

폐흡충에 대한 면역항체의 면역반응 활성화에 관한 연구

김수진 · 이지현
한림대학교 자연과학대학 생물학과

A Study on the Activity of Antibodies Immunreaction to the Antigen of *Paragonimus westermani*

Soo Jin Kim and Ji Hyon Lee
Department of Biology, College of Natural Sciences, Hallym University
Chunchon, Kangwon Do 200-702 Republic of Koera
(Received October 18, 1998)

ABSTRACT

This study was performed to investigate the activity of antibodies in the tissues of *Paragonimus westermani* at the different developmental stages. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Immunelectron microscopy (IEM) were applied, using the dog sera infected with metacercariae isolated from *Cambaroides similis*.

These dog sera were obtained from 3rd to 96th week after infection by bleeding. The supernatants of homogenated worms for worm antigen were used. The worm tissues were embedded in Lowicryl HM 20 medium, treated with infected serum and protein A gold complex (particle size; 12 nm) and observed by electron microscope.

In the pattern of antibody levels by ELISA test in all developmental worm antigens, the activity of antibody was very weak in the 3rd week, but strong in the worm antibody from 4th to 20th week after infection. Its activity was maintained even till 96th week. The antibody level of the 12th week worm antigen was higher than those of the 20th and 48th week worm antigens.

Generally, many gold particles were observed on the secretory granules and the epithelial lamellae. Thus, it was concluded that the antigenic materials in the developmental worm tissues were especially concentrated on the secretory granules in the parenchymal tissues and the epithelial lamellae in the lumen of the caecum.

Key words : *Paragonimus westermani*, Immunelectron microscopy, Antigenic materials

서 론

폐흡충 피낭유충에 감염된 실험동물은 폐흡충에 대한 면역항체를 생성한다는 많은 연구보고가 있으며(Yokogawa *et al.*, 1962; Yogore *et al.*, 1965; 최, 이, 1981; Cho *et al.*, 1991; 이 등, 1989), 폐흡충에 감염된 실험동물이 생성한 면역항체는 감염 기간별 면역반응 활성도가 상이하다는 연구 보고가 있다(임 등, 1992).

감염 기간별 생성된 면역항체의 면역반응 활성도는 면역학적 측정방법에 따라 다소 상이한 것으로 보고된 바 있다(Kim *et al.*, 1986; 이 등, 1989; 주 등, 1989; 임 등, 1992). 면역학적 측정방법으로 Engvall과 Perlmann(1971)이 소개한 효소면역 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이 일반적으로 많이 사용되어 왔다. Cho 등(1981)은 ELISA법으로 폐흡충 총체항원의 민감도가 86.0%이며 특이도는 100%로 나타남을 보고하였고, 성 등(1988)과 주 등(1990)은 간흡충에 감염된 숙주동물은 간흡충의 체액성 물질에 의하여 면역항체가 생성된다는 것을 면역전자현미경법을 이용하여 증명하였다. 주 등(1989)은 enzyme-linked immunoelectron transfer blot (EITB)법을 이용하여 폐흡충 발육단계별 항원항체반응을 증명하였으며, 임 등(1992)이 면역전자현미경법을 이용하여 폐흡충 발육 단계별 조직항원과 면역항체반응을 연구 보고한 바 있다.

Kim 등(1986)과 주 등(1989)은 폐흡충의 피낭유충을 감염시킨 후 폐흡충이 성숙하는 동안 총체의 항원물질이 숙주에게 면역항체를 유도하는데 있어서 폐흡충 성숙정도에 따라 상이한 것으로 보고하였다. Kim 등(1982)에 의하면 ELISA법을 이용하여 실험적으로 폐흡충을 감염시킨 개의 면역항체와 폐흡충의 조항원에 대한 ELISA값을 측정할 바 감염 3주부터 상승하여 12주에서 최고에 이른 다음 15주까지 지속되었다고 하였다.

주 등(1989)은 EITB법을 이용하여 총체의 성숙정도에 따른 조항원을 구성하는 단백질의 특정 항원대를 밝힌 바 있으며, 총체항원의 단백질 성상이나 조

직의 변성에 따른 특정 면역항체들의 면역반응을 관찰하여 보고하였으나, 폐흡충에 감염된 실험동물의 감염 주별 면역항체의 활성도는 규명된 바 없었다.

임 등(1992)은 폐흡충의 성숙정도에 따른 조직항원에 있어서 면역반응을 나타내는 부위가 총체 조직항원을 구성하는 물질에 따라 다르다고 보고한 바 있다. 그리고 폐흡충 감염되어 총체가 성숙하는 동안 총체 조직항원의 분포는 각각 상이할 뿐만 아니라, 폐흡충이 감염되었을 때 실험동물이 생성하는 면역항체 역시 감염후 시간이 경과하면 항체의 활성도가 다소 감소함을 밝힌 바 있다. 임 등(1992)은 면역전자현미경법을 이용하여 감염 12주에서 16주 사이에 실험동물의 면역항체 생성이 극대화되고, 20주 이후부터 면역항체 생성이 다소 감소한다고 보고한 바 있다. 그러나 이들 역시 면역전자현미경법에 의한 특정 조직항원의 세포소기관에 대한 면역항체의 활성도에 불과하였다.

