

## 요꼬가와흡충의 성장기간별 蟲體組織內 抗原性 部位

高麗大學校 醫科大學 寄生蟲學教室 및 熱帶風土病研究所, 翰林大學校 自然科學大學 生物學科\*

林 漢 鍾·金 洙 鎮\*·梁 美 京

**요 약 :** 요꼬가와흡충(*Metagonimus yokogawai*)이 숙주의 장에 기생하여 成熟하는 동안 숙주에게 항체생성을 誘發하는 물질이 蟲체 조직내 분포하는 부위를 규명하고, 특정 성숙기간 동안 숙주로부터 생성된 항체의 면역반응 정도를 확인하기 위하여 요꼬가와흡충 피낭유충을 실험고양이에 감염시키고, 成熟段階別 蟲체와 면역항체를 얻었다. 蟲체의 조직항원과 면역항체를 반응시키고 황금입자를 표지하여 황금입자가 표지된 조직항원은 전자현미경으로 관찰하였다. 표지된 황금입자의 밀도에 따라 조직성분의 항원성을 측정할 결과 감염군 면역항체를 반응시킨 경우 숙주 체내에서 4주와 8주 그리고 12주 동안 성장한 蟲체 조직항원은 표피층의 표피세포에 다소 높은 밀도의 황금입자가 표지되어 항원성이 강한 것으로 관찰되었다. 16주와 20주간 성장한 蟲체의 조직항원은 표피층의 液胞에 황금입자의 표지가 현저하게 증가하여 16주이상 성장한 蟲체 표피층의 液胞를 구성하는 물질이 항원성이 강한 것으로 관찰되었다. 柔軟組織의 분비과립은 蟲체의 감염기간에 상관없이 일정하게 항원성이 나타났으나 盲管上皮는 16주 이상 성장한 蟲체부터 항원성이 다소 미약해졌다. 숙주가 생성하는 요꼬가와흡충에 대한 항체는 감염 후 4주부터 12주사이에는 蟲체의 성장기간과 상관없이 인정량으로 숙주의 혈청 내에 존재하는 것으로 생각되었으나 16주 이후에는 다소 감소하는 것으로 생각되었다.

**Key words:** *Metagonimus yokogawai*, antigenic localization, immunogoldlabeling method

### 緒 論

요꼬가와흡충(*Metagonimus yokogawai*)에 감염된 숙주는 백혈구가 증가하고 숙주의 면역계가 면역항체를 형성한다는 사실은 이미 많은 연구 보고가 있었기에 요꼬가와흡충증의 진단에 분변검사나 더불어 ELISA 법등의 면역학적 진단법들이 사용되고 있다.

안들(1991)은 요꼬가와흡충(*Metagonimus yokogawai*)이 실험동물에 감염되어 다양한 분비단백질 혹은 대사산물을 分泌하여 숙주의 면역계를 자극하고, 숙주의 장상피세포와 항상 접촉하고 있는 蟲체표피의 구성 물질이 숙주에게 항체를 생성하게 한다는 사실을 황금입자 표지법으로 확인한 바 있다. 따라서 면역학적 진단에 蟲체 조항원을 사용하는 ELISA법과 동시에 蟲체조직을 항원으로 이용한 황금입자 표지법 등이 사용되어 요꼬가와흡충의 감염여부를 확인할 수 있게 되었다.

그러나 흡충류의 蟲체가 지니고 있는 항원성 물질들이 숙주 체내에서 蟲체들이 생존하는 동안 계속적으로 혹은 특정 기간동안 동일한 물질이 숙주의 면역계를 자극하여 면역항체를 생성하게 하는지는 확실하지 않다.

최근에 林들(1992)에 의하면 폐흡충이 발육단계별 숙주의 면역계를 자극하는 물질은 성숙정도에 상관없이 유연조직의 분비과립과 맹관 그리고 배설낭의 구성 물질들이며, 폐흡충 유약성 층은 표피성물질이 강한 자극을 하고 12주 이상 성숙한 蟲체는 난황세포의 구성 물질들이 자극을 극대화하는 것으로 보고한 바 있다.

안들(1991)에 의하면 요꼬가와흡충 역시 표피조직을 구성하는 물질과 분비물질들이 폐흡충에 비하여 항원성의 정도에 있어서는 상이하지만 항원성을 지니고 있으며 蟲체 표피에 존재하는 蟲체 표피성 물질이 특히 많은 항체를 생성하게 한다는 사실을 보고한 바 있다. 그러나 요꼬가와흡충이 林들(1992)과 주들(1989)이 보고한 폐흡충에서와 같이 蟲체의 성숙정도에 따라 각기 다른 항원성 물질이 숙주의 면역계를 자극하여 다른 면역항체가 숙주로부터 생성된다면 면역학적 진단법에 사용되는 항원과 항체들은 고려되어야 할 것이다.

따라서 저자는 요꼬가와흡충이 숙주에 감염되어 성숙한 후 일정기간 경과한 성충들을 각각 조직항원으로 사용하고 이에 감염 후 일정기간에 얻은 면역항체들을 각각 면역 반응시키고 황금입자를 표지하였다. 황금입자를 표지한 조직항원들은 전자현미경으로 관찰하여 요꼬가와흡충 조직항원의 0.1 μm<sup>2</sup>에 표지되는 황금입자의 수를 측정하고자 한다. 표지된 황금입자의 수로 변

역반응정도를 비교검토함으로써 요꼬가와흡충의 성장 기간별 항원성 물질이 존재하는 부위를 확인하고 숙주 체내에서 생성되는 면역항체의 생성과 변화를 알아보고자 하였다.

