기 생 충 학 잡 지 제26권 제4호
The Korean Journal of Parasitology
Vol. 26, No. 4, 245-254, December 1988

낭미충(*Cysticercus*)과 스파르가눔(*Sparganum*)에서 추출한 조항원의 면역학적 특성 및 면역진단에의 응용

1. 낭미충에서 추출한 조항원 성분의 면역학적 특성*

경상대학교 자연대학 생물학과

김 창 환

Tropical Diseases Unit, Toronto General Hospital, Toronto, Canada

James Yang

요 약 : 유구낭미충(이하 낭미충)(*Cysticercus cellulosae*)에서 추출한 조항원으로 낭미충증(cysticercosis), 스파르가눔증(sparganosis) 및 포충증(hydatidosis) 환자 및 정상인 혈청내 IgG 항체와의 혈청학적 반응을 ELISA 및 EITB 방법으로 추적하였다. ELISA에서 낭미충의 조항원 단백은 스파르가눔증 환자 혈청과의 교차 반응도 보였고, 포충증 환자 혈청에 대해서는 낭미충 환자 혈청보다 오히려 높은 흡광도(O.D.)를 보였다. 낭미충 조항원을 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 260 KDa~22 KDa 범위에서 31개의 polypeptide band를 얻었으며 이 중 11개의 분획이 강한 염색성을 나타내었다. 낭미충 조항원과 낭미충증 환자 혈청과의 EITB 반응에서 22개의 항원대가 관찰되었으며 이 중 104 KDa, 82 KDa, 78 KDa 및 59 KDa는 모든 검사 혈청에서 인지되었다. 또 22개의 항원대 중 12개는 정상인 혈청에서도 반응이 관찰되어 교차반응하는 비특이성 항원 성분으로 해석되었다. 낭미충 조항원과 스파르가눔증 환자 혈청과의 반응에서 11개의 항원대가 인지되었으며 이 중 낭미충증 환자 혈청과 교차반응하는 9개의 항원대가 인지되었다. 나머지 163 KDa 및 131 KDa 항원대는 스파르가눔 환자에서만 동정되었다. 낭미충 조항원과 포충증 환자 혈청과의 반응에서는 21개의 항원대가 인지되었는데, 이 중 63 KDa는 포충증 환자에서만 인지되었고 나머지는 낭미충증 환자 혈청과 교차반응하는 항원대이었다. 한편 낭미충 조항원 중 104 KDa, 82 KDa, 72 KDa, 59 KDa 및 34 KDa는 낭미충증, 스파르가눔증 및 포충증 환자와 정상인의 혈청에서도 모두 교차반응을 일으키는 항원이었다.

Key words: *Cysticercus*, SDS-PAGE, ELISA, EITB, serological cross reactions, polypeptide antigens

서 론

유구낭미충은 유구조충(*Taenia solium*)의 유충(metacestode)으로서 인수공통기생충증(zoonosis)을 일으키며 감염된 돈육을 불완전하게 조리해 섭식하거나 충란에 오염된 음식물을 통하거나, 충란에 의한 자가감염 등으로 낭미충증(cysticercosis)의 원인이 되고 있다. 한국에서 낭미충증 증례 보고 중에는 뇌낭미충증(neurocysticercosis)이 38.3%나 된다고 보고한 경우도 있다(Park, 1958; 김 및 이, 1960; 임 등, 1980).

피하 기생 낭미충증은 외과적 생검으로 쉽게 진단할 수 있으나 뇌나 척수와 같은 심부 내장 조직의 낭미충증은 진단에 어려움이 있다. 그러나 이에 대하여 1977~1980년 사이에 computerized tomography(CT)가 이용되어 뇌낭미충증을 진단하는데에 유용한 것으로 보고되었다(Rodriguez-Carbajal *et al.*, 1977 & 1983; 홍 등, 1978; 고 및 심, 1980). 그러나 CT에 의한 진단이라도 결정적 병인 진단을 하는 데에는 애매한 경우가 있음을 배제할 수 없다. 이러한 병인을 규명하는 데에 면역 혈청학적 진단법을 도입함으로서 보다 정확한 진단을 유도하여 왔다(WHO, 1976). 그러나 면역학적 진단도 항원, 항체의 선택, 진단 방법 등에 따라 특이성이 다양하여 만족스러운 결과를 얻지 못하고 있다(Flisser *et al.*, 1979). 이것은 낮은 재현성, 다른 기생충과 교차반응을 일으키는 비특이 항원 성분과, 적합하지 못한 정상 혈청을 대조로 하여 생기는 낮은

* 이 연구는 1987년도 문교부 해외파견 연구조성비의 지원으로 수행되었음.

감수성 등 여러가지 문제 때문이었다(Schantz *et al.*, 1980; Coker-Vann *et al.*, 1984; Mohammad *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 1984; Flisser and Larralde, 1986).

최근에는 enzyme-linked immunoelectrophoretic transfer blot (EITB)을 이용하여 복합 항원 성분의 면역학적 특성을 추구하고 있다(Towbin and Gorden, 1984; Grogl *et al.*, 1985; Gottstein *et al.*, 1986). 이 실험에서는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)와 EITB를 도입하여 낭미충(*Cysticercus*)에서 추출한 조항원 성분을 항원으로 하여 낭미충증 환자 혈청의 반응을 관찰하되 계통분류학상 같은 목(order)에 속하는 hydatid cyst(포충 ; *Echinococcus* sp.의 metacestode), 또는 목이 다른 sparganum(스파르가눔 ; *Spirometra* sp.의 metacestode) 감염 환자 혈청과의 면역혈청학적 반응을 함께 관찰함으로써 낭미충의 조항원 성분 중 비특이 항원 성분과 특이 항원 성분을 확인하고 ELISA에서 다른 질환과 위양성(false positive) 반응을 일으키는 항원 성분을 알고자 하였다.

