

폐흡충(*Paragonimus westermani*) 감염백서에서의 혈청내 IgE 항체의 변동

한양대학교 의과대학 기생충학교실

신명현·류재숙·민득영

요약: 폐흡충(*Paragonimus westermani*) 감염시 탈낭유충은 숙주내 여러조직을 거친 후 폐에 기생하게 되는데 이때 조직반응과 더불어 혈액내 호산구와 IgE 항체의 변동이 일어난다. 이 실험에서는 백서에 폐흡충을 감염시키고 혈청내 총 IgE와 특이 IgG 항체값을 시간 경과별로 측정하여 감염후 혈청내 항체의 변동을 관찰하였다. 폐흡충 피낭유충 20개를 백서에 경구 감염시키고 시기별(0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 주)로 IgE의 변동을 avidin-biotin을 이용하여 효소표식 면역검사법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 측정하였으며 IgG는 통상적인 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 실험군의 혈청내 총 IgE치는 감염 2주와 3주 후에 흡광도가 각각 0.18 ± 0.042 , 0.18 ± 0.081 이었으나, 4주에 0.28 ± 0.151 로 급격히 증가하였으며 8주까지 지속적인 상승(0.43 ± 0.055)을 보였다. 반면 대조군의 경우 전 실험기간을 통해 $0.07 \sim 0.12$ 로 낮은 항체가가 유지되었다. 또한 실험군의 혈청내 IgG 항체는 감염 3주 후에 흡광도 0.20 ± 0.032 로 증가하기 시작하여 8주에 0.31 ± 0.067 을 보였으나 대조군에 비해 크게 증가되지 않았다. 이상의 결과로 보아 미호적숙주인 백서에서 폐흡충의 감염이 IgE 및 IgG 항체를 증가시킴을 알 수 있었다.

Key words: *Paragonimus westermani*, albino rat, IgE, IgG, avidin-biotin, enzyme-linked immunosorbent assay

서론

기생충 감염시 혈청내 IgE 항체의 증가(Kojima *et al.*, 1974; Yokogawa *et al.*, 1976; 関 등., 1980; Min and Soh, 1983)를 볼 수 있으며 특히 이러한 IgE의 증가는 조직이행시기를 지낸 유충 감염시 잘 볼 수 있다. 이때 증가된 IgE의 대부분은 감염 기생충에 대한 특이 항체라기 보다는 비 특이적인 항원이 B 림프구를 자극하여 생긴 polyclonal IgE이며 이의 반응도 항원의 주입양과 종(species)에 따른 유전적인 요소에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다(Pauwell *et al.*, 1979).

폐흡충(*Paragonimus westermani*)은 사람, 개 그리고 고양이 등이 호적숙주로 알려져 있으며 감염시에 십이지장에서 탈낭(excystation)하여 장벽을 뚫고 복강 내로 나온 유충이 일단 복벽근에서 일차 발육한 후 다시 복강을 지나 횡격막을 거쳐 흉강에 이르고 흉막을 지나 폐조직에 기생한다. Ikeda and Fujita(1980)는 *P. ohirai* 피낭유충을 백서에 감염시켰을 때 감염 3주 후 IgE가 상승하며 이때 유충의 복강 내로의 이동이 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 그러나 위와 같이 복잡한 조직 이행시기를 지낸 폐흡충 감염시 시간 경과에 따른 IgE 항체의 반응에 대한 연구는 극히 적

은 실정이다. 혈청내 IgE 항체의 측정은 그동안 passive cutaneous anaphylaxis(PCA) 반응(Ikeda and Fujita, 1980), radioimmunoassay(関 등., 1980), paper radio-immunosorbent technique(PRIST) (Pfister *et al.*, 1983) 등의 방법이 사용되어 왔으나 정상에서는 극히 소량 존재하여 이를 측정하는데 어려움이 있었다. 그러나 최근에는 보다 간편한 avidin-biotin을 이용한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 등이 개발되었다(Guesdon *et al.*, 1979., Boorsma *et al.*, 1986).