### 實驗材料 및 方法

#### 1. 實驗材料

요꼬가와흡충 충체를 얻기 위하여 은어(*Plecoglossus altivelis*)로부터 분리한 요꼬가와흡충 피낭유충을 체중 1 kg의 실험고양이 15마리에 약 500개씩 각각 經口 感染시키고 4주와 8주 그리고 12주와 16주 및 20주 후에 요꼬가와흡충의 감염기간별로 3마리씩 고양이를 부검하여 장상피조직의 미세용모에 부착하여 기생하는 요꼬가와흡충 충체를 분리하였다.

면역항체(IgG)는 요꼬가와흡충 충체를 얻기 위해 감염된 실험고양이를 부검할 때 감염기간별로 4주와 8주 및 12주와 16주 그리고 20주 후에 각각 혈액을 얻는 동시에 실험고양이들은 부검한 후 요꼬가와흡충 충체의 감염정도를 확인하였다.

대조군의 면역항체는 분변검사 등으로 요꼬가와흡충 등 기생충에 감염되지 않은 3마리의 실험고양이로부터 혈액을 채취하여 면역항체(IgG)를 분리하였다.

#### 2. 實驗方法

**組織抗原:** 요꼬가와흡충 組織抗原을 실험고양이로부터 얻은 성장기간별 요꼬가와흡충 충체를 1% paraformaldehyde와 1% glutaraldehyde 고정액(pH 7.4)에 2시간 前固定하고 0.12 M cacodylate buffer(pH 7.4)에서 세척하였다. 前固定된 충체들은 2% osmium tetroxide 고정액에 1시간 30분간 後固定하고 alcohol 탈수후에 Lowicryl HM20 mixture에 처리하고 60°C oven에서 24시간 포매하였다. 包埋된 충체는 Reichert-Jung ultramicrotome으로 절편을 만들어 면역반응의 조직항원으로 사용하였다.

**免疫抗體:** 요꼬가와흡충을 감염시키고 4주와 8주 및 12주와 16주 그리고 20주가 경과한 실험고양이에서 분리한 혈청과 요꼬가와흡충에 감염되지 않은 고양이 혈청들을 각각 saturated ammonium sulfate와 60:40으로 혼합하여 Sorvall ultracentrifuge의 A841 rotor 18,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 분리한 면역항체를 면역반응에서 1차 면역항체로 사용하였다. 황금표지항체는 직경 12 nm인 황금입자(colloidal gold)용액에 0.05% protein A 용액을 첨가하여 초원심분리하여 제작한 황금표지 단백질 A 복합체(protein A gold complex)를 면역반응에서 2차 면역항체로 사용하였다.

**免疫反應:** 朱들(1991)과 권들(1991)의 방법에 따라 grid에 부착된 요꼬가와흡충 조직절편을 saturated sodium metaperiodate에 처리한 다음 0.02 M tris buffer(pH 8.2)로 세척하여 실험고양이들의 면역항체들을 각각 tris buffer와 1:100으로 희석하여 각각 반

응시켰다. 실험고양이들의 면역항체들과 반응시킨 조직절편들은 protein A gold complex용액에 반응시킨 후 0.02 M tris buffer (pH 8.2)와 증류수로 세척하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

**電子顯微鏡 觀察:** 중금속에서 이중염색한 충체 조직항원은 Zeiss EM109 전자현미경으로 12,000배의 확대배율로 관찰하였으며 성숙단계별 충체 항원에 반응하는 면역항체의 반응정도는 충체의 조직 0.1 μm<sup>2</sup>당 표지된 황금입자의 수로 비교하였다.

### 實驗成績

#### 1. 對照群 실험고양이 免疫抗體 反應

**가. 4주와 8주 그리고 12주 蟲體:** 기생충에 감염되지 않은 대조군 실험고양이들의 면역항체를 감염 후 4주와 8주, 12주 동안 성장된 요꼬가와흡충 충체조직항원에 각각 반응시킨 결과 충체의 조직세포들에 황금입자는 관찰되지 않았으나 요꼬가와흡충의 미세구조는 정상적인 구조이었다.

표피합포체 tegumental syncytium)는 基底層의 기저막(basement membrane)으로 구별되고, 충체 외부로 포피용기 tegumental ridge)를 형성하고 합포체를 구성하는 원형질층에는 크기가 다양한 미토콘드리아(mitochondria)와 반상(discoidal)과 棒狀의 분비체(secretory body)들과 전자밀도가 높은 皮棘들로 구성되어 있었다. 포피합포체에 매몰된 皮棘은 기저막에서부터 시작하여 충체의 위로 돌출하고 전자밀도가 높은 물질들이 균일하게 구성되어 있었다(Fig. 1).

基底層(basal lamina)은 기저막(basement membrane)으로 합포체층과 근육층을 분리시키며 전자밀도가 낮은 물질들로 구성되어 있었고, 포피세포의 원형질 돌기 tegumental cell cytoplasmic process)와 포피합포체 사이의 연결부위는 기저층의 분리가 명확하게 관찰되었다(Fig. 1).

근육층은 環狀筋(circular muscle)과 縱走筋(longitudinal muscle)이 기저층과 연결되어 배열하고 있으며 筋層사이로 부분적이거나 포피세포 원형질 돌기가 통과하고 있었다. 종주근과 환상근 사이에는 棒狀의 미토콘드리아가 밀집하여 분포하고 전자밀도가 낮은 물질로 구성된 포피세포 원형질과 세포간질(interstitial matrix)이 관찰되었다(Figs. 1 & 5).

포피세포는 원형질에 많은 미토콘드리아를 포함하고 핵소체가 명확하지 않은 유형의 세포도 관찰되었으며 핵소체가 잘 발달되고 다수의 미토콘드리아와 조면소포체(rough endoplasmic reticulum) 그리고 골지복합체(golgi complex)를 포함하고 있는 세포들이 관찰되어 그 종류가 명확하게 구별되었다. 핵소체가 잘 발달된 포피세포는 원형질이 포피합포체의 구성물질인 盤狀, 棒狀分泌體들로 채워져 있었으며 이들 원형질 물

질들은 표피합포체와 연결된 원형질 돌기가 형성되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 5).

