

Toxoplasma 抗原分離와 家兔抗血清과의 免疫血清學的 研究

가톨릭大學 醫學部 寄生蟲學敎室 및 寄生蟲病研究所

李 玉 蘭 · 崔 源 永

緒 論

*Toxoplasma gondii*는 1908년에 Nicolle 및 Manceaux에 의해 北아프리카產 설치류의 一種인 *Ctenodactylus gondi*에서 처음 發見된 病原性 原蟲이다. 그후 Janku (1923)는 本蟲의 人體感染을 밝히었으며 Motomura (1967)는 本蟲의 保有宿主가 45種의 哺乳類와 5種의 冷血動物, 70種의 鳥類등 廣範하게 分布된 典型的인 人獸共通寄生蟲임을 밝혔다.

사람은 胎盤을 通하여 母體로 부터의 先天感染以外에도 後天的으로 經口, 經鼻, 結膜, 經腔 및 創傷을 通하여 感染된다고 한다.

本症의 診斷은 急性期 患者로 부터 蟲體를 分離하면 確實하나 大部分의 患者가 慢性期에 屬하므로 蟲體分離에 依한 診斷法이 實際로 크게 도움이 되지를 못했다. 따라서 간접진단법으로 많은 免疫血清學的 診斷方法이 研究 開發되어왔다. 그러나 非特異反應인 擬陽性 및 擬陰性反應을 제거하기 어려웠다. 近來는 抗原의 特異性을 높이기 위한 抗原의 精製 및 抗體分析이 여러方法에 의해 연구되고 있다.

本研究는 *Toxoplasma*症의 實驗的 血清 反應 研究의 一環으로 抗原製造에 *T. gondii* (RH株)를 材料로 하여 粗抗原 및 Sephadex G-200으로 분리한 分離抗原으로 實驗的 *Toxoplasma*症의 家兔血清 사이의 補體結合反應 (Wassermann 1944), 寒天二重擴散法 (Ouchterlony, 1958) 및 寒天電氣泳動法 (Grabar, 1955)을 利用하여 特異 抗原物質을 檢討하고자 試圖하였다.

實驗材料 및 方法

1. 抗 原

가) 免疫用抗原: *Toxoplasma gondii* (이하 TP)의 强毒

株인 RH株를 20 gm내외의 健康한 마우스에 生體繼代하여 死亡直前의 마우스腹腔에서 生理食鹽水로 蟲體를 씻어낸후 2,000 rpm으로 10분간 2회 세척하였고 현미경下에서 다른 異物에 대한 *Toxoplasma*의 비율이 99%以上인 溶液을 모아서 Brownwill Biosonik-III power-30으로 마쇄하고 4°C에서 10,000 rpm으로 30分間 원심 분리하였다. 이때의 上清液을 抗原原液으로 삼았으며 蛋白濃度는 5.0 mg/ml 이었다.

나) 抗原分離: 위의 抗原을 蛋白濃度가 10.6 mg/ml로 농축시킨 粗抗原 8 ml을 Sephadex G-200에 通過시켰다. 即 80×4cm의 column으로 Tris-HCl (0.1M)-NaCl (1.0 M) Buffer (pH 8.0)로 每管當 3 ml/hr로 유출시켰다. OD 280 nm로 蛋白濃度를 測定하여 分劃 I, II, III, IV, V 및 VI로 나누었고 (Fig. 1) 이들을 各各 濃縮시켜 分離抗原으로 使用하였다. 이때의 各分劃의 蛋白濃度는 I分劃 1.78 mg/ml, II分劃 6.15 mg/ml, III分劃 2.75 mg/ml, IV分劃 5.0 mg/ml, V分劃 3.50 mg/ml, VI分劃 1.50 mg/ml이었다.

2. 抗血清

가) 免疫家兔血清: RH株로 만든 抗原原液 0.5 ml와 同量의 incomplete Freund's adjuvant를 混合하여 2 kg의 健康한 家兔 5마리에게 各各 四肢 皮下에 1週日間隔으로 5回 注射하였다. 最初注射 1週日後 부터 1週日間隔으로 採血하여 곧 분리된 血清은 實驗時까지 -20°C에 保管하였다.

나) 感染家兔血清: 弱毒株인 Beverley株의 cyst를 마우스腹腔에 接種하고 2個月後에 感染마우스의 腦를 生理食鹽水와 같이 tissue grinder로 마쇄한후 家兔 1마리當 cyst가 약 200 개 含有되도록 調整하여 家兔腹腔으로 接種시켰다. 接種 1週日後부터 1週日間隔으로 採血하였으며 곧 分離한 血清은 使用時까지 -20°C에 保管하였다.

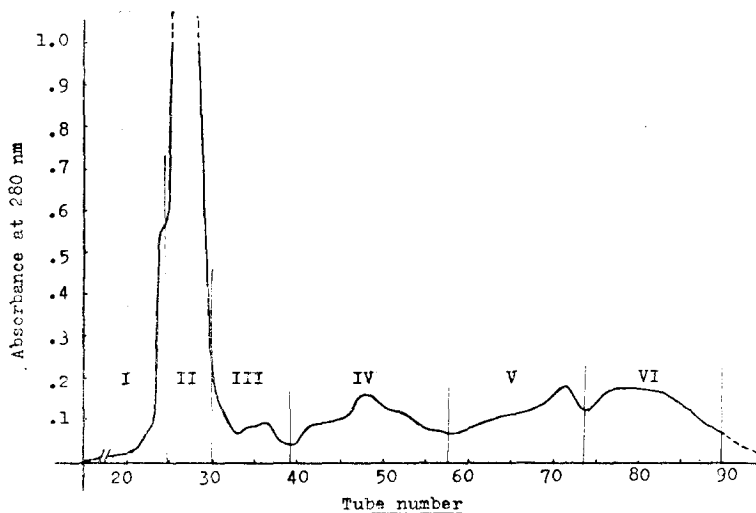


Fig. 1. Fractionation of *Toxoplasma gondii* crude antigen on Sephadex G-200.

