

實驗的 犬蛔蟲症 診斷에 있어서 여러 가지 抗原의 效用性

계명대학교 의과대학 기생충학교실 및 의과학연구소

홍재훈 · 주종윤

Use of Various Antigens in the Diagnosis of Experimental Toxocariasis*

Jae Hoon Hong, M.S. and Chong Yoon Joo, M.D.

*Department of Parasitology,
Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science,
Taegu, Korea*

= Abstract =

Toxocariasis is produced by the migration of the *Toxocara canis* larvae in extra-intestinal tissues in unnatural hosts or under suitable conditions in natural hosts. Serodiagnosis and treatment may be difficult. The present study was performed to observe the specific reacting antigenic bands of crude extract *Toxocara canis* adult and larval worm and excretory-secretory materials. Its reaction to the serum IgG antibody obtained from experimentally infected mice.

For adult antigen, after homogenization with adult worm, the homogenate was extracted at 4 °C for 2 days and centrifuged at 20,000 g for 1 hr. The supernatant was used as adult antigen. For larval antigen, after homogenization with larvae using ultrasonic homogenizer, the homogenate was handled by same method as adult antigen. The supernatant was used as larval antigen. ES antigen was collected excretory-secretory materials of *Toxocara canis* larvae cultured in RPMI 1640. Infected sera were obtained from mice infected with *Toxocara canis* embryonated eggs (A group : infected with 100 embryonated eggs ; B group : 500 embryonated eggs). The control sera were obtained from non-infected mice.

Serum levels of IgG antibody by ELISA using crude antigen increased from 14 day after infection in adult antigen and ES antigen. But it was not observed the difference between infected sera and non-infected sera in larval antigen. And it was observed very little difference of A group and B group. The best result extressed as positive/negative ratio could be obtained when ES antigen was used. So ES antigen will be able to represent a

*이논문은 홍재훈의 석사학위 논문이며, 논문의 성적은 대한기생충학회 제 40회 총회 및 가을 학술대회에 발표되었음(1998)

antigen.

By SDS-PAGE in 4-20% linear gel, it was showed to difference of each other antigens.

By immunoblot, serum antibody was recognized in ES antigen ; major protein bands with molecular weight of 65.6, 51, 33, 27 and 24.5 kDa bands respectively. Among them 24.5 kDa band reacted even in non-infected control sera. The result of reaction was similar between adult and larval antigen, but intensity of reaction was very weak.

These results suggest that *Toxocara canis* ES antigen will be able to represent a antigen that can be used in the diagnosis of toxocariasis.

Key Words: Toxocariasis, ELISA, Immunoblot, *Toxocara canis*

서 론

개회충증 (Toxocariasis)은 개회충의 감염 란이 인체 및 다른 포유동물에서 성충으로 발육하지 못하여 나타나는 증상으로 진단 및 치료가 곤란한 질환이다 (Seo, 1978). 전 세계적으로 약 2백만 마리의 애완견 중에서 많은 개들이 개회충 (*Toxocara canis*)에 감염되어 있다 (Glickman and Schantz, 1981). 인체에 나타나는 개회충증 (Toxocariasis)은 개회충 유충의 이행에 의한 전신성 기생충 감염으로, 유충의 이행은 visceral larva migrans (VLM)와 ocular toxocariasis의 원인이 된다. VLM (Beaver, 1969)은 발열, 호산구증다증(Beaver et al., 1952), 간비대증 및 호흡장애 등 (Glickman and Schantz, 1981; Gillespie, 1987; Taylor et al., 1988)의 증상을 나타내며, ocular toxocariasis는 눈에 염증을 일으켜 망막에 손상을 주거나, 시각장애를 일으킨다 (Pollard et al., 1979; Glick-man and Schantz, 1981; Gillespie, 1987). 그러나 임상적으로 개회충증을 정확히 진단하기에는 매우 어려운 실정이다.

현재 개회충증의 진단은 면역학적 진단법에 의존하고 있으나 개회충 및 십이지장충의 유충체내 이행증, 아니사키스증, 선모충증 (trichinellosis) 등과의 교차반응이 있어서 어느 질환인지 결정하기 매우 곤란한 상태이다. 비근한 예로 호산구증다증이 심하게 나타나는 예에 있어서 이 질환의 양태는 기생충성 감염증일 가능성도 많음에도 어

떤 기생충의 감염에 따른 호산구증다증인지를 구별하기 힘든 경우가 대부분이다. 인체 감염의 혈청학적 진단법으로 시험관내 배양 (de Savigny, 1975)으로 얻은 유충의 분비배설물 (Excretory-secretory materials)을 항원으로 사용하여 ELISA법을 주로 이용한다. 최근에는 항체와 순환항원을 검출하는 방법이 개발되었으며 (Robertson et al., 1988), 항원들의 생리 화학적 성질에 대한 연구도 진행되었다 (Maizels et al., 1984, & 1987; Meghji and Maizels, 1986; Badley et al., 1987; Robertson et al., 1988).

