

肝吸蟲에 대한 殺蟲性 物質에 관한 研究

IV. 이스라엘 잉어(香魚) 粘液으로부터 殺蟲性 物質 分劃

全北大學校 獸醫學科

李宰求 · 金平吉 · 白秉杰 · 李相福

忠南大學校 藥學科

安 丙 浚

緒 論

이스라엘로부터 1973년에 導入된 이스라엘 잉어(*Cyprinus carpio nudus*, 以下 香魚로 略함)는 現在 여러 養殖場에서 人工養殖되고 있으며, 濟林水産 昭陽湖 養殖場에서만도 1년에 무려 200餘톤을 生産하여 全國 各地의 飲食店 등에 供給하고 있어 국민들이 즐겨 生食하고 있는 實情이다.

이러한 時點에서 著者 등은 香魚에 대한 肝吸蟲 第二中間宿主로서의 役割與否를 究明하기 위한 一環으로 香魚表皮의 組織學的 構造를 관찰하고(Rhee *et al.*, 1982) 肝吸蟲 有尾幼蟲의 香魚에 대한 感染實驗을 遂行하여(李 등, 1983) 報告하였는데 이번에는 香魚 體表面 粘液으로부터 肝吸蟲에 대한 殺蟲性 物質을 分劃하였기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 殺蟲性 物質 分劃

1981年 7, 8月 두차례에 걸쳐 濟林水産 昭陽湖 養殖場으로부터 15kg의 길이 25cm 内外, 體重 500g 程度의 香魚(*Cyprinus carpio nudus*)를 분양받아 Fig. 1과 같은 方法으로 處理하여 肝吸蟲에 대한 殺蟲性 物質을 分劃하였다. 즉, 香魚 表皮를 室溫에서 24時間 에테르抽出, 減壓蒸發, 濃縮시킨 다음 그 중 50g을 石油에테르(30%)와 클로로포름(70%)의 처음 混合溶媒를 使用하여 silica gel column chromatography하여 殺蟲性 陰性の 黃色物質을 溶離 除去시킨 다음 兩번째 溶媒인 메탄올을 利用하여 그 컬럼 上段에 殘留하고 있는 物質을 溶離시켜 灰白色 溶離物을 얻어 減壓蒸發, 3.5g의 殺蟲性 陽性 物質을 얻었다. 이에 石油에테르 10ml를 注加, 5°C에서 5日間 放置하여 灰白色 沈澱物(殺蟲性 陰性)과 帶綠黃色 上清液(殺蟲性 陽性)으로 區分하였다.

이 上清液을 減壓蒸發시켜 아세톤(10%)과 벤젠(90%)의 混合溶媒를 使用, silica gel thin layer chromatography하여 7個의 斑點으로 分劃하였다. 그리고, 이 7個의 斑點중에서 殺蟲性이 가장 強力한 Rf. 0.225값의 斑點物質을 集量하기 위하여 처음 300ml의 벤젠을 使用, silica gel column chromatography하여 殺蟲性 陰性 物質을 溶離 除去시킨 다음 벤젠(90%)과 아세톤(10%)의 두번째 混合溶媒를 使用, 溶離시켜 작은 試驗管에 70段階의 各 溶離物을 3ml씩 받았다. 이들을 silica gel thin layer chromatography하여 殺蟲性이 가장 強力한 Rf. 0.225값에 相當한 無色 斑點物質을 確認, 集量하였다.

2. 肝吸蟲의 有尾幼蟲, 脫囊幼蟲 및 成蟲 材料

1981年 8월에 金海湖水에서 採集한 왜우렁(*Parafossarulus manchouricus*)으로부터 李 등(1979)의 方法을 適用하여 有尾幼蟲, 역시 같은 時期와 場所에서 採集한 참붕어(*Pseudorasbora parva*)로부터 分離시킨 被囊幼蟲을 處理하여 얻은 脫囊幼蟲 그리고 被囊幼蟲을 도끼에게 投與하여 얻은 成蟲(李 등, 1979)의 方法을 適用하여 얻어 殺蟲試驗에 供하였다.

3. 肝吸蟲에 대한 殺蟲試驗

香魚 體表面 粘液의 에테르 抽出物을 Fig. 1과 같이 處理하여 얻은 殺蟲性 陽性 帶綠黃色 上清液을 silica gel thin layer chromatography하여 얻은 各 分劃物質을 李 등(1980a)의 方法으로 有尾幼蟲, 脫囊幼蟲 및 成蟲에 대한 殺蟲效果를 관찰하였다.