3. 對照血清

RH株 免疫前의 家兔 및 Beverley株 接種前의 家兔에
서 各 各 採血한후 分離한 血清을 對照血清으로 使用하
였다.

4. 補體結合反應(이하 CFT)

Kolmer-Wassermann 法(1944)에 따라 抗原原液과 抗
血清 사이의 本反應은 粗抗原을 640倍로 使用하였고 分
離抗原과 抗血清 사이의 本反應에서는 各各의 蛋白濃度

Table 1. Complement Fixation Test between RH strain immune rabbits sera and crude antigen

No. of rabbits	Weeks after injection															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	17	19	22
R 1	0	20	20	80	80	80	80	80	80	80	D	*	*	*	*	*
R 2	0	20	40	80	80	80	80	80	80	80	80	80	D	*	*	*
R 3	0	10	40	40	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
R 4	0	20	40	80	80	80	80	160	160	80	80	80	80	80	80	80
R 5	0	20	20	80	80	80	160	160	160	D	*	*	*	*	*	*

D : Death

Table 2. Complement Fixation Test between Beverley strain infected rabbits sera and crude antigen

No. of rabbits	Weeks after injection										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B 1	0	0	40	40	40	40	40	80	80	80	80
B 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B 3	0	0	10	D	*	*	*	*	*	*	*
B 4	0	10	20	80	40	40	80	80	80	80	80
B 5	0	20	40	80	80	80	80	80	160	160	160
B 6	0	20	40	40	80	80	160	160	160	160	160

D : Death

를 粗抗原의 稀釋倍數에서와 같은 濃度を 만들어서 使用하였다. 溶血素는 4,000倍, 綿羊血球는 0.2 %를 使用하였다. 抗血清은 第 1管은 10倍로 稀釋하였고 이어서 2倍數로 稀釋하였다. 溶血이 全然 이루어지지 않은 것을 (冊)로 하고 完全溶血을 (—)로 定하였고 溶血程度에 따라서 (冊), (++) , (+), (±)로 나타내었다. Table 1과 2 에서는 陽性反應을 나타낸 마지막 血清稀釋倍數를 표시 하였다.

5. 寒天二重擴散法(Agar-gel double diffusion)

Ouchterlony法(1958)에 準하였다. 即 1 %의 寒天을 1.5~2mm의 두께로 載物硝子위에 임하고 直經 6 mm의 孔을 만들고 또 孔사이의 거리도 6 mm가 되게 만들었다. 抗原과 抗血清을 各各 50 μ l씩 넣은후 72時間 moist chamber內에서 擴散反應을 시켰다. 擴散시킨후 이 침강반응에 關여하지 않았던 단백질을 제거하기 위

Table 3. Complement Fixation Test between RH strain immune rabbits sera and fractionated antigens

Antigens	Serum dilution						No. of rabbits
	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	
I	±	—	—	—	—	—	R 1
	—	—	—	—	—	—	R 2
	±	—	—	—	—	—	R 3
	±	—	—	—	—	—	R 4
	—	—	—	—	—	—	R 5
II	++++	+++	+	±	—	—	R 1
	++++	+++	++	+	±	—	R 2
	++++	+++	++	±	—	—	R 3
	++++	++++	++	+	±	—	R 4
	++++	+++	++	+	±	—	R 5
III	++++	+++	++	+	—	—	R 1
	++++	++++	++	+	±	—	R 2
	++++	+++	++	+	—	—	R 3
	++++	++++	+++	++	+	—	R 4
	++++	++++	+++	++	±	—	R 5
IV	++++	++++	+++	++	+	—	R 1
	++++	++++	+++	+	+	—	R 2
	++++	++++	++	+	±	—	R 3
	++++	++++	++++	+++	++	±	R 4
	++++	++++	++++	++	+	—	R 5
V	++++	+++	++	+	—	—	R 1
	++++	+++	++	+	±	—	R 2
	++++	++	+	+	—	—	R 3
	++++	++++	++	+	±	—	R 4
	++++	+++	++	+	—	—	R 5
VI	+++	++	+	±	—	—	R 1
	+++	+	±	—	—	—	R 2
	+++	+	±	—	—	—	R 3
	++++	++	+	±	—	—	R 4
	++++	++	+	—	—	—	R 5

하여 生理食鹽水로 48時間 洗滌하고 여과지를 덮어서 室溫에서 건조시킨 다음 amido black 10B로 염색한후 沈降帶를 관찰 하였다.