본 실험에서는 일정기간 성숙한 폐흡충 총체 조항원과 조직항원을 이용하여 감염후 3주부터 96주의 기간동안 폐흡충에 감염된 개에서 생성되는 면역항체의 면역반응 정도와 특정 기간에 얻은 폐흡충의 조항원과 조직항원에 대한 면역항체의 면역반응 정도를 비교 검토하고자 하였다. 또한, 면역반응 활성 정도는 ELISA법과 면역전자현미경법으로 측정하여 비교 검토함으로써 실험 방법에 따른 면역항체 활성도의 오차를 최소화하고, 폐흡충에 감염된 실험동물에서 생성되는 면역항체들의 감염 기간별 총체항원에 대한 활성도를 비교 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

참가재(*Cambaroides similis*)로부터 분리한 폐흡충(*Paragonimus westermani*) 피낭유충을 체중 1kg의 실험개 9마리에 30개씩 각각 경구감염시키고 12주, 20주와 48주에 개를 부검하여 폐조직에서 폐흡충 총체를 얻었다.

면역항체를 얻기 위하여 참가재로부터 분리한 폐흡충 피낭유충을 체중 1kg의 실험개 4마리에 경구감염시키고, 감염 후 3주, 4주, 5주, 8주, 12주, 16

주, 20주, 47주 그리고 96주후에 각각 혈액을 얻는 동시에 실험 개들을 부검한 후 폐흡충의 감염정도를 확인하였다.

2. 실험방법

1) 조항원

폐흡충 피낭유충을 감염시킨 개로부터 얻은 12주, 20주 그리고 48주 폐흡충은 각각 mortar와 homogenizer를 사용하여 분쇄하고, 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 분리된 상등액인 폐흡충 체액은 Sorvall ultracentrifuge A 841rotor를 사용하여 38,000 rpm으로 3시간동안 초원심분리시켜 침전물은 제거하고 상등액을 수집하였다. 상등액은 Bradford microassay method로 단백질을 정량분석하고 용액 1 ml당 단백질 1 mg의 양이 포함되게 하여 폐흡충 체액항원으로 사용하였다.

2) 조직항원

폐흡충 피낭유충에 감염된 개의 폐에서 얻은 폐흡충 충체는 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde고정액(pH 7.4)에 2시간 전고정하고 0.12 M cacodylate buffer (pH 7.4)에서 세척하였다. 전고정된 충체들은 2% osmium tetroxide 고정액을 1시간 30분간 후고정하였고, alcohol 탈수후 Lowicryl HM 20 혼합액에 포매한 다음 60°C oven에서 24시간 중합시켰다. 포매된 충체는 Reichert-Jung ultramicrotome으로 절편을 만들어 면역반응의 조직항원으로 사용하였다.

3) 면역항체

실험에 사용된 항체는 폐흡충을 감염시킨 후 3주, 4주, 5주, 8주, 12주, 16주, 20주, 48주 그리고 96주에 실험 개로부터 각각 혈액을 채취한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 혈청을 1차 면역항체로 사용하였다. ELISA법에는 peroxidase-conjugated goat IgG anti dog IgG를 2차면역항체로 사용했으며, 면역전자현미경법은 직경 12 nm인 황금 표지단백질 A 복합체(protein A gold complex)를 2차 면역항체로 사용하였다.

4) ELISA법

Voller 등(1979)과 McLaren 등(1978)의 방법에

따라 polystyrene microtiter plate (Costar 96-wall EIA plate, flat bottom)를 사용하여 각각의 체액항원을 0.12 M phosphate buffer solution (PBS)에 1:200으로 희석하여 각 well에 200 μ l씩 첨가하고 4°C에서 12시간 보관하였다. Antigen과 반응한 plate는 세척용액(0.12 M PBS/0.1% bovin serum albumin (BSA)/0.25% triton X-100 (TX) buffer solution)으로 3회 세척한 후 PBS/Tween 20에 각각의 면역항체를 1:10에서부터 1:108까지 희석하여 37°C에서 2시간 동안 면역반응을 시켰다. 면역반응후 완충용액으로 3회 세척하여 PBS/BSA/TX buffer solution에 1:1,000으로 희석된 peroxidase-conjugated goat IgG anti dog IgG를 2시간동안 반응시켰다. 2차 면역반응후 2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiosulfonic acid, diammonium salt (ABTS)로 1시간 동안 발색반응을 시킨 다음 발색정도를 Varian DMA 90 spectrophotometer로 파장 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 면역전자현미경법

Kim *et al.* (1987)과 임 등(1992)의 방법에 따라 폐흡충 조직절편을 grid에 부착하여 saturated sodium metaperiodate에 처리한 다음 실험 개들의 1차 면역항체들을 각각 tris buffer와 1:100으로 희석하여 반응시켰다. 1차 면역항체들과 반응시킨 조직절편들은 protein A gold complex 용액에 반응시킨후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하였다. 염색된 grid는 Zeiss EM109 전자현미경으로 관찰하고, 충체의 조직 0.1 μ m²당 표지된 황금입자의 수를 계산하여 면역항체에 따른 면역반응의 정도를 비교하였다.

