

肝吸虫精製 Peptide의 皮內反應에 關한 研究

第 1 報 豫備實驗

慶北大學校 醫科大學 豫防醫學教室(指導 李性寬教授)

崔 東 翊 · 李 相 元 · 金 正 萬 · 李 鍾 澤

緒 論

肝吸虫症의 免疫反應 特別 皮內反應에 關해서 1942 年 富永 및 Chung(1955) 等의 報告 以後 Sadun等 (1959) Wykoff(1959) 藤田(1959) 崔(1958~1964) 等에 依하여 抗原으로 虫體의 生理食鹽水抽出液 乳劑濾液等 精製抗原으로서는 Veronal緩衝液(以下 VBS) 酸 및 鹽基性蛋白 分割, 多糖類分割等에 依한 成績이 報告되어 있다. 現在 數種抗原에 依한 皮內反應은 Screening test로서 널리 使用되고 있으나 若干의 非特異反應이 出現함은 否認할 수 없다. 1961 年 石井等은 山村等(1958~60)의 Tuberculin 活性 Peptide의 精製法에 準하여 肺吸虫(成虫)에서 Paragonimus Peptide (以下 PPT) 抗原을 만들어 肺吸虫 및 顎口虫症者에 從來 使用되어 왔던 VBS 抗原과 比較實驗하였던바 PPT 抗原에 있어서는 VBS 抗原에 比하여 腫脹과 發赤의 크기는 작았으나 더욱 特異反應을 나타 내었다고 報告된바 있어 著者들은 人體寄生肝吸虫에서 石井等(1961)의 方法에 依據하여 Clonorchis Peptide(以下 CPT) 抗原을 만들어 于先 그의 定性反應을 實施하였고 다음에 肝 및 肺吸虫保虫者에 皮內反應을 施行함과 同時に 肝吸虫의 VBS 抗原 및 著者の 蛋白分割(以下 CPF) 抗原과 比較實驗을 하였던바 若干의 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

實驗對象者: 慶北醫大附屬病院 外來患者와 同大學 藥理學教室患者를 對象으로 하였다.

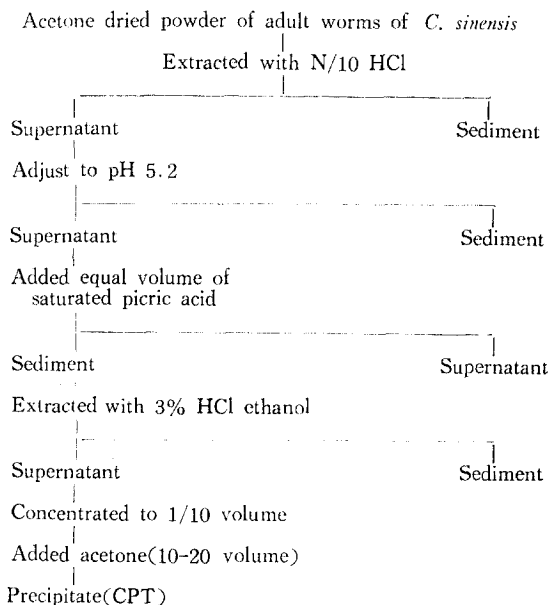
抗原材料: 慶北醫大 病理學教室에서 屍體解剖時에 膽道에서 生存한 成虫만 모아서 數回 生理食鹽水에 洗滌한 後 冷藏乾燥시켜 保存하여 둔 肝吸虫成虫.

抗原精製法: 乾燥虫體를 瑪璃乳針에 담고 冷 acetone 을 加하여 充分히 磨碎한 다음 低溫에서 遠沈(3,000 r.p.m. 10分)하여 上清을 버리고 沈澱에 다시 冷 acetone