재료 및 방법

유구낭미충의 준비 :

유구낭미충(*Cysticercus cellulosae*)에 자연 감염된 제주도산 돼지의 근육에서 0.5×1 cm 크기의 타원형 낭미충만을 적출하여 생리식염수에 여러 번 씻은 다음 파손되지 않은 충체를 −20°C에 보관하고 있던 것을 안양 가축위생연구소에서 분양받아 냉동 건조시켜 사용하였다.

조항원의 준비 :

낭미충에서 조항원 성분의 추출은 Fig. 1과 같은 방법으로 하였다. 즉 초음파 발생기(ultrasonicator, Braun Sonic 1510 B)에서 낭미충을 얼음이 담긴 용기에서 냉각시키면서 100 watt에서 30초 동안 작용하고 60초간 냉각시키는 과정을 10회 되풀이하여 균질화(homogenize)시켰다. 조항원 재료의 단백질 정량은 Bradford (1976)의 방법을 참고로 하되 Bio-Rad (Richimond, California)에서 구입한 Bio-Rad protein assay reagent를 사용하였고 이의 assay procedure에 따라 정량하였다.

혈 청 :

항원-항체 반응에 사용한 혈청은 캐나다의 Toronto General Hospital에 입원한 환자와 외래환자 중 CT에서 뇌낭미충증(neurocysticercosis)으로 진단된 환자 혈청을 사용하였으며, 스파르가눔증(sparganosis) 환자의 혈청은 생검과 ELISA에서 양성 반응으로 확인된 사람의 혈청이었으며 이중 일부는 중앙의대 기생충학교실에서 보관하였던 혈청을 사용하였다. 포충증(hydatidosis) 환자의 혈청은 간접 혈구응집 반응(indirect hemagglutination test: IHA)에서 양성 반응을 나타내었고 그 중 일부는 생검으로 확진된 사람의 혈청을 사용하였다.

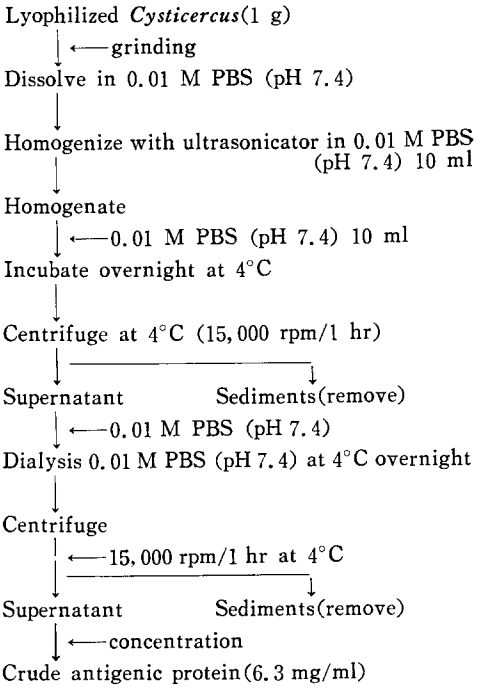

Fig. 1. Extraction procedure of crude antigenic protein from *Cysticercus*.

Micro-ELISA:

ELISA는 Voller *et al.*(1976)이 기술한 방법에 따랐으며 ELISA에 사용한 조항원 단백질의 함량이 3 μg/ml 되게 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer로 희석하여 polystyrene microplate의 각 well에 100 μl(항원 단백질 함량 ; 0.5 μg/100 μl)씩 주입하여 37°C에서 하루 밤 반응시켰다. 이 microplate를 세척 용액(0.9% NaCl과 0.05% Tween-20)으로 3분간 3번씩 씻은 다음 혈청을 3% Skim milk powder-PBST 용액으로 1 : 100으로 희석하여 100 μl씩 주입시킨 후에 37°C 습실에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 과정이 끝난 후에 다시 전과 같은 세척 용액으로 씻고 horseradish peroxidase conjugated anti-human IgG goat serum(Gamma Chain; ICN Chemical Credential Immunobiol.)을 3% SMP-PBST 용액으로 1 : 10,000 희석하여 100 μl씩 주입한 다음 37°C 습실에서 1시간 반응시킨 후 다시 전과 같은 세척 용액으로 씻었다. 여기에 기질 용액으로 OPD-H_2O_2 (*o*-phenylenediamine 50 mg을 pH 5.0의 0.1 M phosphate-citrate buffer 100 ml에 용해하고 여기에 0.5% H_2O_2를 OPD 10 ml 당 100 μl씩 주입한 것)를 사용하여 실온하에 어두운 곳에서 30분간 반응한 후에 2 N H_2SO_4 용액 50 ml씩을 각 well에 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이 과정이 끝난 plate를 Titer-spectrophotometer로 492 nm의 파장에서 흡광도, 즉 O.D. (optical density)를 측정하여 판독하였다.

SDS-PAGE:

전기영동은 Bio-Rad (Richimond, California)에서 공급된 시약과 기구(Min. Protein TM 2 set; power supply 250/200)를 사용하였으며 Laemmli(1971)의 방법에 따라 하되 discontinuous SDS-buffer system과 Bio-Rad에서 제공한 방법을 이용하였다. SDS-PAGE에서는 resolving gel로서 1% SDS를 포함한 12% polyacrylamide gel을 사용하였고 stacking gel은 5% polyacrylamide gel을 사용하였다. 영동은 실온에서 하고 stacking gel은 25 mA로, resolving gel은 bromophenol blue가 gel 밑에 도달할 때까지 50 mA로 통전시켰다.

전기영동을 시작하기 전에 낭미충에서 추출한 조항원을 sample buffer 용액에 1 : 4로 희석한 후 100°C에서 3분간 가열 처리한 다음 냉각시켜서 gel의 각 well에 20 μl(단백질 함량 ; 124 μg/20 μl)씩 주입하였으며 표준 단백질(marker proteins)로는 분자량 200,000 dalton에서 14,400 dalton 범위의 SDS-PAGE용 표준 단백질(Bio-Rad Lab.)을 사용하였다. 전기영동이 끝난 후, 일부 gel은 EITB에 사용하였고 일부는 Morrissey (1981)가 기술한 방법에 따라 Coomassie blue R-250 용액에 염색하였다. 또 일부는 Oakley *et al.* (1980), Morrissey(1981), Tsang *et al.* (1984) 등이 기술한 방법에 따라 silver stain을 하였다.

