

*Tilapia mossambica*의 肝吸虫에 대한 防禦機轉*

李宰求 · 白泳基 · 李浩一 · 梁弘鉉

全北大學校 獸醫寄生虫學教室

(1987년 6월 8일 수리)

Defence Mechanism of Java Tilapia, *Tilapia mossambica*, to *Clonorchis sinensis*

Jae-Ku RHEE, Young-Ki PAIK, Ho-Il LEE, and Hong-Hyun YANG

Department of Veterinary Parasitology, Jeonbug National University,

Jeonju, 520 Korea

(Received June 8, 1987)

As a series of studies on the suitability as a second intermediate host of *Clonorchis sinensis*, artificial infection experiments were applied to *Tilapia mossambica*. And then, in order to elucidate the defence mechanism of the fish to *Clonorchis*, clonorchicidal substance in the epidermal mucus of the fish was isolated by silica gel column and thin layer chromatography and analyzed for its chemical structure by UV, IR and NMR-spectroscopy. The results obtained are summarized as follows:

1. The cercariae which attempted to contact with the fish in the water were observed under stereomicroscope. After contact, the cercariae began to separate their tail from the body after several minutes and then the number increased to 80% more than 10 minutes after the encounter. But very few cercariae could actually invade the epidermis of the fish.

2. The fish were reared with *Parafossarulus manchouricus* which were shedding numerous cercariae of *Clonorchis* in the aquarium for 24 hours. Only a few cercariae could invade the epidermis but most of the invaded cercariae died out before forming their cysts. Very few number of the remaining encysted cercariae were also found to be in a state of suspended animation within 42 hours.

3. In the cases of the control fish, *Pseudorasbora parva*, numerous cercariae of *Clonorchis* were found to invade the fish through the epidermis under stereomicroscope. Then many metacercariae of *Clonorchis* were also found in the fish while they were kept in the aquarium.

4. A sample of the epidermal mucus of *Tilapia mossambica* was extracted with ethyl ether 6 times repeatedly. In silica gel column chromatography, using petroleum ether: chloroform/30:70(v/v) as a first solvent and MeOH as a second solvent, the extract was fractionated into the yellow and brownish red solutions in the first solvent and the clonorchicidal brownish yellow solution in the second solvent.

5. The clonorchicidal brownish yellow solution was added to petroleum ether, and the mixture was stored for 5 days at 5°C and was, then, separated into supernatant fraction and precipitate. Ten mg/ml of the supernatant fraction killed, *in vitro*, the excysted metacercariae in 45 minutes but the precipitate in 600 minutes.

6. In silica gel column chromatography, using acetone: benzene/10:90(v/v) as a solvent, the more clonorchicidal supernatant fraction was fractionated into the first fraction with *Rf.* 0.2966 and the second fraction with *Rf.* 0.072. *In vitro*, 10 mg/ml of the first fraction killed the excysted metacercariae in 28 minutes, the second fraction in 80 minutes and the first fraction was, therefore, determined to be a final clonorchicidal substance.

* 본 研究論文은 財團法人 全北大學校 學術研究財團 研究助成費에 의하여 研究되었음.

7. By this purification procedures, the most clonorchicidal substance from the epidermal mucus of *Tilapia mossambica* was purified 71-folds with 0.2075% yield. Infra red, nuclear magnetic resonance and ultraviolet spectrometric analysis of the purified substance revealed that the substance is linoleic acid.

According to the results of the present studies it seemed that this species can not serve as a proper intermediate host of *Clonorchis sinensis*, and that defence mechanism to the fluke seems to be correlated with linoleic acid in the epidermal mucus of this species.

緒 論

肝吸虫症은 우리나라에서 중요한 吸虫類의 一種으로서 南韓 各處 河川流域에 큰 流行地를 形成하고 있으나 肝吸虫症의 疫學的 事實을 理解하는 데 필요한 第二中間宿主에 대한 生態學的 知識에는 不充分한 點이 많다.

同一水系에 棲息하고 있는 淡水魚類라 할지라도 그 종류에 따라 肝吸虫의 有尾幼虫이 용이하게 侵入, 成熟하여 그 第二中間宿主 役割을 할 수 있는 것과 그렇지 않은 것으로 大別할 수 있을 뿐더러 淡水魚類 體內에 있어서 그 被囊幼虫의 壽命이 현저하게 다르다는 것은 周知의 事實이며(田, 1964b; 鈴木 및 小宮, 1966; 李, 1973; 李 등, 1985), 오늘날에 와서는 잉어(*Cyprinus carpio*), 붕어(*Carassius carassius*), 香魚(*Cyprinus carpio nudus*) 등은 그 第二中間宿主의 役割을 거의 할 수 없다는 假說이 받아들여지고 있는 실정이다(田, 1964a, b, c; 李 등, 1979; 1980a, b; 1983a, b; 1984; 1987).

한편, 우리나라 淡水魚 養殖業界에서는 1955年 泰國으로부터 *Tilapia mossambica*(최근에는 *Oreochromis mossambicus*로 쓰이고 있음)를, 1970年代 末期(未確認)에는 台灣과 日本으로부터 *Oreochromis niloticus*(=*T. nilotica*) 및 이들 사이 또는, *Oreochromis aureus*(=*T. aurea*)와의 잡종이라고 인정되는 몇가지 제종을 도입하여 기르고 있으며 現在에는 年間 100餘톤을 生産, 全國 各地의 飲食店 등에 供給함으로써 國民들이 즐겨 生食하고 있다.

이러한 現時點에서 틸라피아에 대한 肝吸虫 第二中間宿主로서의 役割與否를 糾明한다는 것은 國民保健上 時急하고도 重且大한 문제라고 생각하며, 한걸음 더 나아가서 萬一 그 第二中間宿主로서의 役割이 否定되었을 경우 틸라피아의 肝吸虫에 대한 防禦機轉을 闡明한다는 것은 肝吸虫의 生態學的 研究에 큰 도움이 되는 資料를 제공한다고 보겠다.

그러므로, 著者 등은 肝吸虫 有尾幼虫의 *Tilapia*

*mossambica*에 대한 人工感染試驗을 遂行하고 그 表皮에 有尾幼虫이 용이하게 침입하지 않는 것을 확인한 다음, 이의 機轉을 糾明하기 위하여 그 體表面 粘液으로부터 肝吸虫에 대한 殺虫性 純粹物質을 分離, 化學的 分析을 통하여 그 物質의 構造를 확인하였다.

材料 및 方法

1. 實驗 材料

틸라피아(자바틸라피아, *Oreochromis mossambicus* 또는 태래어 *T. mossambica*): 群山水產專門大學 養殖場으로부터 1986年 9월에 平均 體長 14 mm의 寄生虫 未感染 *Tilapia mossambica* 稚魚 100마리와 滿1年生 體長 18 cm 안팎의 成魚 10 kg을 분양받아서 전자는 人工感染試驗에 후자는 그 體表面 粘液으로부터 殺虫性 純粹物質 分劃에 供하였다.