맹관은 맹관상피층과 막구조물인 맹관상피막층(caecal epithelial lamellae)으로 구성되어 있으며 막구조물들은 상피층에서 맹관 내강으로 돌출하여 발달되어 있었으며 크기와 전자밀도가 다양한 盲管內 소화물질들이 부분적으로 관찰되었다. 맹관상피층은 합포체 부분과 근육층 그리고 맹관 상피세포층으로 구별되고 細胞間質은 조면소포체가 잘 발달되어 있었다. 세포질은 전자밀도가 낮은 물질로 구성된 부분과 미소과립을 포함하는 부분 그리고 미토콘드리아가 밀집한 부분들이 원형질막에 의하여 나누어져 관찰되었다(Fig. 8).

分泌顆粒(secretory granule)은 충체의 유조직층에 크기가 다양하게 관찰되었으며 분비과립 주위에는 조면소포체가 잘 발달되어 있었으며 분비세포의 핵주변 부위의 과립은 크기가 작은 것으로 관찰되었으나 핵으로부터 떨어진 과립들은 크기가 다소 큰 과립이 주로 관찰되었다(Figs. 12 & 13).

卵黃腺은 근층과 기저층들에 의하여 유조직과는 구별이 가능하였으며 여러 개의 난황세포들로 구성되어 있다. 난황세포들은 과립들을 크기가 다양하고 하나의 과립이 이등분 혹은 삼등분되어 전자밀도가 높게 관찰되었다. 난황세포의 핵세포와 핵막이 잘 발달되어 있었으며 조면소포체가 전자밀도가 높은 과립들 사이로 잘 발달되어 세포질의 대부분을 차지하고 있었다(Fig. 14).

배설낭 상피층은 배설낭 상피막구조물(epithelial lamellae of excretory bladder)이 내강으로 발달되었으며 표피세포층은 미소과립을 많이 포함하는 원형질로 구성되어 있었다(Fig. 15).

나. 16주와 20주 : 숙주의 체내에서 16주와 20주 동안 성숙한 충체의 조직항원에 대조군의 실험 고양이 면역항체를 각각 반응시킨 결과 황금입자는 관찰되지 않았으나 미세구조는 다소 특이하였다.

충체표피의 합포체에 많은 液胞(vesicle)들이 다양한 형태로 관찰되었으며 皮棘의 주변에도 많은 액포들이 관찰되었다. 이들 액포들은 몇개씩 융합하여 크기가 다양하게 변형된 것도 관찰되었으며 液胞의 내부에 전자밀도가 다소 높은 과립을 포함하는 것들도 관찰되었다(Fig. 2).

기저층은 굴곡이 다소 심하게 나타났으며 기저층을 구성하는 물질들은 전자밀도가 균일하게 관찰되었다(Fig. 2).

근층은 환상근과 종주근이 배열되어 있으나 근층사이로 표피합포체와 표피세포 원형질이 연결되는 원형질 돌기들은 많은 수의 액포를 포함하고 있었으며 근층과 표피세포의 원형질 사이에 액포들로 인하여 분리되고 있는 것도 관찰되었다(Fig. 2).

표피세포들은 세포의 미세소기관들이 정상적으로 포함되어 있으나 세포질에 많은 수의 액포들이 관찰되어

표피세포의 세포질이 액포들로 찢잔 세포가 주로 관찰되었다. 조면소포체는 액포들 사이에 부분적으로 관찰되었다(Fig. 2).

맹관은 맹관상피층의 막구조물들이 분화되어 있었으나 맹관 상피세포의 세포질에 조면소포체가 관찰되지 않는 부분이 많았다(Fig. 15).

분비과립과 난황세포의 원형질에 포함된 과립들 그리고 배설낭의 상피층 막구조물들은 4주와 8주 그리고 12주 성숙 충체들의 조직에서와 같이 분화되어 있는 것으로 관찰되었다(Figs. 12 & 13).

## 2. 감염군 실험고양이 免疫抗體 反應

가. 4주와 8주 그리고 12주 충체 : 감염 후 4주와 8주, 12주에 얻은 충체조직 항원들에 각 감염군 실험고양이들의 면역항체들을 반응시킨 결과 충체의 표피합포체와 분비과립 그리고 맹관상피에서 강한 면역반응이 관찰되었으며 난황세포의 과립과 배설낭의 상피에도 다소 특이한 면역반응이 관찰되었다. 미세구조는 대조군의 면역항체를 반응시켰을 때와 동일한 구조가 관찰되었으며 세포 소기관들 역시 동일하게 관찰되었다.

감염 후 4주의 면역항체는 4주 성숙 충체 조직항원과 반응에서 표피합포체에  $24 \pm 3/\mu m^2$ 개의 황금입자가 관찰되었으며 4주, 8주 그리고 12주 성숙충체와의 반응에서 분비과립과 맹관사이에 평균  $13 \pm 1/m^2$ 개의 황금입자가 각각 표지되어 강한 면역반응이 관찰되었다. 4주 면역항체는 4주, 8주, 12주 성숙충체와의 반응은 표피합포체와 맹관상피 및 분비과립들에 특이하게 강한 면역반응이 관찰되었다(Figs. 5, 6, 9, 10, 12 & 13).

감염 후 8주와 12주 및 16주 후의 면역항체는 표피합포체에 평균  $16 \pm 3/\mu m^2$ 개의 황금입자와 분비과립에 평균  $11 \pm 2/\mu m^2$ 개의 황금입자 그리고 맹관상피에 평균  $12 \pm 2/\mu m^2$ 개의 황금입자가 표지되어 강한 면역반응이 관찰되었으며 난황선의 과립에 평균  $3 \pm 1/\mu m^2$ 개와 배설낭의 상피에 평균  $2 \pm 1/\mu m^2$ 개의 황금입자가 표지되어 다소 특이한 면역반응이 나타나는 것으로 관찰되었다(Table 1).