현재 가장 보편적으로 쓰이는 면역진단법인 ELISA는 민감도나 특이도에 있어서 예전의 어떠한 검사법보다도 우수한 것이 사실이지만 실제 사용하기에는 아직도 무리가 있다. 인체 및 다른 포유동물에서 개회충이 성충으로 발육하지 못하여 나타나는 개회충증의 진단에 유용한 항원에 대하여 연구하고자 하였다. 이러한 관점에서 개회충 유충항원, 분비배설항원, 성충항원을 제조하여 개회충증 진단에 있어서 유용한 항원을 찾고자 본 실험을 계획하였다.

개회충 성충 및 유충과 분비배설물의 단백질은 항원성이 있으므로 이를 조사하고자 감염 혈청과 반응시켜 항체 갑을 검토하여 유용한 항원을 알아보려고 하였다. 자충포장란을 생쥐에 감염시킨 후 얻은 감염 혈청과 각 항원과의 반응에서 항원성이 높은 분획을 전기영동과 immunoblot을 사용하여 찾아내고자 하였다.

이상의 실험을 통해 감염시 시간 경과에 따른

IgG 변화 양상을 관찰하고, 감염 혈청에 대한 면역반응 결과 가장 높은 항원성을 나타내는 단백질 분획을 확인하고자 하였다. 이를 바탕으로 유용한 항원으로 효소면역학적 방법을 개발하여 개회충 감염 여부를 판단하는데 사용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

개의 장(腸)으로부터 약 200 마리의 개회충 (*Toxocara canis*)들을 수집하였으며, 감염항체와 면역항체를 얻기 위하여 체중 150 g 흰 생쥐 (ICR mouse) 50 마리를 사용하였다.

개회충 자충포장란 100개 (A군), 500 (B군) 개씩을 각각 100 마리의 생쥐에 경구감염시켰다.

2. 개회충 유충배양

개회충 성충을 해부하여 자궁에서 충란을 분리하여 2% 포르말린 용액에 넣고 실온에서 4주간 배양하면서 수정란만 구별 선택하였다. 선택된 개회충 수정란을 배양액에 넣어 37 °C 배양기에서 부화시키고, 부화된 유충들은 활동이 활발한 것들만을 선별하여 24 시간, 72 시간 각각 분리 배양하였다. 그리고 배설항원을 수집하기 위한 유충들은 지속적으로 배양하였다.

3. 혈청의 채취

감염된 생쥐의 혈청은 감염 일로부터 5, 10, 15, 21, 이후는 1 주일 간격으로 10 주까지 채혈하여 -40 °C에 보관하면서 사용하였다.

4. 항원

4. 1. 성충항원 (adult worm antigen W): 개회충 성충을 재료로 하여 항원을 제조하였다. 즉 충체를 PBS (pH 7.2)로 잘 닦은 다음 1 gm에 PBS 20 ml를 첨가하고 teflon coating 된 유리마쇄기에 넣어 마쇄하였다. 마쇄된 액을 10,000 rpm에서 60 분간 원심분리하고 상청액을 얻어 단백질함량을 측정하여 항원으로 사용하였다.

4. 2. 유충항원 (larval antigen L): 수집된 유충을 초음파 마쇄기 (Soniprep 150)로 power 2에서 40 분간 마쇄한 다음 원심 분리하여 상청액을 항원으로 사용하였다.

4. 3. 분비배설항원 (excretory-secretory antigen E): 개회충 유충을 RPMI 1640 배양액에서 배양시키면서 나온 분비배설물을 수집하여 분비배설항원으로 사용하였다.

5. 항원의 분석

5. 1. ELISA: ELISA법은 Voller *et al* (1979)과 McLaren *et al* (1978)의 방법에 준하여 혈청희석배율은 1:100, 항원의 단백질함량은 2.5 µg/ml, conjugate는 peroxidase conjugated IgG fraction, goat anti-mouse IgG (Bio-Rad Co. USA)를 적정희석배율로 희석하여 사용하였다.

5. 2. SDS-PAGE: SDS-PAGE는 Novex System (Xcell Mini-cell, USA)을 사용하여 4-20% gradient gel에서 130 V로 bromophenol blue tracking dye가 맨 밑에 올 때까지 전기영동하고 염색은 Merril (1981)의 은염색을 시행하였다.

5. 3. Immunoblot: Immunoblot은 Novex system (Blot module, USA)을 이용하여 20 V DC constant current 150 mA로 2시간 동안 PVDF membrane (PVDFM)에 전이한다. 다음 PVDFM을 incubation tray에 넣고 PBS-3% Tween 20 액으로 1:50 희석한 생쥐 실험혈청을 각각 넣어 rotary shaker에서 하룻밤을 반응시켰다. 항원대와 부착한 항체는 ELISA법으로 확인하며 이 과정 중 conjugate는 peroxidase conjugated IgG fraction goat anti-mouse IgG 를 1:1,000으로 희석하여 사용하였고 conjugate 반응 후 H₂O₂가 첨가된 침전성 발색제 기질인 3-3'-diamino-benzidine (Sigma, USA) 으로 발색시켰다.