肝吸蟲의 有尾幼蟲, 脫囊幼蟲 및 成蟲에 대한 死滅與否 判定은 李 등(1979)의 方法에 準하였다.

4. 殺蟲性 物質의 季節的 變化

每月 1kg씩의 香魚를 Fig. 1과 같은 方法으로 處理하여 Table 4에 表示한 메탄올溶分을 各各 얻어 이에 10ml의 石油에테르를 加하여 分劃한 0.5ml의 帶綠黃色 上清液을 시계침지에 取하여 溶媒를 蒸發시킨 다음 李 등(1980a)의 方法으로 肝吸蟲의 有尾幼蟲, 脫囊幼蟲 그리고 成蟲에 대한 殺蟲性을 觀察하였으므로, 그 上

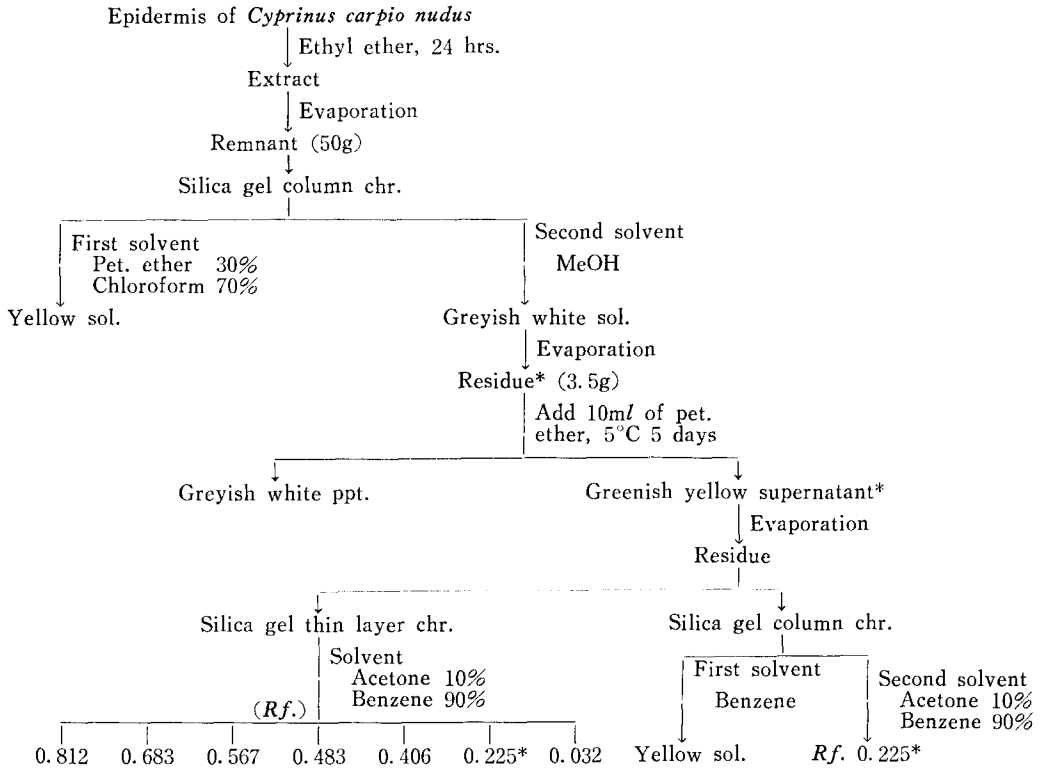


Fig. 1. Fractionation method of wormicidal substance on *Clonorchis sinensis* from *Cyprinus carpio nudus*.
* : Wormicidal activity

清液을 減壓蒸發시켜 벤젠 : 아세톤/90 : 10의 混合溶媒를 使用하여 silica gel thin layer chromatography하여 各 分割物質의 Rf. 값을 求하였다.

5. 香魚와 붕어의 殺蟲性 物質의 殺蟲性 比較

1981年 8월에 香魚와 全州 地域에서 採集한 붕어 (*Carassius carassius*)를 各 各 1kg씩 取하여 香魚는 Fig. 1과 같은 方法으로, 붕어는 李 등(1979)의 方法으로 處理하여 各 各 第6 斑點인 Rf. 0.225 값과 第1 斑點인 Rf. 0.952값의 分割物質을 얻어 李 등(1980a)의 方法을 適用하여 肝吸蟲에 對한 殺蟲效果를 관찰하였다.

