

肝디스토마 雌性生殖細胞 分化過程의 電子顯微鏡的 研究

白 景 基 · 金 明 苑 · 崔 春 根
〈延世大學校 生物學科〉

An Electron Microscopy of Oogenesis and Fertilization in *Clonorchis sinensis*

Kyong Ki PAIK, Myong Won KIM and Choon Keun CHOI

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul Korea)

(1971. 3. 5 接受)

Abstract

The morphological and fine structural changes during the oogenesis of *Clonorchis sinensis* were studied on the developing ova in the ovary and ootype with electron microscope. Adult worms were removed from the hepar of the rats which had previously infected with metacercariae of *Clonorchis sinensis*. The ovary including the Mehlis' glands and an ootype from adult worm was prefixed for 1-2 hours in 1.25% glutaraldehyde buffered with 0.2M cacodylate at PH 7.2, secondarily fixed for 30 minutes in potassium bicromate and postfixed for an hour in 1% osmic acid buffered with 0.4M cacodylate at PH 7.2.

After fixation tissues were dehydrated in an alcohol series, embedded in Epon 812 from propylene oxide and stained with saturated uranyl acetate and Pb(NO₃)₂ solution. Material was examined with a Hitachi HS-7S electron microscope.

The periphery of the ovary, except for the posterior region, is made up of oogonia. As the oogonia divide they proliferate primary oocytes toward the central part of the ovary. After a period of growth the primary oocyte leaves the ovary and is penetrated by a sperm in the ootype. Sperm penetration immediately activates the primary oocyte to resume its meiotic activity. After the oocytes meiotic activity is completed, the pronuclei fuse to form a single cleavage nucleus which possesses two nucleoli.

As the oocytes develop their cytoplasmic materials are abundant; small mitochondria are abundant and often their profiles are more numerous in one part of the cytoplasm than elsewhere; the granular endoplasmic reticulum becomes alveolar-sac form and after it leaves the ovary it becomes stratified form.

The reticular Golgi apparatus is apparent in the developed oocyte.

A little of cortical granules are distributed inside of the plasma membrane in oogonia and large quantity of cortical granules are arranged just inside of the plasma membrane of the primary oocyte and after fertilization they are disappeared with broken out.

I. 緒 論

吸蟲類의 配遇子 形成에 關한 細胞學의인 變化는 1908年 Goldschmidt 가 *Dicrocoelium dentricum*(=D. lanceatum)의 卵子形成 및 受精過程을 觀察한 이래 1910年에는 Dingler 가 同種에서 精子 完成의 細胞學

的研究를 하여 미토콘드리아(mitochondria), 中心體(centrosomes), 紡錘系(spindle fibers) 等의 變化를 觀察하였고 1957年에는 Nez and Short가 60여종의 吸蟲類의 配遇子 形成에 關한 報告가 있었으며, Paul R. Burton 은 1960年에 개구리의 肺에 寄生하는 *Haematoloechus medioplexus*의 配遇子 形成 과 程度를

精에 關하여, 1967년에는 개구리 肺디스토마 生殖系의 微細構造을 電子 顯微鏡的으로 밝힌 바 있다.

肺디스토마(*Clonorchis sinensis*)에 關하여는 Ujiiie, N(1936), 이(1956), 주(1961, 1962), Björkman 等(1962), Komiya(1964), 조等(1966)의 一般 形態學研究 報告가 있었으나 生殖細胞에 關한 研究는 1968년 白等에 依한 精子 完成의 細胞學的인 報告外에는 文獻上으로 찾아볼 수 없었으므로 筆者는 雌性生殖細胞의 分化 및 受精過程을 電子顯微鏡的으로 밝혔다.

II. 實驗材料 및 方法

봉어에서 분리한 메타 셀카리아를 훈취에 카테타로 經口投與하여 感染시킨 후 약 60일 經過된 肝디스토마(*Clonorchis sinensis*) 成蟲을 使用하였다.

感染된 훈취의 肝臟에서 採取한 活發히 運動하는 虫體를 解剖顯微鏡下에서 卵巢部位(Mehl's gland; 卵形成腔포함)와 子宮基部를 切取하였다. 切取된 試料는 0.2M Cacodylate buffer로 調整한 pH7.2의 1.25% glutaraldehyde 溶液에 1~2時間 0~4°C에서 또 2% KMnO₄ 溶液에서 30分間 前固定한 後 pH7.2의 0.2M Cacodylate buffer로 洗滌한 後 1% Osmic Acid로 1시간 0~4°C에서 固定하였다.

