

## *Heterophyopsis continua*에 대한 praziquantel의 시험관내 효과의 광학현미경적 관찰

우 호 춘·서 명 득·홍 성 종\*  
경상대학교 수의과대학, 경상대학교 의과대학\*  
(1990. 8. 2 접수)

### Light microscopic observations on the *in vitro* effects of praziquantel on *Heterophyopsis continua*

Ho-choon Woo, Myung-deuk Suh, Sung-jong Hong\*  
College of Veterinary Medicine and College of Medicine\*,  
Gyeongsang National University

(Received Aug 2 1990)

**Abstract:** This study was carried out to observe *in vitro* effect of praziquantel on the viability and internal organ changes of *Heterophyopsis continua* with light microscopy. Metacercariae were collected from the perch, *Lateolabrax japonicus*, by artificial digestion technique and fed to 2-week old chickens. Adult worms were recovered from the small intestines of chickens 8 days after infection. For working solutions, praziquantel was diluted with TC199 medium at the concentration of 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu$ g/ml. To each petri dish containing 10ml of solution, 5~10 worms were introduced and incubated at 37°C. Motility of worms was observed at 5, 15, 30, 60 minutes, 1, 2, 4 and 6 hours after incubation. For light microscopy, worms were fixed in 10% formalin under cover glass pressure and stained with Semichon's acetocarmine.

The results were as follows:

1. In 0.01 $\mu$ g/ml praziquantel, the worms had their mobility until 6 hours post treatment. However, worms in over 0.1 $\mu$ g/ml of praziquantel contracted within 5 minutes and immobilized.
2. Intestine of the worm incubated in 0.001 $\mu$ g/ml praziquantel for 5 minutes was dilated and intestinal wall was thickened.
3. In incubated over 0.1 $\mu$ g/ml praziquantel, pharynx of the worm protruded out from oral sucker.
4. The lowest effective lethal concentration of praziquantel on *H. continua* was 0.1 $\mu$ g/ml. The worms exposed to the drug were observed to be immobilized immediately after incubation in solutions of over 0.1 $\mu$ g/ml concentration. All of the worms in early period showed severe contraction and those in late period showed severe dilation.

**Key words:** *Heterophyopsis continua*, praziquantel, *Lateolabrax japonicus*, *in vitro*.

#### 서 론

*Heterophyopsis continua*는 이형흡충과(Family Heterophyidae)에 속하는 장흡충의 하나이며 성충은 물고

기를 먹고 사는 조류나 포유동물의 소장에 기생한다.<sup>1</sup> 이 흡충은 Onji와 Nishio<sup>2</sup>가 일본에서 송어에서 분리한 피낭유충을 개에 실험감염시켜 성충을 회수하여 최초로 보고하였다. *H. continua*의 종속주로는 개<sup>3</sup>, 오리

와 고양이<sup>2,4</sup>, 갈매기<sup>5</sup>와 사람이 보고 되었다. 사람은 물고기를 생식함으로써 감염되며 인체감염례는 일본에서 처음 보고 되었고<sup>3</sup> 우리나라에서는 서 등<sup>6</sup>에 의해 2례가 보고 되었다.

우리나라에서 인체 감염원이 되는 제 2 중간숙주로는 농어(*Lateolabrax japonicus*), 문절망둑(*Acanthogobius flabimanus*), 전어(*Clupanodon punctatus*) 및 은어(*Plecoglossus altivelis*)가 보고 되었다.<sup>7,8</sup>

장흡충류 감염시의 치료는 tetrachotethylene bithionol 및 niclosamide 등이 효과적이거나 사용상의 번거로움과 부작용 때문에 사용이 제한되어 왔다. 현재 Praziquantel은 acetylated isoquinolino-pyrazine의 하나로서 많은 종류의 조충류와 흡충류에 높은 구충효과를 나타내는 구충제로 많이 사용되고 있다.<sup>9-12</sup> Praziquantel의 약리기전은 충체의 표피에 작용하여 초기에는 근육의 수축을 일으키고 후기에는 근육을 이완시키며 생식기관에 손상을 주며 또한 표피에 수포와 공포를 형성하여 표피를 파괴한다고 하였다.<sup>10,12-16</sup> 그러나 praziquantel의 약리기전은 확실하게 밝혀지지 않은 상태이다.