結 果

1. 肝吸蟲에 對한 殺蟲試驗

各 分割物質의 右尾幼蟲, 脫囊幼蟲 및 成蟲에 對한 殺蟲性은 Table 1, 2, 3에 表示한 바와 같이 各 分割物質을 *in vitro*에서 右尾幼蟲, 脫囊幼蟲 및 成蟲에 各 各 直接 接觸시켜 經時的으로 觀察한 所見은 Rf. 0.812~0.032값의 7個의 分割物質중에서 第6 斑點인 Rf. 0.225값의 物質이 다른 分割物質에 比較하여 殺蟲性이 強力하였다.

즉, 이 物質을 右尾幼蟲에 直接 接觸시킨 直後에 高

Table 1. Wormicidal effects of ether extract of mucus from *Cyprinus carpio nudus* on the cercariae of *Clonorchis sinensis*

Status of cercariae	Fractions						
	Thin layer chromatography (Rf.)						
	0.812	0.683	0.567	0.483	0.406	0.225	0.032
State of convulsion	+	+	+	+	+	+	+
First appearance of tail separating	20'	21'	18'	18'	10'	1''	3'
First appearance of the death	25'	25'	23'	23'	20'	10''	7'
Death of all the worm	45'	45'	42'	43'	31'	5'	30'

Remark; ', Minutes ''; Seconds +; Slight ++; Moderate +++; Severe

Table 2. Wormicidal effects of ether extract of mucus from *Cyprinus carpio nudus* on the excysted metacercariae of *Clonorchis sinensis*

Status of metacercariae	Fractions						
	Thin layer chromatography (Rf.)						
	0.812	0.683	0.567	0.483	0.406	0.225	0.032
Duration of normal movement	40'	35'	30'	30'	20'	2'	17'
First appearance of body relaxation	81'	56'	50'	49'	37'	4'	29'
Death of all the worm	100'	90'	80'	80'	60'	12'	40'
Remark; ' ; Minutes							

Table 3. Wormicidal effects of ether extract of mucus from *Cyprinus carpio nudus* on the adults of *Clonorchis sinensis*

Status of adults	Fractions						
	Thin layer chromatography (Rf.)						
	0.812	0.683	0.567	0.483	0.406	0.225	0.032
Regurgitation of intestinal contents	—	—	—	—	—	2/3*	—
First appearance of body relaxation	153'	151'	130'	120'	73'	45'	60'
Death of all the worm	510'	300'	330'	280'	210'	80'	175'
Remark; —; Negative ' ; Minutes *; Number of worms discharging intestinal contents at death							

도의 痙攣을 일으키며 1秒부터 尾部가 體部로부터 分離되어 10秒에 死滅하기 시작하며, 2분에 모든 幼蟲의 尾部가 分離되어 5분에는 모두 死滅하였다.

脫囊幼蟲에 이 物質을 直接 接觸시킨 다음 2분까지는 正常的인 諸運動을 관찰할 수 있으나 그 후부터는 次第적 底部에 口吸盤을 密着시킨 體 痙攣을 일으키며 微弱한 收縮運動을 하다가 4분에는 蟲體가 弛緩되기 시작하였다. 그리고, 6분에는 거의 運動性이 消失된 體 蟲體는 高度로 收縮되어 12분에는 모든 蟲體가 死滅, 變性하기 시작하였다.

그리고, 이 物質을 成蟲에 直接 接觸시킨 다음 30분부터 주로 吸盤의 伸縮에 의한 波狀運動이 微弱해지기 시작하여 45분에는 蟲體가 弛緩되기에 이르러 80분에는 모든 成蟲이 死滅하였으며, 특히 모든 成蟲의 2/3가 死滅할 때 腸內容物이 吐出되었다.

對照에 있어서 有尾 및 脫囊幼蟲은 24時間以上, 成蟲은 72時間 以上 生存하였으며 蟲體의 諸運動은 李 등(1979)이 관찰한 所見과 類似하였다.

