는 본 실험에서는 분자량 16,000~17,000 dalton (band No.32)으로 다소 차이는 있으나 본 실험의 major protein (MW 11,000~18,500) 범위에 속하였다. WWA에서는 분자량 100,000 dalton 이상의 단백질 분획은 관찰되지 않았고 MEA와 EGA에서는 각각 1,4個의 bands가 관찰되었다. Hayunga *et al.* (1979a)은 동결-용해 제조방법으로 만들어진 *Schistosoma* 항원은 분자량이 낮은 단백질이 주로 나타난다고 보고한 바 있다.

本 肝吸蟲 成蟲 粗抗原(freeze-thawed saline homogenate)인 WWA와 NP-40 extract인 EGA-MEA를 같은 條件에서 비교하기 위해 成蟲 NP-40 extract 항원(WNA)을 만들어 WWA와 SDS-PAGE로 비교하였다 (Fig. 4). WNA의 band들은 WWA에 비해 전반적으로 다소 확산되어 있었으며 WWA에서 볼 수 없었던 분자량 100,000 dalton 이상의 微細한 minor bands 4~5개가 관찰되었다. MEA (분자량 100,200)와 EGA (분자량 107,400)에서는 뚜렷하게 나타나지만 WWA에

서는 볼 수 없었던 분자량 100,200 dalton의 band가 NP-40 extract 成蟲 抗原인 WNA에서는 극히 微細한 band로 나타났다. 항원 제조방법에 따라 minor band의 有無는 쉽게 일어날 수 있을 것으로 추측된다. 그러나 WWA와 WNA의 major band와 전체적인 band의 양상은 유사하였다 (Fig. 4 & 7).

발육단계별로 増減, 消失 또는 新生되는 단백질 분자가 관찰되었으므로 成蟲 抗原(WWA)의 major protein은 분자량 31,000 dalton 이하에 주로 분포되어 있는 반면 蟲卵 抗原(EGA)과 被囊幼蟲 抗原(MEA)에서는 분자량 30,000 dalton 이하의 단백질은 희박하였다. 제 항원의 major protein의 범위는 WWA는 11,000~18,500 및 28,000~31,000, MEA는 43,900~65,600, EGA는 36,600~69,700 dalton으로 成蟲 抗原에서 단백질 분자의 큰 변화를 볼 수 없었다. 또한 성충 항원인 WWA는 EGA나 MEA에 비해 단백질량이 많았다. 즉 분자량 11,000~80,000 dalton의 범위에 35~40개의 band중 (微細한 bands 포함) major bands를 제외한 분자량 31,000~80,000 dalton의 범위에 24개의 minor band가 있었고 이들 중 15개는 MEA와 EGA의 major band들과 상응하는 단백질을 나타내고 있었다.

ELISA에 의한 발육단계별 간흡충 항원의 항원성은 WWA는 예민하였으나 EGA는 감염 家兎血清과 陰性反應을 나타내어 抗原性이 없었고 MEA는 II~IV群의 일부 家兎血清(6~10週)과 陽性 OD값 0.6이상을 나타내어 미약한 抗原性이 인정되었다. Sun and Gibson (1969)은 間接螢光抗體法으로 肝吸蟲의 被囊幼蟲은 弱한 항원성을 나타내며 蟲卵은 抗原性이 없음을 보고한 바 있다. 또한 Sun (1969)은 circumoval precipitin test로 肝吸蟲의 intact ova는 抗原性이 없다고 한 바 있다. Hackett *et al.* (1985)은 상당한 抗原性이 있는 *Schistosoma* 蟲卵도 成蟲이나 그 幼蟲(schistosomula)에 비해서는 낮은 抗原性을 나타낸다고 하였다. 김 등 (1986)의 肺吸蟲 蟲卵 抗原도 成蟲 抗原에 비해서는 미약한 항원성을 나타내었다. 일반적으로 발육초기인 蟲卵의 항원성은 약한 것으로 생각된다. 그러나 Boctor *et al.* (1979)은 *Schistosoma mansoni* egg homogenate로부터 分子量 200,000 dalton 이상이며 amino acid를 포함하지 않는 polysaccharide antigen을 분리 정제하였고 다른 種(*S. haematobium* 및 *S. japonicum*)과 免疫交叉되지 않는 特異 抗原性 물질로 보고한 바 있다. Hackett *et al.* (1985)도 anti-egg antiserum은 분자량 200,000이상의 surface antigen과 결합된다고 한 바 있다. 따라서 기생충에 따라서는 蟲卵에도 特異 항원 성분이 있으나 대체로 蟲卵 抗原은 감수성이 낮은 것으로 생각된다.