3重 固定된 試料를 方法에 따른 에타놀로써 脱水하여 Epon 812(Luft, 1961)로 包埋한 後 ULTRAMICROTOME으로 超簿切片을 만들었다. 切片은 酢酸우라닐(Watson's Method)과 水酸化鉛(Raynold's Method)으로 二重 染色한 後 Hitachi HS-7S型의 전자현미경으로 觀察하였다.

III. 觀察

卵原細胞 :

卵巢의 表層에 位置한 卵原細胞는 紡錘形으로 二重으로 된 細胞膜(80Å°)에 의하여 限界膜을 이루고 있다. 核質에 比하여 少量인 細胞質에는 細胞器官인 미토콘드리아(0.7~1.2μ)는 典型的인 二重膜과 線粒體櫛로써 되어 있으며, 基質의 밀도가 높음을 나타내고 있다. 小胞體는 리보솜이 膜에 附着하여 粗面小胞體를 이루고 內腔은 扁平囊狀의 것이 少量 細胞質內에 分布되어 있으며 細胞質에는 또 遊離 리보솜이 分散되어 있다.

골지裝置는 細胞質의 몇 部位에 端片的으로 分布되어 있으며 小胞體와 連結되어 있다. 이 밖에 細胞의 表層에 顆粒體(直徑 0.3μ)가 分布되어 있다.

核은 二重으로 된 核膜(60Å)에 依하여 細胞質과

境界를 이루고 있으며 核膜은 核孔(直徑 0.1μ)을 가지고 있으며 또한 核周圍의 粗面小胞體와 連結되어 있다. 核은 密度가 높은 網工을 이룬 異質染色質과 密度가 낮은 少量의 真正染色質로 되어 있다. 電子密度가 높은 楕圓形의 仁(1.2~2μ)은 核周邊 혹은 核膜에 密着되어 있다(Fig. 2).

排卵前의 卵母細胞 :

卵原細胞로부터 成長發育하여 가는 여러 段階의 第一次卵母細胞는 卵巢의 中心部로 向하여 紡錘形으로부터 圓形으로 되어가고 細胞質이 卵原細胞에 比하여 豐富하다.

크기가 서로 다른 미토콘드리아(短徑 0.5~0.8μ長絲 0.6~1.3μ)가 比較적 많이 分布되어 있으며 粗面小胞體의 內腔은 擴張되어 胞狀囊으로 되어 있고 遊離리보솜은 몇개씩 모여서 小集塊를 形成하여 細胞質에 고루 分布되어 있다. 골지裝置는 細胞의 한쪽 部位에 網狀으로 線球體形을 하고 그 속에 2~3개의 골지 小胞를 만들고 있다. 表層顆粒은 細胞膜 가까운 表層部에 一列로 配列되어 있다.

核은 卵原細胞에서 豐富하던 異質染色質이 減退하고 真正染色質이 많아지며 仁도 消失되었다(Fig. 3).

排卵後의 卵母細胞 :

第一次卵母細胞의 狀態로 排卵된 卵細胞는 卵巢內의 것에 比하여 세포질은 더욱 많아졌으며 크기가 비슷한 楕圓形의 미토콘드리아(0.9~1.3μ)가 細胞質한쪽 部位에 分布되어 있으며 그 反對쪽 部位에는 扁平囊狀인 粗面小胞體가 集團의 으로 層板狀을 이루고 있다. 골지裝置는 더욱 뚜렷한 網工을 이루고 있으며 表層顆粒은 細胞膜直下에 平行하여 一列로 配置되어 있다.

核은 豐富한 真正染色質과 楕圓形의 仁(1.5~2μ)을 가지고 있다(Fig. 4).

受精後의 卵母細胞 :

輸卵管을 通하여 受精囊과 連結되는 卵形成腔開口部까지 移動한 第一次卵母細胞는 精子의 侵入을 받는다. 精子는 頭部와 双軸의 中片만이 第一次卵母細胞에 吸引되고 꼬리는 卵母細胞 밖에 남는다(Fig. 5).

精子의 侵入을 받은 第一次卵母細胞는 表層顆粒의 消滅을 가져오고 核膜이 崩壞하기 始作하면서 異質染色質의 網工이 뚜렷하여지고 電子密度가 낮은 2개의 仁이 核內의 가장 민족 核膜直下에 對立狀으로 位置한다(Fig. 6). 精核이 卵核에 接近되면서 卵核은 二回에 걸친 減數分裂에 依하여 極體를 내어 半減된 染色體를 가진 卵前核의 狀態로 精前核과 融合하면서 卵形成腔속으로 移動한다(Fig. 7).