이 연구에서는 폐흡충 피낭유충을 백서에 감염시킨 후 혈청내 총 IgE는 최근 소량의 항체를 측정하는데 널리 이용되고 있는 avidin-biotin을 이용한 capture 효소표식 면역검사법으로 측정하였으며 특이 IgG는 통상적인 ELISA법을 이용하여 측정하여 폐흡충 감염 후 항체의 변동을 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 폐흡충 피낭유충의 수집

폐흡충 피낭유충은 만연지역으로 알려진 전라남도 완도군 보길도에서 폐흡충의 제 2 중간숙주인 참가재(*Cambaroides similis*)를 수집하고 유발에서 마쇄한

후 인공소화액(pepsin 0.2 g, 농염산 0.7 ml, 증류수 99.3 ml)에 처리하여 피낭유충을 얻었다.

2. 실험동물 및 감염방법

150~200 gm 내외의 자성 Wistar 주 백서 10 마리를 사용하였으며 폐흡충 피낭유충을 각 마리당 20~25 개씩 경구 감염시켰다. 이때 같은 무게의 5 마리의 백서를 대조군으로 삼았다.

3. 항원의 제조

폐흡충 피낭유충을 고양이에게 경구감염시킨 후 3개월째 희생시켜 폐장으로부터 성충을 얻어 PBS로 3회 세척하여 이들 성충을 소량의 식염수와 함께 약절구에 넣어 -70°C 에서 동결시킨 후 동결상태에서 마쇄하고 융해시킨 후 재동결하는 동결-융해방법에 의해 1일 4~5회 2일간 마쇄한 후 ultrasonicator(Lab line, Illinois)로 5~10 초간 처리하여 세포막을 파괴시키고 4°C 에서 30 분간 10,000 rpm으로 원심 침전시킨 후 상청액(supernatant)을 취하였다. 상청액은 4°C 에서 증류수 내에서 24 시간 투석하여 이를 -70°C 에서 보관하면서 사용하였다. 항원의 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951) 방법에 따라 측정하였으며 그 함량은 50 mg/ml이었다.

4. 혈액채취 및 혈청분리

혈액채취는 감염시기 별(0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 주)로 감염군과 대조군의 흰쥐의 후안과 정맥총에서 혈액을 분리한 후 -70°C 에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

5. 혈청내 총(Total) IgE 항체의 측정

혈청내 총 IgE 항체가의 측정은 Hirano *et al.* (1989)의 방법을 약간 수정하여 avidin-biotin을 이용한 capture enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 측정하였다. Monoclonal mouse anti-rat IgE (Zymed Lab., California)를 도포완충액(coating buffer, pH 9.6)으로 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 되게 희석하여 96 well polystyrene microplate(Dynatech, Virginia)의 각 홈(well)에 $100\text{ }\mu\text{l}$ 씩 넣어 4°C 에서 하룻밤 방치하였다. 3% bovine serum albumin(BSA) (Sigma, St. Louis)을 각 홈에 첨가하여 37°C 온습상자에 넣어 2 시간 방치한 후 1:10으로 희석한 시험혈청을 첨가하고 37°C 온습상자에 1 시간 방치한 후 1:1,000으로 희석한 biotin-mono-clonal mouse anti-rat IgE(Zymed Lab., California)를 첨가하여 37°C 에서 1 시간 방치하였다. 1:4,000으로 희석한 peroxidase-conjugated streptavidin(Zymed Lab., California)을 첨가하여 37°C 에서 1시간 방치하였고, phosphate citrate buffer에 orthophenylene diamine과 H_2O_2 를 녹여 각 홈에 $50\text{ }\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 25°C 에서 30 분 방치한 후 2.5 M H_2SO_4 를 $50\text{ }\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA광량계(Dynatech, Virginia)를 사용하여 파장 492 nm에서 흡수 광량을 측정하였다.