또 Hackett *et al.* (1985)은 *Schistosoma mansoni*에서 항원성이 있는 단백질의 분자량이 15,000, 20,000, 32,000 및 38,000 dalton이었다 하며, 이(1986)의 肺吸蟲 成蟲 抗原의 主成分 분석에서도 분자량 30,000 dal-

ton이하의 분자량을 가진 단백질이었다고 하였다. 또한 Imai(1979)는 Sephadex gel filtration으로 분자량에 의해 분리된 肺吸蟲 抗原 分割중 보다 작은 분자량의 분획은 感染血清과 반응하고 보다 큰 분자량 분획은 免疫(항원물질 주사) 실험과 반응을 보지 못한 바 있다. 즉 기능적인 항원물질은 보다 낮은 분자량의 항원물질임을 암시하고 있다.

Sun and Gibson(1969)은 肝吸蟲 被囊幼蟲의 cyst wall에 중요한 항원 성분이 있고 cyst 内部의 幼蟲도 항원성이 있으나 主 抗原成分은 成蟲에 있다고 보고한 바 있다. 本 肝吸蟲의 蟲卵이나 被囊幼蟲 抗原의 主단백질이 WWA에 비해 보다 高分子(분자량 36,000 dalton)이고 成蟲 抗原의 主단백질이 分子量 31,000 dalton 以下에 분포되어 있으며 ELISA로 예민한 감수성을 나타낸 것으로 보아 기능적인 항원성분은 成蟲에 있음을 나타내고 있다. 앞으로 복합 항원성분 중에서 精製과정에서 敏感度를 弱화시키지 않고 特異 抗原成分을 分離해내는 일이 필요하다고 생각한다.

(本 논문이 나오기까지 수고해 주신 연세의대 기생충학 교실의 장재경 선생님과 순천향의대 예방의학 교실의 이성수 선생님께 진심으로 감사드립니다).

참 고 문 헌

Boctor, F.N., Nash, T.E. and Cheever, A.W.(1979) Isolation of a polysaccharide antigen from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Immunol.*, **122**(1):39-43.

Carter, C.E. and Colley, D.G. (1979) Partial purification and characterization of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen with Con A Sepharose chromatography. *J. Immunol.*, **122**(6):2204-2209.

崔源永·李玉蘭(1979) 各種 寄生蟲의 免疫電氣泳動法에 關한 研究. 기생충학잡지, **17**(2):147-152.

崔源永·陳榮觀·李玉蘭·金雲奎(1981) 肝디스토마의 發育段階別 蛋白質成分의 分析. 기생충학잡지, **19**(1): 8-17.

Christensen, N.O., Nansen, P., Frandsen, F., Bjerneboe, A. and Monrad, J. (1978) *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*: Cross-Resistance in Mice. *Exp. Parasit.*, **46**:113-120.

Chung, H.L., Weng, H.C., Hou, T.C. and Ho, L.Y. (1955) The value of complement fixation test in the diagnosis of paragonimiasis. *Chinese Med. J.*, **71**:47-54.

Chung, H.L., Hou, T.C. and Weng, H.C. (1956) Further studies on paragonimiasis complement fixation test and cross complement fixation reactions of sera of patients with paragonimiasis, clonorchiasis and schistosomiasis to different trematode antigens. *Chinese Med. J.*, **74**:207-221.

Hackett, F., Simpson, A.J.G., Knight, M., Ali, P., Payares, G. and Smithers, S.R.(1985) *Schistosoma mansoni*: Antigen preparations which induce antibodies to schistosomula surface antigens. *Exp. Parasit.*, **60**:294-303.

Hayunga, E.G., Darwin, K., Taylor, D.W. and Vannier, W.E. (1979a) Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* I. Evaluation of techniques for radioisotope labeling of surface proteins from adult worms. *J. Parasit.*, **64**(4):488-496.

Hayunga, E.G., Murrell, K.D., Taylor, D.W. and Vannier, W.E. (1979b) Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* II. Antigenicity of radiolabeled proteins from adult worms. *J. Parasit.*, **65**(4):497-506.

Hillyer, G.V., DeViaz, A.L. and Reyes, C.N.(1977) *Schistosoma mansoni*: Acquired immunity in mice and hamsters using antigens of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasit.*, **42**:348-355.

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.

Huer, B., Kim, S.I., Kang, S.Y. and Cho, S.Y. (1985) Electrophoretic patterns of proteins from *Paragonimus westermani* in early developmental stages. *Korean J. Parasit.*, **23**(2):189-196.

Imai, J.I. (1979) Studies on the antigenic analysis in *Paragonimus westermani* 2. Observations on antibody response against fractionated antigens from adult-worm extract. *Tropical Med. (Nagasaki)*, **21**(2):45-55.

陳成元·李駿商·林漢鍾(1983) 肝吸蟲 및 肺吸蟲症에 있어서 免疫 動物血清을 利用한 ELISA法과 Ouchterlony法의 比較研究. 高麗醫大論文集, **20**(1):191-199.

김석인·고응우·강신영·조승연(1986) 폐흡충 증란 항원의 항원성 평가. 기생충학잡지, **24**(1):49-54.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:681-685.