감염 후 20주 면역항체를 4주와 8주 그리고 12주 성숙한 충체조직 항원에 반응시킨 결과 모든 충체조직은 4주 면역항체반응에 비하여 상대적으로 황금입자의 표지가 다소 감소하는 것으로 관찰되었다. 표피합포체에 평균  $10 \pm 3/\mu m^2$ 개로 관찰되었으며 분비과립에 평균  $10 \pm 2/\mu m^2$ 개로 관찰되어 감염 초기의 면역항체들의 반응과 유사하였으나 맹관상피에 평균  $4 \pm 1/\mu m^2$ 개의 황금입자가 표지되어 현저하게 감소하는 것이 관찰되었다.

난황선의 과립과 배설낭의 상피층에는  $2 \pm 1/\mu m^2$ 개와  $1 \pm 1/\mu m^2$ 개의 황금입자로 표지되어 미약한 면역반응이 관찰되었다(Table 1).

나. 16주와 20주 충체 : 감염 후 16주와 20주 성숙

**Table 1.** Quantitative density of the labeled gold particles in each tissues of *Metagonimus yokogawai* reacted with antibodies (IgG)\* obtained from cats infected with *M. yokogawai*. (Mean No. of gold particles/0.1 $\mu$ m<sup>2</sup> of each tissue of the worm of age)

Tissue of the developmental stage		Sera of the experimental animal groups				
		4W	8W	12W	16W	20W
Tegumental syncytium	4th week	24 $\pm$ 3	14 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2
	8th week	16 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	17 $\pm$ 3	14 $\pm$ 1	12 $\pm$ 3
	12th week	18 $\pm$ 3	16 $\pm$ 2	18 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2	10 $\pm$ 3
Secretory granules	4th week	13 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2
	8th week	12 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2
	12th week	13 $\pm$ 3	14 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2
Granules of the vitelline gland	4th week	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
	8th week					
	12th week	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Epithelial lamellae & lumen in the caeca	4th week	12 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1
	8th week	14 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
	12th week	14 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1
Epithelial lamellae in the excretory bladder	4th week	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
	8th week	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
	12th week	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1

\* Cats sera were collected at 4, 8, 12, 16 and 20 weeks after experimental infection with *M. yokogawai* metacercariae.

충체는 실험동물의 소장에서 분리되는 수와 활동정도는 4주 동안 성숙한 충체와 解剖顯微鏡下에서는 동일한 형태의 구조와 활동들이 관찰되었다. 이들 충체들의 조직학원에 감염군 실험고양이들의 면역항체를 반응시킨 결과 미세구조는 대조군의 면역항체를 반응시킨 것과 동일했으나 표피합포체와 유조직세포 분비과정에서 강한 면역반응이 관찰되었다. 특히 표피합포체와 표피세포들이 세포질에 포함되어 있는 액포에 강한 면역반응이 관찰되었다(Figs. 3 & 4).

맹관의 상피는 특이한 면역반응이 관찰되었으나 4주, 8주, 12주 성숙 충체에 비하여 상대적으로 다소 항원성이 감소하는 것으로 관찰되었다(Table 1).

감염 후 4주의 면역항체는 16주와 20주 성장 충체조직학원과 반응에서 황금입자가 평균 13 $\pm$ 2/ $\mu$ m<sup>2</sup>개로 표지되었으며 분비과립에 평균 9 $\pm$ 2/ $\mu$ m<sup>2</sup>개의 황금입자가 표지되어 특이한 면역반응이 나타나는 것으로 관찰되었다. 그러나 맹관상피는 평균 8 $\pm$ 2/ $\mu$ m<sup>2</sup>개의 황금입자가 표지되어 항원성이 다소 감소하는 것으로 관찰되었다(Table 2, Fig. 11).

감염 후 8주, 12주, 16주의 면역항체를 16주와 20주 성숙 충체학원과 반응시킨 결과 표피합포체에 표지되는 황금입자는 16주 면역항체에서 23 $\pm$ 4/ $\mu$ m<sup>2</sup>개로 타항체에 비하여 상대적으로 면역반응이 증가된 것으로

관찰되었다. 특히 표피합포체의 액胞에 강한 면역반응이 관찰되었다. 분비과립은 11 $\pm$ 2/ $\mu$ m<sup>2</sup>개 정도의 황금입자가 표지되어 항체와 항원에 상관없이 유사한 정도의 면역반응이 나타나는 것으로 관찰되었다. 맹관상피는 평균 9 $\pm$ 2/ $\mu$ m<sup>2</sup>개의 황금입자가 관찰되어 4주 성숙 충체에 비하여 상대적으로 다소 감소하는 것으로 관찰되었다. 난황선의 과립과 배설낭 상피는 평균 2 $\pm$ 1/ $\mu$ m<sup>2</sup>개의 황금입자가 표지되어 미약한 면역반응이 나타나는 것으로 관찰되었다(Table 2, Fig. 15).

감염 후 20주 면역항체를 16주와 20주 성장한 충체에 반응시킨 결과 표피합포체는 22 $\pm$ 3/ $\mu$ m<sup>2</sup>개의 황금입자가 표지되어 강한 면역반응이 나타나는 것으로 관찰되었다. 표피합포체의 액胞에 특히 높은 밀도의 황금입자가 표지되어 표피합포체에 강한 면역반응이 나타나는 것으로 관찰되었다. 분비과립은 항체와 항원의 종류에 상관없이 일정한 황금입자의 수가 표지되어 면역반응의 정도가 변화하는 것으로 관찰되었다. 盲管上皮는 3 $\pm$ 1/ $\mu$ m<sup>2</sup>개의 황금입자가 표지되어 면역반응이 매우 미약하였으며 4주의 면역항체반응에 비하여 상대적으로 면역반응이 현저하게 감소하는 것으로 관찰되었다. 난황선의 과립과 배설낭에도 역시 미약한 면역반응이 관찰되었다(Table 2, Figs. 3 & 4).