따라서 장흡충류에 대한 praziquantel의 살충효과 및 약리기전에 대해서는 앞으로 많은 연구가 추진 되어야 하겠다. 본 연구에서는 praziquantel을 함유한 TC199 배지에서 *H continua*를 배양하면서 충체의 활동성을 관찰하여 *H continua*에 대한 Praziquantel의 최저 살충농도를 확정하고 각 기관의 변화를 광학 현미경으로 관찰하여 praziquantel의 작용기전을 이해하는데 필요한 지견을 제공하고자 하였다.

### 재료 및 방법

*H continua*의 피낭유충은 1987년 8월 25일에 경남 삼천포 수산시장에서 구입한 41마리의 농어를 인공소화시켜서 해부현미경하에서 수집하였으며 수집된 피낭유충을 2~3주령의 병아리(마니커, 천호부화장) 5마리

에 300개씩 경구감염 시켰다. 감염후 제 8일에 병아리를 경추탈구법으로 희생시키고 소장으로부터 충체를 회수하였다.

실험용 배지는 TC199 500mg을 3차증류수 500ml에 녹여서 냉장 보관하였고 NaHCO<sub>3</sub> 0.175g을 사용하기 전에 첨가하였다. Praziquantel 600mg을 absolute ethanol 21ml에 녹인 다음 증류수를 첨가하여 60ml을 만들고 TC199배지에 0.01, 0.01, 1, 10µg/ml 농도로 희석하여 실험용액(working solution)을 준비하였다. 대조군의 용액은 TC199에 ethanol을 같은 농도로 첨가하여 사용하였다. 준비된 각 농도의 배양액 10ml에 충체를 5~10마리씩 넣고 37°C에 배양하면서 5, 15, 30, 60분 및 2, 4, 6시간에 충체의 활동성을 관찰하였고 실험시간별로 형태학적인 변화를 관찰하기 위하여 광학현미경용 표본을 준비하였다. 표본은 각 농도군의 5, 15, 30, 60분 작용군에서 5마리씩 꺼내어 준비하였다. 그 다음에 neutral 10% formalin으로 cover glass 압력하에서 고정하였으며 고정된 충체는 Semichon's acetocarmine으로 염색하여 balsam으로 포매한 다음 관찰하였다.

### 결 과

**Praziquantel 용액내에서 충체의 활동성**: 대조군의 충체는 배양 6시간까지 매우 활발히 움직이고 있었다. Praziquantel 0.01µg/ml 실험군의 충체에서는 대조군의 충체보다 활동성이 떨어지기는 했으나 6시간까지 활동성을 보였다. Praziquantel 0.1µg/ml 이상의 실험군에서는 배양 5분 이내에 충체가 수축하여 관찰하는 6시간 동안 계속하여 움직이지 않았다(Table 1). 따라서 시험관내에서 *H continua*에 대한 praziquantel의 최저 살충농도는 0.1µg/ml이라고 생각되었다.

**광학현미경적 관찰**: Praziquantel을 함유하지 않은 배양액에서 60분 배양한 충체는 배·복면으로 평편하고 긴 나뭇잎 모양을 한 원통형이었다. 구흡반은 충체

**Table 1.** Activity of *H continua* after incubation in solution with various concentrations of praziquantel

| Praziquantel concentration<br>(µg/ml) | Activity of worms after |       |       |       |     |     |     |
|---------------------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
|                                       | 5min                    | 15min | 30min | 60min | 2hr | 4hr | 6hr |
| 10                                    | —                       | —     | —     | —     | —   | —   | —   |
| 1                                     | —                       | —     | —     | —     | —   | —   | —   |
| 0.1                                   | —                       | —     | —     | —     | —   | —   | —   |
| 0.01                                  | ‡                       | ‡     | ‡     | ‡     | ‡   | ‡   | ‡   |
| control                               | ‡                       | ‡     | ‡     | ‡     | ‡   | ‡   | ‡   |

\*\_‡ : very active, ‡ : moderately active, + : slightly active, — : immobilized.

