

간흡충: 충체 및 대사성 항원의 특성분석 (1)항원투여 마우스 비장조직에 대한 면역조직화학적 연구

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과. 경산대학교 보건과학과*. 한양대학병원 조직병리과**

양용석† · 류장근* · 주난영 · 송강원**

국문초록: 저자들은 마우스를 실험모델로 하여 간흡충의 항원을 투여 했을 때 비장조직에 대한 CD3, CD4 및 CD8 모노클로날 항체의 반응 여부를 알아보고자 하였다. 즉, 간흡충에 대한 세포면역학적인 특성을 규명하고자 하였으며 특히 비장 조직에 대한 phenotype을 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 간흡충의 조항원을 면역증강제와 함께 복강 투여한 다음 일정 기간 후에 비장조직을 Avidin-biotin complex 면역조직염색을 실시한 결과 CD3에서 강한 양성 반응을 나타냈고 CD4와 CD8에서는 약한 반응을 나타냈다. 조직부위를 보면 피막, 혈관, 임파관, 백수부위와 림프구 및 대식세포의 세포막에서 양성반응을 보였다.

서 론

간흡충증(*Clonorchiasis*)은 한국을 포함하여 중국 대만 일본 월남 등에 널리 분포되어 있으며, 현재 우리나라에서만 약 100만 여명의 간흡충증 환자가 있을 것으로 추정되고 있다. 간흡충(*Clonorchis sinensis*)은 제2중간숙주로부터 감염기 피낭유충(*metacercariae*)이 섭취되어 성충은 간담도에 기생하며 때로는 담관에 기생하기도 한다.¹⁶⁾ 뿐만아니라 간흡충은 숙주에게 간암 또는 담관세포암의 원인이 되는 문제의 기생충이다.¹⁶⁾ 윤충(*helminthes*)들은 숙주체내에서 여러 단계의 발육과정을 거쳐 성충이 되며, 이때 발육단계별 항원성은 변할 뿐만아니라 충체에서 분비하는 항원은 림프구 대식세포 과립세포 등에게 활성화를 가져와 조직의 염증반응을 조절하는 것으로 알려져 있다.^{3,11)} 간흡충과 폐흡충의 경우 피낭유충을 실험동물에 감염시켰을 때 혈청내 IgE 및 IgG 항체가 증가함을 관찰하여 체액성 면역반응이 관여함을 보고하였다.²⁰⁾ 그리고 만손주열흡충

에 감염된 실험동물의 세포를 *in vitro*에서 기생충 항원으로 자극할 경우 림프구 아세포화(*blastogenesis*) 반응과 지연형 과민반응이 유발됨을 보고하였다.⁴⁾ 간질흡충 역시 감염되었을 때 interleukin-2(IL-2)가 증가됨을 관찰하여 세포매개성 면역반응이 관여됨이 보고되고 있다.¹⁴⁾

세포매개성 면역반응에서 T세포는 성숙과정에서 활성화효과 및 기억(*memory*)은 항원과 MHC의 인식에서 이루어지며 특히 α CD3와 TCR이 깊이 관여되고¹⁸⁾, T cell은 MHC 관련 Target cell과 TCR에 의한 항원과의 반응에서 CD4와 CD8는 전사의 역할을 한다.⁹⁾ 당단백질인 CD4와 CD8는 T cell의 표면 특이 단백질로서 면역 globulin의 gene superfamily에 속한다.²⁰⁾ CD4는 항원의 자극 세포로서 세포막에 대한 signal transduction 기전을 갖게되며¹⁹⁾, 대식세포 단핵구 및 신경계의 세포에도 발현된다.¹²⁾ 한편, 세포독성 T 림프구(CTL)는 *in vivo*에서 이종항원이나 비자기항원의 표적세포를 멸살하며, 바이러스성 항원을 파괴한다고 보고 하였다¹⁴⁾

그리고 간흡충의 조항원을 마우스에 Freund's complete adjuvant 및 complete adjuvant 함께 항원을 주사하였을 때 비장 T 림프구에는 CD2는 크게 증대하나 CD4와 CD8는 미약한 반응을 보였다고 보고하였다.¹⁶⁾ 현재 T세포의 세포면역 기능 그리고 각 모노클로날 항원에 대한 T 세포의