성적

1. ELISA 성적

1. 1. 성충항원: 감염된 생쥐 혈청에 대한 흡광도를 측정하였다. 각 군의 대조혈청과 감염혈청의 흡광도 값은 Figure 1과 같다. 감염기간이 오래 될수록 증가됨을 볼 수 있었으며 4 주 이후부터는 거의 일정하였다. 대조혈청의 평균치가 0.351 ± 0.026 이었으며, 평균치 $\pm 3 \times$ 표준오차 ($= 0.429$)를 양성의 기준으로 하였을 때 각 군은 감염 15일 이후부터 양성범위에 들기 시작하였다.

1. 2. 유충항원: ELISA 성적은 Figure 2와 같다. 그림에서 보이는 것처럼 유충항원을 이용한 경우에는 감염혈청과 대조혈청간의 흡광도 변화가 양성 및 음성의 기준을 잡기가 어려웠다.

따라서 유충항원은 개회충증 진단에 있어서 유용한 항원이 될 수 없었다.

1. 3. 분비배설항원: 감염 후 각 군의 흡광도 값을 Figure 3에 나타내었다. 대조혈청과 감염혈청과의 흡광도 변화가 뚜렷하게 나타났으며, 대조혈청의 평균치가 0.177 ± 0.041 이었으며, 평균치 $\pm 3 \times$ 표준오차 ($= 0.300$)를 양성의 기준으

로 하였을 때 각 군은 감염 10일 이후부터 양성범위에 들기 시작하였다.

이상의 성적에서 보는 바와 같이 ELISA에 있어서 우수한 결과를 보인다는 것은 대조혈청의 흡광도 값은 낮아야 하며, 상대적으로 감염혈청의 흡광도 값은 높아야 한다. 이러한 관점에서 양성치/음성치의 비율을 각 항원에서 검토한 결과 분비배설항원이 6.5로 가장 높았다 (Table 1).

2. SDS-PAGE

성충항원에서는 182, 118, 60, 39, 25.5, 16, 13.5 및 12 kDa의 단백분획들이 진하게 염색되었으며 그다음으로 65.6, 44.5, 34, 29.5 및 24.5 kDa의 단백분획들이 중간 정도로 염색되었다. 유충항원에서는 118, 65.6 및 41 kDa의 단백분획들이 진하게 염색되었으며 37, 29, 27 및 13.5 kDa의 단백분획들은 약하게 염색되었다. 분비배설항원은 118, 97.4, 92, 65.6, 60, 33, 29.5, 27 및 24.5 kDa의 단백분획들이 진하게 염색되었다 (Figure 4).

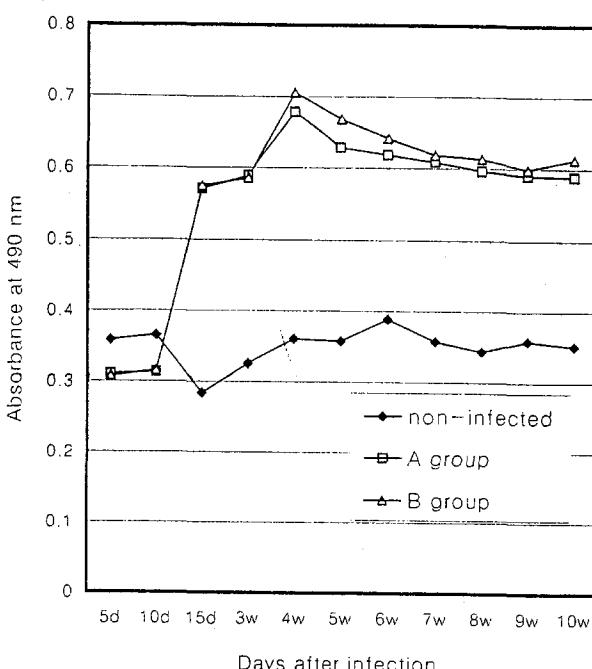


Figure 1. Absorbance values of *Toxocara* specific-IgG antibody levels using adult worm antigen.