이때 모든 과정은 3% BSA를 넣은 PBS Tween-20 (pH 7.4)으로 3회 세척하였다.

6. 혈청내 특이(specific) IgG 항체의 측정

폐흡충 성충의 체세포 항원(somatic antigen)을 도포 완충액으로 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 되게 희석하여 96 well polystyrene microplate의 각 홈에 $100\text{ }\mu\text{l}$ 씩 넣어 4°C 에서 하룻밤 방치하였다. 3% bovine serum albumin(BSA)을 각 홈에 첨가하여 37°C 온습상자에 넣어 2 시간 방치하였다. 1:800으로 희석한 시험혈청을 첨가하고 37°C 온습상자에서 1 시간 반응한 후 1:1,000으로 희석한 peroxidase conjugated anti-rat IgG(Cappel Lab.)를 첨가하여 37°C 에서 1 시간 방치하였고 phosphate citrate buffer에 orthophenylene diamine과 H_2O_2 를 녹여 각 홈에 $50\text{ }\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 25°C 에서 30 분 방치한 후 2.5M H_2SO_4 를 $50\text{ }\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA광량계를 사용하여 파장 492 nm에서 흡수 광량을 측정하였다.

이때 모든 과정은 3% BSA를 넣은 PBS Tween-20 (pH 7.4)으로 3회 세척하였다.

실험 성적

1. 혈청내 총(total) IgE 항체가의 변동

실험군의 혈청내 총 IgE 치는 감염 2 주, 3 주 후에 흡광도가 0.18 ± 0.042 , 0.18 ± 0.081 로 증가하기 시작하여 4 주 후에 0.28 ± 0.151 이었고 8 주 후에 0.43 ± 0.055 로 지속적으로 상승하였으며, 대조군의 흡광도는 전 실험기간을 통해 $(0.07\pm 0.021\sim 0.12\pm 0.025)$ 일정한 양상을 보였다(Table 1).

2. 혈청내 특이(specific) IgG 항체가의 변동

혈청내 특이(specific) IgG 항체는 감염 3 주 후에 흡광도가 0.20 ± 0.032 로 증가하기 시작하여 8 주 후에 0.31 ± 0.067 로 약간 증가하였다(Table 2).

Table 1. Serum IgE values in rats infected with *P. westermani*

| Weeks after infection | Absorbance at 492 nm | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| | Infected(10)* | Control(5) |
| 0 | $0.09\pm 0.042^{**}$ | 0.10 ± 0.006 |
| 1 | 0.11 ± 0.029 | 0.12 ± 0.025 |
| 2 | $0.18\pm 0.042^{***}$ | 0.11 ± 0.023 |
| 3 | $0.18\pm 0.081^{***}$ | 0.07 ± 0.026 |
| 4 | $0.28\pm 0.151^{***}$ | 0.11 ± 0.032 |
| 6 | $0.39\pm 0.125^{***}$ | 0.11 ± 0.038 |
| 8 | $0.43\pm 0.055^{***}$ | 0.07 ± 0.021 |

*: No. examined

** : Mean \pm standard deviation

***: Student's t-test ($p<0.05$)

Table 2. Serum IgG values in rats infected with *P. westermani*

| Weeks after infection | Absorbance at 492 nm | |
|-----------------------|----------------------|------------|
| | Infected(10)* | Control(5) |
| 0 | 0.13±0.048** | 0.17±0.020 |
| 1 | 0.14±0.026 | 0.16±0.000 |
| 2 | 0.15±0.061 | 0.16±0.023 |
| 3 | 0.20±0.032*** | 0.11±0.035 |
| 4 | 0.22±0.025*** | 0.16±0.035 |
| 6 | 0.29±0.056*** | 0.18±0.019 |
| 8 | 0.31±0.067*** | 0.17±0.026 |