*논문접수 1996년 10월 4일, 수정재접수 1996년 11월 30일

†별책요청저자

*이 연구는 1993년도 연세대학교 학술연구비의 일부로 이루어졌음.

phenotype 유무는 세포면역의 기전 규명에 필요하다. 그러나 간흡충의 경우 세포매개성 면역반응에 대한 규명이 충분히 연구되지 않은 상태이며 특히 연구의 모델로 이용되고 있는 실험동물에 대한 면역학적 특성과 기초 자료들이 적은 상태에 있다. 본 연구에서는 간흡충의 조항원을 adjuvant와 함께 마우스 복강에 투여하고 일정 기간이 경과한 후에 마우스 비장조직에 대한 CD3, CD4 및 CD8 모노클로날 항체의 반응과 세포면역반응 및 그 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 간흡충의 피낭유충 수집

간흡충의 피낭유충은 부산지역을 관류하는 낙동강 하류지역에서 간흡충 제2중간숙주인 참붕어를 수집하였다. 참붕어는 유발에서 마쇄한 후 인공소화액에 처리하여 피낭유충을 수집하였다.

2. 실험동물 및 피낭유충 감염

실험동물로는 대한실험동물센터에서 구입한 가토를 사용하였으며, 간흡충의 피낭유충을 각 마리당 200개씩 경구 감염시키고 90일 간 사육한 후 거살하여 간흡충을 수집하였다.

3. 간흡충 성충 항원

수집된 간흡충을 phosphate buffered saline(PBS) pH 7.4로 3회 세척한 후 소량의 PBS와 함께 homognizer로 마쇄한 후 ultrasonicator로 5-10초간 수회 처리하고 4°C 10,000 rpm 30분 간 원심침전하였다. 상청액(supernatants)을 4°C 증류수내에서 24시간 투석하고 이를 완전히 냉동건조 시켰다. 이를 Dulbeccos modificationn Eagle's medium, 10% fetal calf serum 배지에서 적정 농도로 희석하여 -70°C에 보관하면서 실험하였다.

4. 실험동물군의 설정

대한실험동물센터에서 6주 이상 사육한 BALB/c 마우스를 구입한 후 정상군과 간흡충 항원 투여군으로 구별하였다. 정상군에는 PBS(pH 7.2), 항원 투여군에는 면역을 증강시키기 위하여 간흡충 조항원을 100 µm을 Freund's complete adjuvant와 동량으로 혼합하여 마우스 복강에 주사하였고, 2주 후에 간흡충 조항원을 100 µm을 Freund's incomplete adjuvant와 동량으로 혼합하여

마우스 복강에 주사하였다. 또 4주 후에는 간흡충 조항원 100 µm만을 마우스 복강에 주사하였다. 그리고 5주 후에는 항원 50 µm을 마우스 복강에, 50 µm은 마우스 정맥에 주사하였고 4일 후에 거살하여 실험에 사용하였다.

5. 조직항원의 면역반응

비장 조직부위의 항체 생성 여부를 관찰하기 위한 염색방법은 Anderson C 등(1991)의 Avidin-biotin complex방법에 따라서 진행하였다. 조직은 중성 formalin에서 고정한 후 paraffin 포매를 작성하였다. 절편 후 normal goat serum 5%가 포함된 Tris용액에서 10분 경과시킨 후 T cell marker CD 3, CD4, CD8(DAKOPTTS) 일차 항체에서 1시간 반응시켰다. Tris용액에서 5분씩 3회 수세하고 goat antimouse IgG conjugated biotin(DAKO) 이차 항체에서 20분 간 반응시켰다. 다시 Tris용액에서 3회 수세하고 streptavidin conjugated complex에서 20분 수세하였고 substrate(DAB)에서 3분 경과한 다음 증류수에서 5분 간 수세하고, Mayer Hematoxylin-eosin으로 20초 동안 counter stain을 실시하였다.

6. 면역반응의 강도

면역화학적 염색 후 광학현미경 상에서 갈색으로 반응을 나타내는 부위를 양성으로 표시하였으며, 피막 백수 적수 혈관부위(혈관 임프관 비동 비색 등) 혈구세포(림프구 대식세포 등)가 갈색으로 발견되는 강도에 따라서 +++++, ++++, ++, +, +-, (양성) 그리고 - (음성)로 반응정도를 구분하였다.