결 과

1. ELISA 결과

1) 1차 면역항체 1:100 희석배율

폐흡충 피낭유충을 실험 개에 감염시켜 감염 주별로 분리한 폐흡충 충체의 조항원에 감염시킨 후 주별로 얻은 실험개의 면역항체를 반응시키고, ELISA 값을 측정한 결과 감염후 3주의 면역항체부터 면역

반응이 나타났다. 4주의 면역항체는 ELISA값이 급격히 증가하여 감염 96주까지 면역반응이 계속적으로 나타나는 것으로 관찰되었다.

12주 폐흡충 충체 조항원에서 ELISA값은 높게 측정되어 면역항체의 반응 활성이 활발하였으며, 감염 3주부터 항체활성이 나타났고, 특히 감염 후 16주의 면역항체는 12주 조항원에 대하여 면역반응이 강하게 나타났다 (Table 1).

20주 폐흡충 충체 조항원은 감염 후 4주부터 96주까지의 면역항체에 대하여 면역반응이 다소 강하게 나타났으며, 특히 감염 12주의 면역항체와의 반응에서 ELISA값이 가장 높게 측정되었다 (Table 1).

48주 폐흡충 충체 조항원은 감염 후 4주부터 얻은 면역항체에 대하여 ELISA값이 높게 나타났으며, 감염 후 48주에 얻은 면역항체와의 면역반응에서 ELISA값이 최대로 측정되었다 (Table 1).

2) 1차 면역항체 1:1,000 희석배율

각 감염 주별 조항원에 감염주별 면역항체의 희석배율을 1:1,000으로 하여 면역반응시킨 결과 ELISA법의 흡광도값이 0.41 ± 0.03 에서 2.00 ± 0.23 에 이르기까지 다양하게 측정되었다. 12주 폐흡충 충체 조항원은 감염 후 3주의 면역항체 반응에서 ELISA값이 0.41 ± 0.03 로 측정되어 감염 후 16주의 면역항체 반응에서 ELISA값이 1.91 ± 0.05 로 최대치에 이르렀으며, 96주 면역항체에서도 1.42 ± 0.28 로 나타나 흡광도값이 유지되는 것으로 관찰되었다.

20주 폐흡충 충체 조항원은 감염 후 3주 면역항체 부터 면역반응이 관찰되어 12주 면역항체 반응에서

1.75 ± 0.19 로 최대치를 나타낸 다음, 96주 면역항체 반응에서 ELISA값이 0.96 ± 0.07 로 급격히 감소하였다 (Table 2).

48주 폐흡충 충체 조항원은 감염 4주 면역항체의 반응에서 ELISA값이 증가하여 감염 48주 면역항체 반응에서 2.10 ± 0.23 로 최대치를 나타냈으며, 96주 면역항체 반응에서 0.98 ± 0.11 로 급격히 감소하는 것으로 측정되었다 (Table 2).

2. 면역전자현미경 관찰 결과

1) 12주 성숙충체

숙주 체내에서 12주 성숙한 충체의 조직항원에 감염 주별 면역항체를 반응시킨 결과 맹판상피조직은 감염 후 3주에 얻은 면역항체에 대하여 황금입자가 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 1 ± 1 개로 표지된 것으로 관찰되었으며, 4주 후부터 다소 증가하여 감염 후 12주, 16주 그리고 20주의 면역항체 반응에서 최대치인 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 13 ± 2 개가 표지되었다. 또한 96주에 얻은 면역항체를 조직항원에 반응시킨 결과 황금입자가 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 8 ± 1 개로 표지되어 황금입자의 표지가 다소 감소하는 것으로 관찰되었다 (Table 3).

유조직내의 분비과립은 감염 후 3주의 면역항체에 대한 황금입자의 표지가 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 4 ± 1 개로 관찰되었으며, 4주 후부터 급격히 증가하여 16주의 면역항체 반응에서 분비과립의 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 11 ± 2 개의 황금입자가 표지된 것으로 관찰되었다. 96주의 면역항체 반응은 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 3 ± 1 개의 황금입자만이 표지되어 황금입자 표지정도가 급격히 감소하는 것으로 관찰

Table 1. Absorbance values to crude antigens of *P. westermanni* reacted with antibodies obtained from dogs infected with *P. westermanni* metacercariae (Antibody dilution ratio is 1 to 100.)