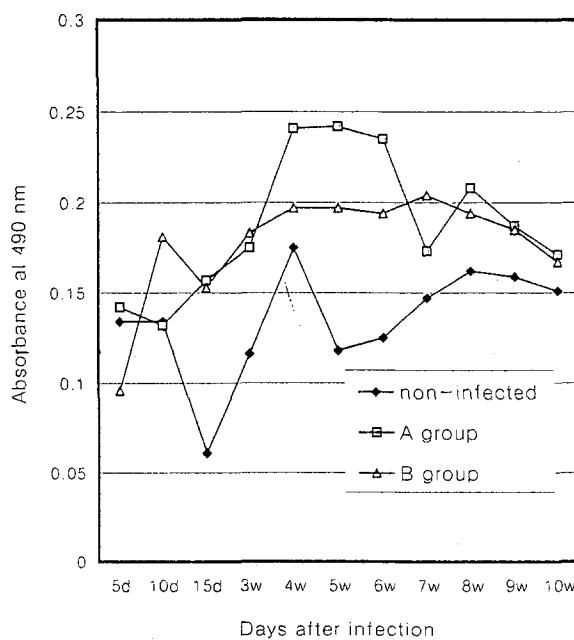


Figure 2. Absorbance values of *Toxocara* specific-IgG antivbody levels using larval antigen

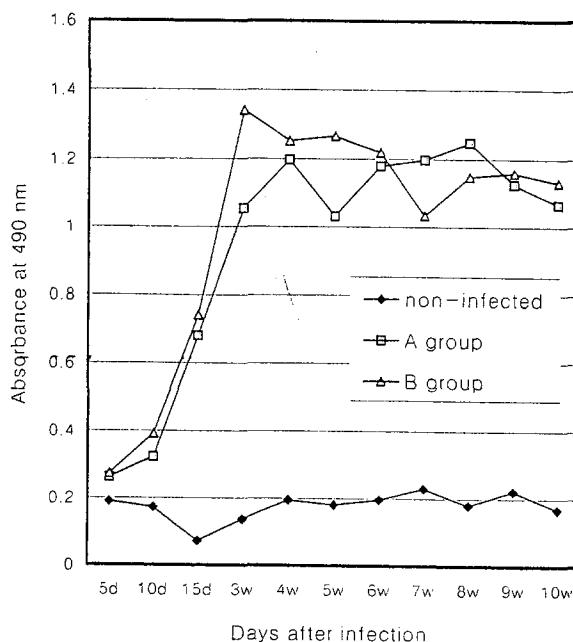


Figure 3. Absorbance values of *Toxocara* specific-IgG antigody levels using ES antigen.

Table 1. Positive/negative ratio of ELISA absorbance value of each prepared antigen against infected sera of *Toxocara canis* and normal control

Antigen	Infected sera			Normal Control	+/- ratio
	A	B	Mean		
adult antigen	0.613	0.631	0.622	0.351	1.8
larval antigen	0.204	0.193	0.199	0.135	1.5
ES antigen	1.137	1.194	1.165	0.177	6.6

3. Immunoblot

성충항원에서는 74.6, 60, 33 및 24.5 kDa 항원들이 각 군과 반응하는 항원대로 나타났으며 100개 감염군에서는 90 및 39 kDa, 500개 감염군에서는 24.5 kDa에서 각각 반응을 나타내었다. 반응정도는 강하지 않았다. 한편 대조군에서도 24.5 kDa에서 반응을 나타내었다.

유충항원에서도 반응 양상은 거의 같았다. 65, 6, 41, 30.5, 29.5 및 27 kDa에서 감염군 공통으로 반응을 하였으며 33 kDa에서는 500개 감염군에서 반응을 나타내었다. 대조군에서 공통으로 반응하는 항원대는 없었다.

분비배설항원에서 65.6, 51, 33, 27 및 24.5 kDa 분획에서 강하게 반응하는 항원대로 나타났으나, 대조혈청에서도 24.5 kDa 분획에서 반응을 나타내었다 (Figure 5).

고 찰

개회충유충에 감염되었을때는 외부로 배출되는 충란이나, 유충, 성충 등이 없으므로 기생충학적 진단이 불가능하여 면역학적 진단법이 개발되었다 (de Savigney *et al.*, 1979; Glickman and

Schantz, 1981; Josephs *et al.*, 1981; van Knapen *et al.*, 1983). 면역학적 진단 법으로 환자의 양성을 보고한 바 있으나 실제 감염상황에 비하여는 매우 높은 양성을 나타났었다 (de Savigney *et al.*, 1979; Glickman and Schantz, 1981; Josephs *et al.*, 1981; van Knapen *et al.*, 1983) 이러한 높은 양성을은 개회충의 유충조항원 (*Toxocara larval extract antigen*)이 고래회충, 선모충, 회충, 고양이회충 등 대부분의 선충류 유충항원과 교차반응을 일으키기 때문인 것으로 알려져 있다(Smith *et al.*, 1983).

인체 감염의 혈청학적진단법으로는 시험판내 배양 (de Savigny, 1975)으로 얻은 유충의 분비배설물 (ES)을 항원으로 사용하여 ELISA법을 주로 실시한다. 최근에는 항체와 순환항원을 검출하는 방법이 개발되었으며 (Robertson *et al.*, 1988), 항원들의 생리화학적 성질에 대한 연구도 진행되었다(Maizels *et al.*, 1984, 1987; Meghji and Maizels, 1986; Badley *et al.*, 1987; Robertson *et al.*, 1988).