6. 寒天電氣泳動法(Agar-gel electrophoresis)

Grabar方法(1955)에 依하였다. 即 pH 8.6의 Veronal buffer에다 溶解시킨 1 % agar를 載物硝子 위에다 1.5 ~2.0mm의 두께로 입히고 中央에 直徑 3mm의 孔을 만 들고 이 孔에서 4 mm間隔을 두고 2.0×70.0 mm의 溝를 만들고 孔에 20 μ l의 抗原을 넣었다. Veronal buffer

(pH 8.6) 內에서 5 volt/cm로 3時間 泳動시키고 그후 에 이溝에는 200 μ l의 抗血清을 넣은후 moist chamber에 넣어 4~6°C의 냉장고에서 72時間 擴散시켰다. 以下 二重擴散法과 같은 方法으로 染色하였다.

成 績

1. 補體結合反應

가) RH株로 免疫한 家兔抗血清과 粗抗原 사이의 本反

Table 4. Complement Fixation Test between Beverley strain infected rabbits sera and fractionated antigens

Antigens	Serum dilutions						No. of rabbits
	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	
I	±	—	—	—	—	—	B 1
	±	—	—	—	—	—	B 2
	±	—	—	—	—	—	B 4
	—	—	—	—	—	—	B 5
	±	—	—	—	—	—	B 6
II	+++	++	+	—	—	—	B 1
	±	—	—	—	—	—	B 2
	+++	++	+	—	—	—	B 4
	++++	++	++	+	±	—	B 5
	++++	+++	+	±	—	—	B 6
III	++	+	±	—	—	—	B 1
	—	—	—	—	—	—	B 2
	++	+	+	—	—	—	B 4
	+++	++	+	±	—	—	B 5
	+++	+	+	+	—	—	B 6
IV	++++	+++	+	—	—	—	B 1
	±	—	—	—	—	—	B 2
	++++	+++	++	+	—	—	B 4
	++++	+++	++	+	—	—	B 5
	++++	++	++	+	—	—	B 6
V	±	—	—	—	—	—	B 1
	±	—	—	—	—	—	B 2
	—	—	—	—	—	—	B 4
	—	—	—	—	—	—	B 5
	±	—	—	—	—	—	B 6
VI	±	—	—	—	—	—	B 1
	—	—	—	—	—	—	B 2
	—	—	—	—	—	—	B 4
	±	—	—	—	—	—	B 5
	±	—	—	—	—	—	B 6

應은 免疫 2~3週日後 부터 陽性反應을 나타내기 始作 하였고 4~5週日後 까지 抗體價의 上昇을 보였고 觀察 한 22週후 까지 5週와 같은 抗體價를 持續했다. 그러나 5마리의 家兔中 2마리에서 7~9週 사이에서 抗體價가 약간 높아졌다(Table 1).

나) Beverley株로 感染시킨 6마리의 家兔중 1마리에서는 抗體價가 認定되지 않았고 나머지 5마리는 2~3週 사이에 抗體價가 나타나고 漸次로 抗體價가 높아지 7週 이후 11週現在 까지 그대로 持續되었다(Table 2).

다) RH株로 免疫시킨 家兔血清과 分離抗原과의 7~9週후의 補體結合反應에서는 I 分割을 除外 하고는 모든 分割에서 陽性反應을 나타냈으며 특히 IV 分割에 對한 抗血清은 높은 抗體價를 나타내었다(Table 3).

라) Beverley株로 感染시킨 家兔血清과 分離抗原과는 II, III, IV 分割에서 陽性反應을 보였으나 I, V, VI 分割에서는 陰性反應을 나타냈다. 또한 IV 分割과의 反應에서 가장 높은 抗體價를 나타내었다(Table 4).

2. 寒天二重擴散法

가) RH株 免疫家兔血清과 粗抗原과의 寒天二重擴散反應에서는 免疫 2週日後에 5마리중 3마리에서 弱한 1個의 沈降帶를 형성하였고 3週後에는 5마리家兔 全部에서 沈降帶形成이 있었다. 免疫接種 5~8週後에 沈降帶數도 2~5個를 만들었으며 染色反應도 가장 뚜렷하였다(Fig. 2).

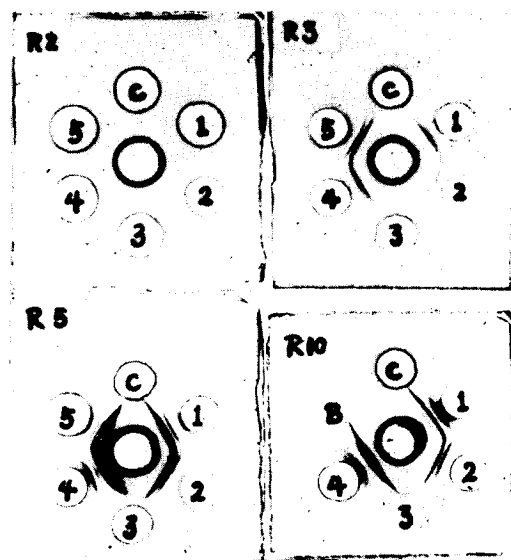


Fig. 2. Precipitin reaction of immune rabbits sera with *Toxoplasma* crude antigen in agar-gel double diffusion.

나) Beverley株 感染家兔血清과 粗抗原과의 本反應은 感染 2週日後에 沈降帶를 形成하여 漸次 反應이 強해졌으며 6週日以後에는 繼續 強한 染色反應이 持續되었으나 沈降帶數는 1~2個로 前者에 비해서 鮮明하지 못하였다(Fig. 3).