Sera at different infection periods	Absorbance values for worm antigens at different infection periods (mean \pm S.D.)		
	12 week worms	20 week worms	48 week worms
3 week serum	0.83 ± 0.08	0.89 ± 0.16	0.81 ± 0.18
4 week serum	1.80 ± 0.62	1.69 ± 0.23	1.66 ± 0.53
5 week serum	1.94 ± 0.54	1.86 ± 0.11	1.73 ± 0.29
8 week serum	2.02 ± 0.19	1.92 ± 0.23	1.96 ± 0.35
12 week serum	2.23 ± 0.21	2.11 ± 0.12	1.98 ± 0.09
16 week serum	2.35 ± 0.02	1.98 ± 0.23	1.94 ± 0.12
20 week serum	2.21 ± 0.26	2.07 ± 0.17	1.99 ± 0.21
48 week serum	2.24 ± 0.03	2.02 ± 0.12	2.25 ± 0.19
96 week serum	2.18 ± 0.02	2.04 ± 0.15	2.10 ± 0.30

Table 2. Absorbance values to crude antigens of *P. westermani* reacted with antibodies obtained from dogs infected with *P. westermani* metacercaria (Antibody dilution ratio is 1 to 1000.)

Sera at different infection periods	Absorbance values for worm antigens at different infection periods (mean \pm S.D.)		
	12 week worms	20 week worms	48 week worms
3 week serum	0.41 \pm 0.03	0.59 \pm 0.15	0.47 \pm 0.09
4 week serum	0.66 \pm 0.24	0.78 \pm 0.21	0.71 \pm 0.26
5 week serum	1.23 \pm 0.59	1.08 \pm 0.14	0.78 \pm 0.19
8 week serum	1.34 \pm 0.50	1.51 \pm 0.28	0.98 \pm 0.12
12 week serum	1.84 \pm 0.66	1.75 \pm 0.19	1.44 \pm 0.20
16 week serum	1.91 \pm 0.05	1.62 \pm 0.30	1.52 \pm 0.07
20 week serum	1.83 \pm 0.55	1.63 \pm 0.17	1.58 \pm 0.12
48 week serum	1.75 \pm 0.21	1.59 \pm 0.23	2.10 \pm 0.23
96 week serum	1.42 \pm 0.28	0.96 \pm 0.07	0.98 \pm 0.11

Table 3. Quantitativ density of the labeled gold particles in the secretory granules (SG) and the caeca (Ca) of *P. westermani* reacted with antibodies (serum). These dogs werw collected at 3, 4, 5, 8, 12, 16, 20, 48 and 96 weeks after infection with *P. westermani* metacercariae.

Sera at different infection periods	Mean number of gold particles/0.1 μ m ² tissue of worm at different infection periods (mean \pm S.D.)					
	12weeks Ca	12week SG	20week Ca	20week SG	48week Ca	48week SG
3 week serum	1 \pm 1	4 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1
4 week serum	7 \pm 2	15 \pm 2	4 \pm 1	12 \pm 4	5 \pm 1	3 \pm 2
5 week serum	6 \pm 1	20 \pm 2	5 \pm 2	11 \pm 2	3 \pm 1	7 \pm 2
8 week serum	8 \pm 2	19 \pm 3	9 \pm 2	13 \pm 4	7 \pm 2	11 \pm 3
12 week serum	11 \pm 3	27 \pm 4	12 \pm 2	17 \pm 2	13 \pm 2	13 \pm 5
16 week serum	10 \pm 2	35 \pm 4	9 \pm 3	12 \pm 3	11 \pm 2	9 \pm 3
20 week serum	13 \pm 2	28 \pm 5	14 \pm 2	9 \pm 2	10 \pm 3	10 \pm 4
48 week serum	10 \pm 3	11 \pm 2	11 \pm 2	5 \pm 1	11 \pm 2	12 \pm 4
96 week serum	8 \pm 1	3 \pm 1	6 \pm 1	3 \pm 1	9 \pm 1	5 \pm 2

되었다 (Table 3).

2) 20주 성숙충체

감염후 20주 성숙한 충체의 조직항원에 감염 주별 면역항체를 반응시킨 결과 맹관상피조직은 glycogen granule들이 풍부하게 관찰되었으며, 맹관 상피막층 (intestinal tegument lamella) 사이에 장 내용물이 존재하고 있으며, 맹관상피와 맹관 내용물에 감염후 3주에 얻은 면역항체를 반응시킨 바 0.1 μ m²당 1 \pm 1개의 황금입자가 관찰되었다 (Table 3, Fig. 4). 4주 후부터 황금입자의 표지가 증가하여 감염후 20주 면역항체에 대한 반응은 맹관상피조직의 0.1 μ m²당 14 \pm 2개의 황금입자가 표지되었다. 96주에 얻은 면역항체와의 반응에서 0.1 μ m²당 6 \pm 1개로 황금입자의 수가 관찰되어 황금입자의 표지가 감소하는 것으로

나타났다 (Table 3, Fig. 5).