EITB:

SDS-PAGE로 전기영동한 조항원 성분의 분획된 gel을 Towbin *et al.* (1979), Tsang *et al.* (1983), Grogl *et al.* (1985) 등이 기술한 방법을 참고로 하여 electrophoretic transfer instruction을 사용하여 Bio-Rad에서 제공한 방법에 따라 nitrocellulose 막에 전기영동 전이를 하였으며 영동 전이 전개는 Tris-glycine transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3/20 % methanol) 용액을 사용하여 30 V (0.11 A)로 17시간 반응시켰다.

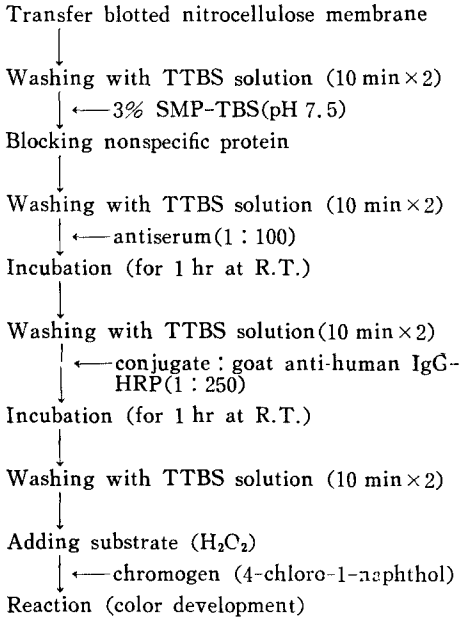

Fig. 2. Procedure of ELISA.

영동이 끝난 nitrocellulose막을 TTBS(20 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) 용액에 10분씩 2회 세척한 다음 일부는 amido black 염색액(10.15% amido black 용액 65 ml, methanol 25 ml)에 염색하여 대조(control blot)하였고 나머지 nitrocellulose 막은 효소 표식 항원-항체 반응 검사(ELISA)하는데에 사용하였다.

효소 표식 항원-항체 반응 검사는 Fig. 2와 같은 과정으로 하였으며 blocking solution으로는 3% Skim milk powder-TBS 용액을 사용하였고 혈청은 1% SMP-TBS 용액으로 1 : 100배 희석하고, conjugate인 goat anti-human IgG-HRP는 1% SMP-TBS 용액으로 1 : 250배 희석하여 사용하였다.

결 과

ELISA 결과 :

낭미충에서 추출한 조항원에 대하여 낭미충증 환자, 스파르가눔증 환자, 포충증 환자 혈청중 IgG 항체와의 반응을 ELISA로 측정한 바 흡광도(OD)는 Table 1과 같았다. 낭미충증 환자에서는 0.18±0.026 (mean+SD)에서 0.86±0.073까지의 분포이고 대조군인 정상인 혈청과의 반응치는 0.16±0.024에서 0.20±0.032였다. 양성 기준의 OD치를 0.2로 하였을 때 7명의 낭미충증 환자 중 6명이 양성이었으며 따라서 민감도(sensitivity)는 85.7%이었다.

스파르가눔증 환자의 혈청에서는 OD치가 0.14±0.028에서 0.44±0.036으로 5명중 3명이 양성으로 나타났으며 (60.0%), 포충증 환자의 혈청에서는 0.46±0.035에서 1.24±0.030의 범위로 9명 모두가 양성으로 나타났다. 또한 OD 측정치가 낭미충증 환자의 경우보다 높았다.

조항원의 SDS-PAGE:

낭미충에서 추출한 조항원을 SDS-PAGE로 전개하여 얻은 항원 단백질의 분획은 Fig. 3과 같다. 즉 260 KDa에서 22 KDa에 이르는 분자량을 가진 분획으로 Coomassie blue R-250에 염색된 겔에서는 21개의 단백질 분획이 확인되었으며 이중 66 KDa, 51 KDa, 40 KDa, 38 KDa, 31 KDa등 5개의 단백질 분획이 강하게 염색되었다. Silver-stain에 염색된 겔에서는 31개의 단백질 분획대가 확인되었고 이중 230 KDa, 150 KDa, 97 KDa, 66 KDa, 51 KDa, 40 KDa, 38 KDa, 36 KDa, 31 KDa등 11개의 단백질 분획대가 강한 염색성을 나타내었다.

Table 1. The ELISA absorbance values obtained in patients sera using *Cysticercus* crude extract as antigen(data of 7, 5, 9 sera of each disease and 7 controls)

Absorbance(O.D.*) in			
Cysticercosis sera (mean±SD)	Sparganosis sera (mean±SD)	Hydatidosis sera (mean±SD)	Normal sera (mean±SD)
0.64±0.056	0.14±0.028	0.78±0.086	0.17±0.019
0.64±0.036	0.15±0.042	0.68±0.043	0.16±0.024
0.45±0.064	0.25±0.030	0.87±0.084	0.17±0.019
0.43±0.067	0.44±0.036	0.66±0.099	0.17±0.022
0.86±0.073	0.42±0.032	1.24±0.030	0.19±0.032
0.66±0.035	—	0.85±0.040	0.20±0.032
0.18±0.026	—	0.46±0.035	0.18±0.031
—	—	0.95±0.033	—
—	—	0.52±0.090	—

