

肝吸蟲의 微細構造에 關한 研究*

V. 精子의 微細構造

順天鄉大學 理學部 生物學科

鄭 啓 憲

高麗大學校 醫科大學 寄生蟲學教室 및 熱帶風土病研究所

林 漢 鍾

緒 論

吸蟲類의 精子形成過程 또는 成熟精子의 形態에 關해서는 Nez and Short(1957), Burton(1960, 1967, 1968, & 1972), Gresson and Perry(1961), Hendelberg(1962 & 1969), Gresson(1965), Sato *et al.* (1967), Grant *et al.* (1976), Kitajima *et al.* (1976) 및 Fujino *et al.* (1977) 등에 의하여 보고된 바 있으며, 특히 Jeong *et al.* (1976)은 본 연구에서 취급한 肝吸蟲 (*Clonorchis sinensis*)을 대상으로 精子形成過程을 면밀히 보고한 바 있다. 본 연구는 投過電子顯微鏡을 주로 이용하여 肝吸蟲 成熟精子의 微細構造를 밝히기 위하여 수행되었다.

材料 및 方法

1. 材 料

感染후 6個月된 肝吸蟲(*Clonorchis sinensis*)의 成蟲을 사용하였다. 材料를 구하기 위하여 洛東江 上流에서 捕獲한 참붕어(*Pseudorasbora parva*)의 筋肉을 人工胃液으로 소화시켰으며, 遊離되어 나온 肝吸蟲의 被囊幼蟲 중에서 光學顯微鏡을 이용하여 新鮮한 幼蟲들을 選別하여 家兔에는 頭當 30마리씩, 白鼠에는 頭當 30마리씩 經口의으로 感染시켰다.

2. 方 法

光學顯微鏡의 觀察을 위하여 肝吸蟲에 人工感染된 家兔 및 白鼠의 肝膽道로부터 採集된 成蟲에서 受精囊을 분리한 후 glass slide 위에서 열어 精子를 塗抹하고 neutral red 및 janus green B로 生體染色하는 한편 塗抹된 精子를 乾燥시키고 2% glutaraldehyde blue로 固定하여 1% azur-eosin-methylene으로 染色하였다.

電子顯微鏡의 觀察에 있어서는 採集된 肝吸蟲들을

2% glutaraldehyde(pH 7.4)와 1% osmium tetroxide에 固定하여 acetone 脫水 후 Epon 812에 包埋하였다. Thin section은 uranyl acetate와 lead citrate로 二重染色하였고 JEM-100C×II型 投過電子顯微鏡(TEM)으로 觀察하였다.

結 果

光學顯微鏡 및 位相差顯微鏡으로 관찰한 바에 의하면 肝吸蟲 成熟精子의 길이는 정확히 측정할 수는 없었으나 대략 170 μ m 정도이고 전체적으로는 약간 螺旋狀의 모습을 하고 있었다. 頭部는 약간 두툼하고 細長하나 尾部와 뚜렷한 구분은 잘 되지 않았다.

電子顯微鏡(TEM)으로 관찰한 바에 의하면 頭部는 尾部보다 현저히 그 直徑이 컸으며 精子形成過程의 後期 즉 變態過程 중에 頭部의 後方에 위치하는 中心體의 양 옆에 각각 하나의 rootlet이 發生하여 이들로부터 하나씩의 鞭毛가 突出되어 나와 결국 한 쌍의 鞭毛를 가지게 되는데 이들은 頭部의 後方으로 伸長되는 細胞質과 融合하여 尾部를 형성하였다. 核은 頭部로부터 시작하여 두 鞭毛를 따라 길게 螺旋狀을 이루며 존재하고 있었다(Fig. 2). Acrosome은 관찰되지 않았다.

미토콘드리아는 核과 함께 平行하게 존재하다가 核이 끝난 다음에도 尾部의 대부분을 따라 두 鞭毛 사이의 細胞質내에 존재하였다. Cristae는 미약하게 발달한 상태였다.