**Table 2.** Quantitative density of the labeled gold particles in each tissues of *Metagonimus yokogawai* reacted with antibodies (IgG)\* obtained from cats infected with *M. yokogawai*. (Mean No. of gold particles/0.1 $\mu$ m<sup>2</sup> of each tissue of the worm of age)

Tissue of the developmental stage		Sera of the experimental animal groups				
		4W	8W	12W	16W	20W
Tegumental syncytium	16th week	11 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1	23 $\pm$ 4	22 $\pm$ 3
	20th week	15 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2	24 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2
Secretory granules	16th week	10 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1
	20th week	9 $\pm$ 2	11 $\pm$ 3	8 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2
Granules of the vitelline gland	16th week	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
	20th week	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Epithelial lamellae & lumen in the caeca	16th week	7 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	8 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1
	20th week	8 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Epithelial lamellae in the excretory bladder	16th week	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
	20th week	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1

\* Cats sera were collected at 4, 8, 12, 16 and 20 weeks after experimental infection with *M. yokogawai* metacercariae.

### 考 察

요꼬가와흡충의 미세구조는 Inatomi *et al.* (1968)과 Saito *et al.* (1972) 그리고 金들(1986) 및 金(1986) 등에 의하여 많은 연구가 되어 왔다. 그러나 성장기간별 충체의 표피층의 미세구조적 변화는 확인된 바 없었다. 본 실험에서 대조군의 면역항체를 반응시킨 16주 이상 성장된 충체에서 표피층에 液胞가 형성되어 표피합포체와 표피세포의 세포질에 다양한 크기의 많은 液胞가 분포하고 있는 것이 관찰되었다.

金들(1986)에 의하면 4주 동안 성숙한 요꼬가와흡충이 albendazole의 영향을 받았을 때 표피합포체에 공포가 형성되고 이들 공포들은 표피층을 탈락시키는 것으로 보고한 바 있어 본 실험에서 16주 이상 성장한 충체의 표피합포체와 표피세포에서 관찰되는 액포는 충체의 부분적인 노화현상인 것으로 추측되었다.

Chai *et al.* (1979)와 Lee *et al.* (1981) 그리고 Ohnishi & Taufan(1984)에 의하면 요꼬가와흡충이 숙주에 감염되면 숙주의 장상피에 병리학적 증상이 나타남과 동시에 백혈구의 浸潤이 급격히 증가하고 이로 인해 숙주의 면역계가 자극되어 면역 항체형성을 유발하는 것으로 보고하였다. 呂 (1985)는 ELISA값을 측정한 바 요꼬가와흡충은 피낭유충을 감염시킨 후 감염 1주부터 숙주의 면역항체가 충체의 조항원에 대하여 면역반응이 나타나기 시작하는 것으로 보고하였다. 安들(1991)은 감염 후 4주의 면역항체를 4주동안 성장된 충체 조직항원에 반응시킨 결과 표피합포체와 장상피층 및 분비파립에서 특이한 면역반응이 나타났다고

했다.

본 실험에서도 4주부터 20주까지 성장기간별 충체 조직항원에 4주부터 20주까지 감염군의 면역항체를 각각 반응시킨 결과 표피합포체와 장상피층 및 분비파립에 강한 면역반응이 관찰되었다. 그러나 성숙정도와 면역항체의 종류에 따라 면역반응의 정도는 일부 상이하였다.

흡충류의 충체표피층 항원에 관한 연구는 Deelder *et al.* (1985)과 Imai & Nawa (1988) 및 Ikeda & Cikawa (1991) 등에 의하여 연구 보고되었으며 Fujino *et al.* (1989)에 의하면 *Paragonimus ohirai*에서 충체의 성숙시기에 따라 표피합포체의 분비체 형태가 변하며 표피세포에서 합성되어 일정기간 표피합포체로 이동되고 있음을 확인하였다. 林들(1992)은 *Paragonimus westermani*에서 표피합포체의 항원성물질이 유약성충일 때는 숙주의 면역항체형성을 유도하지만 성숙할수록 면역항체형성에 상관이 적은 것으로 보고한 바 있다. 安들(1991)은 4주동안 성숙한 요꼬가와 흡충은 표피합포체의 분비물질이 항원성이 강한 것으로 보고한 바 있다.

본 실험에서 4주부터 12주까지 성숙한 충체의 표피합포체는 강한 항원성이 나타났으며 16주와 20주 성숙한 충체의 표피합포체는 표피합포체에 많이 분포하는 액포에 강한 면역반응이 관찰되었다. 따라서 요꼬가와 흡충이 성숙초기에는 표피합포체의 분비물질을 포함한 표피합포체의 구성물질이 숙주의 면역항체형성에 연관이 있으나 성장기간이 경과할수록 표피합포체의 액포에 포함된 물질이 항원성이 강한 것으로 생각되었다.

흡충류의 유조직층 분비파립의 항원성에 관한 보고

는 成들(1988), 朱들(1990)은 간흡충(*Clonorchis sinensis*)에서 확인하였으며 權들(1991)과 林들(1992)은 폐흡충에서, 安들(1991)은 요꼬가와흡충에서 각각 항원성을 확인하였다. 林들(1992)은 분비과립이 폐흡충의 발육단계와 상관없이 일정한 항원성이 나타난다고 했다.