다) RH株 免疫家兔血清과 分離抗原 사이의 本反應은 I 分割을 除外한 II, III, IV, V, VI 分割과는 沈降帶를 형성 하였으며 그중 IV 分割이 가장 뚜렷하였고 沈降帶數는 3~4個였다. (Fig. 4)

라) Beverley株 感染家兔血清과 分離抗原과의 本反應에서는 II, III, IV 分割에서 沈降帶가 만들어졌다(Fig. 5).

3. 寒天電氣泳動法

가) RH株 免疫家兔血清과 粗抗原과의 本反應 에서는 γ 部位에서 albumin部位까지 8個의 沈降帶가 出現하였다(Fig. 7).

나) Beverley株 感染家兔血清과 粗抗原과는 γ 部位에 1個, β 部位에서 1~2個, α 部位에서 1~2개의 沈降帶가 형성되었다(Fig. 8).

다) RH株 免疫家兔血清과 分離抗原과는 I 分割을 除外한 全分割에서 沈降帶가 나타났었다(Fig. 6).

라) Beverley株 感染家兔血清과 分離抗原과는 II, III, IV 分割에서 4個의 沈降帶가 만들어졌다(Fig. 9).

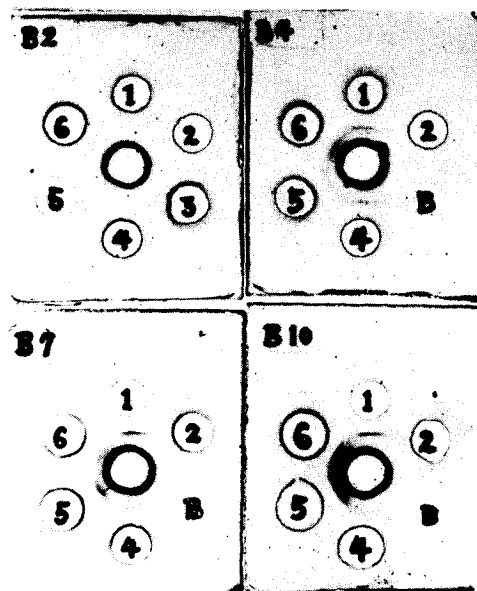


Fig. 3. Precipitin reaction of infected rabbits sera with Beverley strain of *Toxoplasma gondii*. Center wells: *Toxoplasma* crude antigen Outer wells: No. of infected rabbits sera

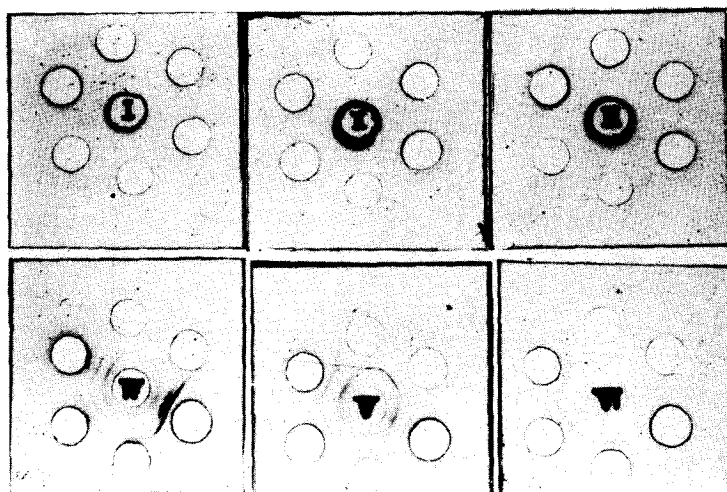


Fig. 4. Precipitin reaction of immune rabbits sera with *Toxoplasma* fractionated antigens in agar-gel double diffusion.

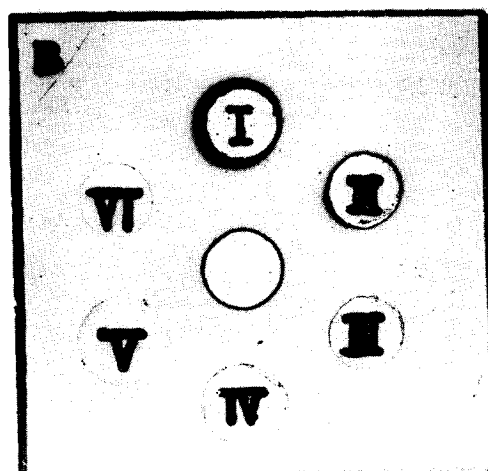


Fig. 5. Precipitin reaction of infected rabbits sera with *Toxoplasma* fractionated antigens in agar-gel double diffusion.



Fig. 6. Immunoelectrophoretic patterns of *Toxoplasma* immune rabbits sera between fractionated antigens.

Wells : fractionated antigens I-VI
Trough : immune rabbits sera



Fig. 7. Immunoelectrophoretic patterns of *Toxoplasma* immune rabbits sera between homologous crude antigen.

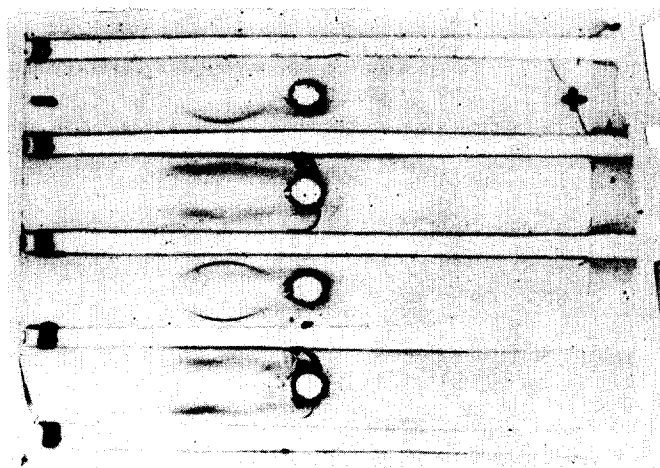


Fig. 8. Immunoelectrophoretic patterns of *Toxoplasma* infected rabbits sera between homologous crude antigen.