李駿商(1975) 肝吸蟲의 免疫電氣泳動에 關한 研究. 高麗醫大論文集, **12**(2):487-493.

이옥란(1986) 數種의 웨스테르만 肺吸蟲 抗原의 血清 免疫 沈降反應과 抗原의 電氣泳動像. 順天鄉大學論文集, **9**(2):239-246.

李玉蘭·張在景(1986) 肺吸蟲의 粗抗原과 精製항원에 의한 肺吸蟲 감염 고양이 實驗의 免疫酵素反應. 기생충학잡지, **24**(2):187-193.

- 李玉蘭·安郁洙(1987) 肺吸蟲 感染 家免의 免疫診斷에 대한 研究 1. 全蟲體 抽出物 粗抗原에 대한 ELISA. 順天鄉大學論文集, 10(2):409-414.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Sadun, E.H., Walton, B.C., Buck, A.A. and Lee, B.K. (1959) The use of purified antigens in the diagnosis of *Clonorchis sinensis* by means of intradermal and complement fixation tests. *J. Parasit.*, 45(2):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(6):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. Parasit.*, 17: 340-349.
- Sun, T. and Gibson, J.B. (1969) The sites of antigen formation in different developmental stages of *Clonorchis sinensis*. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 22:263-271.
- Sun, T. (1969) The non-antigenicity of intact ova of *Clonorchis sinensis*. *J. Med. Microbiol.*, 2:358-362.
- Tsuji, M. (1975) Comparative studies on the antigenic structure of several helminths by immunoelectrophoresis. *Jap. J. Parasit.*, 24(4):227-236 (in Japanese).
- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., Fleck, D.G., Perkins, M. and Oladehin, B. (1976) A microplate enzyme immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J. Clin. Path.*, 29:150-153.
- Wykoff, D.E. (1959) Studies on *Clonorchis sinensis*. II. Development of an antigen for complement fixation and studies on the antibody response in infected rabbits. *Exp. Parasit.*, 8:51-57.
- 梁正成·李駿商·林漢鍾(1983) 肝吸蟲症 診斷에 있어서 ELISA법의 應用에 관한 研究. 高麗醫大論文集, 20(1):201-209.

==Abstract==

Studies on the Immunodiagnosis of Rabbit Clonorchiasis

2. Immunoaffinity purification of whole worm antigen and characterization of egg, metacercaria and adult antigens of *Clonorchis sinensis*

Ok-Ran Lee, Pyung-Rim Chung* and Hae Seon Nam

Department of Parasitology, Soonchunhyang University College of Medicine, Cheon-An City, Ssangyong-dong, Chungnam 330-090, and Department of Parasitology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea*

The sensitivity and specificity of crude and affinity-purified antigens of *Clonorchis sinensis* obtained from the infected rabbits were studied. Stage-specific antigenic proteins from the eggs, metacercariae and adult worms were characterized by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The results were as follows:

1. The antibody-binding antigen (ABA) purified from whole worm crude antigen (WWA) by CNBr-activated Sepharose 4B affinity chromatography made 4 specific bands against rabbit anti-sera on Ouchterlony gel diffusion plate, while WWA made 7 bands. Major WWA protein bands by SDS-PAGE were found at 16,300~18,500 and 28,000~29,000 daltons, while major ABA protein bands were at 18,000~21,000 and 29,000~31,000 daltons. The reactivity of ABA with rabbit anti-sera in ELISA was remarkably less sensitive than that of WWA.

2. Molecular weights of egg antigen (EGA), metacercarial antigen (MEA) and adult worm antigen (WWA) of *C. sinensis* ranged from 15,000~200,000 daltons, 15,000~100,000 daltons and 11,000~80,000 daltons, respectively. Major WWA proteins consisted mainly of polypeptide bands of low molecular weight, less than 31,000 daltons, while those of EGA and MEA consisted of higher molecular weights than 30,000 daltons.

3. The ELISA reactivities of WWA to rabbit anti-sera were remarkably greater than those of MEA. EGA showed negative reaction throughout the experiments. WWA showed higher optical density (O.D.) than 1.0, when reacted with rabbit anti-sera obtained at 4~6 weeks after the infection. In the rabbit anti-sera later than 12 weeks after the infection, the O.D. reacting with WWA showed a plateau without variation. MEA showed relatively low O.D. values (<0.6), when reacted with anti-sera from lightly infected groups throughout the experiments, although there were some weak positive cases (O.D.>0.6) in heavily infected groups. MEA reacted with rabbit anti-sera showed negative results on Ouchterlony gel diffusion plates.

Summarizing the above results, it is suggested that the whole worm antigen prepared from the adult worms of *C. sinensis* is most highly antigenic. However, this antigen might reveal cross reactions with other trematodes such as *Paragonimus westermani*, therefore, purification of antigenic proteins from the crude antigen is essential to increase the sensitivity and specificity for the immunodiagnosis of clonorchiasis.