*本論文의 要旨은 第6回 大韓寄生蟲學會에서 發表하였을

을 加하여 遠沈하였다(數回反復). 다음에 除濕器內에서 乾燥시켜 acetone 乾燥粉末을 얻었다. 이 粉末에 20~50 倍量의 0.1 N-HCl 을 加하여 24時間 室溫에서 攪拌抽出後 다시 遠沈하여 上清을 分離하고 沈澱에 0.1 N-HCl 을 加하여 數回 抽出한後 遠沈하여 上清을 모아 合하였다. 이 上清을 pH 5.2로 修正(5N-NaOH)한 後 2時間 室溫에 放置하여 生成된 沈澱物을 遠沈하여 上清을 모았다. 이에 等量의 飽和 picric acid 液을 加하여 12時間 室溫에 放置하고 생긴 黃色沈澱物을 遠沈分離하여 이 沈澱에 3% HCl-ethanol 를 加하고 約 3 時間 抽出하여 다시 遠沈分離하였다. 이 上清液을 1/10 量으로 減壓濃縮하여 10~20 倍量의 acetone 을 加하고 생기는 沈澱物을 遠沈分離하였다. 이 沈澱은 다시 冷 acetone 으로 數回 洗滌하여 picric acid 를 除去한後 除濕器內에서 乾燥시켰다 이 ethanol 可溶分割을 CPT 抗原으로 하였다(Table 1)

Table 1. Isolation of Peptide Antigen.



2. 實驗方法

定性反應: CPT의 蛋白 및 糖의 定性反應에는 Ninhydrin, Xanthoprotein, Millon, Biuret, 坂口, Molish, Diphenylamine 및 Orcinol 反應等を實驗하였다.

皮內反應의 術式 및 判定基準: CPT는 0.5% Phenol을 加한 生理食鹽水에 1μ/0.05ml로 稀釋하여 被檢者의 前膊皮內에 正確히 0.05 ml 注射한 다음 橫川等(1955~59) 및 石井等(1961)의 方法에 準하여 注射直後와 15分後의 腫脹의 平均値를 測定하였고 判定基準은 腫脹差에 있어서 3mm 以下를 陰性 4mm를 疑陽性 5mm 以上을 陽性反應으로 하였다. VBS 抗原은 國立防疫研究所製(1959)를, 蛋白分劃(CPF)抗原은 本大學 豫防醫學教室 寄生虫部製를 使用하였다.

實驗成績

定性反應: 家兎寄生肝吸虫에서 分離한 CPT의 蛋白,

糖 및 核酸에 對한 反應에 있어서 Ninhydrin, Xanthoprotein, Millon 및 坂口反應 등은 모두 陽性이었고 Molish, Diphenylamine 및 Orcinol 反應은 陰性이 었다. (Table 2)

Table 2. Results of qualitative analysis with CPT.

Reaction	Results	Reaction	Results
Ninhydrin	++	Molish	—
Xanthoprotein	+	Diphenylamine	—
Biuret	+	Orcinol	—
Millon	++		
Sakaguchi	+		

皮內反應: Formalin-ether 集卵法으로 確認한 肝吸虫 症者 82名 (年齡 13~57歲)에 對한 CPT 抗原의 皮內 反應成績은 Table 3에서 提示한 바와 같이 陽性 42.7%

Table 3. Cutaneous reaction to a *C. sinensis* Peptide Antigen (CPT) in person with clonorchiasis, paragonimiasis, metagonimiasis and in non-infected controls.

Group.	Number of cases	Number of cutaneous reaction			Mean size of enlarged wheal in mm.
		+	±	—	
<i>C. sinensis</i>	82	35 (42.7)	3 (3.7)	44 (53.6)	3.74 ± 0.308
<i>P. westermani</i>	21	0	0	21 (100)	1.71 ± 0.296
<i>M. yokogawai</i>	5	0	0	5 (100)	1.72 ± 0.313
Controls	76	0	1 (1.3)	75 (98.7)	1.63 ± 0.305

() : Per cent of cutaneous reaction.

(35名) 疑陽性 3.7% 였고 53.6% (44名)에서 陰性으로 出現하였다. 肺吸虫症者 21名과 橫川吸虫症者 5名에 있어서는 모두 陰性이 었다. 對照群에 있어서는 79名中 1名 (1.2%)에서 疑陽性으로 出現하였다. 抗原材料에 있어서는 人體寄生肝吸虫과 家兎寄生肝吸虫을 使用하였으나 腫脹差에 있어서 兩者間에 有意的差를 認定할수없었다(Table 3).