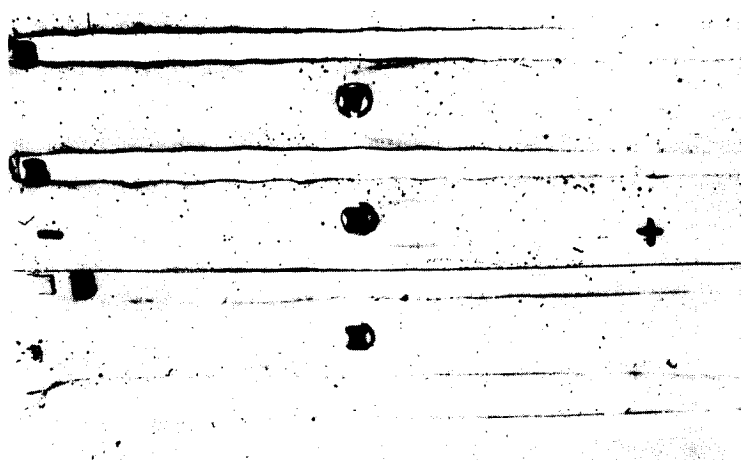


Fig. 9. Immunoelectrophoretic patterns of *Toxoplasma* infected rabbits sera between fractionated antigens.
Wells : fractionated antigens II-IV, Tough : infected rabbits sera

考 察

*Toxoplasma*症에서는 患者로부터 病原體를 分離하기가 極히 困難하므로 免疫血清學的 診斷方法이 더욱 重要하다.

즉 色素試驗(Sabin, 1948)을 爲始하여 補體結合反應(Nicolau, 1937), 赤血球凝集反應(Jacobs, 1957), 寒天二重擴散法(O'Connor, 1957), 免疫電氣泳動法(Strannegard, 1960), 螢光抗體法(Coons, 1950), 및 Dermal Sensitivity test(Frenkel, 1948)등이 開發되어 왔다. 그런데 모두 凝

陽性 및 凝陰性 등의 非特異反應을 排除하기 어려웠다. 따라서 이들의 特異性을 높이기 爲하여 抗原의 精製와 抗體分析등에 關하여 많은 努力을 하고있다. 한편 같은 *toxoplasma*症에서도 診斷方法에 따라서 抗體의 出現時期와 抗體價의 差異를 볼 수 있으며(Cutchins, 1956; Desaram, 1962; Maitani, 1970) 檢査방법에 따라서 同一 抗原에서 分離시킨 分離抗原에 따라서 抗體에 對應하는 分割이 달리 나타날수 있다(Launde, 1967; Fujita, 1970). 免疫學的 診斷法中에서 色素反應이 가장 銳敏하고 또 特異性이 높은 方法으로 評價되고 있으나 accessory factor의 入手問題와 아울러 危險性 있는 生蟲體를 取扱해야

하는등의 어려움이 있어서 敬遠하는 사람들도 없지 않다(Jacobs, 1957).

Steen등(1951)은 抽出抗原이 特異하고 anticomplementary properties가 없다고는 하였으나 Eichenwald(1956)와 Cooney등(1958)은 腹腔에서 抽出한 抗原은 蟲體는 豊富하지만 強한 anticomplementary properties가 있다고 하여 抽出抗原의 難點을 들었다. 특히 Cooney등(1958)은 100,000 rpm으로도 anticomplementary properties를 除去할수는 없었다고 한다. 또한 Sabina, Tosluty(1971)는 組織抗原으로 사람, 쥐 및 家兔의 CFT에서 組織抗原이 浸出抗原보다 感受성이 높고 anticomplementary properties도 없었다고 한다. 그러나 蟲體를 容易하게 多量을 얻을수 있으려면 TP-RH株 蟲體를 마우스에 生體繼代하여 多量の 蟲體를 얻는방법이다. 그러므로 추출항원중의 anticomplementary properties를 제거하여 감수성을 높이기위하여 蟲體의 純度を 높여야 한다. 이때의 *Toxoplasma*蟲體를 마우스腹腔液속의 다른 細胞들과 遊離시키는 方法에 關한 實驗이 Fulton(1957), Tsunematsu(1960)에 의하여 進行되었으며 回收率は 40% 程度였다. 한편 抗原의 精製過程에서 여러段階를 거치는 동안에 材料 또한 變性되므로서 抗體價가 쉽게 低下될 것이다. Warren등(1941)은 CFT 抗原製造時 凍結-溶解方法으로는 抗原價의 低下가 있다고 하였고 Pettersen등(1968)은 alkali에 의한 抽出로 抗原價의 低下를 防止할 수 있었다고 하였다.