유조직내의 분비세포의 세포질은 조면소포체가 특히 발달하였으며, 다양한 크기의 분비과립을 포함하고 있었다. 감염후 3주의 면역항체반응에서 0.1 μ m²당 2 \pm 1개의 황금입자가 표지된 것으로 관찰되었다 (Table 3, Fig. 1). 4주후부터 황금입자의 표지가 급격히 증가하여 감염후 12주 면역항체의 반응에서 0.1 μ m²당 17 \pm 2개의 최대치를 나타내었다 (Table 3, Fig. 2). 감염후 96주의 면역항체 반응은 0.1 μ m²당 3 \pm 1개의 황금입자사 표지되어 다소 감소하는 것으로 관찰되었다 (Table 3, Fig. 3)

3) 48주 성숙충체

감염후 48주 성숙한 충체의 조직항원에 감염 주별 면역항체를 반응시킨 결과 맹관상피조직은 감염후 3

주의 면역항체 반응에서 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 1 ± 1 개로 매우 적은 수가 표지되었으며, 4주후부터 증가하여 감염 후 12주에 얻은 면역항체와의 반응에서 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 13 ± 2 개의 황금입자가 표지되었다, 96주의 면역항체 반응은 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 9 ± 1 개의 황금입자가 표지되어 조직항원은 항원성이 유지되는 것으로 관찰되었다 (Table 3). 유조직내의 분비과립은 감염후 3주의 면역항체 반응에서 역시 $1 \mu\text{m}^2$ 당 2 ± 2 개로 적은 수의 황금입자가 표지되었으며, 4주부터 다소 증가하여 감염 12주 면역항체와의 반응에서 황금입자의 표지가 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 13 ± 5 개로 표지되었으며, 48주까지 동일한 황금입자의 표지가 관찰되었고, 96주의 면역항체와의 반응에서부터 황금입자의 표지가 $0.1 \mu\text{m}^2$ 당 5 ± 2 개로 다소 감소하는 것으로 관찰되었다

고 찰

폐흡충 피낭유충을 감염시킨 실험 개의 면역항체 형성에 관하여 Kim *et al.* (1982)과 최 등(1986)이 ELISA법으로 측정 한 바에 의하면, 감염후 3주부터 6주 사이에 면역항체가 생성되기 시작하여 12주에서 18주 사이에 최고치에 이르다고 보고하였으며, 이장(1986)과 최 이(1986) 및 Kim *et al.* (1986) 역시 폐흡충이 감염되었을 때 숙주의 면역계는 감염후 12주에서 18주에 면역항체 생성이 최대치에 이르게 된다고 하였다. 권 등(1991)은 폐흡충 피낭유충을 감염시킨 후 폐흡충 조직항원에 대한 실험개의 IgG는 16주에 면역항체 반응이 강하게 나타난다고 하였다.

본 실험에서는 폐흡충 피낭유충을 감염시키고 12주, 20주 그리고 48주에 분리한 폐흡충 충체 조직항원에 감염 주별 실험 개에서 얻은 면역항체를 반응시킨 결과 12주 폐흡충 충체 조항원은 16주에서 면역항체 활성이 최대로 나타났으며, 그 후에도 계속 면역항체 활성이 유지되는 것으로 관찰되었다. 20주 폐흡충 충체 조항원 또한, 감염 후 32주부터 면역반응이 관찰되어 96주까지 면역항체 활성이 유지되었으며, 특히 감염 후 12주의 면역항체 활성이 최대로 나타났다. 따라서 감염 주별 폐흡충 충체 조항원에 대하여 면역항체들은 충체의 성숙정도에 따라 면역

항체 활성정도가 다소 상이하나, 감염 후 4주부터 면역반응이 점점 증가하여 12주에서 20주에 얻은 면역항체가 충체의 성숙 대하여 가장 강한 면역반응을 나타내었다. 감염후 48주에서 96주동안에 얻은 면역항체는 항체 생산이 다소 감소하였지만 면역항체의 활성은 일정하게 유지되는 것으로 생각되었다.

임 등(1992)에 의하면 폐흡충은 감염 초기에 폐흡충 충체의 표피를 구성하는 물질에 숙주의 면역계가 자극되어 항체를 생성하며 시간이 경과되면 숙주는 표피구성물질에 자극된 항체의 생성과 폐흡충 충체가 표피를 통과하여 분비되는 물질의 생성이 감소하거나 혹은 표피성 분비물질이 분자구조적 변화를 초래하여 항원성이 미약해지는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 감염 기간별 각각의 폐흡충 충체 조항원에 대하여 감염 후 48주에서 96주동안 분리한 면역항체의 활성이 감소하였으나, 항체활성이 일정수준으로 유지되고 있었다. 따라서 폐흡충에 감염된 숙주는 시간이 지날수록 면역항체의 생성이 감소하나 일정하게 유지되는 것으로 생각된다.