의 최전방에 위치하고 복흡반은 총체 1/3 수준에 위치하였다(Fig 1). 복흡반의 오른쪽 바로 후방에는 rodlet를 갖고 있는 생식흡반이 위치하였다. 저장낭은 복흡반의 후방에 위치하고 2~3엽으로 나누어져 있으며 난소는 구형으로 총체의 중앙에 있다. 전·후고환은 구형으로 총체의 후반부에 직렬로 배열되어 있었다. 장(cecum)은 복흡반의 앞에서 이분지되어 총체의 후반까지 뻗어 있었다(Fig 2).

Praziquantel 0.01 $\mu$ g/ml 농도에서 5분 배양한 총체는 대조군의 총체에 비해 수축되었고 구·복흡반 및 생식기관의 변화는 관찰되지 않았고 장(cecum)의 팽대가 식도에서부터 말단까지 관찰되었고 장벽은 매끄러웠으며 염색성이 짙어진 것이 관찰되었다(Fig 3). 15분 배양한 총체에서는 장의 팽대가 다소 가라앉고 30분 작용시킨 실험군에서는 다시 장이 팽대되고 장벽이 비후되었으며 구부러져 있던 저장낭의 우엽이 난원형이 되었다. 60분 된 실험군에서는 장의 팽대가 조금 더 심해졌다.

Praziquantel 0.1 $\mu$ g/ml 농도에서 배양한 전 실험군에서는 총체의 근육이 수축되어 총체 후반부의 폭이 넓어졌으며 인두가 구흡반 밖으로 돌출되었거나 구흡반 내로 밀려 올라가 있는 것이 관찰되었다(Fig 4). 장은 팽대되었고 장벽은 비후되어졌으며 자궁내 총란의 양이 감소했으며 저장낭 내의 경자가 사출되어 저장낭의 크기가 축소된 것이 관찰되었다(Fig 5).

Praziquantel 1 $\mu$ g/ml 농도에서 5분 배양한 총체에서는 구흡반과 인두사이가 이완되고 인두가 구흡반내로 밀려 올라간 것이 없었다. 장이 심하게 팽대되었으며 장벽은 비후되고 장의 내강내에서 삼출물이 관찰되었다(Fig 6). 저장낭의 수축은 관찰되지 않았다. 15, 30, 60분 배양한 총체에서는 인두가 구흡반내에 있거나 돌출되었으며 장의 팽대와 장벽의 비후는 계속해서 관찰되었다. 저장낭의 수축 및 총란의 감소는 관찰되지 않았다.

Praziquantel 10 $\mu$ g/ml 농도에서 5분 배양한 총체에서는 전반부의 이완이 현저하였으며 배양시간이 경과할수록 더 이완되는 경향을 보였다. 인두가 구흡반 밖으로 돌출된 총체는 없었다. 장은 팽대되고 비후되었으며 내강에서 삼출물이 관찰되었다(Fig 7). 15분 배양한 총체는 장이 팽대되어 풍선처럼 된 부분도 있었다. 장벽은 비후되고 내강이 넓어졌으며 내강에는 삼출물이 있었다. 30분 된 총체에서는 총체의 전반부가 이완되어 cone 모양을 하고 있으며 후반부는 더 수축되었다. 장은 팽대되었고 내강의 넓어짐은 뚜렷하지 않았으며 삼출물도 적었다. 60분 된 총체에서는 전반

부의 이완이 현저하였고 인두가 구흡반 내에 있거나 돌출 되어졌다. 장이 팽대되었고 심한 부분은 풍선 모양을 하였으며 내강에는 삼출물이 있었다(Fig 8).