*: No. examined

** : Mean±standard deviation

***: Student's t-test($p<0.05$)

고 찰

면역글로블린 E(IgE)가 Ishizaka *et al.*(1966)에 의해 처음 보고된 이래 현재까지 이에 대한 많은 연구가 계속 진행되고 있다. 일반적으로 윤충들은 감염된 사람과 동물 체내에서 독특한 조직 이행시기를 거쳐 주기생장소에 도달하며 이 시기에 IgE 항체의 상승이 가장 특징적인 면역 반응으로 알려져 있다(Katz, 1980; Soesatyo *et al.*, 1987; Yagihashi *et al.*, 1990).

Reiner and Zahner(1986)는 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)에 감염된 Wistar 주 백서에서 혈청내 총 IgE 치가 감염 3주 이후 증가하기 시작하여 5주 후에 절정에 이르렀으며 그 이후 15주까지 높은 항체가 유지되는 것을 보고하였고 関 등(1980)도 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 감염 백서의 총 IgE 치가 감염 1~2주 사이에 증가하기 시작하여 6주까지 높은 IgE 치가 유지되는 것을 보고하였다. Pfister *et al.*(1983)은 간질(*Fasciola hepatica*)을 백서에 감염시켜 혈청내 총 IgE 치가 감염 7~25일 사이에 증가하여 42일째에 절정에 이른 후 100일 이상 높은 IgE 치가 유지되는 것을 보고하였다. Rousseaux-Prevost *et al.*(1977 & 1979)도 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)과 *Dipetalonema viteae* 감염 백서에서 혈청내 총 IgE 치가 감염 1~2주에 증가하여 감염 100일까지 높은 항체가를 관찰하였다.

이 실험에서는 미호적숙주로 알려진 백서(Wistar 주)에 폐흡충(*P. westermani*)을 감염시켜 시기별로 혈청내 총 IgE, 감염 기생충에 대한 특이 IgG의 변동을 관찰하였다. 혈청내 총 IgE의 함량은 감염 2주 후에 0.18로 대조군에 비해 유의하게 증가하기 시작하여 3주까지 유지되었고 4주 후에 급격히 증가(0.28)하여 8주까지 지속적인 상승(0.43)을 보였다. 한편 대조군의 경우 전 실험기간을 통해 낮은 항체가(0.07~0.12)

가 유지되었다. 그러나 본 실험에서 총 IgE의 증가 시기가 감염 4주 후 또는 6주 후에 상승하는 경우도 있었는데 이는 같은 종(species)이라도 개체에 따라 감염 기생충에 대한 숙주 고유의 면역반응이 다르기 때문인 것으로 해석된다. 李 및 張(1986)은 폐흡충을 고양이에게 감염시켰을 때 특이 IgG 항체는 감염 3주~4주 후에 증가하여 8주까지 항체가가 증가되었고 총체가 폐에 도달하여 정착하기 시작하는 시기에 항체생성이 활발해짐을 보고한 바 있다. 또한 Yong *et al.*(1987)의 보고에 의하면 폐흡충 감염 백서의 혈청내 excretory-secretory 항원에 대한 IgG 항체가가 감염 1주부터 증가하여 12주까지 계속 상승하였다. 본 실험에서는 혈청내 IgG 항체가 감염 8주 후에도 크게 증가되지 않아 그 결과가 일치하지는 않았다. 그러나 고양이등과 같은 호적숙주와 달리 백서에서는 성숙 총체로 제대로 발육되지 않아 미성숙 총체에 대한 항체만 생성되었으리라고 보나 미호적숙주 체내에서의 특정 항원에 대한 항체생산 과정은 좀 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