요꼬가와흡충의 성장기간별 총체의 柔組織層의 분비과립 역시 성숙정도에 상관없이 항원성이 있는 것으로 관찰되었다. 그러나 감염 후 20주의 면역항체반응에서 항원성이 다소 감소하는 것이 관찰되었다. 이는 요꼬가와흡충 역시 폐흡충 및 간흡충과 유사하게 분비과립이 항원성이 있으며 폐흡충과 마찬가지로 총체의 성숙정도에 상관없이 분비과립에 항원성이 유지되는 것으로 생각되었다. 다만 감염 후 20주 이상 경과한 숙주의 면역항체반응에서 면역반응이 다소 감소하는 것으로 사료되었다.

흡충류의 맹관에 존재하는 물질과 맹관 막구조물의 항원성에 관한 연구는 Sun & Gibson(1969)과 成들(1988) 및 朱들(1989)은 간흡충(*Clonorchis sinensis*)의 맹관에 항원성이 있는 것으로 보고했으며 Nash(1974)와 Lichtenberg *et al.* (1974) 및 Hamburger *et al.* (1989) 그리고 De Water *et al.* (1886b)은 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)에서 맹관 내용물이 항원성이 있다고 했다.

폐흡충의 맹관 내용물의 항원성에 관하여는 Yogore *et al.* (1965)이 폐흡충의 생리식염수 추출항원으로 면역확실편을 사용한 결과 항원성이 있다고 했으며 Ohara *et al.* (1985)은 *Paragonimus ohirai*에서 맹관 내용물에서 항원성이 높게 나타나는 것으로 보고하였다. 權들(1991)은 폐흡충에 감염된 실험동물의 IgG를 幼若成嚙의 盲管組織에 반응시키고 황금입자를 표지한 결과 맹관상피의 膜構造物과 맹관 내용물이 숙주에 항원성이 있는 것으로 보고하였다. 安들(1991)은 요꼬가와흡충에서 맹관상피의 膜構造物과 맹관 내용물에 항원성이 있다고 했다.

본 실험에서도 4주부터 16주까지 성숙한 총체의 盲管上皮的 膜構造物과 맹관 내용물에 항원성이 강한 것으로 관찰되었으나 20주 총체는 항원성이 다소 감소하였으며 이는 요꼬가와흡충의 맹관상피의 物質代謝能과 연관이 있는 것으로 생각되었다.

난황세포의 항원성에 관하여는 朱들(1990)은 간흡충에서, 林들(1992)은 폐흡충에서 일정한 성숙한 총체는 난황세포의 과립에 항원성이 나타나는 것으로 보고하였으며 安들(1991)은 요꼬가와흡충에서 난황세포의 과립과 연관이 있는 총란의 외피에서 미약하나마 항원성이 나타난다고 했다.

요꼬가와흡충의 성장기간별 난황세포의 과립들에는 성숙정도와 요꼬가와흡충 감염 후 면역항체의 종류에 상관없이 미약한 면역반응이 나타났으므로 난황세포의 과립에도 항원성이 미약하나마 존재하는 것으로 생각

되었다.

Imai(1979)와 Barsoum *et al.*(1991) 등에 의하면 흡충류에서 분비배설항원은 강한 항원성이 있는 것으로 이미 보고된 바 있으나 요꼬가와흡충은 배설당 상피는 표피합포체와 분비과립 및 맹관상피의 막구조물에 비하여 상대적으로 항원성이 미약한 것으로 관찰되어 항원성은 존재하지만 면역항체와의 반응은 미약한 것으로 생각되었다.

Joo *et al.*(1989)과 Song *et al.*(1991) 및 Sujiyama *et al.* (1987)등에 의하면 흡충류의 체액성·단백질 중의 숙주의 면역항체형성에 관여하는 특이항원에는 요꼬가와흡충의 경우 감염기간과 감염 후 특정기간 경과한 면역항체에 상관없이 일정하게 항원성을 유지하는 분비과립에 존재하는 물질일 것으로 추측되었다.

### 參 考 文 獻

權五成·李駿商·林漢鍾·金洙鎭 (1991) 免疫黃金標識法을 이용한 肺吸蟲 幼若成蟲 조직내 抗原性 部位에 관한 研究. 寄生蟲학잡지, 29(1):31-41.

金洙鎭 (1986) 腸吸蟲 (*Metagonimus yokogawai* Katsurada 1912) 表皮 및 感覺乳頭에 관한 형태학적 연구. 한림대학논문집, 4:79-92.

金永洙·金洙鎭·林漢鍾 (1986) 요꼬가와흡충에 대한 Albendazole의 영향에 관한 연구. 高醫大論集, 23(1):1-12.

成大林·金洙鎭·嚴基善·林漢鍾 (1988) 間接螢光抗體法 免疫黃金標識法을 이용한 肝吸蟲 組織內 항원성 부위에 관한 연구. 高醫大論集, 25(3):813-827.

安 懋·林漢鍾·金洙鎭 (1991) 免疫黃金 標識法을 이용한 요꼬가와흡충의 組織內 抗原性 부위에 관한 연구. 寄生蟲학잡지, 29(3):245-257.

林漢鍾·金洙鎭·宣一朱·李駿商 (1992) 免疫黃金標識法을 이용한 肺吸蟲의 發育段階別 蟲體 組織內 抗原性 部位에 관한 연구. 寄生蟲학잡지, 30(1):1-14.

呂煥旭 (1985) ELISA법에 의한 요꼬가와 감염가토의 항체가 변동에 관한 연구. 숙명여자대학교 석사학위논문.

朱鳳德·林漢鍾·金洙鎭 (1990) 免疫黃金標識法을 이용한 肝吸蟲의 體液抗原에 관한 연구. 寄生蟲학잡지 28(1):11-23.

Barsoum, I.S., Kamal, K.A., Bassily, S., Deelder, A.M. and Colley, D.G.T.I (1991) Diagnosis of human schistosomiasis by detection of circulating cathodic antigen with a monoclonal antibody. *J. Infect. Dis.*, 164(5):1010-1013.

Chai, J.Y. (1979) Study on *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912) in Korea V. Intestinal pathology in experimentally infected albino rats. *Seoul J. Med.*, 20(2):104-117.