이 연구에서는 동물 실험을 통하여 개회충증 진단에 있어서 성충항원, 유충항원 및 분비배설항원들을 이용하여 항체가를 측정할 수 있는 시기를

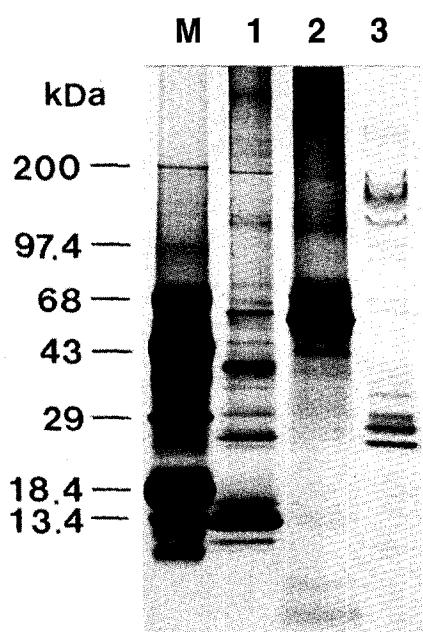


Figure 4. SDS-PAGE finding of various *Toxocara canis* antigens.

Silver stained protein bands in 4-20% gradient gel.

M : size marker

Lane 1 : adult worm antigen

Lane 2 : larval antigen

Lane 3 : ES antigen

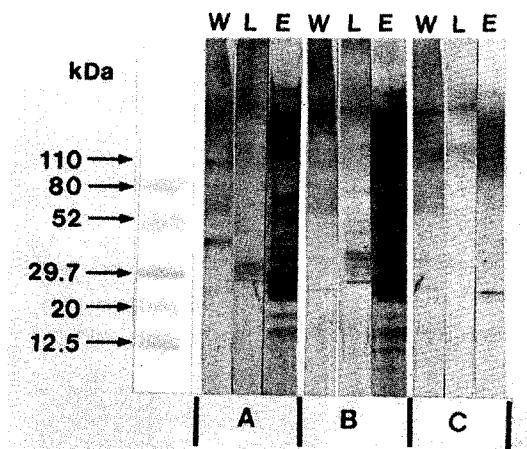


Figure 5. Immunoblot findings of IgG reacting bands to various *Toxocara canis* antigens using mouse anti-*Toxocara* sera (infected, non-infected).

W : adult worm antigen
L : larval antigen
E : ES antigen
A : infected serum with 100 embryonated eggs
B : infected serum with 500 embryonated eggs
C : non-infected

알아보고 이들중 어느 항원이 가장 유용한지를 알아보았다. 혈청 IgG 항체가는 성충항원은 15 일 이후, 분비배설항원에서는 10 일 이후부터 양성의 범위에 들기 시작하였다. Cuellar *et al* (1990)은 토끼에 개회충 감염란 2000 개를 일주일 간격으로 중복 감염한 후 유충의 분비배설항원으로 항체를 측정한 결과 2 주부터 증가하기 시작하여 3 주부터는 높은 항체가를 나타낸다고 하였으며, Smith *et al* (1982)도 분비배설 항원으로 항체가를 측정하였더니 감염 후 3 주에 높은 항체가를 나타냈으며 6 주까지 지속되었다고 하였다. 이 연구에서도 감염 2 주부터 성충항원 및 분비배설항원에서는 양성의 결과를 나타내었다. Dwight *et al* (1987)은 BALB /c mice 에 감염란 500 개를 경구감염시키고 IgG 및 IgM 항체가를 분비 배설 항원으로 측정한 바 IgM은 감염 후 1 주일부터 검출할 수 있었으며, IgG는 감염 후 2 주 일부터 증가하기 시작하여 16 주에는 최고치에 이르렀다고 하였다. 김문규 (1997)는 성충항원을 이용한 토끼 개회충증 진단에 이용한 바 감염 후 10 내지 14 일 이후부터 항체가가 양성으로 나타나기 시작하였다고 하였다. 이 결과들은 본 실험과 거의 같은 결과라고 할 수 있다. 따라서 개회충증의 진단에 있어서 분비배설항원이 가장 유용하며, 성충항원도 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 감염시킨 충란의 양 즉, 감염강도에 따라

항체가가 높게 나타난다고 하였으나 (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995) 이 실험에서는 감염강도에 따른 흡광도 변화는 크게 나타나지 않았다.

전복실 외 (1991)는 고래회충 진단에 있어서 여러가지 항원으로 감염된 토끼의 혈청 항체가를 측정하여 감염 2 주부터 강한 양성결과를 나타내었으며 5 주에는 최대값을 나타내고 점차 감소하기 시작하였다고 하였으며 한편 고래회충 진단에 있어서 분비배설항원이 가장 우수하다고 하였다. 이 연구에서도 분비배설항원이 개회충증 진단에 있어서 가장 유용하였다.