2. 殺蟲性 物質의 季節的 變化

香魚의 體表面 粘液으로부터 分割한 帶綠黃色 上清

Table 4. Seasonal variation of the wormicidal substances from mucus of *Cyprinus carpio nudus* on *Clonorchis sinensis*

Month	Water temp. (°C)	Ether extracts (g)	Soluble substances in MeOH (g)	Time for killing		
				Cercaria	Excysted metacercaria	Adult
January	7.5	12.0	0.8	9'	54'	150'
February	5.0	9.4	0.6	10'	51'	160'
March	6.0	11.2	0.7	11'	53'	190'
April	11.0	24.4	2.2	12'	47'	140'
May	15.0	28.3	4.0	9'	52'	145'
June	24.0	34.0	4.3	10'	45'	140'
July	28.0	32.5	4.1	12'	42'	137'
August	28.0	30.7	3.9	13'	50'	160'
September	25.0	23.5	3.2	11'	47'	155'
October	18.5	15.4	1.8	10'	55'	165'
November	15.0	13.7	1.2	12'	46'	147'
December	10.0	12.8	1.0	11'	48'	170'

Remark; ' ; Minutes

Table 5. Seasonal changes of *Rf.* value of spots on the TLC of the wormicidal substances from mucus of *Cyprinus carpio nudus*

Month	Thin layer chromatography (<i>Rf.</i>)							
	Spots	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th*	7th
January		0.806	0.690	0.574	0.490	0.413	0.258	0.045
February		0.800	0.683	0.567	0.483	0.406	0.245	0.032
March		0.794	0.677	0.574	0.477	0.400	0.212	0.026
April		0.806	0.683	0.567	0.490	0.413	0.219	0.032
May		0.794	0.677	0.567	0.490	0.400	0.212	0.026
June		0.806	0.677	0.567	0.477	0.400	0.245	0.026
July		0.812	0.683	0.567	0.483	0.406	0.225	0.032
August		0.806	0.677	0.567	0.477	0.400	0.253	0.045
September		0.806	0.690	0.574	0.490	0.413	0.264	0.045
October		0.800	0.683	0.574	0.483	0.413	0.251	0.045
November		0.806	0.690	0.574	0.490	0.413	0.270	0.012
December		0.800	0.690	0.574	0.490	0.400	0.253	0.045

Remark; *, Wormicidal activity

Table 6. Comparison between the time for wormicide of the sixth fraction in *Cyprinus carpio nudus* and the first fraction in *Carassius carassius* on the *Clonorchis sinensis*

Fraction from	Time for killing		
	Cercaria	Excysted metacercaria	Adult
<i>Cyprinus carpio nudus</i>	5'	11'	80'
<i>Carassius carassius</i>	40'	90'	460'

Remark; ', Minutes

액의 殺蟲性에 대한 季節的 變化는 Table 4에 表示한 바와 같이 體表面 粘液의 에테르抽出物과 메탄올溶分の 量이 모두 다른 季節에 比較하여 4~9月間이 월등하게 많았는데도 불구하고 殺蟲性에서는 거의 季節的 變化를 認定할 수 없었다.

그리고, 帶綠黃色 上清液을 thin layer chromatography하여 얻은 各 分割物質의 *Rf.* 값의 季節的 變化도 Table 5에 表示한 바와 같이 거의 認定할 수 없다.

3. 香魚와 붕어의 殺蟲性 物質의 比較

붕어와 香魚 모두 다른 分割物質에 比較하여 殺蟲性이 가장 強力하였던 붕어 第1斑點과 香魚 第6斑點의 肝吸蟲에 대한 殺蟲效果를 比較한 結果는 Table 6에 表示한 바와 같이 香魚쪽이 붕어보다 鈍하게 強力하였다.

考 察

同一水系에 棲息하고 있는 淡水魚類라 하더라도 肝吸蟲의 第二中間宿主로서 適合한 것과 그렇지 않은 것으로 大別할 수 있으며, 이의 機轉을 解明하기 위한

調査 研究은 田(1964)의 最初の 研究 報告 以來 最近에 이르러 활발하게 進行되고 있다(李 등, 1979, 1980 ab).

著者 등은 國民들이 즐겨 生食하고 있는 香魚에 대한 肝吸蟲 第二中間宿主로서의 役割 與否를 叫明하기 위한 一環으로 前報(Rhee et al., 1982; 李 등, 1983)에 이어 그 體表面 粘液으로부터 肝吸蟲에 대한 殺蟲性 物質을 分割하였다.