本實驗에서는 마우스腹腔에서 꺼낸 蟲體를 鏡檢하여 蟲體의純도가 99%以上인 것만을 使用하였기 때문에 蟲體純度を 爲한 段階가 省略되었으므로 이때에 생기는 抗原價의 損失을 막을수 있었다고 본다. 많은 研究者들이 蟲體抽出物質인 粗抗原에서 特異抗原成分만을 찾아내기爲한 많은 努力이 있었다. 即 Fujita등(1969)은 赤血球凝集反應用 抗原을 얻은 目的으로 遠心分離方法, Sephadex G-200 gel 여과법, ammonium sulfate 沈澱法, Sucrose Density-Gradient centrifugation (SDGC)로 精製한바 SDGC에 의하여 얻어진 分割抗原은 分離前の 粗抗原에 比하여 特異抗原價가 230배나 되었다고 한다. 또 Chordi(1964)는 赤血球凝集反應用抗原, 補體結合反應用抗原에 對한 抗 *Toxoplasma*家兔血清의 寒天擴散法에서 7~9개의 沈降帶를 얻었으나 抗正常마우스血清(NM)으로 吸收시킨 後의 抗家兔血清에 對한 *Toxoplasma*抗原과의 反應에서는 2~3개의 沈降帶를 얻었을뿐이라고한다. 이같은 事實로 미루어 抗原의 精製는 必要한일이라 할수있다. 또 Takayanagi등(1971)은 蟲體가 包含되지 않은 浸出抗原에서도 2개의 抗原性분이 있음을 관찰한바 있었다.

本實驗에서는 腹水內의 粗抗原을 Sephadex G-200 gel 여과법에 의하여 蛋白質의 濃도에 따라 6個의 分割으로 分離한후 各分割과 抗 TP家兔血清 사이의 CFT, 寒天二重擴散法 및 免疫電氣泳動法으로 各分割의 抗原性을 比較檢討하고자 한것이다. 本實驗에서 gel 여과에 의한 蛋白質濃度の 分布는 Fujita(1969)의것과 類似하였다. 그러나 CFT의 抗原性は Fujita의 2~3peak에 該當하는 IV 分割에서 가장 銳敏하였으나 Fujita의 赤血球凝集反應에 대한 特異抗原은 1-peak에서 높았는데 이것은 本實驗에서는 II分割에 該當된 것이다. 또한 補體結合反應에서 RH株에 의한 免疫家兔血清은 一部를 除外한 家兔血清에서는 免疫後 4~5週後에 抗體價가 最高에 達한 것은 Janitschke(1972)와 일치하였고 Beverley株 감염 家兔에서 7~9週에 抗體價가 最高에 達한것은 Maitani등(1970)의 色素反應이나 赤血球凝集反應의 結果와 類似하다.

한편 Sephadex G-200 gel filtration에 의한 分離抗原에서 나타난 補體結合反應에서는 RH株에 의한 免疫家兔血清이나 Beverley株을 感染시킨 家兔血清에서 共히 IV 分割에서 높은 抗體價를 나타낸것으로 보아서 이部位에 補體結合反應의 特異抗原이 存在하고 있다고 생각된다.

寒天二重擴散法에서 보면 RH株 免疫家兔群에서는 IV 分割에서 3~4個의 沈降帶가 V 分割에서 2~3個의 沈降帶가 만들어졌다. 이에 反해서 Beverley株 感染家兔群에서는 II, III, IV 分割에서만 1個씩의 沈降帶가 形成되어서 兩群 사이에 差異點을 분수 있었다.

免疫電氣泳動反應에서는 粗抗原과 RH株 免疫家兔群은 albumin部位로 부터 γ globulin部位까지 沈降帶가 형성됐으나 Beverley株 感染群은 沈降帶數도 적었거니와 albumin 부위에는 나타나지 않았다. 또 分離抗原에 있어서는 RH株 免疫家兔群은 β 와 α 部位에 強한 沈降帶가 나타났고 Beverley株에서도 亦는 β 와 α 部位에 RH株보다는 弱한 沈降帶를 만들어서 Chordi(1964)가 實驗한 正常마우스血清으로 吸收시킨後의 抗*Toxoplasma*家兔血清과 *Toxoplasma*抗原 사이에서 나타난 沈降帶는 유사한 部位였다.

以上の 成績에 따르면 補體結合反應, 寒天二重擴散法 및 免疫電氣泳動反應에서 分離抗原中 IV 分割에서 가장 感受성이 높은 것으로 보아 이 部位에 特異抗原成分이 있다고 생각된다. 따라서 앞으로 IV 分割에 對한 仔細한 檢討가 必要하지만 分離過程에서의 抗原價의 低下를 防止하는 方法도 研究되어야 할 것으로 생각된다.

結 論

*Toxoplasma*症의 免疫血清學的研究의 一環으로 *Toxo-*

plasma蟲體의 抽出物인 粗抗原을 만들었고 또한 이粗抗原을 Sephadex G-200 gel-filtration으로 얻은 分離抗原 6個를 各各 抗原으로 하였다. 한편 이들 粗抗原과 分離抗原에 대응할 抗血清으로 RH株 免疫家兔血清과 Beverley株 感染家兔血清을 얻어 이들 抗原-抗血清 사이의 補體結合反應, 寒天二重擴散反應 및 免疫電氣泳動反應을 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 補體結合反應: RH株 免疫家兔血清과 Beverley株 感染家兔血清에 對한 粗抗原과의 反應은 兩群 모두 2~3週후에 陽性反應이 出現해서 免疫群에서는 免疫 4~5週後에 그리고 感染群에서는 感染 7~9週後에 最高抗體價를 나타내었다. 한편 이들 抗血清과 分離抗原 사이에서는 免疫群은 II, III, IV, V 및 VI分劃에서 모두 陽性反應을 나타냈으나 特히 IV分劃의 抗體價가 높았다. 그러나 感染群에서는 II, III 및 IV分劃에서 反應을 보였고 또한 IV分劃에서 力價가 높았다.