분비배설 항원을 이용하여 인체 개회충증 진단을 위한 보고(van Knapen *et al.*, 1983; Jacquier *et al.*, 1991; Magnaval *et al.*, 1992; Abo-Shwhada *et al.*, 1992; Gillespie *et al.*, 1993; Havasiova *et al.*, 1993) 들이 있었으나 개회충 성충 항원을 이용한 자료는 없었다. 그러나, 이 연구에서는 성충항원도 유용하다는 것을 알 수 있었다.

이숙환 외 (1987)는 간모세선충을 감염시킨 생쥐에서 IgG 항체가를 간접형광항체법으로 측정한 결과 3 주부터 항체가가 128 (양성기준치=32)로 높게 나타나기 시작하여 5 주후에 최고치에 도달했으며 서서히 감소하여 15 주 후에는 감염전의 수준으로 되돌아왔다고 하였다. Crandall and Crandall (1972) 과 Kagan and Norman (1970)

은 선모충 특이 IgG를 양성으로 판단할 수 있는 시기에 대하여 10 일 전후라고 하였으나 탁병연 외 (1995)는 ELISA법을 이용하여 IgG 가 유의성 있게 증가하는 것은 감염 후 6 일부터였다고 하였다. 최규홍 외 (1994)는 토끼에 대한 고래회충의 실험적 감염 후 IgM이 유의성 있게 증가하는 것은 5 일째에서 7 일째 사이에 처음 감지되며, 이후 약 20 일간 지속되며, IgG는 IgM 보다 2 일 정도 늦게 양성으로 판별된다고 하였다. Yang *et al* (1991)은 역시 고래회충의 실험적 감염 후 IgM의 변화를 ELISA로 관찰한 바 감염 6 일째부터 양성으로 되어 감염 19 일 까지 지속된다고 한바 있다. Tsuji (1989)에 의하면 ELISA을 이용하여 고래회충 특이 IgG를 양성으로 판단할 수 있는 최초의 시기가 10 일에서 20 일 사이라고 하였다. 주경환 외 (1989)는 폐흡충의 발육단계별 항원으로 폐흡충증을 진단한 결과 감염 3 주부터 반응이 나타났다고 하였다. 이선경 외 (1991)는 간흡충의 발육단계별 항원으로 ELISA법을 실시하여 간흡충 감염 토끼의 혈청 항체가를 측정한 결과 감염 3 주부터 증가하는 경향을 나타내었다고 하였다.

이 연구에서는 개회충 분비배설항원 및 성충항원으로 개회충증 진단에 있어서 감염 15 일 후면 ELISA 법으로 혈청 항체가를 검출할 수 있었다.

Chan *et al* (1990)은 선모충 조항원을 이용하여 35, 34 kDa의 항원대가 강하게 반응하고 29, 14 kDa 항원대에서는 각각 편중 및 *Metastrengylus apri*와 교차반응을 한다고 하였으며, 탁병연 외 (1995)도 다른 유사 선충류 감염에 따른 교차반응을 실시하여 선모충과 특이하게 반응하는 16, 55 및 60 kDa들의 항원대를 확인하였다. 최규홍 외 (1994)는 고래회충 조항원을 gel에서 여과하여 분획을 구하고 각 분획별로 고래회충 특이 IgG, 또는 IgM과 반응하는 항원대를 관찰하여 15, 46.8 58, 61.5 및 72 kDa 분획들이 고래회충 특히 IgG 항체와 반응하는 항원대로 규명하였으며, 46.8 kDa 항원은 고래회충 특히 IgM 항체와 반응하는 항원대로, 39 kDa 항원대는 다른 선충류와 교차반응을 하는 공통항원대로 규명하였

다.

Robertson *et al* (1989)은 개회충 유충의 분비배설물에서 단백질 분해효소를 추출하여 활성도를 관찰한 바 최저 pH는 9였으며, 활성을 나타내는 분획은 120 kDa이었고, PMSF에 의한 저해작용이 있었다고 하였다. 임한종 외 (1997)는 단백분해효소를 추출하여 항원성을 검토하였는데 110 kDa의 분획이 특이 항원이라고 하였다.

김문규 (1997)는 개회충 성충항원을 immunoblot을 시행한 결과 개회충을 감염시킨 토끼의 혈청과 특히 IgG와 강하게 반응하는 항원대는 110, 101, 72, 62.5, 48, 42, 32.5 및 13.5 kDa로 나타났으며, 대조군에서도 110, 72, 62.5 및 48 kDa이 반응성을 나타내었고 101, 32.5 및 13.5 kDa 항원대는 대조군과 반응을 나타내지 않았다고 하였다.

이 연구의 목적이 여러 가지 항원 중에서 개회충증의 진단에 가장 유용한 항원을 찾는데 있었으며 ELISA에서 유용성을 보인 분비배설항원에서 65.6, 51, 33, 및 27 kDa의 항원대가 특이한 반응을 보였다. 앞으로 이 항원대의 교차반응성 등을 추가로 실험하여 개회충증 진단에 이용하여 고 한다.