## 고 찰

본 연구에서는 praziquantel이 시험관내에서 0.1 $\mu$ g/ml의 낮은 농도로 *H continua*에 대해 살충효과를 나타내는 것을 관찰하였다. *H continua*는 0.01 $\mu$ g/ml의 praziquantel 농도에서 근육이 수축되었지만 운동성은 나타내었다. 0.1 $\mu$ g/ml 농도 이상에서는 praziquantel에 노출되는 즉시 근육이 수축되어 운동성을 상실하였다. 따라서 *H continua*에 대한 praziquantel의 시험관내 최저살충농도는 0.1 $\mu$ g/ml로 생각 되어진다. Praziquantel에 노출된 총체는 초기에는 근육이 수축되고 배양시간이 경과함에 따라 총체의 전반부가 이완되었다. 0.01 $\mu$ g/ml 농도에서는 배양 5분 이내에 총체가 수축되었으나 0.1 $\mu$ g/ml 이상 농도에서는 배양 즉시 수축되었다. 이러한 총체의 빠른 근육수축은 praziquantel이 총체내에 빠르게 흡수된다는 연구결과와 일치한다.<sup>17</sup> Praziquantel로 처치한 흡충에서 전반부의 이완은 *C sinensis*<sup>18</sup>, *Schistosoma mansoni*<sup>15</sup>와 *F seoulensis*<sup>12</sup>에서 관찰되었다.

본 연구에서는 10 $\mu$ g/ml의 praziquantel 농도에서 60분 배양한 총체에서 전반부 이완이 현저하게 나타났다. 이러한 총체의 이완은 근육의 수축후 총체가 죽음으로서 나타나는 현상으로 추측 되어진다. 이 등<sup>14</sup>이 *P westermani*을 시험관내에서 praziquantel로 처치한 후 총체를 조직절편하여 관찰한 바에 의하면 표피하층과 합포체에 공포가 형성되고 난소의 배아층에도 많은 공포가 형성되어 난소의 윤곽이 불규칙해지며 고환의 배아층에도 많은 공포가 형성된다고 하였다. 장은 장상피세포가 비후되어 장관이 좁아지고 용모에 작은 수포가 형성된다고 하였다. 본 연구에서 *H continua*의 장 팽대와 장벽의 비후가 관찰되었으며 1 $\mu$ g/ml 이상 농도에서는 장내에 삼출물이 관찰 되었다. 또한 인두가 앞쪽으로 밀려서 구흡반내에 존재하거나 돌출되었으며 인두의 돌출은 0.1 $\mu$ g/ml 농도에서 가장 현저하였다. 장의 변화는 praziquantel이 표피 뿐만 아니라 소화관을 통해서도 흡수되며 총체내의 모든 장기와 조직에 고루 분포하여 각 조직에 손상을 준 결과이다. 인두의 돌출은 praziquantel의 작용으로 인한 총체의 강한 수축에 기인되는 것 같다.

이상을 종합해보면 *H continua*에 대한 praziquantel의 살충작용은 초기에는 근육을 수축시키고 후기에는 근육이 이완되는 것으로 보아 praziquantel이 총체의

신경을 마비시킴으로서 충체를 죽이는 것으로 사료되었다. 또한 praziquantel이 생식기관 및 장관에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

## 결 론

Praziquantel의 *H. continua*에 대한 시험관내 살충효과를 관찰하고자 본 실험을 하였다. 충체는 농어에서 수집한 피낭유충를 병아리에 경구 감염시키고 8일 후에 회수하여 사용하였다.

배양액은 TC199배지에 praziquantel을 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu$ g/ml의 농도로 희석하여 사용하였으며 각배양액 10ml에 충체를 5~10마리씩 넣고 37°C incubator에 배양하면서 작용후 5, 15, 30, 60분 및 2, 4, 6시간에 충체의 운동성을 관찰하고 광학현미경용 표본을 제작하여 관찰하였다.