참붕어(*Pseudorasbora parva*): 群山水產專門大學 養殖場에서 體長 20 mm 안팎의 寄生虫 未感染 稚魚를 1986年 9월에 분양받아서 人工感染試驗의 對照群으로 사용하였다.

왜우렁(*Parafossarulus manchouricus*) 및 肝吸虫 有尾幼虫: 1986年 9월에 沃溝郡 大野面 山月里所在 水路에서 왜우렁을 채집하여 自然遊出法으로 多數의 肝吸虫 有尾幼虫이 유출되는 8個를 선택하여 室內水槽에서의 人工感染試驗에, 그리고 그 왜우렁으로부터 유출된 후 2시간 이내의 신선한 그 有尾幼虫을 立體顯微鏡下에서의 人工感染試驗에 사용하였다.

肝吸虫 脫囊幼虫: 1986年 9월에 金海湖水에서 채집한 體長 5~7 cm의 참붕어 200餘 마리를 人工胃液으로 소화시킨 다음 各種 被囊幼虫을 分離, 人工腸液을 加하여 36°C에서 30分間 放置하여 脫囊된 肝吸虫의 幼虫만을 선별하여 殺虫試驗에 사용하였다.

2. 實驗 方法

立體顯微鏡下에서의 人工感染試驗: 內徑 40 mm,

*Tilapia mossambica*의 肝吸虫에 대한 防禦機轉

높이 50 mm의 비이커 10개에 肝吸虫 有尾幼虫 80餘 마리, 물 5 ml 및 틸라피아 稚魚 1마리씩을 各各 넣은 다음 立體顯微鏡下에서 有尾幼虫이 魚體內로 침입하는 상내를 30분간 계속 관찰하였다. 그리고 對照로서 참붕어 5마리도 前述한 방법으로 처리하여 역시 관찰하였다.

室內水槽에서의 人工感染試驗 : 길이 76 cm, 폭 24 cm, 높이 38 cm의 水槽에 30 cm 높이까지 24°C의 물을 채우고 틸라피아 稚魚 70마리, 참붕어 3마리 및 肝吸虫 有尾幼虫이 다수 遊出되는 왜우렁 8마리를 넣고 24시간에 걸쳐 有尾幼虫의 魚類에의 遭遇를 試圖한 다음 魚類를 신선한 물을 넣은 다른 水槽로 옮겨 사육하면서 적당한 시간간격으로 魚體를 슬라이드 壓片標本으로 만들어 肝吸虫 被囊幼虫의 存在 與否와 그 變性 死滅過程을 관찰하였다.

殺虫性物質 分劃 : 틸라피아의 表皮와 眞皮를 剝離하여 에탄에테르에 浸漬시켜 24시간마다 6회에 걸쳐 體表面 精液을 抽出하였다. 이를 減壓濃縮시켜 얻은 에테르 抽出物을 李 등(1987)의 方法에 準하여

Fig. 1과 같이 處理하여 純粹殺虫性 物質을 分離하였다.

즉, 직경 3 cm, 높이 45 cm의 컬럼에 실리카 겔(0.2~0.5 mm)과 石油에테르 : 클로로포름/30 : 70 (v/v)의 第一混合溶媒를 혼합, 充填시킨 다음 에테르 抽出物을 넣어 第一混合溶媒를 약 60滴/分の 流速로 溶離, 殺虫性 陰性的 黃色溶離物과 帶褐赤色溶離物을 제거하였다. 다음, 第二溶媒인 메탄올을 사용하여 그 컬럼 上段에 殘留하고 있는 物質을 다시 溶離시켜 帶褐黃色的 殺虫性 陽性溶離物을 얻어 농축하였다.

이에 石油에테르 30 ml를 加하여 5°C에서 5日間 放置하여 殺虫性 陰性的 帶褐黃色 沈澱物과 殺虫性 陽性的 乳白色 上清液으로 구분하였다. 이 上清液의 濃縮物을 아세톤 : 벤젠/10 : 90(v/v)의 混合溶媒를 사용, 시리카 겔(0.06~0.2 mm) 컬럼크로마토그래피하여 작은 시험관에 3 ml씩 120段階의 溶離物을 取하였다. 이들을 위와 같은 溶媒를 사용하여 시리카 겔 薄膜크로마토그래피하여 2個의 斑點을 확인.

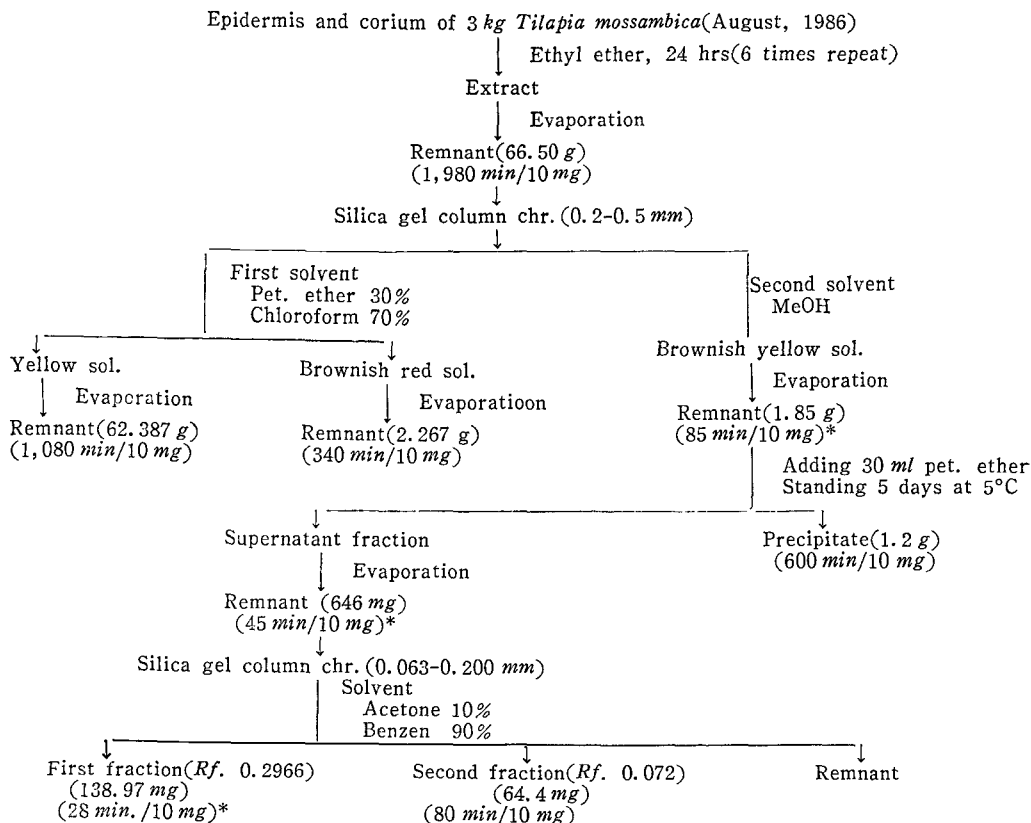


Fig. 1. Fractionation method of clonorchicidal substance from *Tilapia mossambica*.