* optical density

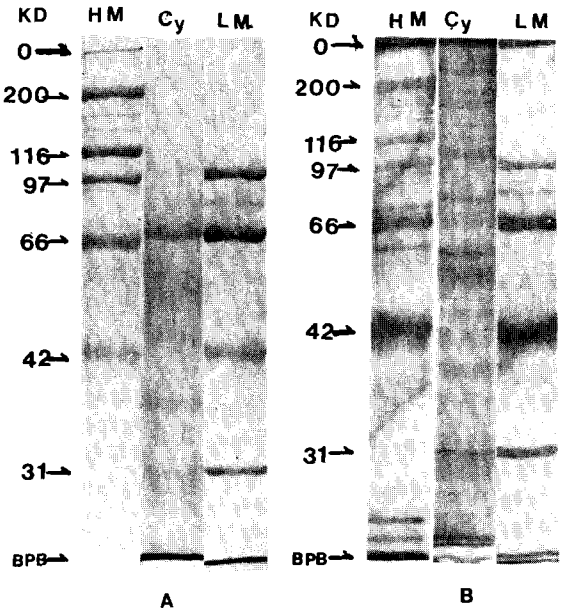

Fig. 3. Resolved bands of crude antigenic protein extracted from *C. cellulosae* by 12% SDS-PAGE.
(A: Protein was visualized by staining with Coomassie blue R-250, B: Protein was visualized by staining with silver)
[HM: High molecular weight marker protein, LM: Low molecular weight marker protein, BPB: Bromophenol blue, Cy: *Cysticercus* crude antigenic protein]

낭미충증 환자 혈청으로 인정된 조항원 성분 :

조항원 성분이 전이된 nitrocellulose 막을 7명의 낭미충증 환자, 4명의 스파가르가눔증 환자 및 7명의 정상인 혈청중 IgG 항체와 혈청 반응한 결과는 Table 2와 같다. 이 중 7명의 낭미충증 환자 IgG 항체와 반응하여 동정된 항원 성분의 분획은 Fig. 4와 같다. 낭미

Table 2. Crude antigenic proteins from *Cysticercus* reacting with cysticercosis, sparganosis, hydatidosis and normal sera by EITB

Antigenic proteins resolved by 12% SDS-PAGE (Mw:KDa)	Crude antigenic proteins reacting with			
	Cysticercosis sera (7 sera)	Normal control sera (7 sera)	Sparganosis sera (4 sera)	Hydatidosis sera (9 sera)
260	+4	—	—	—
230	+5	—	+4	+7
200	+6	—	+4	+5
180	+4	—	—	+8
163	—	—	+4	—
150	+4	+4	—	+9
131	+1	—	+1	—
116	+1	—	—	+6
104	+7	+3	+1	+8
97	—	+7	+3	—
92	+4	—	—	+3
82	+7	+7	+4	+8
78	+6	+1	—	+2
72	+4	+7	+4	+7
66	+5	—	—	+2
63	—	—	—	+7
59	+7	+7	+4	+2
54	+2	—	—	+1
51	+1	—	+2	+9
48	+6	—	—	+4
45	+4	+1	—	+2
42	+2	+1	—	+6
40	—	—	—	—
38	+4	+2	+2	+2
36	+3	—	—	+4
34	+4	+1	+1	+8
31	+2	—	+1	+3
28	+6	—	—	+5
26	—	—	—	+1
24	+2	—	—	+6
22	—	—	—	—

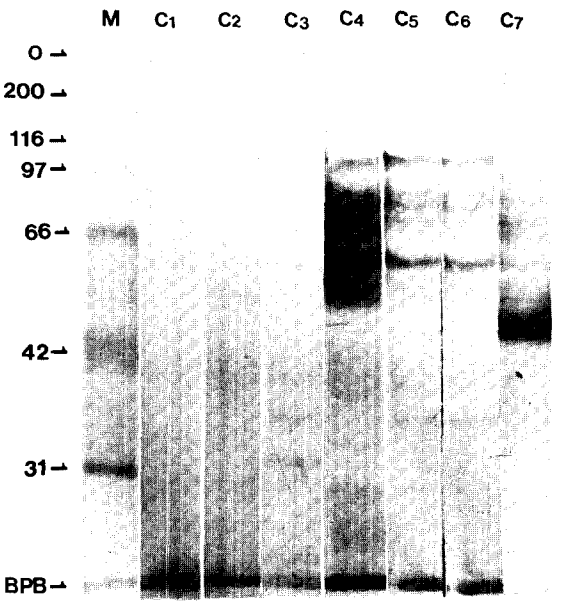

Fig. 4. Antigenic components from *Cysticercus* reacting with sera of 7 cysticercosis patients.
(M: Marker protein, C_n: Serial No. of cysticercosis sera)

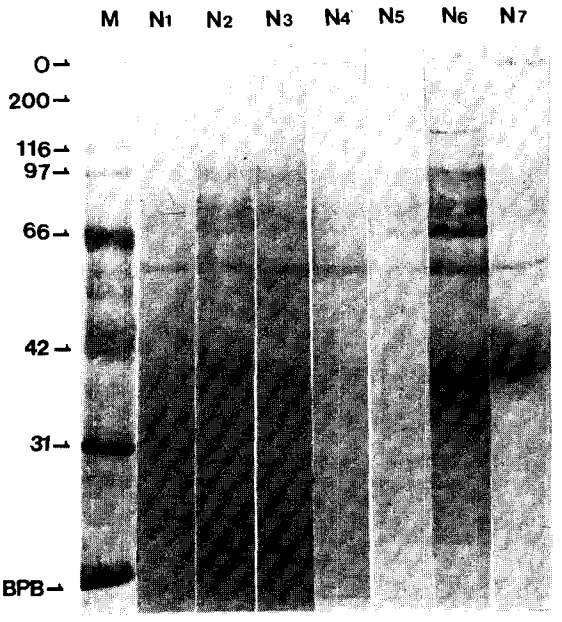

Fig. 5. Antigenic components reacting with sera of 7 normal humans (control group).
(M: Marker protein, N_n: Serial No. of normal control sera)

충증 환자 혈청에서는 260 KDa에서 24 KDa에 이르는 분자량을 가진 25개의 항원 성분이 동정되었으며 이중 104 KDa, 82 KDa, 59 KDa의 항원 성분은 7명 전원에서 인지되었고 260 KDa, 78 KDa, 48 KDa, 28 KDa는 7명중 6명에서 인지되었다(Table 2).