그 결과는 다음과 같다.

1. Praziquantel의 최저살충농도는 0.1 $\mu$ g/ml이었으며 배양후 5분 이내에 충체가 수축하여 움직이지 않았다.

2. 0.01 $\mu$ g/ml 농도에서 5분배양한 충체는 운동성은 관찰되었으나 장관은 확장되었고 장벽은 두꺼워졌다.

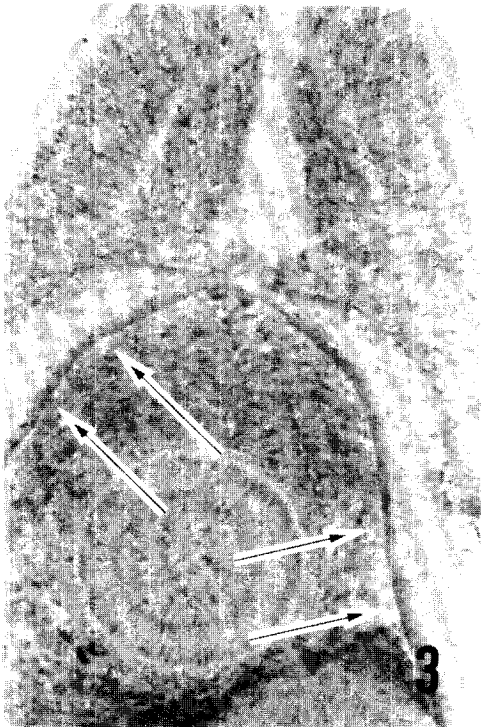
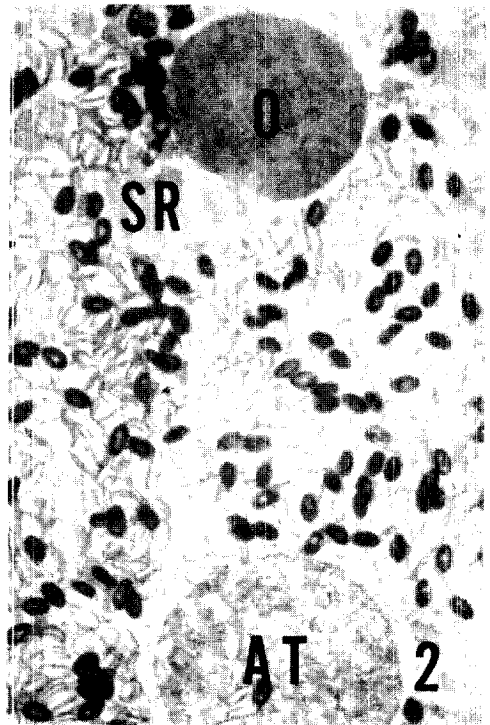
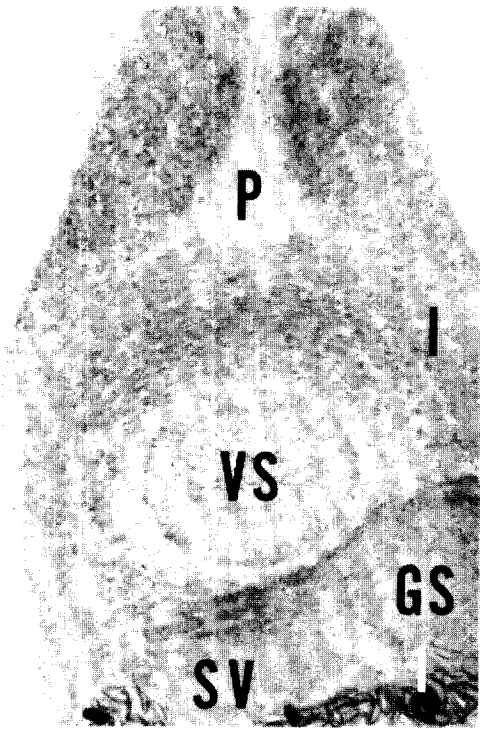
3. 0.1 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 배양한 충체는 인두가 구흡반의 전방으로 돌출되었다.