* Clonorchicidal effect

그 중에서 殺虫性이 보다 강력한 Rf. 0.2966 값에 相當한 물질을 모아서 最終分割 純粹殺虫性 物質(無色, 油狀)로 하였다.

脫囊幼虫에 대한 殺虫試驗: 틸라피아의 體表粘液 으로부터 추출한 各 段階 分割物質에 適當한 양의 에테르를 첨가하여 10 mg 상당의 물질이 함유된 에테르 용액을 시계접시에 取하여 溶媒를 완전히 증발시키고, 10마리의 肝吸虫 脫囊幼虫이 들어있는 生理食鹽水 1 ml 를 넣고 직접 접촉시켜 脫囊幼虫의 변성, 사멸과정을 관찰하였다.

한편, 對照로서 시계접시에 에테르 1 ml 만을 취하여 완전히 증발시켜 生理食鹽水와 肝吸虫 脫囊幼虫을 가하여 그 변성, 사멸과정을 관찰하였다. 實驗 및 對照群 모두 이러한 실험을 三反復으로 실시하였다.

脫囊幼虫의 死滅 判定은 그 운동의 완전 정지 및 층체의 이완을 起點으로 하였다.

殺虫性 物質의 化學分析: 赤外線 分光分析은 Beckmann spectrophotometer 를 사용하여 MeOH 용매로 AgBr-window 에 塗布하여 필름層을 만들어 波數 4,000~400 cm^{-1} , 速度 300 cm^{-1}/min , gain 1.5, period 1 sec, slit width 0.3 mm 의 條件下에서 측정하였다(Rao, 1963; Colthup *et al*, 1975).

核磁氣共鳴 分光分析은 Varian 80 FT-NMR spectrophotometer 를 사용하여 測定範圍 0~9 ppm, spectrum amplitude 25, sweep time 250 sec, sweep width 500 Hz, filter 2, solvent $CDCl_3$ 의 條件下에서 측정하였다(Günther, 1980).

紫外線 分光分析은 Pye Unicam 社의 Ultraviolet spectrophotometer 를 사용하여 分析材料를 MeOH 로

용해시킨 다음 適當한 농도로 희석하여 紫外線 스펙트럼을 측정하였다(Jaffé and Orchin, 1970).

結 果

立體顯微鏡下에서의 人工感染試驗: 일반적으로, 肝吸虫 有尾幼虫을 틸라피아 稚魚에 遭遇를 試圖하면 數分 後부터 尾部가 體部로부터 分離되기 시작하여 시간이 경과함에 따라 그 數가 증가하여 10餘分 後에는 80%에 이르렀으며, 한편 正常으로 보이는 有尾幼虫이라도 그 旋廻運動은 극히 微弱하였다. 그리고, 15分 後에는 모든 有尾幼虫의 尾部가 體部로부터 分離되었으며, 20分 後에는 體部の 變性, 透明像을 보여 주었다.

極히 少數의 有尾幼虫에서 魚體 表面에 부착한 尾部가 분리되고 體部만이 魚體內로 침입하여 그 部位를 다소 隆起시키는 像을 관찰할 수 있었다.

한편, 對照인 참붕어에 있어서는 遭遇試驗 1分 以內에 그 體表面에 有尾幼虫이 부착하기 시작하여 10分 後에는 참붕어 한 마리당 平均 8마리에 이르렀으며, 부착한지 30秒만에 尾部가 體部로부터 분리되어 體部만이 匍匐運動으로 서서히 魚體 筋肉內로 침입하는 像을 관찰할 수 있었다.

室內水槽에서의 人工感染試驗: 室內水槽에서의 人工感染試驗 結果는 Table 1에 표시한 바와 같이 총 64마리의 틸라피아 중에서 8마리로부터 13마리의 肝吸虫 幼虫을 검출하였다. 한편, 對照인 3마리의 참붕어 體內에서는 遭遇 試圖後 3.5日에 활발한 固有의 旋廻運動을 하는 85마리의 肝吸虫 被囊幼虫을 검출하였다. 틸라피아 體內에 있어서 幼虫의 變性 死

Table 1. Results of experimental infection with *Clonorchis cercariae* to *Tilapia mossambica* for 24 hours in aquarium

Hours/days after exposure	Number of fish		Number of larvae	Motile larvae		Non-motile larvae	
	Inspected	Infested		Encysted	No cyst	Encysted	No cyst
<i>Tilapia mossambica</i>							
Immediately	8	0	—	—	—	—	—
3 hrs	8	3	4	2	—	—	2
9 hrs	8	1	2	—	—	—	2
15 hrs	8	1	1	1	—	—	—
21 hrs	8	1	4	2	—	1	1
42 hrs	8	2	2	1	—	1	—
3.5 days	8	0	—	—	—	—	—
7 days	8	0	—	—	—	—	—
Total	64	8	13	6	—	2	5
<i>Pseudorasbora parva</i>							
3.5 days	3	3	85	85	—	—	—

滅過程을 經時的으로 관찰한 결과를 要約하면 다음과 같다.

遭遇終了直後—肝吸虫의 幼虫을 전혀 檢出할 수 없었다.

3時間後— 두 마리의 魚體로부터 有尾幼虫이 魚體 內로 침입한 직후에 폐사한 것으로 생각되는 被囊을 형성하지 않은 두 마리의 幼虫을 한마리씩 발견하였다. 그들의 크기는 $45.05 \times 106 \mu m$ (Fig. 4 參照), $58.3 \times 79.5 \mu m$, 眼點의 길이는 $7.95 \mu m$, $5.3 \mu m$ 이었다. 虫體 全般에 걸쳐 淡褐色 色素顆粒이 均等하게 分布되어 있었으며, 前者의 虫體 後半部는 붕괴상태 였다.

한편, 한 魚體로부터 활발한 운동성이 있는 두 마리의 피낭유충을 檢출하였는데 그들의 크기는 $60.95 \times 95.4 \mu m$, $66.25 \times 106 \mu m$, 眼點의 길이는 모두 $7.5 \mu m$, 被囊壁의 두께는 $2.12 \mu m$, $1.37 \mu m$ 였다.