Tada *et al.* (1967)은 *Paragonimus miyazaki*로 감염된 주의 혈청 침강반응으로 감염 90일 이후 침강계수의 감소를 관찰하였고 이는 충낭내 충체의 배설이 원활치 못한 것으로 보고하였으며, Seed 등(1966)은 충낭내의 충체는 항체와 접촉없이 성충으로 자랄 수 있다고 한 바 있다. 이와 장(1986)은 폐흡충으로 감염된 동물에서 12주부터 16주 이후에 ELISA값(항체량이 감소되는 것은 충낭형성 정도와 관계되는 것으로 이 시기에 충낭 낭벽의 발달로 기인한다고 보고하였다.

본 실험에서 관찰된 감염기간에 따른 항체생산은 감염 후 12주에서 16주에 최고의 ELISA값을 나타내고 그 이후 비슷한 정도를 유지하거나 감소되었으며 숙주의 면역계를 자극하는 폐흡충의 항원성 물질이 변화하는 것으로 생각된다.

Hillyer *et al.* (1979)은 동일한 간충충체항원을 원심분리속도를 달리하여 각각 항체반응이 다른 항원성분이 분리됨을 관찰한 바 있고, 주 등(1989)에 의하면 폐흡충은 발육단계별로 단백질 양상이 상이하고 분자량이 다른 단백질들이 항원항체반응을 특이하게 나타내는 등 발육단계별에 따라 숙주의 면역계

를 자극하는 특수단백질이 총체 내에서 다양하게 생성된다고 하였다. 본 실험에서도 발육단계별 총체항원에 대해 12주동안 성숙한 폐흡충인 경우 20주나 48주 폐흡충 항원에서 나타난 ELISA 값보다 높은 것으로 미루어 12주 총체항원의 항체 활성화도가 다른 항원에 비해 높은 것으로 생각된다.

흡충류의 맹관의 막 구조물에 대한 항원성 연구는 Sun과 Gibson (1969)과 성 등(1988) 및 주 등(1990)이 간흡충(*Clonorchis sinensis*)의 맹관에 항원성이 있는 것으로 보고한 바 있으며, Nash (1974), Lichtenberg 등(1974), De Water 등(1986)은 만손 주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)의 맹관 내용물에 항원성이 있다고 하였다. 폐흡충에 대한 맹관 내용물의 항원성 연구는 Yogore *et al.* (1965)이 폐흡충의 생리식염수 추출항원으로 면역 확산법을 사용한 결과 항원성이 있다고 하였으며, Ohara *et al.* (1985)과 Fujino과 Lshii (1988)은 *Paragonimus ohirai*에서 장 내용물의 항원성이 높게 나타나는 것으로 보고한 바 있다. 이 등(1989)은 폐흡충 조직항원에 대해 효소 발색법을 사용하여 광학현미경으로 관찰한 결과 맹관상피의 막 구조물과 맹관 내용물에 항원성이 있다고 하였으며, 주 등(1990)은 간흡충(*Clonorchis sinensis*)에서 체액항원에 대한 IgG반응은 맹관 내용물과 맹관 상피층에서 특이한 면역반응이 나타난다고 하였다. 또한, 권 등(1991)과 임 등(1992)은 폐흡충에 감염된 실험동물의 IgG를 유약성층의 맹관조직에 반응시킨 결과 맹관상피의 막 구조물과 맹관 내용물이 숙주에 항원성이 있는 것으로 보고한 바 있다.

본 실험에서는 감염후 12주, 20주 그리고 48주 성장한 폐흡충 총체들의 맹관의 내용물들은 3주에 형성된 면역항체에 대하여 모두 항원성이 다소 낮았으나, 4주에서 96주까지 형성된 항체에 대하여 지속적인 항원성이 유지되는 것으로 관찰되었다. 따라서 폐흡충의 면역항체는 감염 4주후부터 생성이 급격히 증가하여 20주까지 증가하고 48주후부터 다소 감소하지만 96주까지 생성이 유지된다.

성 등(1988)과 주 등(1990)은 간흡충의 유조직층에 존재하는 분비과립에 항원성이 있다고 하였으며, 안 등(1991)은 요꼬가와흡충(*Metagonimus yokoi*)

gawai)에서 분비과립에 항원성이 관찰되었다고 보고하였다. 권 등(1991)은 폐흡충에 감염된 실험동물의 면역항체에 대하여 총체의 분비과립이 강한 항원성을 나타낸다고 하였으며, 임 등(1992)은 성숙단계별 폐흡충 총체의 유조직내 분비과립들이 4주부터 20주까지의 면역항체에 대하여 매우 강한 항원성을 나타내므로 성숙정도에 관계없이 항원성을 나타내는 물질이 포함되어 있으며, 이들이 숙주의 면역체를 자극하는 물질이라고 보고한 바 있다.