CPT, CPF 및 VBS 3種抗原의 比較: 肝吸虫保虫者 82名에 CPT, CPF 및 VBS 3種抗原을 同時에 注射하였다. 그成績은 陽性率에 있어서 CPT 抗原의 42.7%에 比하여 CPF 및 VBS 抗原에서는 各各 95.1%, 96.4%로서 CPF 및 VBS 抗原에서 높았다. 其中 3種抗原에서 모두 陰性은 1.2% (1名) 였고 CPT 抗原의 陽性者는 CPF 및 VBS 抗原에 모두 陽性이 었다. (Table 4)

Table 4. Comparison of results of intradermal test with CPT, CPF and VBS(K) antigens in 82 Clonorchiasis patients.

Antigen	Number of cases	Results of intradermal test			Statistics of enlarged wheal			
		+	±	—	\bar{x}	Sx	$\bar{x} \pm$ S. E.	\bar{x}
CPT	80	35 (42.7)	3 (3.7)	44 (53.6)	3.7	2.27	3.7 ± 0.308	
CPF	83	78 (95.1)	3 (3.7)	1 (1.2)	7.5	2.28	7.5 ± 0.308	
VBS(K)	82	79 (96.4)	1 (1.2)	2 (2.4)	7.0	2.29	7.0 ± 0.257	

() : Per cent of cutaneous reaction.

腫脹差에 있어서는 CPT 抗原의 平均腫脹大 3.7 ± 0.308 에 對하여 CPF 抗原은 平均腫脹大 7.5 ± 0.308 , 相關係數 $r=0.045$ 였으며, VBS 抗原에 있어서는 平均腫脹大 7.0 ± 0.257 , 相關係數 $r=0.041$ 로서 相互間에 有意의 相關은 認定할수 없었으나 CPF 抗原에서 가장 컸고 CPT 抗原에서 가장 작았으며 VBS 抗原은 中間値를 나타내었다(Fig. 1, 2, 3) CPF 抗原과 VBS 抗原間에 있

No. of

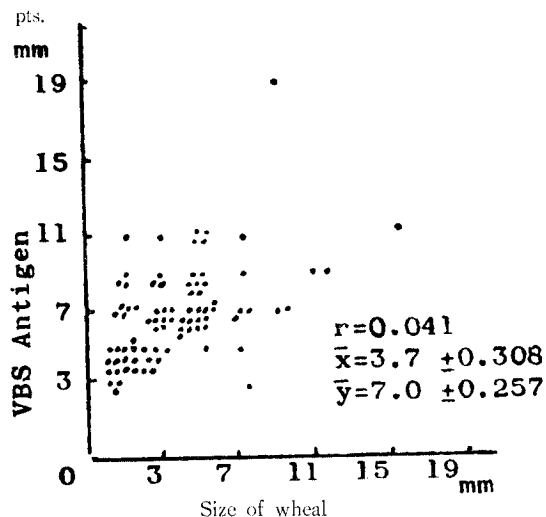


Fig. 1. Frequency Distribution of Enlarged wheal sizes in 82 Clonorchiasis patients.

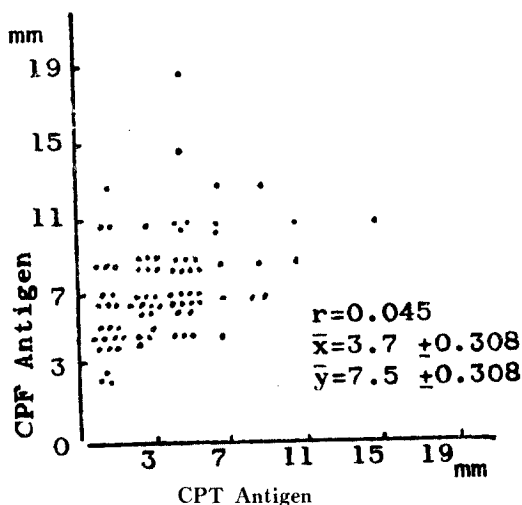


Fig. 2. Comparison of the increased diameters of the wheals between CPT and CPF antigens.