9時間後— 한 마리의 魚體로부터 두 마리의 幼虫을 檢출하였는데 모두 被囊을 형성하지 않은 斃死例이 있었다. 그들의 크기는 $39.75 \times 145.75 \mu m$, $42.7 \times 106 \mu m$ 이며, 眼點의 길이는 $7.95 \mu m$, $3.97 \mu m$ 이었다. 崩壞狀態에 있는 이들의 虫體 全般에는 黃褐色 色素顆粒이 散在하고 있었다.

15時間後— 한 마리의 魚體로부터 활발한 운동성이 있는 한 被囊幼虫을 檢출하였다. 被囊壁이 얇은 虫體의 크기는 $58.3 \times 98.05 \mu m$ 이었으며, 眼點은 명확하였으나 宿主에 의해서 형성되는 固有被囊壁은 확인할 수 없었다.

21時間後— 한 魚體로부터 4마리의 幼虫을 檢出하였다. 두 마리의 幼虫은 魚體에 침입한 잠시 후 또는 直後에 폐사한 것으로서 被囊을 약간 또는 전혀 形成하지 않았으며 虫體는 崩壞狀態이었다. 이들 虫體의 크기는 $79.5 \times 143.1 \mu m$ (Fig. 5 參照), $106 \times 185.5 \mu m$ (Fig. 6 參照)이었으며, 眼點은 명확하였으나 黃褐色 色素顆粒이 虫體 全般에 散在하였다.

한편, 운동성이 있는 또 다른 두 마리의 被囊幼虫

의 크기는 $58.3 \times 98.05 \mu m$ (Fig. 7 參照), $53 \times 98.05 \mu m$ 으로서 虫體內에서 명확한 眼點($6 \sim 10 \mu m$), 被囊壁($2.6 \mu m$), 固有被囊壁($4 \mu m$), 口吸盤, 排泄囊 등을 인정할 수 있었다.

42時間後— 한 魚體로부터 운동성이 전혀 없는 $71.55 \times 95.4 \mu m$ 크기의 한 被囊幼虫을 檢출하였다. 被囊壁의 두께는 $2.65 \mu m$ 이었으며, 黃褐色 色素顆粒이 虫體 全般에 걸쳐 分布하였다.

또, 다른 한 魚體에서 極히 微弱한 운동성이 있는 $58.3 \times 90.1 \mu m$ 크기의 被囊幼虫을 발견하였다. $5.3 \mu m$ 길이의 眼點, 1.32 두께의 被囊壁, $5.3 \mu m$ 두께의 固有被囊壁을 관찰할 수 있었으며, 排泄囊의 輪廓도 명백하였다.

3.5日後— 8마리의 魚體로부터 피낭유충을 전혀 檢출할 수 없었다.

7日後— 역시, 8마리의 魚體로부터 被囊幼虫을 전혀 檢출할 수 없었다.

各段階 分割物質의 殺虫試驗: 틸라피아 體表面 粘液의 에테르 抽出物($66.504g$)의 肝吸虫 脫囊幼虫에 대한 殺虫時間은 $1,980$ 分/ $10 mg$ 이었다. 第二分割階로서 컬럼크로마토그래피하여 얻은 各分割物質의 탈낭유충에 대한 살충시간을 관찰한 결과는 Table 2 에 표시한 바와 같이 殺虫性이 가장 강력한 것은 第三分割으로서 85 分/ $10 mg$ 이었다. 이 第三分割을 다시 分割하여 얻은 物質들에 대한 살충시험을 수행한 結果는 Table 3에 表示한 바와 같이 上清液이 45 分/ $10 mg$ 으로서 강력하였다. 이 上清液의 濃縮物을 아세톤:벤젠/ $10:90(v/v)$ 의 혼합용매를 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 얻은 2個의 분획물질의 탈낭유충에 대한 살충효과를 관찰한 結果는 Table 4에 表示한 바와 같이 第一分割이 28 分/ $10 mg$ 으로서 強力하였다. 한편, 對照群에 있어서 脫囊幼虫의 壽命은 24 시간 이상였다.

各 分割段階別 殺虫性物質의 精製度 및 收率: 各 段階 殺虫性 分割物質의 精製度 및 收率은 Table 5에

Table 2. Time required for killing excysted metacercariae in the second step fractions
First solvent-Pet. ether:Chloroform/30:70 Second solvent-MeOH

Fractions	First	Second	Third
Colour	Yellow	Brownish red	Brownish yellow
Time for clonorchicide(min/10 mg dry weight)	1,080	340	85

Table 3. Time required for killing excysted metacercariae in the third step fractions
Adding pet. ether, standing 5 days at 5°C

Fractions	Supernatant fraction	Precipitate
Time for clonorchicide(min/10 mg dry weight)	45	600

Table 4. Time required for killing excysted metacercariae in the fourth step fractions
Solvent-Acetone: Benzene/10:90

Fractions	First fraction	Second fraction
Rf. values	0.2966	0.072
Time for clonorchicide(min/10 mg dry weight)	28	80

Table 5. Purification of clonorchicidal substance from *Tilapia mossambica*

Step	Total amount* (mg)	Specific activity** (min/10 mg dry weight)	Purity (-fold)	Yield (%)
1	66,504	1,980	1	100
2	1,850	85	23	2.78
3	646	45	44	0.97137
4	138	28	71	0.2075

* Clonorchicidal activity ** Time(min) required to kill *Clonorchis* metacercariae

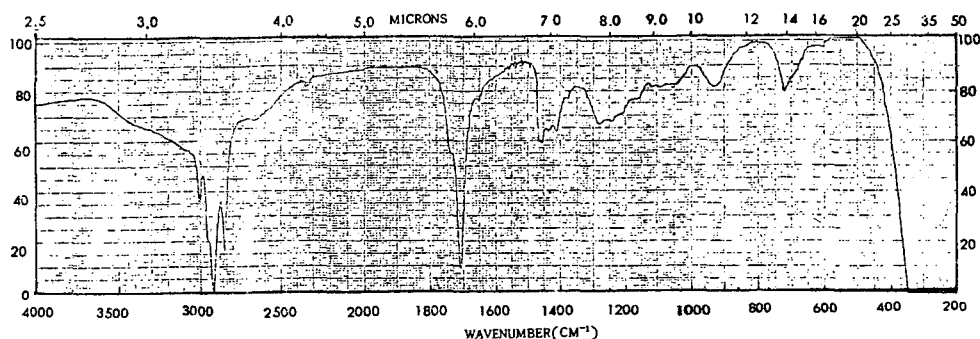


Fig. 2. IR-spectrum of final clonorchicidal substance of *Tilapia mossambica*.