前報(Rhee et al., 1982; 李 등, 1983)에서는 香魚의 表皮를 組織學的으로 檢索하여 肝吸蟲 殺蟲과 관계가 있는 것이 아닌가 推測되는 棍棒狀細胞가 많이 存在한다는 事實을 밝히었을 뿐만 아니라 立體顯(微鏡下, 비이커 및 室內水槽內에서의 人工感染試驗과 金海湖水에서의 自然感染試驗 등으로 肝吸蟲의 有尾幼蟲을 香魚稚魚에의 遭遇를 試圖하는 各種 感染實驗을 遂行한 바 비이커內에서의 感染試驗에서만 極히 一部 有尾幼蟲이 魚體內로 侵入하지만 그 大部分이 被囊하지 않고 死滅되며 被囊한 極少數도 48時間 以內에 完全히 死滅하였다고 報告하였다. 이러한 結果들로 미루어 보아 香魚는 肝吸蟲의 第二中間宿主로서 適合하지 않다고 생각할 수 있는데 本 實驗에서 香魚 體表面 粘液으로부터 지금까지 分割한 어느 淡水魚類 體表面 粘液에서도 보다 強力한 殺蟲性 物質을 分割함으로써 前報(李 등, 1983)의 實驗結果를 더욱 더 堅實하게 뒷받침해 주고 있는 셈이다.

즉, *in vitro*에서 試圖한 肝吸蟲에 대한 殺蟲效果 判定에 使用된 殺蟲性 分割物質의 濃도가 各各 다르기 때문에 斷言은 할 수 없겠지만 前報에서 李 등(1980a)은 붕어 14分, 잉어 28分, 메기 30分, 금붕어 26分 그리고 가물치 35분에 모든 有尾幼蟲이 死滅된다고 하였는데 本 實驗結果에서는 모든 有尾幼蟲이 死滅하는데

는 5분에 不過하였으며 脫囊幼蟲과 成蟲에 대한 殺蟲效果도 同一한 結果이었다. 그리고, 分割方法은 다르겠지만 같은 條件으로 處理하여 香魚와 붕어의 殺蟲性物質의 強度를 比較 檢討한 本 實驗結果도 모든 有尾幼蟲의 死滅에 所要되는 時間이 5분과 40분이었으며, 脫囊幼蟲과 成蟲에 대한 殺蟲效果도 역시 同一하였다. 이와 같은 結果들은 香魚 體表面 粘液內에는 다른 어는 淡水魚類보다 많은 量의 (또는 強力한) 殺蟲性物質이 含有되어 있거나 그렇지 않으면 붕어를 비롯한 그 밖에 淡水魚類의 體表面 粘液 에테르抽出物은 單 1회의 thin layer chromatography操作을 하였는데 만하여 香魚의 體表面 粘液 에테르抽出物은 column chromatography와 分割 등 여러 단계를 거친 다음 thin layer chromatography하였기 때문에 이러한 處理過程에서 不純物이 除去되어 보다 純粹하게 殺蟲性物質이 分離되었다고 생각할 수 있다.

Von Frisch(1941)와 Pfeiffer(1963)는 많은 數의 魚類는 주위환경에서 오는 위협으로부터 自身을 保護하기 위하여 體表面에서 警戒物質(alarm substance)을 分泌하며, 이 物質의 量은 겨울철보다도 여름철에 많다고 하였다. 그리고, 李 등(1980b)은 붕어 體表面 粘液內에 含有된 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質은 5~9月間인 여름철에 많이 分泌되며, 그 粘液의 에테르抽出物을 thin layer chromatography한 各 斑點物質중에서 5~9月間의 最上端 第 1 斑點인 Rf. 0.924~0.965값의 斑點에만 殺蟲性物質이 含有되어 있으며 그 밖의 달은 最上端 斑點의 Rf. 값이 0.612~0.752밖에 이르지 않는다고 報告하였다.

그러나, 本 實驗結果는 體表面 粘液의 에테르抽出物과 메탄올溶分量은 모두 4~9月間인 여름철에 월등하게 많았는데도 불구하고 肝吸蟲에 대한 殺蟲性에 있어서는 季節의 變化를 거의 認定할 수 없었으므로 앞으로 이의 機轉을 解明하기 위한 調查研究가 遂行되어야 할 것으로 생각된다.

結論의으로, 香魚에 대한 肝吸蟲의 第二中間宿主로서의 不適合性을 闡明하기 위해서는 앞으로 殺蟲性物質에 대한 여러가지 機器分析和 物理恒數 등을 測定 比較 檢討하여 그 構造가 밝혀지, 나아가서 그 物質을 人工合成하여 殺蟲效果를 檢討하여야 할 것으로 생각된다.