요 약

Toxocariasis(개회충증)은 개회충의 감염란이 인체 및 다른 포유동물에서 성충으로 발육하지 못하여 나타나는 유충의 이행에 의한 전신성 기생충 감염으로, 유충의 이행은 visceral larva migrans (VLM)와 ocular toxocariasis의 원인이 되며 진단 및 치료가 곤란한 질환이다

이 연구는 개회충 성충 및 유충과 분비배설물의 단백질은 항원성이 있으므로 이를 조사하고자 감염 혈청과 반응시켜 항체가를 검토하였으며, 감염 혈청에 대한 면역반응 결과 가장 높은 항원성을 나타내는 단백질 분획을 확인하고자 하였다.

성충항원은 개회충 성충을 tissue homogenizer로 마쇄한 다음 4 °C에서 2 일간 추출한 후 20,000 g에서 1 시간 원심분리하여 상청액을 항원으로

사용하였으며, 유충항원은 유충을 초음파 마쇄기로 마쇄한 다음 원심분리하여 상층액을 사용하였으며, 분비배설항원은 개회충 유충을 RPMI 1640 배양액에서 배양시키면서 나온 분비배설물을 수집하여 항원으로 사용하였다. 실험혈청은 개회충 감염란 (자충포장란)을 100 개, 500 개씩을 생쥐에 경구감염 시킨 후 시기별로 채혈하여 사용하였으며 감염시키지 않은 생쥐의 혈청을 대조로 사용하였다.

IgG 변화 양상은 ELISA법으로 실시하였으며 항원대 규명은 SDS-PAGE와 immunoblot를 이용하였다. 실험결과는 다음과 같다.

ELISA를 실시한 결과 성충항원과 분비배설항원에 대하여 감염 2 주부터 양성으로 나타났으며, 유충항원에서는 감염혈청과 대조혈청과의 차이를 관찰할 수 없었다. 한편, 100 개 및 500 개군 감염혈청간의 차이는 거의 없었다. 양성치/음성치의 비율이 분비배설항원에서 제일 높았으므로 ELISA에 가장 유용한 항원으로 나타났다. 4-20% linear gel에서 SDS-PAGE를 실시한 결과 각 항원에 대하여 차이를 보였으며, immunoblot을 실시한 결과 분비배설항원에서 65.6, 51, 33, 27 및 24.5 kDa 분획에서 강하게 반응하는 항원대로 나타났으나, 대조혈청에서도 24.5 kDa 분획이 반응성을 나타내었다. 성충항원과 유충항원에서도 반응 양상은 거의 같았으나 반응 정도가 매우 미약 했다.

이상의 결과로 분비배설항원이 개회충증 진단에 있어서 가장 유용한 항원으로 사료된다.

참고문헌

- 김문규: 개회충 성충항원을 이용한 실험적 토끼개 회충증 혈청항체가의 측정. *제명대학교 의과대학 석사학위논문* 1997;1-22.
 이선경, 주경환, 정명숙, 임한종: Immunoblot 법을 이용한 간흡충 항원의 밀육 단계별 항원성 분석에 관한 연구. *한국농촌의학회지* 1991;16(1):61-69.
 이숙환, 엄기선, 임한종: *Capillaria hepatica* 감염

마우스에 있어서 간접형광 항체반응을 이용한 IgG, IgM 및 IgA의 변동에 관한 연구. *고려의대논문집* 1987;24:97-105.

임한종, 주경환, 최서아, 이혜정, 주종윤, 정명숙: 조직기생 선충류 유충에서 분리한 단백분해 효소의 특성 및 항원성 검토. *한국농촌의학회지* 1997;22(1):61-74.

전복실, 정명숙, 주경환, 임한종: *Anisakis* 감염 가토의 시기별 항체검출에 대한 각종 항원의 적용성. *한국농촌의학회지* 1991;16(1):70-78.

주경환, 홍성철, 정명숙, 임한종: Immunoblot technique을 이용한 폐흡충의 밀육단계별 항원 특이성 분석. *기생충학잡지* 1989;27(1):1-7.

최규홍, 정명숙, 주경환, 임한종: Gel 여과한 아니사키스 유충항원의 Immunoblot 분석. *고려의대논문집* 1994;31(3):365-376.

탁병연, 정명숙, 주경환, 김수진: Immunoblot 와 면역황금 표지법을 이용한 선모충 특이항원 분석. *고려의대논문집* 1995;32(1):55-70.

Abo-Shehada MN, Sharif L el-Sukhon SN, Abuharfeil N and Atmeh RF: Seroprevalence of *Toxocara canis* antibodies in humans in northern Jordan. *J Helminthol* 1992;66:75-78.

Badley JE, Grieve RB, Bowman DD, Glickman LT and Rockey JH: Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: Physicochemical characterization and antibody recognition. *J Parasitolol* 1987;73:593-600.

Beaver PC: The nature of visceral larva migrans. *J Parasitol* 1969;55:529-539.

Beaver PC, Synder CH, Carrera GM, Dent JH and Lafferly JW: Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics* 1952;9:7-10.