卵形成腔을 通하는 동안 受精卵은 2~3개의 卵黃

細胞와 더불어 메리스氏腺에서 分泌된 分泌液에 의하여 卵殼이 形成되어 複合卵이 된다.

이 複合卵은 子宮으로 移動하면서 卵割을 하여 子宮에 到達한 卵은 이미 4~16細卵期의 卵割卵이 되어 있다(Fig.8).

IV. 論識 및 結論

吸蟲類의 雌性生殖細胞 完成에 關하여는 여리 學者들이 報告한 바 있다.

Burton(1960)은 개구리에 寄生하는 吸蟲類 *Haematocephalus medioplexus*에서 卵原細胞로부터 成長分化하여 가는 過程에 있는 卵母細胞들은 形態의으로 多樣하고 서로 緘密하게 密集되어 있으며, 卵巢의 周邊에는 卵原細胞들이 多量 存在한다고 報告하였으며 Guilford(1961)는 吸蟲類의 *Halipegus eccentricus* T.에서 均一한 細胞質을 가진 卵原細胞는 第一次 卵母細胞와 크기가 거의 비슷하여 구별하기 힘드나 核相에 의해 뚜렷이 구별된다고 하였다.

Clonorchis sinensis(肝디스토마)에서도 卵原細胞는 卵巢表層에 位置하고 卵母細胞로 分化함에 따라 中央部로 移動되고 卵原細胞와 一次卵母細胞는 核相에 따라 區分되었다.

Burton은 *H. medioplexus*에서 初期 卵母細胞는 細胞質의 粘度나 原形質膜 變異에 의하여 多變의이지만 主로 紡錘形으로 나타나며 完熟된 第一次卵母細胞는 橢圓形이라 報告하였다.

肝디스토마에서 成長發育하여 가는 第一次卵母細胞는 紡錘形이던 것이 점차 圓形으로 되어가며 卵巢의 中心部로 갈수록 거의 完熟된 第一次卵母細胞가 되는 것은 Burton의 報告와 같았다.

Burton은 *H. medioplexus*에서 第一次卵母細胞의 細胞質內에 電子密度가 높은 顆粒形의 物質이 나타나는데 이를 顆粒形 物質의 形態는 多樣하며 仁과 같은 染色性을 띠운다고 하였으며, Schellenberg(1961)는 *Fasciola hepatica*에서 이 細胞質內 特殊顆粒 物質을 卵黃物質이라 하였다. 또한 Chen(1937), Cable(1931)等도 第一次卵母細胞에서 特異한 顆粒物質이 있음을 밝혔으며, Yosufzai(1953)는 *F. hepatica*에서 細胞質內 顆粒들은 仁에서 起因되었다고 報告하였다.

그러나 肝디스토마의 卵母細胞에서는 特異한 顆粒物質은 찾아볼 수 없었으며 細胞膜 가까운 表層部位에 電子密度가 높은 顆粒만이 發見되었을 뿐이다.

康(1968)은 肝디스토마의 腸上皮細胞에서 蛋白質合成과 分泌過程의 活性 反應으로 膨脹된 粗面小胞體의 分泌狀 및 發達된 골지裝置를 報告한 바 있다.

Porter(1961)가 粗面小胞體와 골지體는 分泌蛋白質의 合成과 輸送에 關係한다고 報告한 事實을勘案할 때, 本 實驗에서 排卵前 卵母細胞에서 分裂結果로 크기 가 서로 다른 미토콘드리아가 比較的 많이 分布되어 있는 것과 粗面小胞體 內腔의 膨脹 및 골지裝置가 細胞의 한쪽 部位에 網狀으로 線球體形을 하여 그 속에 2~3個의 골지小胞를 만들고 있는 것으로 보아 細胞分裂의 活潑性과 蛋白質合成의 活潑性을 나타낸다고 思慮된다.

Burton은 *H. medioplexus*에서 完熟된 卵母細胞의 미토콘드리아는 特異하게 核周圍의 一定한 部位에 集團의으로 나타나며 모양은 大部分이 卵丹形이나 때로 伸張되어 있다고 하였다.