2. 寒天二重擴散反應: 粗抗原과 免疫群 및 感染群의 寒天二重擴散反應은 兩群 모두 2週後에 沈降帶를 형성했고 免疫群에서는 5~8週後에 沈降帶數가 2~5個로 最高値를 나타내었으나 感染群에서는 6週後부터 1~2個로 持續되었다. 分離抗原과의 本反應에서는 RH株 免疫群에서는 II, III, IV, V, VI分劃에서 沈降帶가 形成되었으나 特히 IV分劃에서 가장 강한 染色反應과 3~4個의 沈降帶가 形成되었다. 한편 感染群에서는 II, III 및 IV分劃에서 弱한 染色反應을 보였으나 그중 IV分劃이 多少 強하였다.

3. 寒天電氣泳動反應: 粗抗原과 免疫群 및 感染群의 本反應은 免疫群에서는 γ -部位에서 albumin部位에 이르기까지 8個의 沈降帶를 形成하였으나 感染群에서는 albumin 부위를 제외한 나머지 부위에 4~5個의 沈降帶가 形成되었다. 分離抗原과의 本反應은 免疫群은 IV分劃抗原과의 反應에서 6개의 沈降帶를 만들었으며 그 외의 II, III, V 및 VI分劃에서 1~2個의 沈降帶를 보여 주었다. 또 感染群에서는 II, III 및 IV分劃에서 모두 弱한 1개의 沈降帶를 만들었다.

REFERENCES

- Chordi, Andres, Kenneth W. Walls and Irving G. Kagan (1964). Analysis of *Toxoplasma gondii* Antigens by Agar Diffusion Methods. J. Immun., 93(6): 1034-1044.
- Cooney, M.K., Kimball, A.C., Bauer H. (1958). Studies on toxoplasmosis. I. Complement fixation test with peritoneal exudate antigen. J. Immun., 81:177-186.
- Coons, A.H., and Kaplan, M.H. (1950). J. Exp. Med., 91.
- Cutchins, E.C., and J. Warren (1956). Immunity Patterns in the Guinea pig Following *Toxoplasma* Infection and Vaccination with Killed *Toxoplasma*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 5:197-209.
- Desaram, W., A.E. Kelen and N. A. Labzoffsky (1962). Comparison of Serological Tests in Toxoplasmosis, Canad. Med. Ass. J., 87:604-607.
- Eichenwald, H.F. (1956). The laboratory diagnosis of toxoplasmosis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 64:207-214.
- Frenkel, J.K. (1948). Dermal Hypersensitivity to *Toxoplasma* Antigens (Toxoplasmins). Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 68:624-639.
- Fujita, Koichiro, Kiseko Kamei, Tsuneko Fujita, Kohei Shioiri-Nakano, and Yukinori Tsunematsu (1969). Purification of *Toxoplasma* Antigen for Hemagglutination Tests. Am. J. Trop. Med. Hyg., 18(6):892-901.
- Fujita, Koichiro, Kiseko Kamei, and Kohei Shioiri-Nakano (1970). *Toxoplasma*: Sero-reactions with Antibody Fragments. Exp. Parasit., 27(3):395-402.
- Fulton, J.D., and Spconer, D.F. (1957). Preliminary Observations on the metabolism of *Toxoplasma gondii*. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 51:123-124.
- Grabar, P. & Williams, C.A. (1955). Methodes immuno-electrophoretiques danalyse de melanges de substances antigeniques. Biochim. Biophys. Acta., 17:67.
- Jacobs, L., and Milford N. Lunde (1957). A Hemagglutination Test for Toxoplasmosis. J. Parasit., 43:308-314.
- Janitschke, K., H. Pichl, und G. Seeger (1972). Antikörpertiter nach experimentellen *Toxoplasma*-Infektionen beim Hauskaninchen.