Chan SW, Ko RC: Serodiagnosis of human trichinosis using a gel filtration antigen and indirect IgG-ELISA. *Trans R Soc Trop*

- Med Hyg* 1990;84:721-722.
- Crandall RB and Crandall CA: *Trichinella spiralis*: Immunologic response to infection in mice. *Exp Parasitol* 1972;31:378-386.
- Cuellr C, Fenoy S, Aguila C and Guillen JL: Evaluation of chemotherapy in experimental toxocarosis by determination of specific immune complexes. *J Helmintol* 1990;64:279-289.
- de Savigny DH: *In vitro* maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitolol* 1975;61:781-782.
- de Savigny DH, Voller A and Woodruff AW: Toxocariasis: Serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1979; 32:284.
- Dwight D, Bowman, Marcia Mika-Grieve and Robert B. Grieve: Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36(1):75-82.
- Glickman LT and Schantz PM: Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev* 1981;3:230-250.
- Gillespie SH: Human toxocariasis. A review. *J Appl Bacteriol* 1987;63:473-479.
- Gillespie SH Bidwell D, Voller A, Robertson BD and Maizels RM: Diagnosis of human toxocariasis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Pathol* 1993;46:551-554.
- Havasova K, Dubinsky P and Stefancikova A: A seroepidemiological study of human *Toxocara* infection in the Slovak Republic. *J Helminthol* 1993;67:291-296.
- Havasova-Reiterova K, Tomasovicova O and Dubinsky P: Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol Res* 1995;81:13-17.
- Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y and Eckert J: Immunodiagnosis of Toxocariasis in Humans: Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol* 1991;29:1831-1835.
- Josephs DS, Bhinder P and Thompson AR: The prevalence of *Toxocara* infection in a child population. *Public Health* 1981;95:273
- Kagan IC and Norman C: The serology of trichinosis in: Trichinosis in man and animals (SE Gould, ed) Illinois Charles C Thomas Springfield, 1979, p 222.
- Maizels RM, de Savigny DH and Ogilvie BM: Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol* 1984;6:23-37.
- Maizels RM, Kennedy MW, Meghji M, Robertson BD and Smith HV: Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secrete epitopes of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J Immunol* 1987;139:207-214.
- Malzels RM: Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clin Exp Immunol* 1988; 74:236-241.
- McKerrow JH: Parasite proteases. *Exp Parasitol* 1989;68:111-115.
- McLaren M, Draper CC, Roberts JM, et al: Studies on the enzyme-linked immunosorbent assay test for *Schistosoma mansoni* infections. *Ann Trop Med Parasitol* 1978;72: 243.
- Meghju M and Maizels RM: Biochemical

- properties of larval excretory-secretory (ES) glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol Biochem Parasitol* 1986;18:155-170.
- Merril CR, Goldman D, Sedan SA and Ebert MH: *Science* 1981;211:1437.
- Pollard ZF, Jarret WH, Hagler WS, Allain DS and Schantz PM: ELISA for diagnosis of ocular toxocariasis. *Ophthalmology* 1979;86:743-752.
- Robertson BD, Bianco AT, McKerrow JH and Maizels RM: *Toxocara canis*: Proteolytic Enzymes Secreted by the infective Larvae *in Vitro*. *Exp Parasitol* 1989;69:30-36.
- Robertson BD, Burkot TR, Gillespie SH, Kennedy MW, Wambai Z and Malzels RM : Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clin Exp Immunol* 1988;74:236-241.
- Seo BS: *Clinical Parasitology*. Seoul, Il Cho Kak, 1978, pp172-173.
- Smith HV, Kusel R and Girdwood RWA: The production of human A and B blood group-like substances by *in vitro* maintained second stage *Toxocara canis* larvae ; their presence on the outer laeval surface and in their excretion/secretions. *Clin Exp Immunol* 1983;54:625.
- Smith HV, Quinn R, Bruce RG and Girwood RWA: Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxoascaris leonina*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982;76:89-94.
- Taylor MR, Keane CT, O'Connor P, Mulvhill E and Holland C: The expanded spectrum of toxocarial disease. *Lancet* 1988; I:692-695.
- Tsuji M: Serological and immunological studies. In Ishikura H (ed). *Gastric anisakiasis in Japan* Tokyo, Springer Verlag, 1989,
- van Knapen F, van Leusden J, Polderman AM and Franchimont JH: Visceral larva migrans examinations of enzyme-linked immunosorbent assay of human sera for antibodies to excretory-secretory antigens of the second stage larvae of *Toxocara canis*. *Z Parasitenkd* 1983;69:113.
- Voller A, Bidwell DE, Barlett A: The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe (ed), 1979.
- Yang HJ, Cho YJ and Paik YH: Changes of IgM and IgG antibody levels in experimental rabbit anisakiasis as observed by ELISA and SDS-PAGE/immunoblot. *Korean J Parasitolol* 1991;29:389-396.