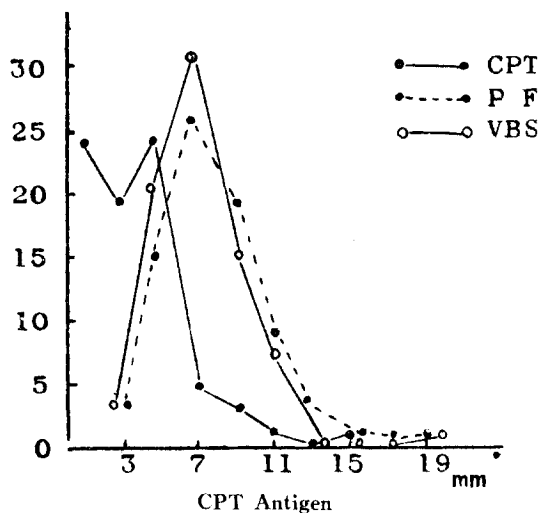


Fig. 3. Comparison of the increased diameters of the wheals between VBS and CPT antigens.

어서는 Fig. 4 에서 提示한 바와같이 CPF 抗原의 平均腫脹大 7.5 ± 0.308 에 對하여 VBS 抗原은 平均腫脹大 7.0 ± 0.257 , 相關係數 $r=0.816$ 으로서 相互間에 顯著的한 相關을 볼수 있었고 CPF 抗原은 VBS 抗原에 比하여 若干 컸다 (Fig. 4)

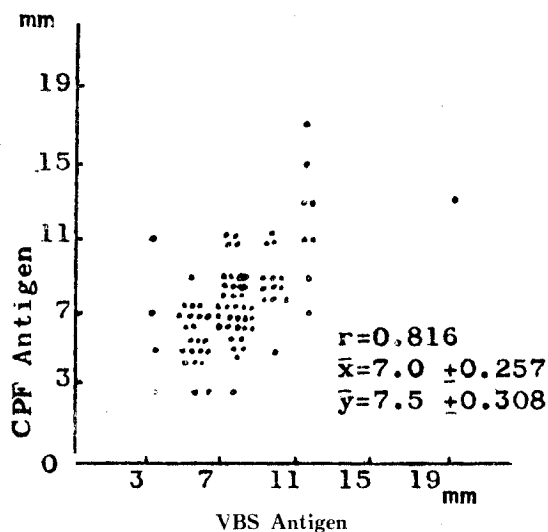


Fig. 4. Comparison of the increased diameters of the wheals between VBS and CPF antigens.

他寄生虫疾患 : 馬來糸狀虫保虫者 3 名, 無鉤條虫排泄者 4 名에 대해서는 CPT, CPF 및 VBS 의 3 種抗原에서 모두 陰性이 었다.

考 察

肺吸蟲保蟲者에 대하여 PPT 抗原은 VBS 抗原에 比하여 腫脹과 發赤(以下 皮疹)의 크기는 작았으나 特異反應을 나타내었다고 石井等(1961)이 報告한바 있어 著者들은 肝吸蟲成蟲에서 CPT 抗原을 만들어 于先 그 定性反應을 實施하였고 다음에 生物學的의 性狀 即 皮內反應을 實驗함과 同時에 著者들(1958~64)의 CPF 抗原 및 國立防疫研究所製인 VBS 抗原(1959~60)과 比較檢討 하였다. 皮內反應의 化學的性狀을 보면 寄生蟲疾患에는 蛋白抗原이 主役를 한다고 報告되어 있다.