- Angew Parasitol., 13:2-13.
- Janku, J. (1923). Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of the macula lutea in an eye of normal dimensions and in a microphthalmic eye with parasites in the retina. Cos. Lek. Cesk., 62:1021.
- Lunde, M.N. and Leon Jacobs (1967). Differences in *Toxoplasma* Dye Test and Hemagglutination Antibodies shown by Antigen Fractionation. Am. J. Trop. Med. Hyg., 16(1):26-30.
- Maitani, Takeshi, Toshio Suzuki, Satoshi Sekino and Masamitsu Otsuru (1970). Analyses of *Toxoplasma* Antibodies. I. Analysis of Precipitating Antibody by Means of Gel diffusion Method. Jap. J. Parasit., 19(6):610-618.
- Motomura, Ichiro (1967). Biological Studies on *Toxoplasma gondii*. I. Examination on the Resistance of *Toxoplasma gondii* to Physico-Chemical Conditions. Trop. Med., 9(4):201-225.
- Nicolau, S., and Ravelo, A. (1937). Bull. Soc. Path. Exot., 30:855-859.
- Nicolle, M.M.C., and Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi (*Toxoplasma* n. sp.). Arch. Inst. Pasteur Tunis, 2:97.
- O'Connor, G.R. (1957). A.M.A. Arch. Ophth., 57:52-57.
- Ouchterlony, O. (1958). Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy, 5:1-78.
- Pettersen, Eiliv K. (1968). Preparation of *Toxoplasma gondii* Antigen for the Complement Fixation Test. Acta Path. Microbiol. Scand., 74:35-40.
- Sabin, A.B., and Feldman, H.A. (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science, 108:660-663.
- Sabina, Tos-Luty (1971). A study of *Toxoplasma gondii* antigens used in the complement fixation test. Acta. Parasit. Pol., 19(17):205-225.
- Steen, E., and Kass, E. (1951). A new *Toxoplasma* antigen for complement fixation test. Acta Path. Microbiol. Scand., 28:36-39.
- Strannegard, O. (1962). Brit. J. Exp. Path. 43:600-613.
- Takayanagi, Tan, Hiroji Kambara and Gloria L. Enriquez (1971). Antigenic Analysis of the Peritoneal Exudate of *Toxoplasma gondii* Infected Golden Hamster. Jap. J. Parasit., 20(3):181-187.
- Tsunematsu, Y. (1960). Purification of *Toxoplasma* by means of Sonic Vibration and Tryptic Digestion. Am. J. Trop. Med. Hyg., 9:556-561.
- Warren, Joel and Sabin, Albert B. (1942). The Complement fixation reaction in toxoplasmic infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 51:11-14.
- Wassermann ([n.d]). "Kolmer-Wassermann Complement-Fixation Test with Serum and Spinal Fluid." *Laboratory Methods of United States Army*. ed. Simons, James Stevens and Cleon J. Gentzkow, LEA & FEBIGER, 1944, pp. 131-139.

=Abstract=

Serological Studies on rabbits inoculated with *Toxoplasma gondii*

Ok Ran Lee and Won Young Choi

*Department of Parasitology and Institute of Parasitic Diseases,
Catholic Medical College*

Serological studies on toxoplasmosis were conducted with rabbits sera that were immunized with RH strain or infected with Beverley strain of *Toxoplasma gondii*.

Complement fixation tests, agar-gel double diffusion tests and agar-gel immunoelectrophoresis were performed. *Toxoplasma* crude antigen was prepared from the organisms in mice peritoneal fluids, which were infected with RH strain of *Toxoplasma gondii*. The organisms were suspended in saline volume originally exudated and counted in hemocytometer for purity of the organisms over 99%. These suspended organisms were prepared by sonication, and the solution was centrifuged for 30 min. at 10,000 rpm in 4°C. These supernatant fluids were used as crude antigen.

On the other hand, purified antigens were fractionated on sephadex G-200 gel filtration. A sephadex G-200 column, 80 by 4cm, equilibrated with Tris-HCl-(0.1M)-NaCl (1.0M) buffer, pH 8.0 was used. The eluate fractions were collected in 3 ml per hour and the absorbance at 280 nm was measured with a Beckman Du-2 spectrophotometer. Each tube is pooled into 6 fractions by protein density graph.

For immunization of rabbits, crude antigen of RH strain was emulsified with an equal amount of incomplete Freund's adjuvant and 1ml of mixture was injected subcutaneously into them once a week for 5 successive weeks.

Antisera were obtained at an interval of a week, beginning the first week after the last immunization, while several rabbits were infected with Beverley strain of *Toxoplasma gondii* by inoculating about 200 cysts and antisera were obtained from them serially at a week interval. The results were as follows:

1. The sera from the rabbits immunized with the RH strain or infected with Beverley strain of *Toxoplasma gondii* against the crude antigen showed the first positive reactions in 2 or 3 weeks after the administration or immunization in complement fixation tests. Maximum titers appeared in 4 or 5 weeks after immunization with RH strain and in 7 or 9 weeks after infection with Beverley strain respectively.

2. Complement fixation tests showed the positive reactions in the rabbits sera immunized with RH strain against the purified antigens II, III, IV, V and VI: moreover, antigen IV fraction showed the highest titer. On the other hand in the rabbits sera infected with Beverley strain against the purified antigens II, III and IV fractions showed the positive reaction; especially, antigen fraction IV showed the highest titer.

3. In immuno-diffusion tests, the sera from the rabbits immunized with RH strain and infected with Beverley strain, against the crude antigen appeared the precipitin bands 2 weeks after the immunization or infection. And the former showed the 2 or 5 precipitin bands after 5-8 weeks and the latter showed the 1 or 2 precipitin bands after 6 weeks.

4. The sera from the rabbits immunized with RH strain against the purified antigens II, III, IV V and VI showed the precipitin bands, and the sera from the rabbits infected with Beverley strain against the purified antigens II, III and IV showed the precipitin bands in the immuno-diffusion tests. Especially antigen IV was the strongest reaction against the sera from RH strain and Beverley strain.

5. In agar-gel immunoelectrophoresis, the immunized sera against the crude antigen showed 8 arcs. But the infected sera against the crude antigen showed 4 or 5 arcs.

6. The immunized sera against the fractionated antigens II, III, IV, V, VI showed arcs, but against the fractionated antigen IV showed 6 arcs and in the antigens II, III, V, VI showed 1 or 2 arcs only. On the other hand, the infected sera against the fractionated antigens IV showed 4 arcs, II and III showed the 1 arcs, which was the most weak of all.