- Deelder, A.M., El-Dosoky, I., Van-Marck, E.A.E. and Qian, Z.L. (1985) Immunofluorescent localization of *Schistosoma mansoni* circulatory cathodic antigen in tissues of infected mice using monoclonal antibody. *Z. Parasitenkd.*, 71(3):317-323.
- De-Water, R., Fransen, J.A.M. and A.M. Deelder (1986b) Ultrastructural localization of the circulating anodic antigen in the digestive tract of *Schistosoma mansoni* using monoclonal antibody in an immunogoldlabeling procedure. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35(3):549-558.
- Fujino, T., Ikeda, T., Oikawa, Y., Fukuda, K. and Ishii, Y. (1989) Expression of a tegumental antigen during the development of *Paragonimus ohirai*. *Jap. J. Parasitol.*, 38(5):263-270.
- Hamburger, J., Weil, M., Anton, M. and Turetzky, T. (1989) *Schistosoma mansoni* antigens recognized in *Biomphalaria glabrata* hemolymph by monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40(6):605-612.
- Ikeda, T. and Oikawa, Y. (1991) *Paragonimus ohirai* Immunobiochemical characterization on the tegumental glycocalyx of excysted juveniles recognized by a monoclonal antibody. *Exp. Parasit.*, 72(3):252-261.
- Imai, J. (1979) Studies on the antigenic analysis in *Paragonimus westermani* 2. Observations on antibody response against fractionated antigens from adult worm extract. *Trop. Med.*, 21(2):45-55 (in Japanese).
- Imai, J. and Nawa, Y. (1988) Immunochemical characterization of major antigenic components of *Paragonimus westermani* (triploid type) adult worms. *Jap. J. Parasitol.*, 37(6):398-404.
- Inatomi, S., Tongu, Y., Sakumoto, D., Suguri, S. and Itano, K. (1968) The ultrastructure of helminth 2) The body wall of *Metagonimus yokogawai takahashii* Suzuki, 1930. *Jap. J. Parasitol.*, 17(6):456-460 (in Japanese).
- Joo, K.H., Ahn, H., Chung, M.S. and Rim, H.J. (1989) Demonstration of species-specific and cross reactive components of *Paragonimus westermani* crude worm antigen by EITB. *Korean J. Parasit.*, 27(1):9-14.
- Lee, J.B., Chi, J.G., Lee, S.K. and Cho, S.Y. (1981) Study on the pathology of metagonimiasis in experimentally infected cat intestine. *Korea J. Parasit.*, 19(2):109-129.
- Lichtenberg, F.V., Bawden, M.P. and Sealey, S.H. (1974) Origin of circulating antigen from *Schistosoma* gut. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23(6):1088-1091.
- Nash, T.E. (1974) Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23(6):1085-1087.
- Ohara, H., Ikeda, T., Oikawa, Y. and Tani, S. (1985) Studies on antibody response in rats infected with *Paragonimus ohirai* by immunofluorescent staining method. *Jpn. J. Parasitol.*, 34:245-252.
- Ohnishi, Y. and Taufan, M. (1984) Increase of permeability in the intestinal mucosa of mice infected with *Metagonimus yokogawai*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46:885-887.
- Saito, S. (1972) On the differences between *Metagonimus yokogawai* and *Metagonimus takahashii*: I. The morphological comparisons. *Jap. J. Parasitol.*, 21(6):449-458.
- Song, C.Y. and Rege, A.A. (1991) Cysteine proteinase activity in various developmental stages of *Clonorchis sinensis*: A comparative analysis. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 99B(1):137-140.
- Sujiyama, H., Sugimoto, M., Akasaka, K., Horiuchi, T., Tomimura, T. and Kozaki, S. (1987) Characterization and localization of *Paragonimus westermani* antigen stimulating antibody formation in both the infected cat and rat. *J. Parasitol.*, 73(2):363-367.
- Sun, T. and Gibson, J.B. (1969) The sites of antigen formation in different development stage of *Clonorchis sinensis*. *Jpn. J. Med. Sc. Biol.*, 22:263-272.
- Yogore, M.G., Lewert, R.M. and Madraso, E.D. (1965) Immunodiffusion studies on paragonimiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14(4):586-591.
- Yokogawa, M., Tsuji, M. and Okura, T. (1962) Studies on the complement fixation test for paragonimiasis as the method of criterion of cure. *Jpn. J. Parasitol.*, 11(2):117-122.

### Explanation of Figures

**Figs. 1~5.** Electron micrographs of the tegument of *Metagonimus yokogawai*.

**Fig. 1.** The teguments of all growth stage worms which were reacted with control cat sera showed the tegumental syncytium(TS), basal layer(BL), circular muscle(CM) layer, interstitial matrix(IM) and tegumental cell cytoplasm(TCC). The gold particle was not labeled on the tegument or other portions of the tissue.

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Fig. 2.** The tegument of the worms at 16 and 20 weeks grown which was reacted with sera from cats after infection. The gold particle was not labeled on the tegumental syncytium but many vesicle (V) observed on the tegumental syncytium and tegumental cell cytoplasm.

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Fig. 3.** The tegument of the worms at 16 and 20 weeks grown which reacted with sera from cats at all infected groups. Gold particles specifically labeled the vesicle in the tegumental syncytium(TS).

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Fig. 4.** The tegumental cells of the worms at 16 and 20 weeks grown which reacted with sera from cats at all infected groups. Gold particles were predominately labeled on the vesicle of the tegumental syncytium(TS).

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Figs. 5, 6 & 7.** The teguments of the worms at 4, 8 and 12 weeks grown which reacted with sera from cats at all infected groups. Gold particles were labeled on the tegumental syncytium(TS).

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Figs. 8~11.** Electron micrographs of the epithelial lamellae and lumen area of the caeca of worms.