본 실험에서도 감염후 12주 총체의 분비과립은 4주에서 48주까지 생성된 면역항체에 대하여 모두 강한 면역반응이 관찰되었다 그러나, 감염후 12주, 20주 및 48주의 총체에서 분비과립들은 96주의 면역항체에 대하여 모두 면역반응이 현저하게 감소하는 것으로 관찰되어 96주부터 생성되는 면역항체들은 분비과립에 포함된 단백질과 상이한 단백질들이 면역항체 생성에 부분적으로 관여하는 것으로 생각된다.

결 론

폐흡충(*Paragonimus westermani*)이 숙주의 폐조직 내에서 성숙하는 동안에 항체생성을 유도하는 물질의 활성도를 확인하기 위하여 폐흡충 피낭유충을 실험 개에 감염시키고 성숙 기간별 총체를 수집하였다. 감염기간별 조항원은 면역항체를 반응시킨 다음 항체활성 정도를 ELISA법으로 관찰하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

ELISA법에 의하여 조항원을 면역항체와 반응시킨 결과 숙주 체내에서 12주, 20주 및 48주 성숙한 총체의 조항원은 4주 이후부터 면역반응 활성화도가 증가하여 96까지 면역항체의 활성이 유지되는 것으로 관찰되었다. 12주 성숙한 총체의 조항원은 다른 조항원에 비해 모든 감염주별 면역항체에 대한 ELISA 값이 최대치로 나타나 12주 총체에 대한 면역항체 활성이 활발한 것으로 관찰되었다. 특히 감염 16주 항체와의 반응에서 최대치를 나타내어 면역항체는 12주 조항원들에 의하여 항체 생성이 유도되는 것으로 생각되었다. 20주 폐흡충 총체 조항원은 감염 12주의 면역항체와의 반응이 가장 높게 나타났고, 48주 성숙한 총체의 조항원은 감염 48주 항체와의

반응에서 강하게 반응하였으나, 그 후 급격히 면역항체의 활성이 감소하였다.

황금입자가 표지된 조직항원은 전자현미경으로 관찰하고 황금입자의 빈도에 따라 조직성분의 면역항체 반응정도와 항원의 분포를 관찰한 결과 숙주 체내에서 12주, 20주 및 48주 성숙한 충체는 맹관상피 조직에서 감염 초기의 면역항체 반응에서 면역항체 활성이 미약하였으나, 감염후 12주부터 16주 사이에 항체활성이 극대화되는 것으로 관찰되었고 96주까지 충체항원의 항원성이 유지되는 것으로 나타났다. 숙주 체내에서 12주, 20주 및 48주 성숙한 충체의 조직항원을 관찰한 결과 분비세포의 분비과립들은 충체의 성숙정도에 상관없이 일정한 정도의 면역항체 활성을 보였으나, 12주 성숙충체에서 가장 높은 면역항체 활성을 나타내었다.

참 고 문 헌

- 안 혁, 이준상, 임한중, 김수진 1991. 면역황금표지법을 이용한 요꼬가와 흡충의 조직내 항원성 부위에 관한 연구 기생충학잡지, 29(3), 245-257
- 최원영, 이옥란 1981. 실험적 폐흡충증의 한천침강 반응. 기생충학잡지, 19(2), 101-108
- 최원형 유재을 남호우 최형락, 1986. 폐흡충 감염 고양이 혈청에 대한 ELISA항체가의 의의. 기생충학잡지, 4(2): 177-186.
- Cho SY, Hong ST, Roh Y H, Choi S, Han YC, 1981. Application of micro-ELISA in serodiagnosis of human paragonimiasis. Korean J. Parasit, 19(2), 151-156.
- De water R, Franssen JA, Deelder AM, 1986. Ultrastructural localization of the circulating amodic antigen in the digestive tract of *Schistosoma mansoni* using monoclonal antibody in an immunogoldlabeling procedure. Am. J. Trop. Med. Hyg, 35(3), 549-558
- Engvall E, Perlman P, 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: Quantitative assay of immunoglobulin G. immunochemistry pergamon Press, 8, 871-874
- Fujino T, Ishii Y, 1988. Cytochemical studies on the effects of starvation in the gastrodermis of the lung fluke *Paragonimus ohirai*. Jpn. J. Parasitol., 37(3), 147-155
- Hillyer GV, Pelley RP, Diaz dLD, 1979. Solubilization of antigens of *Fasciola hepatica* which react with antibodies to *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol, 65(1), 55-60
- Joo KH, Ahn H, Chung MS, Rim HJ, 1989. Demonstration of species-specific and cross reactive components of *Paragonimus westermani* crude worm antigen by EITB. Korean J. Parasitol, 27(1), 9-14
- 주경환, 홍성철, 정명숙, 임한중. 1989. Immunoblot technique을 이용한 폐흡충의 발육단계별 항원 특이성 분석, 기생충학잡지, 27(1), 1-7
- 주봉덕, 김수진, 임한중. 1990. 면역황금표지법을 이용한 간흡충의 체액 항원에 관한 연구. 기생충학잡지, 28(1), 11-23.
- 권오성, 이준상, 임한중, 김수진. 1991. 면역황금표지법을 이용한 폐흡충의 유약성충 조직내 항원성 부위에 관한 연구. 기생충학잡지, 29(1), 31-41
- Kim SI, Ko EK, Kang SY, Cho SY, 1986. Antigenicity of the soluble egg antigen of *Paragonimus westernami*. Korean J. Parasit, 24, 49-54
- Kim D, Lee OY, Lee JS, Ahn SA, 1982. Studies on control of paragonimiasis by ELOSA using secretory-excretory antigen. Rep. NIH Korea, 19, 109-114(in Korean)
- Kim SJ, Lee KO, Takamia S, Capald RA, 1987. Mitochondrial myopathyinvolving uviquinol-cytochrome c oxidoreductase (complexIII) identified by immunoelectron microscopy. Biochimica et Biophysica Acta, 894, 270-279.
- 이순형, 정숙환, 채종일. 1989. 폐흡충 충체 부위별 항원성에 대한 면역조직화학적 연구, 기생충학잡지, 27(2), 109-117.
- 이옥란, 장재경. 1986. 폐흡충의 조직원과 항체항원에 의한 폐흡충감염 고양이 혈청의 면역 기생충학잡지, 24(2), 109-117.
- Lichtenberg FV, Bawden MP, Sealey SH, 1974. Origin of circulating antigen from Schistosome gut. Am. J. Trop. Med. Hyg, 23(6), 1088-1091
- McLaren M, Draper CC, Roberts JM, Minster-