이들 분획을 환자 개인별로 분석하여 보면, C_1(case 1)에서는 104 KDa에서 38 KDa의 분자량을 가진 6개의 항원 성분이 인지되었고 C_2에서는 200 KDa에서 28 KDa의 분자량을 가진 12개의 항원 성분이 인지되었다. 이 중 104 KDa, 83 KDa, 78 KDa, 59 KDa, 48 KDa, 38 KDa가 비교적 강한 반응을 나타내었다. C_5와 C_6에서는 16개의 항원 성분이 인지되었고 이 중 104 KDa, 82 KDa, 78 KDa, 59 KDa의 성분대가 강한 반응을 나타내었다. 또한 C_7에서는 11개의 항원 성분이 인지되었고 이중 104 KDa에서 51 KDa의 분자량을 가진 항원 성분에서 강한 반응을 나타내었다.

정상인의 혈청 내 IgG 항체와의 반응에서는 Table 2에서 보는 바와 같이 150 KDa에서 34 KDa에 이르는 범위의 분자량을 가진 11개의 항원 성분이 인지되었고 이 중 97 KDa, 82 KDa, 72 KDa, 59 KDa 등은 7명 전원에서 인지되었으며 각 개인별 반응 결과는 Fig. 5와 같다.

정상인의 혈청중 IgG 항체에 의해 인지된 항원 성분 중 97 KDa의 항원 성분을 제외한 다른 10개는 낭미충증 환자 혈청내의 IgG에 의해서도 동정된 분자량이 같은 성분으로서 서로 교차 반응을 일으키는 항원 성분

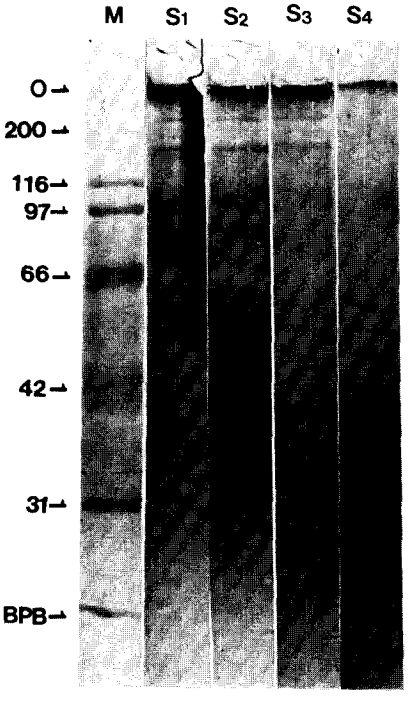

Fig. 6. Antigenic components reacting with sera of 4 sparganosis patients.
(M: Marker protein, S_n: Serial No. of sparganosis sera)

이었다. 따라서 낭미충증 환자의 IgG 항체에 의해 동정된 25개의 항원 성분중 15개는 낭미충증 환자 혈청에 의해 동정된 것으로 볼 수 있었다.

스파르가눔증 환자혈청으로 인지된 낭미충의 조항원 성분 :

스파르가눔증 환자 4명의 IgG 항체와 혈청 반응에 의해 인지된 낭미충 조항원 성분은 Table 2와 같으며 개인별 혈청 반응 결과는 Fig. 6과 같았다. 즉, 230 KDa에서 31 KDa 범위의 분자량을 가진 13개의 항원 성분이 동정되었으며 이 중 230 KDa, 200 KDa, 163 KDa, 82 KDa, 72 KDa, 59 KDa 등은 4명 전원에서 인지되었다. 낭미충증 환자의 IgG 항체에서 인지된 항원 성분과 비교하면 163 KDa는 스파르가눔증 환자 혈청에서만 인지되었고 나머지 12개는 낭미충증과 교차반응을 일으키는 항원 성분이었다.

포충증 환자 혈청으로 인지된 낭미충의 조항원 성분 :

포충증 환자 9명의 IgG 항체에 의해 인지된 조항원 성분은 Table 2에서와 같이 230 KDa에서 24 KDa의 분자량을 가진 25개의 항원 성분이 동정되었다. 이 중 150 KDa, 51 KDa는 9명 전원에서 인지되었으며 180 KDa, 104 KDa, 82 KDa, 34 KDa 항원 성분은 9명중 8명의 혈청에서 인지되었고 또한 230 KDa, 72 KDa, 63 KDa는 9명중 7명의 혈청에서 인지되어 비교적 많은 빈도로 나타나고 있었다. 개인별 혈청 반응의 결과는 Fig. 7과 같이 개체에 따라 다소 차이가 있으나 150 KDa, 104 KDa, 63 KDa, 34 KDa 등은 강한 반응이 나타났다.

낭미충증 환자의 IgG 항체에 의해 인지된 항원 성분과 비교하면 63 KDa의 항원 성분은 포충증 환자의 혈청에서만 인지되었고, 나머지는 모두 교차 반응을 일으키는 항원 성분이었다. 또 104 KDa, 82 KDa, 72 KDa, 59 KDa, 38 KDa, 34 KDa 등의 항원 성분은 낭미충증, 스파르가눔증, 포충증 등의 환자 IgG에서 모두 인지된 비특이 항원 성분이었고 230 KDa, 200 KDa, 51 KDa, 31 KDa 등은 정상인의 혈청에서는 인지되지 않았으나 낭미충증, 스파르가눔증, 포충증 등 환자 혈청에서는 모두 인지되었다. 한편, 260 KDa의 항원 성분은 낭미충증 환자의 혈청에서만 인지되었다.

고 찰

이 실험에서는 유구낭미충(*Cysticercus cellulosae*)에서 추출한 조항원 성분과 *Sparganum*, *Cysticercus*, *Hydatid*에 감염되어 혈청 내에 생성된 IgG 항체와의 혈청학적 반응으로 인지된 조항원 성분의 특성을 ELISA와 EITB로 추구하여 종 특이 항원 성분과 비특이 항원 성분을 추적함으로써 ELISA에서 위양성 반응을 나타내는 원인을 관찰하였다.