尾部의 切斷面을 觀察해 보면 앞쪽일수록 그 모습은 둔한 삼각형을 이루었고 두 鞭毛間의 거리는 멀었으며(Figs. 6, 7), 뒤쪽으로 갈수록 斷面의 모습은 얇은 圓通形을 이루면서 두 鞭毛間의 거리가 점차 가까워져 결국은 맞붙어 존재하였는데 이렇게 모습이 변함에 따라 鞭毛들을 內包한 尾部細胞質의 量이 더불어 감소되었다(Fig. 8).

한 쌍을 이루어 尾部의 principal piece의 끝까지 존재하던 鞭毛들은 end piece에서는 1個의 鞭毛만이 二重의 細胞膜에 둘러싸인 채 존재하였으며 尾部의 最後末

* 본 논문은 1983년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구된 것임.

端에서는 鞭毛는 존재하지 않고 二重膜으로 둘러싸인 橢圓形의 細胞質만이 관찰되었다(Fig. 9).

각 鞭毛는 전형적인 「9+2」 microtubule set를 갖추고 있었고 그 直徑은 0.2 μ m이었다(Fig. 9).

頭部와 尾部의 細胞質 내에는 거의 전반에 걸쳐 glycogen 顆粒이 관찰되었다.

細胞膜直下の 細胞質 내에는 微小管(cortical microtubule)들이 존재하였는데 그 분포는 頭部로부터 尾部에 이르기까지 광범위하였으나 그들의 수는 부위에 따라 많은 차이가 있었다. 즉, 頭部에서는 수가 적었고 尾部 middle piece의 後端으로 가면서 수가 증가하여 최고 24개까지 관찰되었다. Middle piece 중에서 鞭毛들이 細胞質로부터 밖으로 많이 隆起하여 달리는 부위에서는 鞭毛에 집한 細胞膜 내에는 微小管이 존재하지 않았고 다만 두 鞭毛 사이에 있는 細胞膜 내에만 존재하였다.

두 鞭毛間의 거리가 좁아져 결국 서로 맞붙어 달리는 부위에서는 두 鞭毛는 細胞質 내로 깊이 埋沒되는데 이런 부위에서는 全細胞膜 내로 微小管이 존재하였다. 그러나, 鞭毛가 하나만 존재하는 부위의 細胞膜 내에서는 微小管은 전혀 존재하지 않았다(Figs. 6-8).

考 察

肝吸蟲(*C. sinensis*)의 成熟精子 微細構造를 이해하기 위하여는 Jeong *et al.* (1976)이 보고한 精子形成過程을 우선 이해하여야 한다.

즉, 한 쌍의 鞭毛가 頭部後方으로부터 각각 다른 방향으로 돌출하여 나와 결국은 核을 內包하고 頭部後方으로 伸長되어 나가는 細胞質과 융합하여 尾部를 形成하는 것이다. 이러한 현상은 Fujino *et al.* (1977)에 의하여 *Eurytrema pancreaticum*과 *Paragonimus ohirai*의 精子形成過程에서도 보고된 바 있다.

精子의 頭部에서 acrosome이 관찰되지 않은 것도 餘他的 吸蟲類에서와 同一한 현상이었다.

Burton(1960)은 *Haematolechus medioplexus*의 精子를 光學顯微鏡으로 관찰한 후 先體, 頭部, 尾部로 크게 구분하고 尾部를 다시 中片(middle piece)과 末端部(terminal piece)로 나누었으나 본 연구의 光學顯微鏡의 觀察로는 精子의 각 부위를 뚜렷하게 구분할 수 없을 정도로 너무 細長한 모습일 뿐이었다.

그러나, 電子顯微鏡의 觀察에서는 부위에 따라 특이한 구조를 지니고 있음을 알 수 있었다. *E. pancreaticum*과 *P. ohirai* 두 종에서 공히 成熟精子의 頭部 細胞表面에 느슨하게 말린 螺旋上의 隆起가 왼쪽으로 말려져 있음이 走査電子顯微鏡(SEM)을 이용한 관찰에서 밝혀졌으나 본 연구에서는 만족할만한 SEM 관찰을 할 수 없었으므로 肝吸蟲의 精子에서도 이러한 구조가 있는지 확인할 수는 없었다.