실험 성적

1. 비장조직에 대한 CD3의 발현

비장 중앙부위를 세로로 절단하여 여러장의 조직절편(6µm)을 작성한 다음 가장 잘 염색된 절편을 관찰하였다. 반응의 결과는 CD3, CD4 및 CD8 중에서 가장 반응이 강하게 표현되었다(그림 4,5,6). 반응 결과는 비장 피막(capsule)층에서 강한 양성반응을 보였다(그림 4,6). 그리고 피막 하부위의 반응은 혈관 세모혈관 비동 비색 등을 구성하고 있는 혈관부위와 임프관 부위에서 강한 양성반응을 나타내었다(그림 5,6). 또 피막하 부위에 산재해 있는 대식세포와 림프구 적혈구

Table 1. Distribution of *Clonorchis sinensis* antigens reacted with monoclonal antibodies tissue of spleen in mice

Monoclonal antibodies	Tissue of spleen in mice				
	Capsule	Vascular area	Red pulp	White pulp	Blood cells
CD3	+++++	++++	++	+++	++
CD4	++	+	-	+-	+-
CD8	++	+	-	+-	+-

형질세포 등의 세포막에서 강한 양성반응을 나타내었는데 장측면 보다는 횡격면 부위의 세포에서 더 강한 반응을 보였다(그림 4,5,6). 또 사멸된 세포와 포식된 과립소체(hemosidrin) 등에서 강한 반응을 보였다(그림 5). 그림4 에서 보는 바와 같이 적수부위 보다는 백수부위에서 더 강한 반응을 보였고, 적부위의 경우 혈관과 비동 등이 분포된 부위에서 강한 반응을 보였다(그림6). 백수는 혈관을 중심으로 강한 반응을 보였는데 이에서 벗어 나면서 약한 반응을 보이다가 marginal zone부위에서 뚜렷한 반응을 보였다(그림2, 5). 적수는 백수와 접한 부위에서 강한 반응을 나타내다가 적수의 중심부위에서는 반응이 없거나 상대적으로 반응이 약하게 나타냈다(그림 2,5).

2. 비장 조직에 대한 CD4의 발현

비장 중앙부위를 세로로 절단하여 여러장의 조직절편을 작성한 다음 가장 잘 염색된 절편을 관찰하였다. 반응의 결과는 3군 중에서 상대적으로 미약하게 나타났으며(그림 7,8,9). 비장의 장측면 보다는 횡격면 부위에서 더 강한 반응을 보였으며, 피막에서 가장 강하게 반응을 나타냈다(그림7). 이 군에서도 혈관과 림프관 주위의 조직에서 약간의 반응을 보였다(그림 8). 그리고 적수에서는 음성반응을 보였으며, 백수에서는 중심부위의 세포혈관과 비동에서 약간의 반응을 보였다(그림 8,9). 혈구는 적혈구와 과립소체(hemosidrin) 그리고 과립구 등에서 양성반응을 보였다(그림 8,9).

3. 비장조직에 대한 CD8의 발현

비장 중앙부위를 세로로 절단하여 여러장의 조직절편을 작성한 다음 가장 잘 염색된 절편을 관찰하였다. 반응의 결과는 CD4와 비교해 볼 때 별 차이가 없었으며 통계적으로도 차이를 인정

하지 못하였다. 비장의 장측면 보다는 횡측면에서 더 강한 반응을 보이고 있었고 구성부위 중에서는 피막에서 가장 강한 반응을 보였다. 적수에는 반응이 음성이었으며, 백수에서는 주로 혈관 비동 비색 등의 혈관을 중심으로 반응을 보였다. 혈구는 적혈구와 대식세포 과립소체(hemosidrin) 과 같은 소체에서 일부 양성반응을 보였다(그림 10,11,12).