사람의 낭미충증 진단에 Arambulo *et al.* (1978)이 ELISA를 처음 도입하여 적용한 이래 많은 학자들이 낭미충증 진단 방법을 개선하는데에 노력하여 왔다 (Diwan *et al.*, 1982; Yakoleff-Greenhouse *et al.*, 1982; Mohammad *et al.*, 1984; Pammenter and Ros-

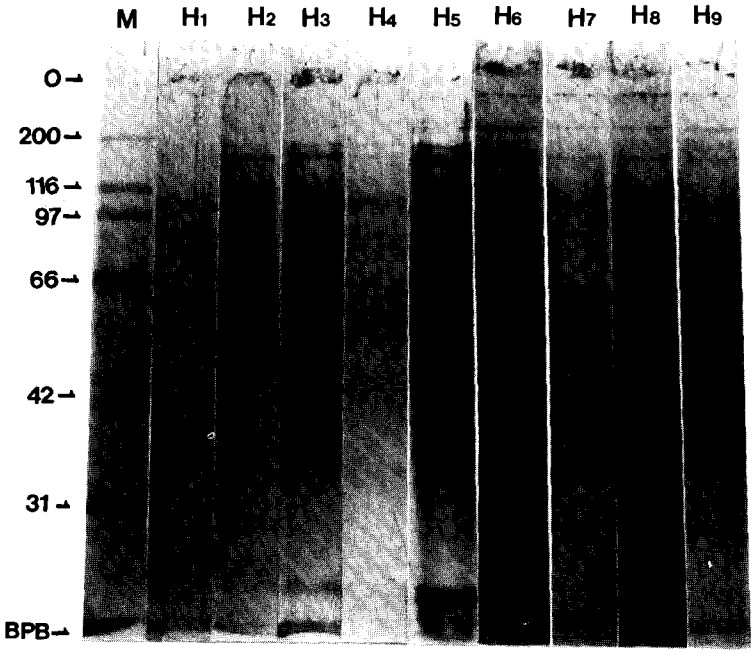

Fig. 7. Antigenic components reacting with sera of 9 hydatidosis patients. (M: Marker protein, H_n: Serial No. of hydatidosis sera)

souw, 1987; Cho *et al.*, 1986; Estrada and Kuhn, 1985). Flisser *et al.* (1980)과 Espinoza *et al.* (1982)은 정제한 antigen B를 사용하여 조사하였고 환자 혈청에서 73%, CSF(cerebrospinal fluid)에서 85%의 민감도를 보고하였고, Tellez-Giron *et al.* (1987)은 ELISA와 IHA를 적용하여 낭미충증 진단의 유용성을 비교하였는데 ELISA에서는 몇 예가 모두 양성이었으나 IHA에서는 5예가 위음성이었다고 보고하여 ELISA가 IHA보다 민감도가 높다고 보고하였다. Costa *et al.* (1982)은 CSF에 있는 IgG 항체에 의해 뇌낭미충증 22예를 확정하였고 Diwan *et al.* (1982)은 ELISA를 이용한 31예의 낭미충증 환자 혈청 검사에서 양성이 61%이었고, 낭미충 항원이 포충증 환자 혈청과 교차 반응이 있다고 보고하였다. 또한 Coker-Vann *et al.* (1984)은 정제한 낭미충 항원으로 20명의 환자 혈청을 검사한 바 80%의 양성 반응을 보여 감수성이 높음을 보고하였다. Mohammad *et al.* (1984)은 ELISA로 19명의 뇌낭미충증 환자 혈청에서 89.5%의 민감도와 100%의 특이도(specificity)가 있으며 CSF에서는 민감도 및 특이도가 모두 100%였다고 보고하였다. Cho *et al.* (1986)도 낭액(cystic fluid)을 항원으로 하여 환자의 혈청 및 CSF에 대한 민감도와 특이도를 검사하여 민감도가 혈청에서는 77.5%이나 CSF에서는 83.1%이었고 특이도는 혈청과 CSF에서 모두 94.2%이었다고 하여 CSF가 더 특이(specific) 반응을 보인다고 하였다. 한편 Choi *et al.* (1986)은 낭미충 항원 중 전 충체 추출물과 낭액을 각각 항원으로 하여 ELISA로 OD치를 비교하였는데 낭액에서 OD치가 0.52±0.20이고 71.9%의 민감도를 얻었으며 낭액이 항원으로서 더 우수하다고 보고하였다.

이와 같이 항원과 항체의 선택이 ELISA에 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 본 실험에서는 충체 성분중 ELISA에서 위양성(false positive) 또는 위음성(false negative)을 나타내는 요소를 추구하고자 하여 전 충체 추출물을 항원으로 사용하였다. Cho *et al.* (1986)은 낭미충의 낭액을 항원으로 하여 스파르가눔증 환자 혈청 및 CSF와의 반응을 본 바 혈청에서는 2/20, CSF에서는 2/10가 양성반응으로 나타나 교차 반응이 있다고 보고하였으며, Coker-Vann *et al.* (1984)과 Diwan *et al.* (1982)은 ELISA에서 낭미충 항원이 포충증 환자 혈청과 교차 반응을 보였다고 보고하였으며, Proctor *et al.* (1966)도 IHA에서 환자의 혈청과 교차 반응이 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 ELISA 뿐만 아니라 EITB 검사에서도 스파르가눔증 환자 혈청과는 60%, 포충증 환자 혈청과는 100%의 교차 반응이 있었고 스파르가눔증 환자보다 포충증 환자 혈청에서 더 강한 교차 반응을 확인할 수 있었다.