崔(1958~64)는 肝吸蟲(成蟲)에서 Saline extract, 蛋白分劃 및 多糖分劃을 分離하여 肝吸蟲症家兎 및 人體에 皮內反應을 實驗했던바 蛋白抗原에 있어서는 皮疹의 크기가 컸을 뿐 아니라 陽性率도 높아서 93.2% 였는데 比하여 多糖抗原은 皮疹도 작았고 28.6%의 陽性反應이 나타났으므로 活性因子는 主로 蛋白分劃에 있는 成績을 나타내었다. Sadun 等(1959)은 肝吸蟲(成蟲)의 酸可溶性蛋白抗原으로 本症保蟲者 132 例中 129 例 (97.7%)에서 陽性反應을 나타내었고 對照群에서는 不過 2 例에서 陽性으로 出現하였다고 報告되어 崔(1958~61)와 同一한 成績을 發表하였다. 橫川等(1955~59)은 肺吸蟲에 있어서는 皮內反應因子는 Cellophan 紙를 透過하지 못했으며, 30,000 r.p.m. 30 分間 超遠沈沈해도 沈澱되지 않았고, 石炭酸分劃, 硫酸分劃 및 低溫 methanol 分劃 등의 各種方法으로 만든 抗原에서 皮內反應이 出現하였으므로 活性因子는 蛋白에 結合되어 있든지 또는 上記方法으로 分離할 수 없는 低分子蛋白일 것이라고 推定하였다. 宋(1959~61)도 同一한 成績을 指摘한바 있다. 1961 年 石井等은 肺吸蟲에서 皮內反應抗原을 稀鹽酸으로 抽出하여 picric acid 로 鹽折한 後 3% HCl-ethanol 로 抽出하여 低分子蛋白으로 認定되는 Peptide(PPT) 抗原을 VBS 抗原과 比較檢討 했더니 PPT 抗原은 VBS 抗原에 比하여 더욱 特異的으로 反應하였으므로 皮內反應의 活性因子는 Peptide 에 있을 것이라 推定하였다.

이번 實驗에 있어서 肝吸蟲의 peptide 인 CPT 抗原은 發赤과 腫脹의 出現이 低率인 同時에 陽性率은 2.7% 로서 CPF 및 VBS 抗原의 各各 95.1%, 96.4%와 比較한다면 甚히 낮아서 PPT 抗原의 肺吸蟲保蟲者에서의 皮內反應成績과 符合되지 않았다. 吸蟲類의 皮內反應抗原에 있어서는 三大要件은 抗原의 安定性, 高度의 陽性率 및 反應特異性이다. 現在 抗原의 安定性과 陽性率에 對해서는 Chung 等(1955), Sadun 等(1959) Wykoff(1959), 山口等(1959), 蘆田(1959), 宋(1959) 및 崔等(1958~64) 등의 實驗成績으로 미루어 보아 解決되었으나 各種抗原의 非特異反應의 出現에 關해서는 富永(1942)의 報告以後

아직도 否認하지 못하는 實情이다.

今般 CPT 抗原에 依한 豫備實驗에 있어서는 陽性率 이 낮은 缺點은 있으나 그의 安定性과 特히 反應特異性 即 肺 및 橫川吸蟲保蟲者에 非特異反應이 나타나지 않았고 石井等(1961)이 報告한 PPT 抗原의 優秀한 成績으로 미루어 보아 더욱 改良된 精製法을 應用하든지 抗原含量을 달리 한다면 陽性率이 높고 非特異反應의 出現이 없는 優秀한 抗原을 얻으리라고 生覺된다.

結 論

肝吸蟲(成蟲)에서 皮內反應抗原을 稀鹽酸으로 抽出하여 picric acid 鹽으로 沈澱시켜서 3% HCl ethanol 로 抽出하여 Clonorchis Peptide(CPT) 抗原을 얻었다 이 抗原을, 1 μ /0.05ml 로 saline 에 溶解하여 肝吸蟲保蟲者에 皮內反應을 實驗함과 同時에 蛋白抗原(CPF) 및 VBS 抗原과 比較實驗하였다.

1) 肝吸蟲保蟲者 82 名에 對한 CPT 抗原에 因한 陽性率은 42.7%(37名) 였다.

2) CPT 抗原의 腫脹과 發赤의 크기는 CPF 및 VBS 抗原에 比하여 작았다.

3) 肺吸蟲保蟲者 21 名에, 橫川吸蟲保蟲者 5 名에 對한 CPT 抗原의 皮內反應은 모두 陰性 이었다.

4) CPF 및 VBS 抗原에 偽陰性者는 CPT 抗原에서도 偽陰性 이었다.