**Fig. 8.** The caeca of the worm at 4 weeks growth stage which reacted with sera from cats at all infected groups showed well developed lamellae and lumen. Gold particles were specifically labeled the lamellae and lumen matrix.

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Fig. 9.** The caeca of the worm at 8 weeks growth stage which reacted with sera from cats at all infected groups. Gold particles were specifically labeled on the lamellae and lumen matrix.

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Fig. 10.** The caeca of the worm at 12 weeks growth stage which reacted with sera from cats at all infected groups. Gold particles were specifically labeled on the lamellae and lumen matrix.

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Fig. 11.** The caeca of the worm at 16 and 20 weeks growth stages which reacted with sera from cats at 16 and 20 weeks after infection. Gold particles were slightly labeled on the lamellae and lumen matrix.

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Figs. 12 & 13.** Electron micrographs of the secretory granules in the parenchymal cell at the all growth stages of the worm.

**Fig. 12.** The parenchymal cell of the worm which reacted with sera from cats at 4 weeks after infection showed well-developed rough endoplasmic reticulum(RER) in the cytoplasm. Gold particles were slightly labeled on the secretory granules(SG).

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Fig. 13.** The parenchymal cell of the worm which reacted with sera from cats at 16 weeks after infection. Gold particles were specifically labeled on the secretory granules.

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Fig. 14.** Electron micrograph of the granules in the vitelline gland of the worm at all growth stage which reacted with sera from cats at all infected groups. Gold particles were slightly labeled on granules (G).

Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )

**Fig. 15.** Electron micrograph of the excretory bladder of the worm at all growth stages, the excretory bladder of the worm which reacted with sera from cats at all infected groups. Gold particles were predominantly labeled on the epithelial lamella area in the excretory bladder.

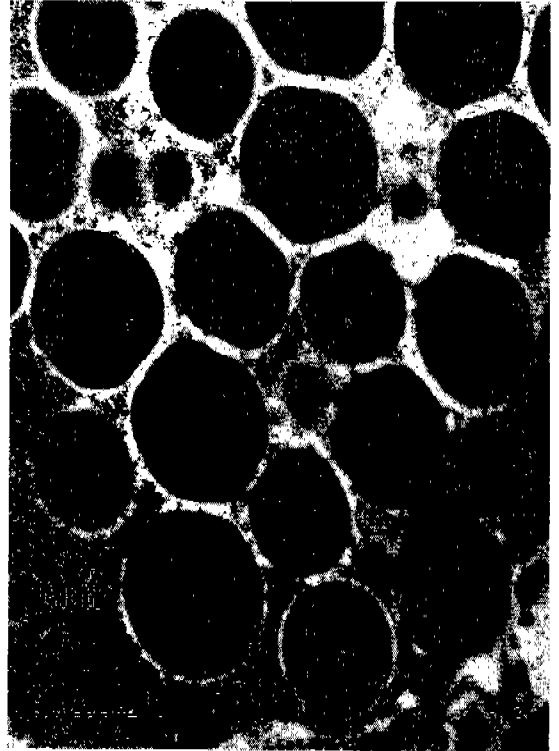
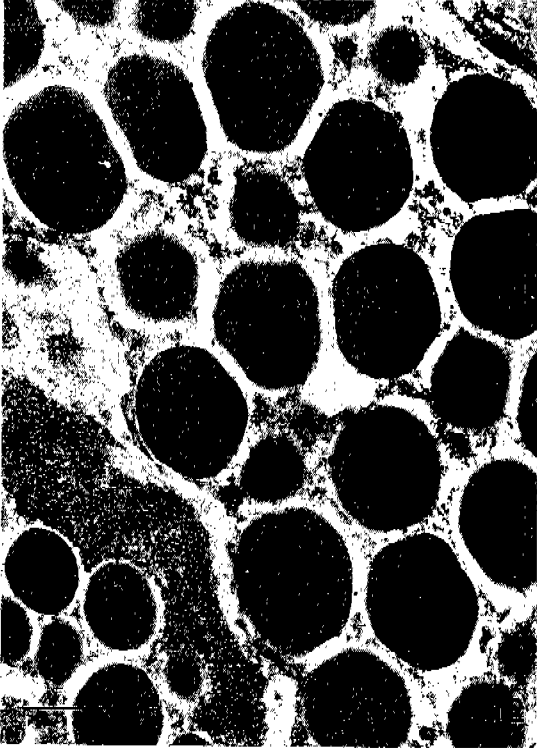
Bar=1  $\mu\text{m}$ ( $\times 20,000$ )











=Abstract=

**Antigenic localities in the tissues of *Metagonimus yokogawai*  
in the period of growth**

Han-Jong Rim, Soo-Jin Kim\*, Me-Gyoung Yang

*Department of Parasitology and Institute for Tropical Endemic Disease,  
College of Medicine, Korea University, Seoul 136-705, and Department of  
Biology\*, College of Natural Science, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea*

In order to observe the antigenic localization in the tissues of *Metagonimus yokogawai* in growth stages, immunogoldlabeling method was applied to using serum of the cat which infected with isolated metacercariae from *Plecoglossus altivelis*. The sectioned worm tissues from each growth stages were embedded in Lowicryl HM 20 medium, stained with infected serum IgG and protein A gold complex (particle size: 12 nm) and observed by electron microscopy. In the worm tissues of all experimental groups, the gold particles were specifically concentrated on the tegumental syncytium and cytoplasm of the tegumental cell as well as the secretory granules in the parenchymal tissue. In the 16th and 20th week grown worm tissues, the gold particles were specifically concentrated on the vesicles in the tegumental syncytium and cytoplasm of the tegumental cell. The gold particles were specifically concentrated on the caecal epithelia of the 4th, 8th and 12th week growth groups but slightly concentrated on those of the 16th and 20th week.

[**Korean J. Parasit.**, 30(4):309-321, December 1992]