이 실험에서 낭미충 조항원 성분을 SDS-PAGE로 전개하여 Coomassie blue R-250 염색에서 21개 항원 성분이 분획되었고 silver stain에서는 31개의 항원 성분이 확인되었는데 이러한 차이는 염료에 대한 감수성의 차이, 염색 과정 등 여러 조건의 차이에서 온다고 Schleicher *et al.* (1983), Oakley *et al.* (1980)이 보고한 바 있다. Larralde *et al.* (1986)은 낭미충 낭액을 SDS-PAGE로 전개한 후 Coomassie blue R-250에 염색하여 246 KDa에서 26 KDa범위에 있는 15개의 단백질 분획을 확인하였고 이 중 6개의 단백질 분획대가 가장 뚜렷하였다고 보고하였다. 또 Plancarte *et al.* (1987)은 낭미충의 전 충체 추출물을 SDS-PAGE하여 20개의 단백질 분획대를 보고하였고 Grogl *et al.* (1985)은 31개의 단백질 분획대를 얻어 이 중 10개의 polypeptide가 중요한 항원 성분이라고 보고하였다. 본 실험에서는 Grogl *et al.* (1985)이 보고한 단백질 분획대의 수와 일치하였다.

EITB에서 낭미충증 환자, 스파르가눔증 환자, 포충증 환자 등의 혈청과 정상인의 혈청중 IgG 항체에 의해 인지된 낭미충 항원 성분들 중 낭미충증 환자에서만 인지된 항원 성분은 26 KDa, 스파르가눔증 환자 혈청에서만 인지된 것은 163 KDa, 포충증 환자 혈청에서만 인지된 것은 63 KDa의 항원 단백들이었다. 이들 항원 성분의 종 특이 항원성 여부는 앞으로 더 확인이 필요하다고 생각된다. 또 104 KDa, 82 KDa, 59 KDa, 38 KDa, 34 KDa 등의 항원 성분은 모든 검사 혈청에서 인지되는 비특이 항원 성분으로서 교차 반응을 일으키는 요소가 되는 것으로 생각된다. 또 이들의 발색반응 정도도 강하게 나타났다. Guerra *et al.* (1982)은 특이 항원 성분으로 antigen B (subunit 105,000 dalton과 95,000 dalton)를 보고하였고 Larralde *et al.* (1980)은 낭미충의 낭액중 103 KDa이 특이 항원 성분이라고 보고하였다. 본 실험에서 인지된 104 KDa의 항원 성분은 낭미충증 환자 7명 전원에서 인지되었으나 포충증 환자 9명중 7명에서도 인지되었고 정상인 혈청과 스파르가눔증 환자의 혈청에서도 인지되어 비특이 항원 성분이라고 생각되었다. 또 Gottstein *et al.* (1986)은 낭미충 항원 중 94 KDa에서 8 KDa의 항원 성분을 확인하였고 이 중 26 KDa와 8 KDa의 항원 성분이 포충증 환자 혈청에서 강력한 교차 반응대로 인지되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 26 KDa의 항원 성분이 포충증 환자 혈청에서 인지되었으나 낭미충증 환자 혈청에서는 인지되지 않았다.

낭미충의 조항원 성분 중 스파르가눔증 환자와 포충증 환자의 IgG 항체에 의해 인지된 항원 성분을 비교하면 스파르가눔증 환자의 IgG 항체에서는 13개의 항원 성분이 인지되고 포충증 환자의 IgG 항체에서는 25개의 항원 성분이 인지되어 포충증 혈청이 스파르가눔증 혈청보다 많이 인지된 것은 계통 분류학상 낭미충이 스파르가눔보다 포충에 더 근연적인 유연 관계가 있기 때문으로 생각된다.

(본 논문에 사용된 유구낭미충 충체를 제공하여 주신 안양 가축위생연구소 전 영 박사님과 스파르가눔증

환자의 혈청을 분양하여 주신 중앙대학교 의과대학 조승열 박사님께 깊은 사의를 표합니다.)

참 고 문 헌

Arambulo, Ⅲ. P.V., Walls, K.W., Bullock, S., Kagan, I.G.(1798) Serodiagnosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay(ELISA). *Acta Tropica*, **35**:63-67.

Bradford, M.M.(1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248-254.

Cho, S.Y., Kim, S.I., Kang, S.Y., Choi, D.Y., Suk, J.S., Choi, K.S., Ha, Y.S., Chung, C.S. and Myung, H.J.(1986) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in serological diagnosis of human neurocysticercosis using paired samples of serum and cerebrospinal fluid. *Korean J. Parasit.*, **24**(1):25-41.

Choi, B.K., Kim, S.I., Kang, S.Y. and Cho, S.Y. (1986) Evaluation of antigens from different parts of *Cysticercus cellulosae* in serological diagnosis of human cysticercosis. *Chung-Ang J. Med.*, **11**(2): 135-146.

Coker-Vann, M., Brown, P. and Gajdusek, D.C. (1984) Serodiagnosis of human cysticercosis using a chromatofocused antigenic preparation of *Taenia solium* cysticerci in an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**:492-496.

Costa, J.M., Ferreira, A.W., Makino, M.M. and Camarg, M.E.(1982) Spinal fluid immunoenzymatic assay(ELISA) for neurocysticercosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **24**(6):337-341.

Diwan, A.R., Coker-Vann, M., Brown, P., Subianto, D.B., Yolken, R., Desowitz, R., Escobar, A., Gibbs, Jr. C.J. and Gajdusek, D.C.(1982) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **31**:364-369.

Espinoza, B., Flisser, A., Plancarte, A. and Larralde, C.(1982) Immunodiagnosis of human cysticercosis-ELISA and immunoelectrophoresis. *In* Cysticercosis-present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. pp.163-178.

John, E.J. and Kuhn, R.E.(1985) Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and anti-larval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *J. Neurol. Sci.*, **71**:39-48.

Flisser, A. and Larralde, C.(1986) Cysticercosis. *In* Walls, K.W. and Schantz, P.M., ed. Immunodiagnosis of parasitic diseases. Vol. I. Helminthic diseases. Academic Press, New York. pp.109-161.