參 考 文 獻

- 1) 荒木元敏(1959): 大平肺吸虫의 免疫學的 研究(日文)福岡醫誌 50(7), 2180~2208.
- 2) 崔東翊(1958): 肝지스토마症의 皮膚反應 慶北大學校 碩士論文拔萃集, 1, 94~95.
- 3) 崔東翊(1959): 肝지스토마症의 皮膚反應及血清學的反應에 對한 研究(第1報) 大邱醫誌, 2 (1), 98~111.
- 4) 崔東翊(1961): 肝지스토마症의 皮膚反應 及血清學的反應에 對한 研究(第2報). 大邱醫誌, 3 (1), 201~215
- 5) 崔東翊(1964): 肝吸虫에서 分離한 蛋白分劃(CPF)의 抗原性에 關한 研究. 慶北醫誌, 5 (1), 49~66.
- 6) 崔東翊 申大植 金正浣 金正萬(1963): 家兎及人體寄生肝吸虫 各種抗原에 依한 皮膚反應과 沈降反應의 比較實驗. 慶北醫誌, 4 (1), 79~85.
- 7) Chung Huei-Lan, Weng Hsin-Chih, Hou Tsung-Ch'ang and Ho Lien-Yin(1955): Cross intradermal reactions of patients with paragonimiasis, clonorchiasis and schistosomiasis and their clinical significance. Chinese Medical Journal, 73, 368~378.
- 8) 宋一(1959): 肺지스토마의 診斷用 皮內反應(第1報)

綜合醫學, 4 (4); 477~480.

9) 宋一(1960): 肺지스트마의 補體結合反應 國立防疫研究所報, 4 (1), 1~6.

10) 石井洋一 森澤成司(1961): 肺吸虫症의 皮內反應 “Peptide 의 皮內反應特異性”(日文). 福岡醫誌, 52 (8), 594~602.

11) 萬納寺德貞(1952): 大平肺吸虫에 關한 研究, 其 3. 大平肺吸虫의 免疫學的研究(日文). 醫學研究, 22(9), 1197~1224.

12) 岡部浩洋 長本喬(1958): 肝吸虫症의 免疫學的研究(日文). 第 14 回 日本寄生蟲學會 西日本大會講演抄錄; 96~99.

13) Okada, Y., Morisawa, S., Soyjima, K., Kitagawa, M., Nakashima, S. and Yamamura, Y. (1963): Improved method for the isolation and properties of Tuberculin active peptides, J. Biochem., 54(6), 484~490.

14) Sadun, E.H., Walton, B.C., Buck A.A. and Lee B.K.(1959): The use of purified antigens in the diagnosis of *Clonorchis sinensis* by means of intradermal and complement fixation test. J. of Parasitology, 45(2), 129~134.

15) 申大植(1964): 慶尙北道民의 肝吸虫의 疫學的調查. 寄生蟲學雜誌, 2(1), 1~13.

16) 藤田日出夫(1959): 肝吸虫症의 免疫學的研究(肝吸虫 5)(日文). 四國醫誌, 15(4), 1004~1023.

17) 富永覺仁(1942): 吸虫症患者에 있어서 免疫學的反應의 診斷的應用價値에 關한 實驗的研究 第 1 編 肺臟 지스트마患者의 皮內反應(假稱 P.G. 反應에 對하여)(日文). 大阪高醫專誌, 9(3), 237~396.

18) Wykoff, D.E.(1959): Studies on *Clonorchis sinensis*. II. Development of an antigen for complement-fixation

and studies on the antibody response in infected rabbits. Exp. Parasit., 8(1), 51~57.

19) 山村雄一 森澤成司 多田功 管勝男 弓場意出夫(1958): 肺吸虫皮內反應抗原의 精製. 1958 年度 文部省 研究集錄(醫學及藥學編), 141~142.

20) Yamamura, Y., Morizawa, S., Tanaka, A. and Shojima, K. (1960): Studies on tuberculin active peptide. I. The isolation, crystalization and properties of tuberculin active peptide from *Tubercle Bacillus*. Biochem. Biophys. Acta, 38, 252~258.