精子의 모습이 전체적으로 螺旋狀으로 보이는 이유는

2개의 鞭毛가 頭部後方으로 伸長되어 나가는 細胞質과 融合되면서 비틀어지고, 鞭毛들이 細胞質 내로 깊이 陷沒되지 않아 突出이 심하므로 尾部를 따라 깊은 고랑을 이루는 까닭인 것으로 思料된다. Fujino *et al.* (1977)은 精子의 비틀림이 精核의 비틀림과 관계가 있을지도 모른다고 하였다.

精子의 細胞質 내에서 관찰되는 다량의 glycogen 顆粒은 β -particles로 인정되며 精子의 生存 및 運動을 위한 energy源으로서 이용되는 것으로 생각된다.

Bonsdorff and Telkkä(1965)는 *Diphyllbothrium latum*의 精子鞭毛에 관한 연구에서 glycogen이 星狀의塊를 이루고 있음을 보고하였는 바 이는 α -particles인 것으로 사료되고 있다.

이와 같이 蠕蟲類 중에서도 精子의 細胞質 내에 존재하는 glycogen 顆粒의 形狀에는 차이가 있음을 알 수 있다.

精子의 細胞膜直下 細胞質에는 부위에 따라 수는 달라도 微小管이 많이 존재하였는데 이들의 機能에 관하여 Silveira and Porter(1964)는 淡水産 planaria를 대상으로 한 연구에서, Lumsden(1965)은 條蟲類를 대상으로 한 연구에서 공히 細胞構造의 維持 및 波狀運動에 寄與할 것이라고 보고한 바 있다.

精子의 尾部 end piece에서 鞭毛가 하나만 관찰되는 것은 두 鞭毛間에 길이의 차이가 있기 때문인지, 아니면 비록 光學顯微鏡의 觀察로는 확인되지 않았지만 end piece가 둘로 갈라져 각각 하나의 鞭毛를 가지는 까닭인지도 모른다. 後者와 같이 end piece가 分枝한 예는 *P. ohirai*의 精子에서 볼 수 있다(Fujino *et al.*, 1977).

結論으로서 肝吸蟲 成熟精子의 微細構造는 이제까지 보고되어 온 他種類의 吸蟲類에서와 같이 2개의 鞭毛를 尾部細胞質內에 지니고 있는 특이한 構造였다. 그러나, 鞭毛의 內部構造에는 다소 차이가 있는 것으로 思料된다. 즉, 鞭毛의 內部微細構造에 관하여 Tullock and Hershenv(1967)가 그때까지의 연구보고들을 정리한 바에 의하면 扁形動物 精子의 尾部鞭毛는 그를 이룬 微小管의 배열이 종래에 鞭毛의 일반적인 구조로 알려져 온 「9+2」 배열이 아니라 「9+1」 배열이라고 하였으며 이러한 양상은 그 후 많은 著者들에 의해서도 보고되어 왔다.

본 연구에서 취급한 肝吸蟲에서는 精子의 尾部鞭毛를 이룬 微小管의 배열이 尾部의 대부분에서 「9+1」 배열인 것처럼 보였으나 鞭毛가 하나만 남아 있는 end piece에서 보면 분명히 「9+2」 배열을 하고 있었다. 이처럼 보이는 원인은 알 수 없으나 肝吸蟲精子의 尾部鞭毛 역시 그 내부에 「9+2」 배열을 한 微小管들을 가지는 것이 확실한 듯 싶다.

結 論

肝吸蟲(*Clonorchis sinensis*) 所熟精자의 微細構造를 관찰하기 위하여 家兔 및 白鼠에 人工的으로 肝吸蟲 被囊幼蟲을 經口感染시킨 후 그들의 成蟲을 肝膽道로부터 채집하여 受精囊內的 精子들을 光學顯微鏡, 位相差顯微鏡 및 電子顯微鏡을 이용하여 관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

精子는 細長하며 全長이 170 μ m 내외인 약간 螺旋狀의 모습으로서 頭部에 acrosome을 가지고 있지 않았다. 두 개의 鞭毛가 尾部 細胞質內에 존재하는데 end piece에서만은 하나의 鞭毛가 존재하였다.