Flisser, A., Perez-Mountfort, R. and Larralde, C. (1979) The immunology of human and animal cysticercosis; a review. *Bull. WHO.*, **57**(5):839-856.

Gottstein, B., Tsang, V.C.W. and Schantz, P.(1986) Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**(2):308-313.

Grogl, M., Estrada, J.J., MacDonald, G. and Kuhn, R.E.(1985) Antigen-antibody analysis in neurocysticercosis. *J. Parasit.*, **71**(4):433-442.

Guerra, G., Flisser, A., Canedo, L. and Laclette, J.P.(1982) Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. *In* Cysticercosis-present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. pp.437-451.

홍승관·최길수·심보성(1978) 중추 신경 계통의 유구낭미충증. 대한신경외과학회지, **7**(2):417-423.

金淳郁·李哲雨(1960) 뇌낭충증 5례보고. 대한외과학회지, **2**:101:105.

고영초·심보성(1980) 한국에 있어서의 뇌 기생충 질환의 전산화 단층촬영 소견. 대한신경외과학회지, **9**(1):7-18.

Laemmli, U.K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.

Larralde, C., Laclette, J.P., Owen, C.S., Maerazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Diaz, M.L., Govezensky, T., Montoya, R.M. and Goodsaid, F.(1986) Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**(5): 965-973.

Miller, B.L., Goldberg, M.A., Heiner, D.G., Myers, A. and Goldberg, A.(1984) A new immunologic test for CNS cysticercosis. *Neurology*, **34**:695.

Mohammad, I.D., Heiner, D.G., Miller, B.L., Goldberg, M.A. and Kagan, I.G.(1984) Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. *J. Clin. Microbiol.*, **20**:775-779.

Morrissey, H.J.(1981) Silver stain for protein in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, **117**:307-310.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, N.R.(1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **105**:361-363.

Pammenter, M.D. and Rossouw, E.J.(1987) The value of an antigenic fraction of *Cysticercus cellulosae* in the serodiagnosis of cysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **81**(2):117-123.

Park, C.G.(1958) A case of cysticercosis. *J. Army Med. Officers Corp.*, **6**:69-71.

Plancarte, A., Espinoza, B. and Flisser, A.(1987) Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Child's Nerv. Syst.*, **3**:203-205.

Proctor, E.M., Powell, S.J. and Elsdon-Dew, R.(1966) The serological diagnosis of cysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **60**:146-151.

林漢鍾・宋堌元・朱炅煥・李駿商・金正俊(1980) 우리나라에 있어서의 條蟲症 感染現況. 기생충학잡지, **18**(2):235-240.

Rodriguez-Carbajal, J., Palacios, E., Azar-Kia, B. and Churchill, R. (1977) Radiology of cysticercosis of the central nervous system including computed tomography. *Radiology*, **125**:127-131.

Rodriguez-Carbajal, J., Salgado, P., Gutierre, R., Escobar, A., Araffo, C. and Palacios, E.(1983) The acute encephalitic phase of neurocysticercosis; computed tomographic manifestations. *Am. J. Neuroradiol.*, **4**:51-55.

Schantz, M.P., Shanks, D. and Wilson, M. (1980) Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**(4):609-612.

Schleicher, M. and Watterson, D.M.(1983) Analysis of differences between Coomassie blue stain and silver stain procedures in polyacrylamide gels; conditions for the detection of calmodulin and troponin C. *Anal. Biochem.*, **31**:312-317.

Tellez-Giron, E., Ramos, M.C., Dufour, L., Alvarez, P. and Montante, M.(1987) Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay(Dot-ELISA) and standard ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **37**(1):169-173.

Towbin, H. and Gordon, J.(1984) Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. *J. Immunol. Methods*, **72**:313-340.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.(1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**(9):4350-4354.

Tsang, V.C.W., Hancock, K., Maddison, S.E., Beatty, A.L. and Moss, D.M.(1984) Demonstration of species-specific and cross-reactive components of the adult microsomal antigens from *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*. *J. Immunol.*, **132**(5):2607-2613.

Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. and Simons, A.R.(1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique(EITB) for studing the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods in Enzymol.*, **92**:377-391.

Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A.(1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine-theory and practice. *Bull. WHO*, **53**:55-65.

WHO(1976) Research needs in taeniasis-cysticercosis (memorandum). *Bull. WHO*, **53**:67-73.

Yakoleff-Greenhouse, V., Flisser, A., Sierra, A. and Larralde, C.(1982) Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. *J. Parasit.*, **68**(1):39-47.

=**Abstract**=

Immunological Characterization of Antigens from *Cysticercus* and *Sparganum* and Their Application to Immunodiagnosis

1. Immunological Characteristics of Crude Antigenic Components from *Cysticercus cellulosae*

Chang-Hwan Kim and James Yang*

College of Natural Science, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea and Tropical Diseases Unit, Toronto General Hospital, Toronto, Canada*

We studied the serological reaction between various antigenic components from *Cysticercus cellulosae* and IgG antibodies in sera of cysticercosis, sparganosis, hydatidosis patients and normal humans by ELISA and EITB. In serological tests by ELISA, we recognized cross reaction of *Cysticercus* antigenic components with IgG antibodies in heterologous sera such as sparganosis and hydatidosis patients or normal humans. The crude antigenic components of *Cysticercus* showed lower ELISA sensitivity in homologous sera from cysticercosis patients than heterologous sera from hydatidosis patients.

A total of 31 polypeptide bands with 260 KDa~22 KDa molecular weights were detected by SDS-PAGE, and 11 of them showed strong intensity. Total 22 components of them were recognized by IgG antibodies in cysticercosis patients sera. However, 12 of them were recognized also by normal human sera, 11 were by sparganosis sera, and 21 were by hydatidosis patients sera. The crude antigenic components of 104 KDa, 82 KDa, 72 KDa, 59 KDa and 34 KDa molecular weights were nonspecific ones, which cross-reacted with sera of either cysticercosis, sparganosis, hydatidosis patients or normal humans.