肝디스토마에서는 Burton이 *H. medioplexus*에서 觀察한 바와 마찬가지로 排卵後의 卵母細胞에서 크기가 비슷한 楕圓形의 미토콘드리아는 扁平囊狀인 粗面小胞體가 集團의으로 層板狀을 이루고 있는 反對쪽 細胞質內에 分布되어 있었다.

Nez와 Short(1957)는 吸蟲類의 *Schistosomatium douthitti*에서 卵母細胞가 排卵直後 精子의 侵入를 받아 卵形成腔內의 卵母細胞에서 精子를 발견할 수 있었다 하였으며, Burton은 *H. medioplexus*에서 精子가 受精囊에서는 非活動性이나 卵形成腔에서 메리스氏腺으로부터 分泌되는 물질을 받아活性를 띠워 卵母細胞內로 들어간다고 하였다. 또한 Guilford는 *H. eccentricus*의 卵母細胞는 子宮基部에 到達할 때까지는 減數分裂이 完成되며 精子가 卵母細胞內로 들어갈 때는 精子의 尾部는 消失되고 단지 頭部나 核部位만이 卵母細胞와 融合되어 卵母細胞內로 들어간後 卵母細胞는 分裂이 活潑해져 減數分裂을 하게 된다고 하였다. Rybika는 *D. caninum*에서 卵形成腔內의 卵母細胞 주위에는 많은 정자가 둘러싸고 있는 것을 발견할 수 있다고 하였으나, Short와 Damian(1967)은 *Dicyema aegira*는 第二極體가 생긴 後 즉 減數分裂을 완전히 마친 卵子에 精子가 들어 간다고 하였다.

肝디스토마에서는 載卵管을 通하여 受精囊과 連結되는 卵形成腔 開口部에서 第一次卵母細胞와 精子가 만나게 되며, Burton이 말한 바와 같이 精核이 卵核에 接近되면서 卵核은 二回의 減數分裂에 의하여 2개의 極體를 形成하고 卵前核이 생기나, Burton이 말한 바와는 다르게 精子의 頭部뿐만 아니라 雙軸의 中片도 第一次卵母細胞에 吸引되고 꼬리는 卵母細胞 밖에 남는다.

L.H. Colwin과 A.L. Colwin(1954)은 *Saccoglossus*:

kowalevskii에서 表層顆粒은 細胞膜 周圍에서 나타나며 排卵直後 細胞膜 周邊에 一列로 配列되어 漸次 그 數가 많아지나 受精後에는 파괴되어 점차 소실된다고 하였다.

肝디스토마에서도 精子의 侵入以前까지는 第一次 卵母細胞의 細胞膜周圍에 一列로 配列되어 있던 많은 表層顆粒은 精子의 侵入以後에는 漸次的으로 消失됨이 觀察되었다.

Guilford는 H. eccentricus에서 는 第一次 卵割이 不等하며 前娘細胞가 後娘細胞보다 크다고 하였으며 第二次卵割에 전 前娘細胞에서만 分裂狀이 나타나고 그 後의 卵割에서는 모든 細胞에서 分裂狀이 나타난다고 報告하였으나 肝디스토마에서는 等割을 하여 子宮基部에 到達한 卵은 이미 第四~十六細胞期의 卵割卵이 되어 있었다.

V. 要 約

卵巢上皮에서 發生한 卵原細胞는 成長發育하여 第一次卵母細胞를 形成하며, 排卵되어 卵形成腔 開口部에서 第一次卵母細胞는 精子의 侵入을 받은 後 二回의 減數分裂을 하여 두개의 極體를 形成하고 卵前核과 精前核이 融合하여 卵割을 始作한다.

細胞質의 變化 :

卵原細胞에서는 크기가 서로 비슷하던 미토콘드리아가 卵母細胞로 成長되어 長에 따라 自己增殖을 하여 第一次卵母細胞에서는 크기가 서로 다르고 複雑 많은 미토콘드리아가 나타난다. 扁平囊狀이던 小胞體는 卵母細胞로 成長하여 細胞質代謝가 活潑하여 長에 따라 胞狀囊의 小胞體로 變하여 排卵後 卵母細胞에서는 細胞質內一部位에 層板狀을 이룬다.

골지裝置는 成熟된 卵母細胞에서 더욱 뚜렷이 나타나며 網狀의 糸球體形成을 하고 그 內에 몇 個의 골지小胞를 만들고 있다.

表層顆粒은 受精前 第一次卵母細胞에서 매우 增加되어 있으나 受精後는 漸次破壞되어 消失된다.