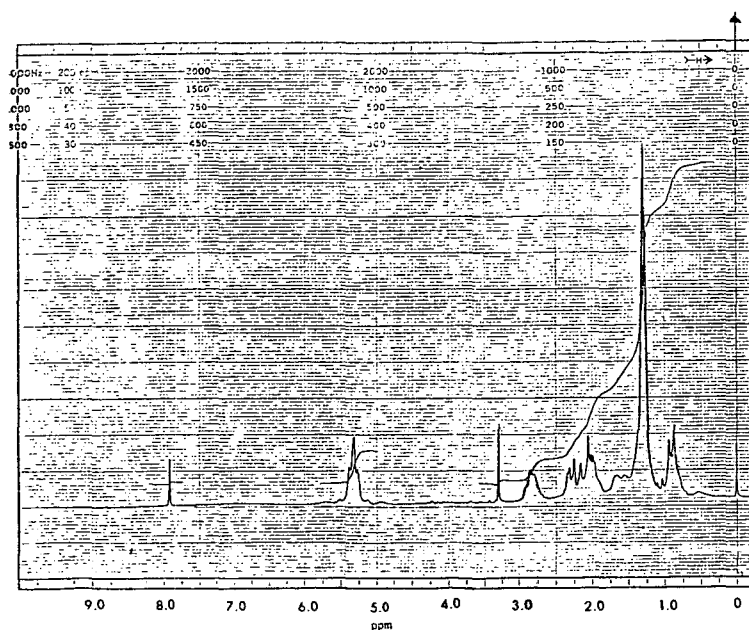


Fig. 3. NMR-spectrum of final clonorchicidal substance of *Tilapia mossambica*.

表示한 바와 같이 틸라피아의 體表面 粘液의 에테르 抽出物 66.504 g 으로부터 最終段階 分劃에서 138 mg 이 回收되었으며 그 精製度는 71배였다.

殺虫性 物質의 化學分析: 最終分劃 純粹 殺虫性物質의 紫外線 分光分析 結果 吸光度(absorbance; Å)는 3.064, 吸收波長은 228.7 nm이다.

赤外線 分光分析 結果는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 波數 2,800~3,000 cm^{-1} 와 1,400~1,460 cm^{-1} 에 강한 피이크, 그리고 720 cm^{-1} 에도 피이크가 있다. 또, 1,710 cm^{-1} 에 강한 피이크와 이와 同時에 3,400 cm^{-1} 部位와 930 cm^{-1} 部位에도 피이크가 있다. 그리고, 1,650 cm^{-1} 및 3,020 cm^{-1} 에 피이크가 있다.

核磁氣共鳴 分光分析 結果는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 5.3 ppm, 0.88 ppm, 1.12 ppm, 1.52 ppm, 1.98 ppm, 2.25 ppm 및 2.75 ppm 部位에 피이크가 있다.

考 察

小林에 의하여 1910年 淡水魚類가 肝吸虫의 第二中間宿主 役割을 한다는 사실이 판명된 以來, 지금 까지 109種의 淡水魚類와 3種의 淡水産 새우가 第二中間宿主로서 報告되었지만(李, 1984), 오늘날에 와서는 잉어, 붕어, 香魚 등의 魚類는 第二中間宿主 役割을 거의 할 수 없다는 假說이 받아들여지고 있다.

일찌기, 田(1964a)과 최근에 이르러 李 등(1983c)은 肝吸虫 流行地로서 널리 알려진 여러 地域에서 채집한 붕어로부터 肝吸虫 被囊幼虫을 전혀 檢出할 수 없었다고 報告하였다. 그리고, 田(1964b)은 잉어, 붕어에 부착한 肝吸虫 有尾幼虫은 魚體內로 침입하기전에 대부분이 폐사하며, 간혹 침입한 유충도 30일이 경과해도 성숙하지 않는다고 報告하였다. 최근에 이르러 李 등(1983a)은 香魚에 대한 肝吸虫 有尾幼虫의 人工 및 自然感染試驗을 遂行한 바 一部の幼虫은 魚體內로 침입하였으나 그 대부분이 被囊하지 못하고 被囊한 極少數도 48時間 以內에 거의 모두 폐사하므로 自然界에서 肝吸虫의 第二中間宿主 役割을 할 수 없다고 하였다.

한편, 肝吸虫 有尾幼虫의 淡水魚類에의 人工感染試驗을 통하여 鈴木 및 小宮(1966)는 피라미(*Zacco platypus*) 體內에 침입한 有尾幼虫은 30日 後부터 그 피낭유충이 變性, 死滅하기 시작하여 약 100日 後에는 그 대부분이 사멸한다고 하였으며, 그 후 李(1973)는 참붕어, 큰납지리(*Acanthorhodeus asmussi*) 및 묵납자루(*Acheilognathus signifer*) 體內에 침입한 有

尾幼虫은 각각 133日, 140日 및 70日부터 그 피낭유충이 變性, 死滅하기 시작하여 時日이 경과함에 따라 그 수가 증가하여 큰납지리 460日, 묵납자루 269日에 모두 변성, 사멸하는데 반하여 770日的 참붕어에 있어서는 58마리 중에서 2마리만이 변성, 사멸하였을 뿐 나머지 것은 微弱한 運動性을 지니고 있었다고 하였다. 또, 최근에 이르러 李 등(1985)은 치리(*Cultricolus eigenmanni*) 體內에서는 30日부터 변성, 사멸하기 시작하지만 時日이 경과함에 따라 死亡率이 一律적으로 증가하는 것이 아니라 魚類宿主의 個體에 따라 심한 차이가 있어 390日, 540日, 586日에 모든 被囊幼虫이 사멸하는가 하면 596日에는 94마리의 피낭유충 사망율이 8.51%에 지나지 않았으며 生存한 81마리를 집토기에 經口投與하여 10.46%의 成虫을 回收하였다고 하였다.

이와 같은 事實에 대한 機轉을 說明하기 위한 研究도 多樣하게 進行되고 있다. 일찌기, 田(1964bc)에 의하여 붕어, 잉어 등의 體表面 粘液內 殺虫性物質 含有說이 報告된 것을 起點으로 하여, 李 등(1979, 1980ab)은 붕어, 잉어, 메기(*Parasilurus asotus*) 등의 체표면 점액으로부터 殺虫性物質을 分劃하기에 이르렀다.

最近에 이르러 李 등(1984)은 잉어의 체표면 점액으로부터 殺虫性物質을 純粹分離하여 赤外線 및 核磁氣共鳴 分光分析을 통하여 肝吸虫에 대한 殺虫性物質이 不飽和脂肪酸의 에틸에스테르라고 보고한 바 있으며, 李 등(1983b, 1987)은 香魚의 體表面 粘液 으로부터 殺虫性物質을 純粹分離하여 赤外線, 紫外線 및 核磁氣共鳴 分光分析을 수행하여 肝吸虫에 대한 香魚의 防禦物質이 linoleic acid라고 하였다. 그리고, 李 등(1983b, 1987)은 香魚와 이미 李 등(1984)이 報告한 바 있는 잉어의 體表面 粘液 으로부터 순순 분리한 殺虫性物質의 赤外線 및 核磁氣共鳴 스펙트럼의 해석을 비교 검토한 바 잉어의 殺虫性物質은 ethyl linoleate임을 알 수 있다고 하였다.