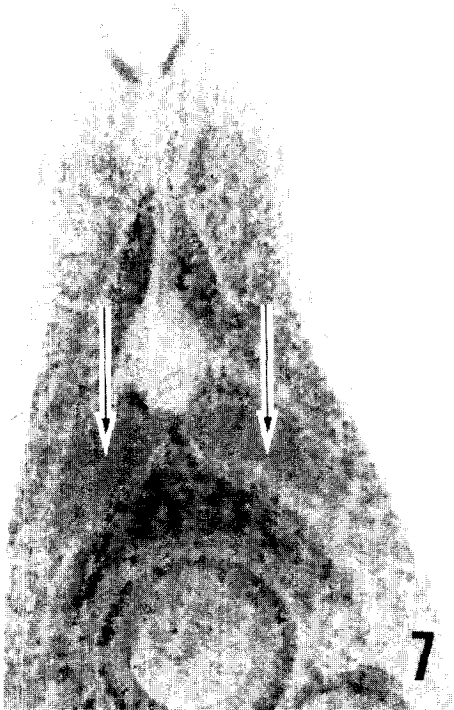
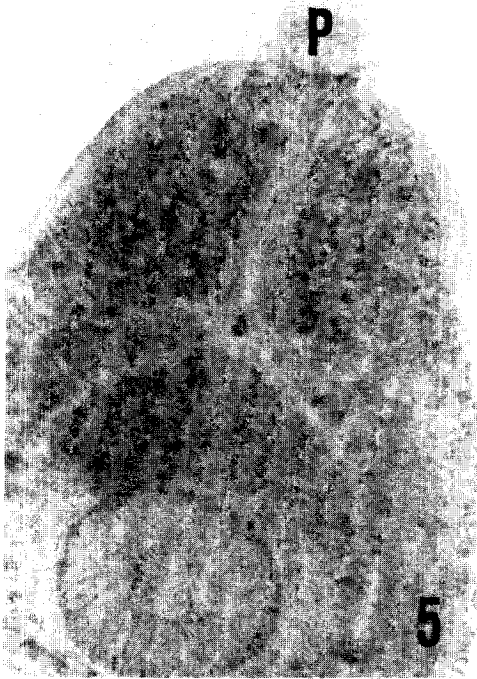
4. 1 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서는 충체의 구흡반과 복흡반의 사이가 현저히 이완되었다.

Praziquantel에 노출된 충체는 초기에는 심하게 수축하였고 후기에는 구흡반과 복흡반사이가 이완되었다 따라서 praziquantel은 충체의 표피 미세구조에 작용함으로써 그 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

## Legends for figures

- Fig 1.** Anterior body of control worm shows pharynx(P), intestine(I), ventral sucker(VS), genital sucker(GS) and seminal vesicle(SV). Semichon's acetocarmine stained(SA),  $\times 100$ .
- Fig 2.** Middle portion of control worm shows ovary(O), seminal receptacle(SR) and anterior testis(AT). SA,  $\times 100$ .
- Fig 3.** Anterior body of *H. continua* incubated in 0.01 $\mu$ g/ml praziquantel solution for 5 minutes. dilated intestine and thickened intestinal wall(arrows). SA,  $\times 100$ .
- Fig 4.** Seminal vesicle of a worm incubated in 0.01 $\mu$ g/ml praziquantel solution for 5 minutes. SA,  $\times 100$ .
- Fig 5.** Anterior body of *H. continua* incubated in 0.1 $\mu$ g/ml praziquantel solution for 5 minutes. Pharynx(P) protruded out from oral sucker. SA,  $\times 100$ .
- Fig 6.** Anterior body of *H. continua* incubated in 1 $\mu$ g/ml praziquantel solution for 5 minutes. Intestine was dilated and filled with exudate. SA,  $\times 100$ .
- Fig 7.** Anterior body of *H. continua* incubated in 10 $\mu$ g/ml praziquantel solution for 5 minutes. Intestine was filled with exudate. Length between oral sucker and pharynx were elongated. SA,  $\times 100$ .
- Fig 8.** Anterior body of a worm incubated in 10 $\mu$ g/ml praziquantel solution for 15 minutes. Severely dilated intestine was filled with exudate. SA,  $\times 100$ .