染色質은 卵原細胞에서 密度가 높고 網工을 이루고 있는 異質染色質과 密度가 낮은 少量의 真正染色質로 되어 있으며 排卵前 卵母細胞에서는 異質染色質이 減退하고 真正染色質이 많아진다. 排卵後 卵母細胞에서는 豐富한 真正染色質을 다시 가진다.

仁은 卵原細胞에서 電子密度가 높은 橢圓形이며 排卵前 卵母細胞에서는 消失되었다가 排卵後 卵母細胞에서는 다시 橢圓形의 仁이 觀察된다.

REFERENCES

- Bjoerkman, N. & W. Thorsell, 1962. The Fine Morphology of The Mitochondria from parenchymal Cell in The Liver Fluke (*Fasciola hepatica L.*) Exp. Cell Res., 27 : 342-346.
- Burton, Paul R. 1960. Gametogenesis and Fertilization in The Frog Lung Fluke, *Haematoloechus medioplexus*. J. parasit., 1967. Fine Structure of The Reproductive System of A Frog Lung Fluke I. Mehlis' Gland and Associated Ducts. J. parasit. 53 : 540-555.
1967. Fine Structure of The Reproductive System of A Frog Lung Fluke II. Penetratopn of The Ovum by A Spermatozoon. J. parasit. 53 : 994-999.
- Cable, R.M. 1931, Studies on The Germ-cell Cycle of *Cryptocotyle lingua*, I. Gametogenesis in The Adult. Ibid., 74 : 564-587.
- Chen, P. 1937. The Germ Cell Cycle in The Trematode, *aragonimus kellicotti*. Trans. Am. Micr. Soc., 56 : 208-236.
- Cho, M.J., K.M. Cho & C.T. Soh, 1966. The Use of Hetol on The Infection of *Clonorchis simensis*. Korean J. of parasit., 4(1) : 21-31.
- Colwin, L.H. & A.L. Colwin, 1954. Fertilization Changes in The Membranes and Cortical Granular Layer of The Egg of *Saccoglossus kowalevskii*. J. Morph., 95 : 1-45.
- Dingler, M. 1910. Ueber Die Spermatogenese Des *Dicrocoelium lanceatum Stil. et Hass.* (*Distomum lanceolatum*). Arch. Zellforsch., 4 : 672-712.
- Goldschmidt, R., 1908. Ueber Das Verhalten Des Chromatins bei Der Eireifung und Befruchtung Des *Dicrocoelium lanceatum Stil. et Hass.* (*Distomum lanceolatum*). Arch. Zellforsch., 1 : 232-244.
- Guilford, Harry G., 1961. Gametogenesis, Egg-capsule Formation, and Early Miracidial Development in The Digenetic Trematode *Halipegus eccentricus Thomas*. J. par. 47 : 757-764.
- Joo, Jung Kyun, 1961. Histochemical Study on *Fasciola hepatica*; S.N.U. Med. J., 2(3) : 31-44.
- Joo, Jung Kyun, 1962. Histochemical Study on *Fasciola hepatica*. S.N.U. Med. J., 3(2) : 55-58.
- 康鱗瑞 : 1968. *Clorchis sinensis*(肝디스토마) 消化管

- 의 微細構造에 關한 電子顯微鏡的 研究(연세의대
논문집 : 197-109.
- Lomiya Y.T., 1964. Biology of *Clonorchis sinensis*.
progress of Med. parasit. in J., 1 : 553-580.
- 李周植 : 1956. *Clonorchis sinensis*에 關한 生物學的
研究 서울大論文集 4集 91
- Luft, J.H., 1961 Improvements in Epoxy Resin Em-
bedding Methods. J. Biophys. Biochem Cytol., 9
: 409-414.
- Nez, M.M. & R.B. Short, 1957. Gametogenesis in
Schistosomatium Douthitti(Cort) (Schistosomatid-
ae: Trematoda). J. parasit. 43 : 167-77.
- 白景基 · 李思鎬 · 崔春根 : 1969. 肝디스토마 精子完
成의 電子顯微鏡的 研究 韓國電子顯微鏡學會誌 1
(1) : 35-43.
- Porter, K.R., 1961. The Endoplasmic Reticulum: some
Current Interpretation of Its Forms and Functions.
Biological Structure and Function. Academ. Press
- N.Y.P., 1 : 127-155.
- Rybika, Krystina. 1964. Gametogenesis and Embry-
onic Development in *Dipylidium caninum*. Exp.
par., 15 : 293-313.
- Short, B. Robert & Raymond T. Damian. 1967.
Oogenesis, Fertilization, And First Cleavage of
Dicyema aegira McConnaughey and Kritzler. J.
par., 53 : 186-195.
- Schellenberg, A., 1961. Ovogenese, Eireifung, und
Befruchtung von *Fasciola hepatica L.* Arch. Zell-
forsch., 6 : 443-482.
- Ujiie, N.m 1963. On The process of Egg-shell For-
mation of *Clonorchis sinensis*, A liver Fluke. J.
Med. Assoc. Formosa 35 : 1894-1896.
- Yosufzai, H.K., 1953. Cytological Studies on The
Oogenesis of *Fasciola hepatica*. Ibid., 55 : 167-
176.