한편, 李(1974) 및 Rhee *et al.* (1982)은 자연계에서 肝吸虫 被囊幼虫이 검출되지 않는 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*), 자가사리(*Liobagrus mediodiposalis*), 메기(*Parasilurus asotus*) 등에서는 그 表皮가 대부분 棍棒狀細胞로 되어 있는데 반하여 肝吸虫의 第二中間宿主로서 널리 알려진 참붕어, 모래주사(*Microphysogobio koreensis*), 긴몰개(*Gnathopogon majimae*), 묵납자루 등에서는 이 세포를 전혀 발견할 수 없으며, 잉어, 香魚, 붕어와 같이 第二中間宿主 役割을 거의 할 수 없는 종류에서는 비교적 많은

수의 이 세포를 관찰할 수 있는데 이와 같은 사실로 미루어 보아 肝吸虫 有尾幼虫의 魚體內 侵入能力이 이 세포의 多寡 또는 有無와 관련된 것이 아닌가 推測케 한다고 하였다.

이와 같이, 잉어나 香魚 등의 肝吸虫에 대한 防禦機轉은 해명되었지만 국민들이 즐겨 生食하고 있는 鱒라피아를 肝吸虫의 第二中間宿主 側面에서 檢討한 報文은 전혀 接할 수 없으므로 著者 등은 鱒라피아의 肝吸虫 第二中間宿主로서의 役割與否를 糾明하기 위한 一環으로 肝吸虫 有尾幼虫의 鱒라피아 稚魚에 대한 人工感染試驗을 수행한 바 魚體內에서 成熟한 肝吸虫 被囊幼虫을 전혀 檢출할 수 없었으므로 그 防禦機轉을 糾明하기 위하여 鱒라피아의 體表面 粘液內에서 殺虫性物質을 순수분리하여 그 화학적 구조를 밝혀내기에 이르렀다.

우선, 第一段階 實驗에서 肝吸虫 有尾幼虫을 鱒라피아의 稚魚에 遭遇시켜 立體顯微鏡下에서 有尾幼虫이 魚體內로 侵入하는 상태를 관찰한 바 일반적으로 유미유충은 魚體에 接觸하지 않은 채 尾部가 體部로부터 분리된다. 極히 少數의 有尾幼虫에서는 魚體表面에 부착한 채 尾部가 분리되고 體部만이 魚體內로 침입하는 像을 관찰할 수 있다. 이와 같은 實驗結果는 田(1964b)이 잉어, 붕어 등에 李 등(1983a)이 香魚에 肝吸虫 有尾幼虫의 감염실험을 입체현미경하에서 수행한 결과와 一致한다고 하겠다.

또한, 室內水槽에서 24시간에 걸쳐 人工感染實驗을 수행한 64마리의 鱒라피아 稚魚에서는 有尾幼虫 遭遇後 3시간부터 42시간까지만 脫사 또는 생존하고 있는 13마리의 幼虫을 檢출하였을 뿐 그 이후에는 被囊幼虫을 전혀 발견할 수 없었는데 이와 같은 실험결과도 李 등(1983a)이 香魚에서 수행한 室內水槽에서의 人工感染試驗 結果와 거의 一致한다.

이와 같은 人工感染實驗을 통하여 鱒라피아는 肝吸虫의 第二中間宿主 役割을 할 수 없다는 사실이 判明됨으로써 鱒라피아의 肝吸虫에 대한 防禦機轉을 糾明하기 위한 一環으로 第二段階 實驗으로서 鱒라피아 體表面 粘液을 에테르로 抽出하여 여러가지 용매를 사용하여 시리카 겔 薄膜 및 컬럼 크로마토그라피하여 純淨 殺虫性物質을 分離하여 赤外線, 紫外線 및 核磁氣共鳴 分光分析을 통하여 殺虫性物質의 構造를 밝혀 냈다.

즉, 鱒라피아의 체표면 점액 에테르 抽出物 66.504 g으로부터 殺虫性이 가장 강력한 Rf. 0.2966 값의 無色, 油狀物質 138 mg(收率 0.2075%, 精製度 71倍)

을 集量하였다. 한편, 李 등(1987)은 香魚 體表面 粘液의 에테르 抽出物 101.8 g으로부터 殺虫性이 가장 강력한 Rf. 0.225 값의 물질 918 mg(收率 0.9%; 精製度 154倍)을 集量하였으므로 鱒라피아의 경우보다도 收率이나 精製도가 보다 良好하였다고 하겠다.

鱒라피아의 體表面 粘液으로부터 순수하게 분리한 殺虫性 物質의 赤外線 스펙트럼에 있어서 2,800~3,000 cm^{-1} 와 1,400~1,460 cm^{-1} 에 강한 alkyl group의 피이크가 있고, 또, 720 cm^{-1} 의 피이크는 4개의 methylene 基가 연속적으로 결합되어 있는 構造의 존재를 示唆한다. 1,710 cm^{-1} 에는 carbonyl 基에 해당하는 강한 피이크가 있으며 이와 同時에 3,400 cm^{-1} 에 퍼져있는 酸의 hydroxy 基, 그리고 酸의 分子間 水素橋結合으로 나타나는 930 cm^{-1} 부위의 피이크의 존재로 보아서 이 물질은 有機酸에 해당한다는 것을 알 수 있다.

또한, 1,650 cm^{-1} 및 3,020 cm^{-1} 부위의 피이크는 C=C의 존재를 暗示한다. 위의 carbonyl 基의 위치로 보아서 이는 二重結合과 共軛되어 있지 않고 水素橋結合만 하고 있다고 볼 수 있다. 만일, 二重結合과 共軛으로 되어 있다면, 이 피이크는 1,700 cm^{-1} 이하에 나타났어야 할 것이다. 赤外線 스펙트럼의 데이터를 종합, 검토하면 이 物質은 4개 이상의 methylene 基로 연결되는 alkyl 基와 C=C와 그리고 이 二重結合에 직접 연결되지 않은 酸基를 지니고 있다(Colthup *et al.*, 1975).

한편으로, 紫外線 스펙트럼의 228.7 nm에서 나타난 피이크는 C=C와 C=O의 존재를 示唆한다(Jaffé and Orchin, 1970).