結 論

香魚에 대한 肝吸蟲의 第二中間宿主로서의 役割을 闡明하기 위한 一環으로 感染試驗에 이어 이번에는 그 體表面 粘液의 에테르抽出物을 Fig. 1과 같이

處理하여 7個 斑點으로 分割하였다. 이들 物質을 肝吸蟲의 有尾幼蟲, 脫囊幼蟲 및 成蟲에 *in vitro*에서 直接 接觸시켜 殺蟲性 試驗을 遂行하여 얻은 成績을 要約하면 다음과 같다.

帶綠黃色 上清液을 thin layer chromatography하여 얻은 7個의 分割物質 중에서 第 6 斑點인 Rf. 0.225값의 物質이 다른 것들에 比較하여 殺蟲性이 월등하게 強力하였다. 그리고, 이들 分割物質의 Rf. 값과 殺蟲性은 季節의으로 變化하지 않았다.

香魚와 붕어의 體表面 粘液內에 含有되어 있는 殺蟲性物質을 比較 檢討한 前 前者가 後者보다 殺蟲性이 強力하였다.

前報(Rhee *et al.*, 1982; 李 등, 1983)와 以上の 實驗結果로 미루어 香魚는 肝吸蟲의 第二中間宿主로서 適合하지 않다고 結論지었다.

參 考 文 獻

- 田世圭(1964) 肝吸蟲의 感染經路에 관한 實驗의 研究. 第三篇 各種 魚類 體表面 粘液性物質의 肝吸蟲 幼蟲에 대한 殺蟲效力. 寄生蟲學잡지, 2(3):12-22.
- Pfeiffer, W. (1963) Alarm substance. *Experientia*, 19(3):113-123.
- 李宰求, 白秉杰, 安丙浚, 朴永竣(1979) 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質에 관한 研究 I. 붕어 粘液으로부터 殺蟲性物質 抽出試驗. 寄生蟲學잡지, 17(2):121-126.
- 李宰求, 白秉杰, 安丙浚, 朴永竣(1980a) 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質에 관한 研究 II. 各種 淡水魚類로부터 殺蟲性物質 抽出試驗. 寄生蟲學잡지, 18(1):98-104.
- 李宰求, 白秉杰, 安丙浚, 朴永竣(1980b) 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質에 관한 研究 III. 붕어 粘液으로부터 抽出한 殺蟲性物質의 季節의 變化. 寄生蟲學잡지, 18(2):179-184.
- Rhee, J.K., Kim, P.G., Baek, B.K., Lee, S.B. and Ahn, B.Z. (1982) Clavate cells of epidermis in *Cyprinus carpio nudus* with reference to its defence activity to *Clonorchis sinensis*. *Korean J. Parasit.*, 20(2):201-203.
- 李宰求, 金平吉, 白秉杰, 李相福, 安丙浚(1983) 肝吸蟲의 이스라엘잉어(香魚)에 대한 感染實驗. 寄生蟲學잡지, 21(1):11-19.
- Von Frisch, K. (1941) Die Bedeutung des Geruchsinnens im Leben der Fische. *Naturwissenschaften*, 29:321-334.

=Abstract=

The Wormicidal Substance of Fresh Water Fishes on *Clonorchis sinensis*

IV. Preliminary research on the wormicidal substance from mucus of *Cyprinus carpio nudus*

Jae Ku Rhee, Pyung Gil Kim, Byeong Kirl Baek and Sang Bork Lee

Department of Veterinary Medicine, Jeonbug National University

Byung Zun Ahn

Department of Pharmacy, Chungnam National University

As a series of studies on the suitability as a second intermediate host of *Clonorchis sinensis*, the wormicidal effects of mucus from epidermis of *Cyprinus carpio nudus* were observed. The results obtained were summarized as follows :

On the silica gel thin layer chromatography with the greenish yellow supernatant in acetone: benzene/10:90 as carrier, seven spots were observed in iodine chamber. The spot of *Rf.* 0.225 value among them disclosed the strongest wormicidal effect on the cercaria, the excysted metacercaria, and the adult of *C. sinensis*. Meanwhile, no seasonal variations were found in *Rf.* values and effect of the wormicidal fractions. The wormicidal materials in epidermal mucus of *C. carpio nudus* and *Carassius carassius* were compared in their effect, and the former was more effective killing substance than the latter.

It seemed that *C. carpio nudus* could not be proper intermediate host of *C. sinensis* according to results of the present study, in addition to our previous observation results.