- goedbloed E, Lightart GS, Teesdale CH, Amin MA, Omer AHS, Bartlett A, Voller A, 1978. Studies on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for *Schistosoma mansoni* infections. Ann. Trop. Med. Parasit, 72, 243-253
- Nash TE, 1974. Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Hyg, 23(6), 1085-1087
- Ohara H, Ikeda T, Oikawa Y, Tani S, 1985. Studies on antibody response in rats infected with *Paragonimus ohirai* by immunofluorescent staining method Jpn. J. Parasitol, 34, 245-252
- 임한중, 김수진, 선일주, 이준상. 1992. 면역황금표지법을 이용한 폐흡충의 발육단계별 총체조직내 항원성 부위에 관한 연구, 기생충학잡지, 30(1), 1-14
- Seed JR, Sognadares-Bernal F, Mills RR, 1966. Studies on *American Paragonimiasis*. II. Serological observation of infected cats. J. Parasit, 52(2), 358-320
- Sun T, Gibson JB, 1969. The sites of antigen formation in different development stage of *Clonorchis sinensis*. Jap. J. Med. Sc. Biol, 22, 263-272
- 성대림, 김수진, 엄기선, 임한중. 1988. 간접형광항체법 및 면역황금표지법을 이용한 간흡충 조직내 항원성 부위에 관한 연구. 고려의대논문집, 25(3), 813-827
- Tada I, 1967. Physiological and serological studies of *Paragonimus miyazaki* infection in rats. J. Parasit, 53, 292-297
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, 1979. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dtbatech Europe (ed.)
- Yogore MG, Lewert RM, Masraso ED, 1965. Immunodiffusion studies in paragonimiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg, 14, 586-591
- Yokogawa M, Tsuji M, Okura T, 1962. Studies on the complement fixation test for paragonimiasis as the method of criterion of cure. Jpn. J. Parasitol, 11(2), 117-122

FIGURE LEGENDS

- Figs. 1-3.** Electron micrographs of the secretory granules in the parenchymal cell at 20 weeks of *P. westermani*.
- Fig. 1.** It shows different-sized secretory granules in the worm parenchymal cells reacted with dogs serum at 3 week after infection. Gold particles are rarely labeled on the secretory granules (SG). Bar equals 1 μm .
- Fig. 2.** It shows well developed rough endoplasmic reticulum (RER) and mitochondria (M) in the worm parenchymal cells reacted with dogs serum at 96 week after infection. Gold particles are partially labeled on the secretory granules (SG). Bar equals 1 μm .
- Fig. 3.** It shows rough endoplasmic reticulum (RER) and mitochondria (M) in the worm parenchymal cells reacted with dogs serum at 12 week after infection. Especially, gold particles are densely labeled on the secretory granules (SG). Bar equals 1 μm .
- Figs. 4, 5.** Electron micrographs of the epithelial lamellae and lumen area in the caeca of the worm at 20 weeks of *P. westermani*.
- Fig. 4.** It shows glycogen granules in the intestinal tegument (ITG) and intestinal contents between intestinal epithelium lamella (IEL) in the worm caeca reacted with dogs serum at 3 week after infection. Gold particles are rarely labeled on the intestinal contents and lamella in the caeca. Bar equals 1 μm .
- Fig. 5.** It shows glycogen granules in the intestinal tegument (ITG) and intestinal contents between intestinal epithelium lamella (IEL) in the worm caeca reacted with dogs serum at 20 week after infection. Gold particles are densely labeled on the caeca. Bar equals 1 μm .