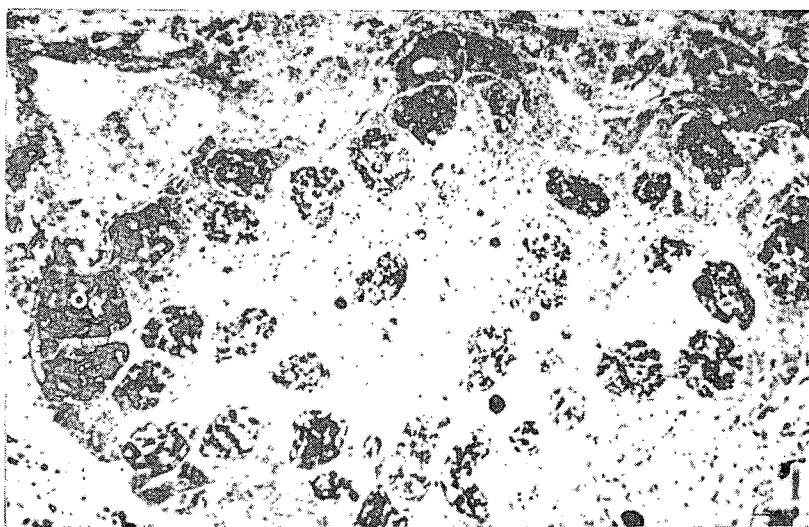


Fig 1. 卵巢内 卵原細胞와 第一次卵母細胞 卵巢上皮細胞(Oe)에서 卵原細胞(Og)가 생겨 卵巢 中央位部로 가며 第一次卵母細胞(Oc)로 成長된다. ($\times 3,000$)

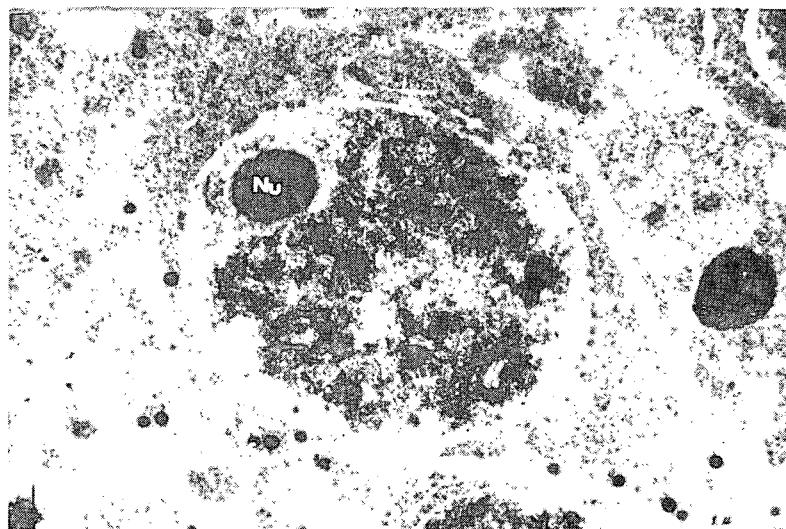


Fig 2. 卵原細胞의 微細構造

卵原細胞에 楕圓形의 仁(Nu)을 가진 核(N) 細胞質에는 粗面小胞體(Er.) 미토콘드리아(M), 골지체(G)가 있으며 二重의 核膜(Nm)에는 核膜孔(Np)이 있다. 原形質膜(Pm)도 二重이며 그周邊에는 表層顆粒(C)이 있다. ($\times 10,000$)