## 참 고 문 헌

1. Yamaguti S. *Digenetic trematodes of vertebrate. Systema Helminthum*. 1958;699~724 & 865~885.
2. Onji Y, Nishio T. *A review on new intestinal parasites*. Igaku Chuo Zasshi 1916;14(8):439~442(in Japanese)
3. Yamaguti S. *Studies on the helminth fauna of Japan. Part 27. Trematodes of mammals II*. Jap J Med Sci 1939b;1(3):131~151.
4. Onji Y, Nishio T. *A monograph of intestinal trematodes*. Chiba Igaku Zasshi 1924;2(3):113-161.(in Japanese)
5. Yamaguti S. *Studies on the helminth fauna of Japan. Part 25 Trematodes of birds IV*. Jap J Zool 1939a;8(2):131~210.
6. Seo BS, Lee SH, Chai JY. Studies on intestinal trematodes in Korea XIII. Two cases of natural human infection by *Heterophyopsis continua* and the status on metacercaria infection in brackish water fishes. *Korean J Parasit* 1984; 22(1):131~210.
7. Cho SY, Kim SI. *Plecoglossus altivelis* as a new fish intermediate host of *Heterophyopsis continua* *Korean J Parasit* 1985;23(1):173~174.
8. 전세규, 반 염수산 어류를 제 2 중간숙주로 하는 흡충류에 관한연구. 제 1 보 *Lateolabrax japonicus* 를 중간숙주로 하는 *Heterophyes continus*에 대하여, 부산수산대학 연구보고, 1960;3:40~42.
9. Andrews P, Thomas H, Pohlke R. et al. Praziquantel. *Medicinal Res Rev* 1983;3(2):147~200.
10. Becker B, Mehlhorn H, Andrews P. et al. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica*(trematoda) *in vitro*. *Z Parasitenkd* 1980;63:113~178.
11. Gonnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z Parasitenkd* 1977;52:129~150.
12. Lee SH. *In vitro* effects of praziquantel on *Fibricola seoulensis*. *Seoul J Med* 1985;26(1):41~51.
13. Lee SH, Chai JY, Seo BS. Studies on intestinal trematodes in Korea XVIII. Effect of praziquantel in the treatment of *Fibricola seoulensis* infection in Albino rats. *Korean J Parasit* 1985;23(1): 41~46.
14. Lee SH, Park HJ, Hong SJ. et al. *In vitro* effect of praziquantel on *Paragonimus westermani* by light and scanning electron microscopic observation. *Korean J Parasit* 1987;25(1):24~36.
15. Mehlhorn H, Becker B, Andrews P. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. *Drug Res* 1981;31 (1):544~554.
16. Mehlhorn H, Kojima S, Rim HJ, et al. Ultrastructural investigations on the effects of praziquantel on human trematodes from Asia; *Clonorchis sinensis*, *Metagonimus yokogawai*, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus westermani* and *Schistosoma japonicum*. *Drug Res* 1983;33(1): 91~98.
17. Andrews P, Thomas H, Weber H. The *in vitro* uptake of <sup>14</sup>C-praziquantel by cestodes, trematodes, and a nematode. *J Parasit* 1980;66(6):920~925.
18. Kim SS, Kim SJ, Rim HJ. Electron microscopic studies on the effect of praziquantel to *Clonorchis sinensis*. *Korea Univ Med J* 1982;19(1):91~105.