한편 총 IgE 뿐만 아니라 감염기생충에 대한 특이 IgE에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. Rousseaux-Prevost *et al.*(1977 & 1978)이 만손주혈흡충에 감염된 백서에서 기생충에 대한 특이 IgE 항체는 총 IgE 중 8~19% 정도 차지하는 것을 보고한 바 있고 Reiner and Zahner(1989)도 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)에 감염된 28명의 환자에서 성충, cercaria, 그리고 충란의 각각 다른 항원을 가지고 효소표식 면역 검사법으로 측정한 바 특이 IgE 항체는 IgG와 달리 대부분 성충에 대해서만 반응을 보였다. 본 실험에서도 백서에 피낭유충을 감염시킨 후 *P. westermani*에 대한 특이 IgE를 측정해 보았으나 그 값이 매우 낮았는데 백서 감염 후 성충까지의 발육이 이루어지지 않아서 일 것으로 추측된다. Jarrett and Haig(1976)는 *N. brasiliensis*에 감염된 백서의 총 IgE 치가 감염 12~14일에 그 값이 절정에 이른 후 급격히 감소하나 기생충에 대한 특이한 리진 항체(reagin antibody)는 총 IgE 항체가 감소한 후 2~3주 후에 나타나는 것을 관찰하여 이 실험의 결과(미발표)와 비슷한 양상을 보였다.

이 실험에서 폐흡충 감염 백서의 시기별 혈청내 총 IgE 항체는 감염초기인 2주 후에 상승하여 8주까지 높은 항체가를 유지하였으며 특이 IgG 항체는 8주까지 약간의 상승을 보였다. 이러한 특이 IgG 항체의 비교적 낮은 상승은 미호적숙주 내에서의 기생충의 성장 및 발육과 관련하여 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

Boorsma, D.M., Bommel, J.V. and Heuvel, J.V. (1986) Avidin-HRP conjugates in biotin-avidin