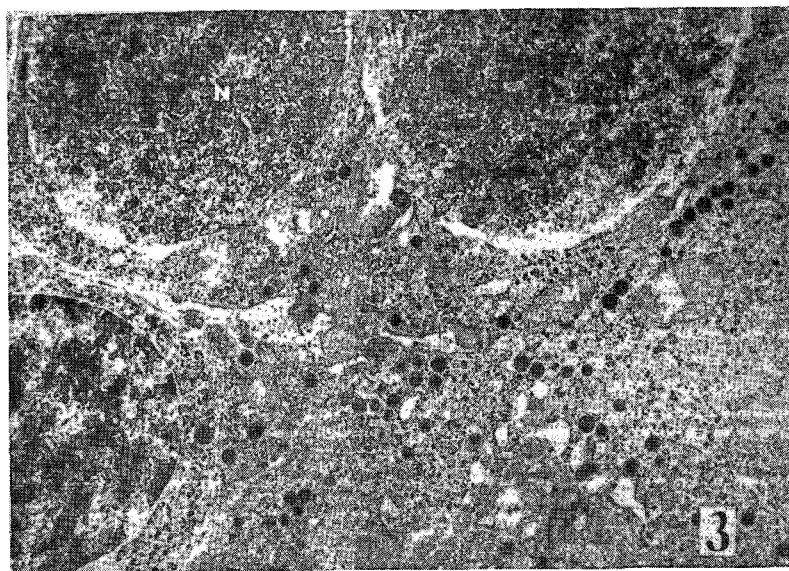


Fig. 3. 排卵前 第一次卵母細胞

圓形에 가까운 第一次卵母細胞의 核(N)內에는 仁이 없고 크기가 서로 다른 많은 미토콘드리아(M), 膨脹된 粗面小胞體(ER)가 있고 細胞膜 周邊에는 多量의 表層顆粒이 配列되어 있다. ($\times 10,000$)

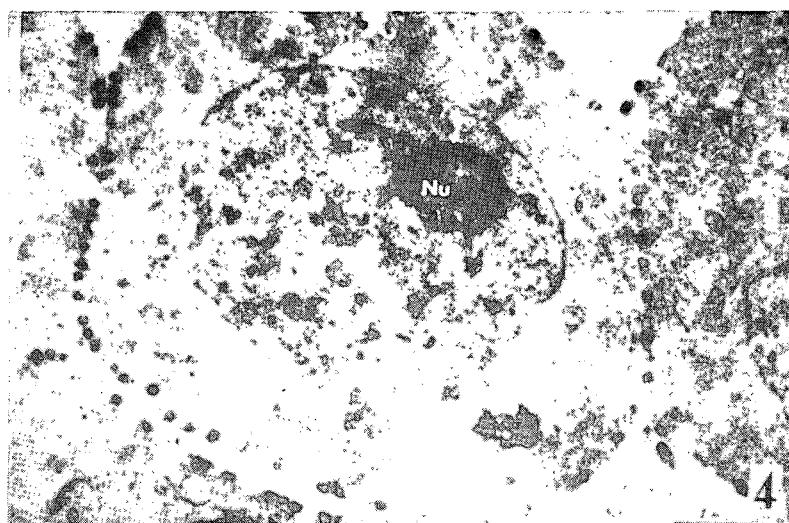


Fig. 4. 排卵直後の 第一次卵母細胞

粗面小胞體(ER)가 한쪽에 集團的으로 나타나며 그 反對部位에 미토콘드리아(M)가 集團的으로 나타났다. 表層顆粒(C)은 細胞膜直下에 있고 細胞質一部位에는 網狀으로 球體形을 한 끌지裝置가 그 内에 끌지 小體를 갖고 있다. ($\times 11,500$)