각 鞭毛는 「9+2」microtubule set을 가지고 있었다. 精子 大部分의 細胞質內에는 多量의 glycogen 顆粒이 존재하였다.

REFERENCES

- Anderson, W.A. and Persone, P. (1970) The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate. *J. Cell Bio.*, **44**:29-51.
- Bonsdorff, C.H. von and Telkkä, A. (1965) The spermatozoon flagella in *Diphyllobothrium latum* (fish tapeworm). *Z. Zellforsch.*, **66**:643-648.
- Burton, P.R. (1960) Gametogenesis and fertilization in the frog lung fluke, *Haematoloechus medioplexus* Stafford (Trematoda: Plagiorchiidae). *J. Morph.*, **107**: 93-122.
- Burton, P.R. (1967) Fine structure of the reproductive system of a frog lung fluke. II. Penetration of the ovum by a spermatozoon. *J. Parasit.*, **53**:993-999.
- Burton, P.R. (1968) Effect of various treatments on microtubules and axial units of lung fluke spermatozoa. *Z. Zellforsch.*, **87**:226-248.
- Burton, P.R. (1972) Fine structure of the reproductive system of a frog lung fluke. III. The spermatozoon and its differentiation. *J. Parasit.*, **58**: 68-83.
- Fujino, T., Ishii, Y. and Mori, T. (1977) Ultrastructural studies on the spermatozoa and spermatogenesis in *Paragonimus* and *Eurytrema* (Trematoda: Digenea). *Japanese J. Parasit.*, **26**(4):240-255.
- Grant, W.C., Harkema, R. and Muse, K.E. (1976) Ultrastructure of *Pharyngostomoides procyonis* Harkema, 1942 (Diplostomatidae). 1. Observation on the male reproductive system. *J. Parasit.*, **62**:39-49.
- Gresson, R.A.R. (1965) Spermatogenesis in the hermaphroditic Digenea (Trematoda). *Parasitol.*, **55**: 117-125.
- Gresson, R.A.R. and Perry, M.M. (1961) Electron microscope studies of spermateliosis in *Fasciola hepatica* L. *Exp. Cell Res.*, **22**:1-8.
- Hendelberg, J. (1962) Paired flagella and nucleus migration in the spermiogenesis of *Dicrocoelium* and *Fasciola*(Digenea, Trematoda). *Zool. Bidr. Uppsala*, **35**:569-587.
- Hendelberg, J. (1969) On the development of different types of spermatozoa from spermatids with two flagella in the Turbellaria with remarks on the ultrastructure of the flagella. *Zool. Bidr. Uppsala*, **38**:1-50.
- Jeong, K.H., Rim, H.J., Yang, H.Y., Kim, W.K. and Kim, C.W. (1976) A morphological study on spermatogenesis in the liver fluke, *Clonorchis sinensis*. *Korean J. Parasit.*, **14**(2):123-132.
- Kitajima, E.W., Paraense, W.L. and Correa, L.R. (1976) The fine structure of *Schistosoma mansoni* sperm (Trematoda: Digenea). *J. Parasit.*, **62**:215-221.
- Lumsden, R.D. (1965) Microtubules in the peripheral cytoplasm of cestode spermatozoa. *J. Parasit.*, **51**: 929-931.
- Nez, M.M. and Short, R.B. (1957) Gametogenesis in *Schistosomatium douthitti* (Cort) (Schistosomatidae: Trematoda). *J. Parasit.*, **43**:167-182.
- Sato, M., Oh, M. and Sakoda, K. (1967) Electron microscopic study of spermatogenesis in the lung fluke (*Paragonimus miyazakii*). *Z. Zellforsch.*, **77**: 232-243.
- Silveira, M. and Porter (1964) The spermatozooids of flatworm and their microtubular systems. *Proto-plasm*, **59**:240-265.
- Tulloch, G.S. and Hershenov, B.R. (1967) Fine structure of platyhelminth sperm tails. *Nature*, **213**: 299-300.