核磁氣共鳴 스펙트럼에 있어서 5.3 ppm에 二重結合상의 4개의 水素가 있다는 것을 알 수 있으며, 피이크의 모양으로 미루어 보아 이들 水素의 성질은 유사하며, 또한 trans 狀態보다 cis 型일 가능성이 높다. 赤外線 스펙트럼에 있어서 725 cm^{-1} 위치에 二重結合상의 cis 型 水素의 out of plane bend가 존재하므로 이와 같은 水素의 존재를 더욱 가능케 하고 있다. 0.88 ppm에 나타나는 피이크는 그 이웃에 methylene 基를 동반한 末端 methyl 基에 해당하고 1.12 ppm에는 methylene 基의 水素가 나타나 있다. Methyl 基를 기준으로 환산한다면 이 위치의 methylene 基의 수는 8개이다. 1.52 ppm, 1.98 ppm, 2.25 ppm 및 2.75 ppm의 피이크들은 4개의 paramagnetic shift를 한 methylene 基에 해당한다. 그 중에서 2.75 ppm의 methylene 基는 두 개의 二重結合 사이에 있을 때의 chemical shift를 가지고 있다. 그 밖의

것은 二重結合 하나에 결합되어 있는 methylene 基들이다. 赤外線 스펙트럼의 해석을 想起한다면 二重結合 중에서 하나는 C=O 즉 酸基이다. 核磁氣共鳴 스펙트럼에서도 두個의 C=O 에 이웃한 水素를 확인하였다. 그러므로, paramagnetic shift 를 한 4個의 methylene 基는 이를 3個의 二重結合의 이웃에 있다 (Günther, 1980).

또한, 酸基의 化學的 確認을 위하여 塗布 길이 10 cm 의 시리카 겔 薄膜크로마토그래피板의 1 cm 部位에 이 물질을 點滴하고 4 cm 部位에 메탄올性 NaOH 를 吸入시켜 하나의 band를 만들어 건조시킨다음 벤젠으로 展開시킨 바 이 물질이 NaOH band 에 머물러 있으므로 酸이라고 생각한다.

위의 데이터들을 종합적으로 분석할 것 같으면 이 물질은 有機酸이며 炭素數가 18~19個이다. 또한, 그 중에서 4個의 炭素가 C=C에 包含하고 있으며, 이들 사이에 하나의 methylene 基가 결합되어 있다. 그리고, 二重結合은 모두 cis 型이다. 이와 같은 구조적 특징은 linoleic acid 의 것과 相違없으므로 이 물질은 linoleic acid 이다.

結論적으로, 이와 같은 鱖라피아의 純粹 殺虫性物質의 機器分析結果는 李 등(1987)이 보고한 바 있는 香魚의 그 물질의 分析結果와 一致함으로써 鱖라피아와 香魚의 體表面 粘液內에 존재하는 肝吸虫에 대한 殺虫性 物質은 同一物質인 linoleic acid 이다. 한편, 李 등(1987)의 報告로 미루어 보아 잉어의 肝吸虫에 대한 防禦物質은 linoleic acid 에 ethyl 基가 붙은 ethyl linoleate 이다. 그러므로, 잉어, 香魚, 鱖라피아는 自然界에서 肝吸虫의 第二中間宿主 役割을 할 수 없으며, 肝吸虫에 대한 이들 魚類의 防禦機轉에 이들 물질이 包含하고 있다는 것을 알 수 있다.

要 約

鱖라피아(*Tilapia mossambica*)에 대한 肝吸虫의 第二中間宿主로서의 役割 與否를 究明하기 위한 一環으로 우선 肝吸虫 有尾幼虫의 鱖라피아 稚魚에 대한 人工感染實驗을 수행하여 그 역할을 할 수 없다는 사실을 闡명한 다음 그 防禦機轉을 糾明하기 위하여 그 體表面 粘液으로부터 殺虫性 物質을 純粹分離하여 機器分析을 통하여 그 化學的 構造를 確認한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 立體顯微鏡下에서 鱖라피아 稚魚를 有尾幼虫에 遭遇를 試圖한 바 인간적으로 有尾幼虫은 數分 後에 尾部가 體部로부터 分離하기 시작하여 시간이 경과

함에 따라 그 수가 증가하여 10餘分 後에는 80%에 이르렀으나 極히 소수의 유미유충은 魚體表面에 부착한 體部만이 魚體內로 침입하고 尾部는 分離되었다.

2. 鱖라피아 稚魚를 室內水槽에서 有尾幼虫에 24 時間 露出시킨 바 一部 有尾幼虫은 魚體內로 침입하였으나 그 대부분이 被囊치 못하고 死滅하였으며, 被囊한 極少數도 42時間 以內에 거의 모두 死滅하였다.

3. 鱖라피아의 體表面 粘液의 에테르 抽出物을 여러 단계의 化學的 處理를 거쳐 第三段階에서 分離한 乳白色 上清液을 薄膜크로마토그래피하여 얻은 2個의 斑點物質을 肝吸虫의 脫囊幼虫에 *in vitro* 에서 直接 接觸시켜 殺虫試驗을 수행한 바 그 중에서 第1斑點인 Rf. 0.2966 값의 물질이 다른 것에 비교하여 殺虫性이 월등하게 強力하였다.

4. 鱖라피아의 體表面 粘液의 에테르 抽出物 66.50 g 으로부터 138 mg 의 殺虫性 純粹物質이 回收되었으며, 그 收率은 0.2075%, 그 精製度는 71倍이었다.

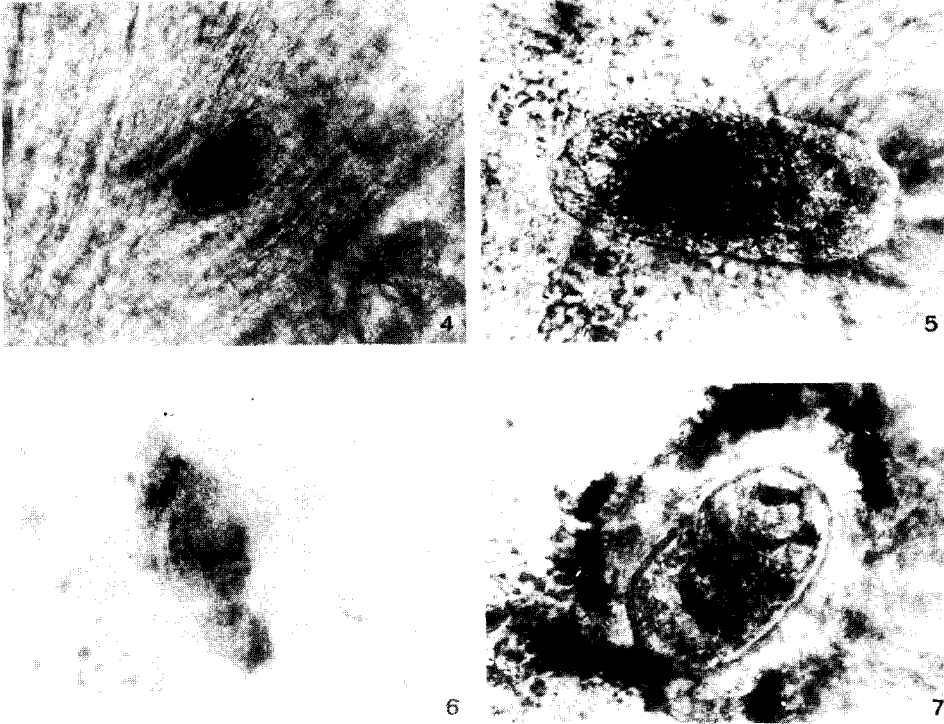
5. 純粹하게 분리된 殺虫性物質에 대하여 赤外線, 紫外線 및 核磁氣共鳴 分光分析을 이용하여 構造確認을 하였던 바 이 물질은 linoleic acid 로 判明되었다.