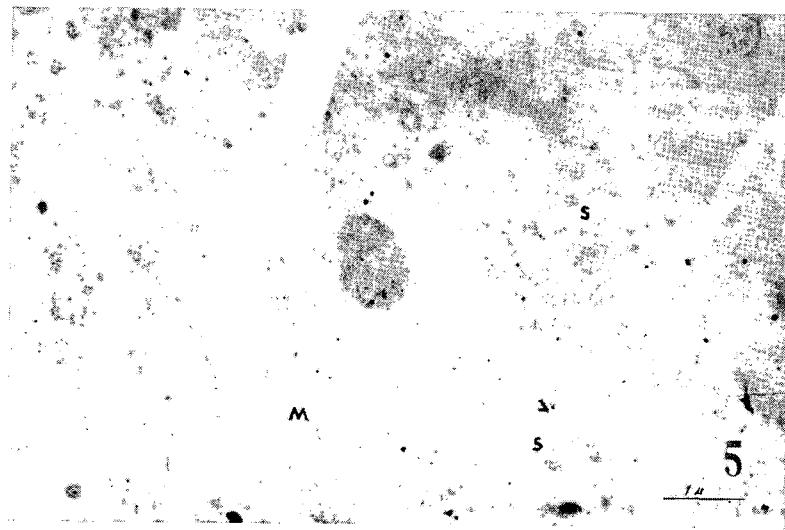


Fig 5. 精子侵入後의 第一次卵母細胞

精子(S)의 頭部와 雙軸의 中片이 第一次卵母細胞內에 있으며 表層顆粒은 消失되어 가고 있다. ($\times 16,000$)

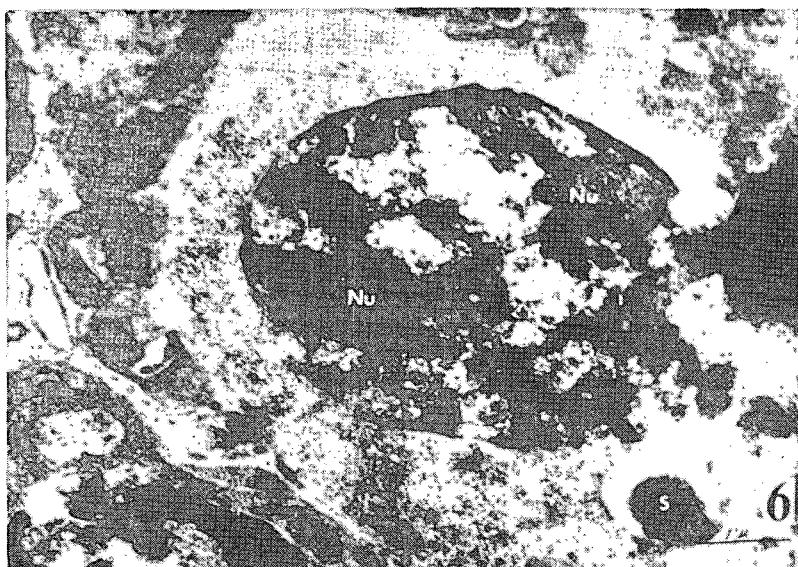


Fig 6. 精子侵入後의 第一次卵母細胞

精子(S)의 侵入을 받은 卵母細胞內에는 表層顆粒이 消失되었고 核內에는 二個의 仁 (Nu)이 있다. ($\times 22,500$)

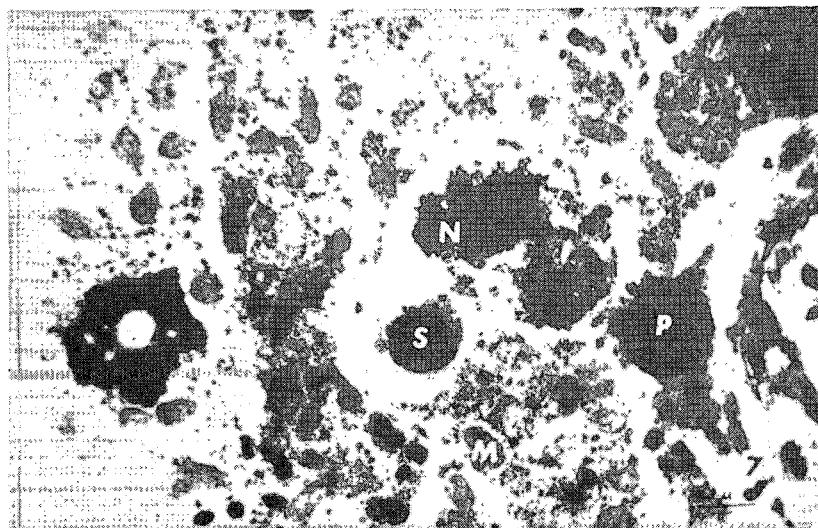


Fig 7. 卵前核과 精前核의 融合

卵前核과 精前核이 融合되고 있는 瞬間 卵細胞는 減數分裂을 하여 極體(P)를 形成하였다. ($\times 7,500$)



Fig 8 卵割期의 卵

卵殼(Es)이 形成되었고 그 內에 卵割期에 들어간 卵과 周圍에 卵黃細胞(V)가 있다. ($\times 18,000$)