- immunoenzyme cytochemistry. *Histochemistry*, 84: 333-337.
- Guesdon, J., Ternynck, T. and Avrameas, S.(1979) The use of avidin-biotin interaction in immuno-enzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 7:1131-1139.
- Hirano, T., Yamakawa, N., Miyajaki, H., Maeda, K., Takai, S., Ueda, A., Taniguchi, O., Hashimoto, H., Hirose, S., Okumura, K. and Cvary, Z.(1989) An improved method for the detection of IgE antibody of defined specificity by ELISA using rat monoclonal anti-rat IgE antibody. *J. Immunol. Methods*, 119:145-150.
- Ikeda, T. and Fujita, K.(1980) IgE in *Paragonimus ohirai*-infected rats: Relationship between titer, migration route and parasitic age. *J. Parasit.*, 66 (2):197-204.
- Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M.M. (1966) Physicochemical properties of reaginic antibody. *J. Immunol.*, 127:716-725.
- Jarrett, E.E.E. and Haig, D.M.(1976) Time course studies on rat IgE production in *N. brasiliensis* infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 24:346-351.
- Katz, D.H.(1980) Review: Recent studies on the regulation of IgE antibodies in experimental animals and man. *Immunology*, 41:1-24.
- Kojima, S., Yokogawa, M. and Tada, T.(1974) Production and properties of reaginic antibodies in rabbits infected with *Clonorchis sinensis* or *Schistosoma japonicum*. *Exp. Parasit.*, 35:141-149.
- 李玉蘭, 張在景(1986) 肺吸蟲의 粗抗原과 精製항원에 의한 肺吸蟲감염 코양이 형성의 免疫酵素反應. 기생충학잡지, 24:187-193.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.(1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- 閔得映・蘇鎮瑋・Capron, A.(1980) 간흡충 감염백서의 혈청내 IgE 변동 및 Allergen의 분리에 관한 연구. 연세의대논문집, 13(2):94-106.
- Min, D.Y. and Soh, C.T.(1983) Elevation of specific IgE antibody in *Clonorchis sinensis* infection. *Korean J. Parasit.*, 21(1):27-31.
- Pauwels, R., Bazin, H., Platteau, B. and Straeten, M.V.D.(1979) The influence of antigen dose on IgE production in different rat strains. *Immunology*, 36:151-157.
- Pfister, K., Turner, K., Currie, A., Hall, E and Jarrett, E.E.E.(1983) IgE production in rat fascioliasis. *Parasite Immunol.*, 5:587-593.
- Reiner, G. and Zahner, H.(1986) IgE responses of Wistar rats to *Schistosoma mansoni* infections. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 79:90-94.
- Reiner, G. and Zahner, H.(1989) Reactivity of IgE in human *Schistosoma mansoni* sera to *S. mansoni* antigens. *Parasitol. Res.*, 75:392-395.
- Rousseaux-Prevost, R., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A.(1977) IgE in experimental schistosomiasis. *Immunology*, 33:501-505.
- Rousseaux-Prevost, R., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A.(1978) IgE in experimental schistosomiasis. II. Quantitative determination of specific IgE antibodies against *S. mansoni*: A follow-up study of strains of infected rats. Correlation with protective immunity. *Immunology*, 35:33-39.
- Rousseaux-Prevost, R., Chassoux, D., Bazin, H. and Capron, A.(1979) Serum IgE levels in rats infected with *Dipetalonema viteae* L3 larvae. *Clin. Exp. Immunol.*, 38:389-393.
- Soesaty, M.H.N.E., Rattanasiriwilai, W., Suntharasamai, P. and Sirisinha, S.(1987) IgE responses in human gnathostomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81:799-801.
- Yagihashi, A., Sato, N., Takahashi, S., Ishikura, H. and Kikukuchi, K.(1990) A serodiagnostic assay by microenzyme-linked immunosorbent assay for human anisakiasis using a monoclonal antibody specific for *Anisakis* larvae antigen. *J. Inf. Dis.*, 161:995-998.
- Yokogawa, M., Kojima, S., Araki, K., Tomioka, H. and Yoshida, S.(1976) Immunoglobulin E: Raised levels in sera and pleural exudates of patients with paragonimiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25:581-587.
- Yong, T.S., Kim, T.S., Lee, J.S., Lee, O.Y. and Kim, D.C.(1987) Detection of circulating antigens in rats experimentally infected with *Paragonimus westermani* by ELISA. *Korean J. Parasit.*, 25:141-148.

=Abstract=

Serum IgE levels in rats infected with *Paragonimus westermani*

Myeong-Heon Shin, Jae-Sook Ryu and Duk-Young Min

Department of Parasitology, College of Medicine,

Hanyang University Seoul 133-791, Korea

Paragonimus westermani is a common fluke in Korea. The present study aimed to determine serum total IgE and specific IgG levels in experimental paragonimiasis of rats. Each Wistar rat was inoculated orally with 20~25 metacercariae of *P. westermani* from *Cambaroides similis*. Before and after infection (1, 2, 3, 4, 6, 8 weeks) of *P. westermani*, the blood was collected from the retro-orbital venous plexus of rats and kept serum at -70°C . Serum total IgE and specific IgG levels were determined by the capture and conventional enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

The results were as follows;

1. Serum IgE values were increased to 0.18 ± 0.042 at 2 weeks, 0.28 ± 0.151 at 4 weeks and 0.43 ± 0.055 at 8 weeks after infection. The absorbances of non-infected rats ranged $0.07 \pm 0.021 \sim 0.12 \pm 0.025$.

2. Specific IgG values were slightly increased at 3 weeks (0.20 ± 0.032) and gradually increased up to 8 weeks (0.31 ± 0.067) after infection. The absorbances of non-infected rats ranged $0.11 \pm 0.035 \sim 0.18 \pm 0.019$. The present results suggested that *P. westermani* could elevate serum IgE and specific IgG antibodies in Wistar rats which were not a good definitive host.

[Korean J. Parasit., 29(4):397-401, December 1991]