이상의 實驗結果로 미루어 보아 鱖라피아는 自然界에 있어서 肝吸虫의 第二中間宿主 役割을 할 수 없으며, 그 體表面 粘液內의 殺虫性物質인 linoleic acid 가 그 防禦機轉에 包含하고 있다고 생각한다.

文 獻

- 田世圭. 1964a. 肝吸虫의 感染經路에 대한 實驗的 研究. 第1篇 淡水魚에 寄生하는 各種 吸虫의 被囊幼虫 調査 및 肝吸虫幼虫의 魚體感染實驗. 釜山水產大學研究報告 6(1), 1-11.
- 田世圭. 1964b. 肝吸虫의 感染經路에 대한 實驗的 研究. 第2篇 특히 肝吸虫 cercaria 의 淡水稚魚에 대한 感染實驗. 寄生蟲學잡지 2(3), 1-11.
- 田世圭. 1964c. 肝吸虫의 感染經路에 대한 實驗的 研究. 第3篇 各種 魚類 體表面 粘液性 物質의 肝吸虫 幼虫에 대한 殺虫效力. 寄生蟲學잡지 2(3), 12-22.
- Colthup, N. B., L. H. Daly and S. E. Wiberly 1975. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy. 2nd ed. 220-310. Academic Press.

- New York.
- Günther, H. 1980. NMR Spectroscopy. 46—62. Wiley & Sons. New York.
- Jaffé, H.H. and M. Orchidn. 1970. Theory and Application of Ultraviolet Spectroscopy. 204—219. John Wiley and Son. Inc. New York.
- Rao, C.N.R. 1963. Chemical Application of Infra-red Spectroscopy. 445—451. Academic Press. New York.
- 李宰求. 1973. 肝吸虫의 第二中間宿主에 관한 實驗的 研究Ⅱ. 참붕어, 묵납자루 및 큰납지리 體內에 있어서 肝吸虫 被囊幼虫의 運命에 관하여. 大韓獸醫學會誌 13(2), 147—160.
- 李宰求. 1974. 肝吸虫의 第二中間宿主에 관한 實驗的 研究Ⅲ. 淡水魚類 表皮의 棍棒狀細胞와 肝吸虫 被囊幼虫의 感染度에 대하여. 기생충학잡지 12(2), 101—110.
- 李宰求·白秉杰·安丙浚·朴永竣. 1979. 肝吸虫에 대한 殺虫性物質에 관한 研究Ⅰ. 붕어 粘液으로부터 殺虫性物質 抽出試驗. 기생충학잡지 17(2), 121—126.
- 李宰求·白秉杰·安丙浚·朴永竣. 1980a. 肝吸虫에 대한 殺虫性物質에 관한 研究Ⅱ. 各種 淡水魚類로부터 殺虫性物質 抽出試驗. 기생충학잡지 18(1), 98—104.
- 李宰求·白秉杰·安丙浚·朴永竣. 1980b. 肝吸虫에 대한 殺虫性物質에 관한 研究Ⅲ. 붕어 粘液으로부터 抽出한 殺虫性物質의 季節的 變化. 기생충학잡지 18(2), 179—184.
- Rhee, J.K., P.G. Kim, B.K. Baek, S.B. Lee and B.Z. Ahn. 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. 1983a. 肝吸虫의 이스라엘 잉어(香魚)에 대한 感染試驗. 기생충학잡지 21(1), 11—19.
- 李宰求·金平吉·白秉杰·李相福·安丙浚. 1983b. 肝吸虫에 대한 殺虫性物質에 관한 研究Ⅳ. 이스라엘 잉어(香魚) 粘液으로부터 殺虫性物質分劃. 기생충학잡지 21(1), 21—26.
- 李宰求·白秉杰·李相福·高弘范. 1983c. 萬頃江流域에 있어서 肝吸虫症의 疫學的 調査. 기생충학잡지 21(2), 157—166.
- 李宰求. 1984. 우리나라에서 報告된 肝吸虫의 第二中間宿主에 대한 知見補遺. 全北大學校 論文集 26, 344—353.
- 李宰求·李相福·安丙浚. 1984. 肝吸虫에 대한 殺虫性物質에 관한 研究Ⅴ. 잉어 體表 粘液內 殺虫性物質의 化學的 性狀. 기생충학잡지 22(1), 127—134.
- 李宰求·白秉杰·李浩一. 1985. 肝吸虫의 第二中間宿主에 관한 實驗的 研究Ⅳ. 치리 體內에 있어서 肝吸虫 被囊幼虫의 運命. 기생충학잡지 23(1), 79—86.
- 李宰求·金平吉·安丙浚. 1987. 肝吸虫에 대한 殺虫性物質에 관한 研究Ⅵ. 香魚 體表 粘液內 殺虫性物質의 構造 確認. 藥學會誌 31(1), 33—39.
- 鈴木了司·小宮義孝. 1966. 肝吸虫第二中間宿主の再檢討 (1) オイカワへの肝吸虫 cercaria の感染. 寄生虫學雜誌 15(3), 215—226.



Legends for Figures

Figures shown are of fresh specimens of the larvae of *Clonorchis sinensis* detected in the body of the fish, *Tilapia mossambica*. Magnification in figures 4 and 6 is 200 times and the remainder, 400 times.

- Fig. 4. The long ellipsoidal cyst, 3 hours after the infection, measured $45.05 \times 106 \mu m$, and a pair of the pigmented eyespots is exclusively observed. The posterior portion of the cyst was degenerated into death.
- Fig. 5. The long ellipsoidal cyst, 21 hours after the infection, measured $79.5 \times 143.1 \mu m$. Its internal structure is impossible to observe except the pigmented eyespots and the thin cyst wall.
- Fig. 6. Irregular shape of the dead, 21 hours after the infection, measured $106 \times 185.5 \mu m$. Its internal structure is impossible to observe except the eyespots owing to the degenerated reddish-brown pigment masses on the whole body.
- Fig. 7. The eyespots are seen from the metacercaria alive and the size of the cyst, 21 hours after the infection, measured $58.3 \times 98.05 \mu m$. It looked brownish in colour owing to the pigment masses scattered throughout the body.