=Abstract=

A Study on the Fine Structure of *Clonorchis sinensis*, a Liver Fluke

V. The Mature Spermatozoa

Kye-Heon Jeong

Department of Biology, Soonchunhyang University, Onyang, Asan, Chungnam, Korea

Han-Jong Rim

*Department of Parasitology and Institute for Tropical Endemic Diseases,
College of Medicine, Korea University*

An ultrastructural study on the mature spermatozoa of *Clonorchis sinensis* was carried out. For this study, the liver flukes were collected from the livers of rabbits and rats artificially infected with the metacercariae obtained from the fresh water fish, *Pseudorasbora parva*. Six-month old worms were used. The collected liver flukes were washed with 0.85% saline solution and then immediately moved to cold 2% glutaraldehyde buffered with 0.1M Millonig's phosphate buffer (pH 7.4). The materials were dissected into appropriate pieces in the fixative about 30 minutes after beginning of the fixation. Two hours later the materials containing the seminal receptacle were rinsed several times with the buffer and were secondarily fixed with cold, buffered 1% osmium tetroxide (OsO₄) for 2 hours. The fully fixed tissue blocks were dehydrated in a series of graded concentrations of acetone and were embedded in Epon 812 mixture. Thin sections obtained from LKB-5 ultramicrotome were stained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate. Observations of the sections were carried out with JEM-100CX II electron microscope.

In general, the mature sperm was long thread-like form with a sickle-shaped head. According to the longitudinal sectioned view of the sperm tail, the nucleus seemed to be spirally coiled and run a little far along the tail. The acrosome was not observed. The cytoplasm of the tail was biflagellated as usual in trematodes. Unlike other platyhelminth spermatozoa, the sperm tail of *Clonorchis sinensis* showed the [9+2] pattern in the microtubular arrangement. The mitochondria with poorly developed cristae were observed throughout the middle piece. The middle piece of the tail showed dull ladder or triangular shapes with the two flagella at the bottom.

But, the principal piece of the tail was slightly flattened cylindrical shape with two flagella within the cytoplasm. The end piece was unflagellated. It was not clearly identified whether the end piece was subdivided into two by flagellum or the lengths of the two flagella were different.

The glycogen granules were rich in the cytoplasm throughout the length of the spermatozoa. These granules might be the energy source for the movement of the spermatozoa.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1.** A spermatid undergoing spermiogenesis. The rootlets (R) serve as sites of origin of the flagella (F). Centriole (C) is located between the rootlets. The cytoplasm (Cy) is getting elongation to form the tail with the flagella. $\times 25,700$.
- Fig. 2.** Longitudinal view of the anterior part of the sperm tail. The spirally coiled nucleus (N) runs along the flagella. $\times 12,900$.
- Fig. 3.** High magnification of the anterior part of the sperm tail. The cytoplasm contains rich glycogen granules (G). $\times 55,100$.
- Fig. 4.** Longitudinal view of the middle piece of the tail. The cytoplasm of the tail is biflagellated (F). $\times 23,600$.
- Fig. 5.** The head part of the sperm with dense nucleus (N). $\times 53,600$.
- Fig. 6.** Cross sectioned view of the anterior middle pieces of the sperms with two flagella. $\times 29,200$.
- Fig. 7.** Cross sectioned view of the middle pieces. Mitochondria (M) with cristae are seen with two flagella (F). $\times 43,700$.
- Fig. 8.** Cross sectioned view of the principal piece. The two flagella are closely neighbored and surrounded by the cortical microtubules (Mt) sited right inside the cell membrane. $\times 87,900$.
- Fig. 9.** Cross sectioned view of the end pieces. The [9+2] arrangement of microtubules in the flagella (F) are seen. A few abnormal flagella (AF) are also observed.