21) 橫川宗雄 大島智夫 勝呂毅(1955): 肺吸虫症의 皮內反應에 關한 研究(1)(日文). 寄誌, 4(3), 276~281.

22) 橫川宗雄 大島智夫 勝呂毅(1955): 肺吸虫症의 皮內反應에 關한 研究(2)(日文). 寄誌, 4(3), 282~289.

23) 橫川宗雄 栗野林(1956): 肺吸虫症의 補體結合反應. 皮內反應과 補體結合反應과의 關係(日文). 日醫事新誌, 1703, 27~35.

24) 橫川宗雄 吉村裕之 大島智夫 木畑知美江(1957): 肺吸虫症의 皮內反應에 關한 研究(3). 人體에 있어서 Prausnitz-Küstner 反應의 實驗(日文). 寄誌, 6(5), 449~456.

25) 橫川宗雄 大島智夫(1958): 肺吸虫症의 皮內反應에 關한 研究(4). 抗原의 透析及超遠心處理(日文). 寄誌, 7(2), 131~141.

26) 橫川宗雄 大島智夫(1958): 肺吸虫症의 皮內反應에 關한 研究(5). 石炭酸分割法에 依한 各分割. 特히 多糖體分割의 抗原性에 對하여(日文). 寄誌, 7(4), 333~337.

27) 橫川宗雄 大島智夫(1959): 肺吸虫症의 皮內反應에 關한 研究(6). 硫酸及低溫 methanol 分割法에 依한 蛋白分割의 抗原性에 對하여(日文). 寄誌, 8(1), 44~49.

=Abstract=

Studies on the Intradermal test of Clonorchis Peptide(CPT) Antigen 1. Preliminary report.

(Director Prof. Sung Kwan Lee)

Dong Wik Choi, M.D., Sang Whong Lee, M.D.
Jung Man Kim, M.D., Jong Taek Lee, M.D.

Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University

Polypeptide antigen was isolated from adult worms of *Clonorchis sinensis* by means of diluted HCl-extraction method. Preliminary intradermal examination with these polypeptide antigen(CPT) were performed on patients of Clonorchiasis, Paragonimiasis and Metagonimiasis, and the results of the intradermal tests with CPT antigen were compared with those of Clonorchis protein fraction(CPF) and Veronal buffer saline extraction(VBS) antigens.

The results of the examination were summarized as follows.

1. When 0.05 ml (1 μ g) of CPT was injected intradermally, the positive intradermal reaction appeared in 42.7%(37 of 82) on the patients of Clonorchiasis.
2. The sizes of the wheal and erythema with CPT antigen was smaller than that of CPF and VBS antigens.
3. Intradermal reaction with CPT antigen was carried out for other parasitic diseases, such as Paragonimiasis and Metagonimiasis. The results indicated that CPT antigen may be showed no cross reactions.
4. Clonorchiasis patients who with negative reaction to CPT antigen, reacted negatively to CPF and VBS antigens.

要 望 事 項

會費未納의 로學會運營에 莫大한 支障이 있아오니 玆
까지 會費를 納付치못하신 會員諸位께서는 서울醫大
寄生蟲學敎室로 送金納付하여 주시길 바라나이다.

제 3 권 · 제 1 호

기 생 중 학 잡 지

통권 제 5 호

登錄番號 第 卅—112 號
西紀 1965 年 6 月 25 日 印刷
西紀 1965 年 6 月 30 日 發行

發行人 徐 丙 萬
編輯人 朱 鼎 均
主 幹 林 漢 鍾

Publisher: Byong Seol Seo, M.D.
Editor in Chief: Jung Kyun Chu, M.D.
Editor: Han Jong Rim, M.D.

The Korean Journal
of Parasitology

Vol. 3, No. 1. (June, 1965)

發 行 所
大 韓 寄 生 蟲 學 會
서울特別市 鍾路區蓮建洞 28
서울大學校 醫科大學 寄生蟲學敎室

印刷處 서울大學校出版部

Published by
The Korean Society for Parasitology
28, Yeon Gheun Dong, Chong Ro Koo,
Seoul Korea
Dept. of Parasitol. College of Medicine
Seoul National University