고 찰

CD3 및 CD4, CD8 모노클로날 항체와 반응시킨 마우스 비장은 CD3에서 제일 강한 반응을 보였고, CD4와 CD8에서는 미약한 반응을 나타냈다(그림 4,7,10). 반응 결과를 비교해 볼때 CD3, CD4, 및 CD8 모노클로날 항체 전부 피막부위에 강한 반응 보였는데 혈관부위와 임파관 부위 그리고 marginal zone 부위에서 적수부위 보다는 백수부위에서 강한 양성반응을 보였다. 이 결과는 림프구와 같은 혈구와의 반응 결과로 보이며 특히 적수에서 보다 백수에서 강한 반응을 보인 것 역시 림프구가 많이 집중되어 있는 결과로 분석된다. 실험된 모노클로날 항체 중에서는 CD3의 경우 제일 강한 반응을 보였는데 이는 간혹항원도 T림프구에서 TCR/CD3가 그 항원에 대한 반응 전달에 가장 큰 전달 역할을 하는 것으로 분석된다. 그리고 대식세포나 림프구는 세포막을 중심으로 강한 양성반응을 보이고 있었으며, CD4와 CD8의 경우에는 혈관부위와 일부 세포막에서 약한 양성반응을 보이고 있었다. 이것은 간혹항원의 특이적인 반응은 TCR/CD3에 의하여 T세포 활성화에 큰 역할을 하는 것으로 보이며, CD4 및 CD8 경우에도 역시 MHC I 및 MHC II 에의 표현과 제한성에 보조적으로 깊이 관계하는 것으로 보인다. Suppressor T세포와 단핵구

그리고 자연살세포의 증가는 질병의 임상증상과 깊은 연관이 있다.¹⁷⁾ Cytotoxic/suppressor T세포는 서로 다른 기능을 가진 세포독성세포와 억제세포 phenotype을 함께 측정할 수 있는데,^{9,7,23)} 예를 들면 *Toxoplasma gondii* 감염시에 생기는 면역불균형은 Suppressor T 세포의 수 및 활동성의 증가와 밀접한 관계가 있다고 보고 되고 있으며,^{7,9,23)} Suppressor T세포 단핵구 자연살세포의 증가는 질병의 임상증상과도 깊은 상관관계가 있다고 보고된 바 있다.¹⁷⁾ 한편 *T.gondii*에 감염된 만성적인 질환에서는 CD8+(cytotoxic)T세포와 CD4+(helper/inducer) T세포가 방어작용에 중요한 역할을 한다고 보고하였고⁷⁾ 간흡충 조항원을 마우스에게 adjuvant와 함께 감염시켰을 때 마우스 비장 아세포에서 CD2, CD4, CD5 그리고 CD8을 관찰한 결과 증감에 영향을 미친다고 하였다.¹⁶⁾ 많은 연구자들은 CD 단일항원을 avidin-biotin complex 염색반응에 응용하여 혈구세포나 조직에서 좋은 반응 결과를 보았다고 하였다. Cancer의 경우 CD3가 다른 염색방법과 비교할 때 더 강하게 조직세포에서 표현되었다고 하며²¹⁾, T 세포도 paraffin 포매를 한 다음 CD3 모노클로날 항체로 면역반응시켰을 때 우수한 성적을 보였다고 한다.¹³⁾ 본 실험에서도 마우스 비장세포에 CD3을 적용시켰을 때 강하게 발현되는 결과를 보였으며 간흡충 항원과 주된 면역 전달의 기능을 수행하고 있음을 알 수 있었다. 그리고 기생충 감염시 숙주 T 림프구의 증식과 억제 현상은 숙주와 기생충의 종류에 따라서 차이를 보인다. 간질 흡충이나 만손주혈흡충 그리고 *Taenia taeniaeformis*와 같은 기생충을 마우스에게 실험적으로 감염시키면 감염초기에는 T 림프구의 증식이 억제되지만^{8,10,23)} 햄스터에게 *Opisthorchis viverrini*를 감염시킨 후 약물치료를 시행하면 T 림프구 증식 억제가 회복됨을 관찰하여, T 림프구의 기능적 활성이 있다고 하며^{6,7,13,22)} 기생충 감염시 T 림프구 증식과 억제에 T림프구와 대식세포가 관여하는 것으로 보고되고 있다.^{2,8,15)} 한편 기생충을 마우스에게 감염시킬 때 감염 초기에는 세포매개성 면역이 방어작용에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 비장의 무게와 세포수에도 변화를 보이는데, 세포의 수는 3-4배 증가하고 단핵구는 30배까지 증가함을 볼수 있다고 보고되고 있다.⁹⁾ 본 실험 성적의 경우 CD3, CD4 및 CD8 단선허체에 대한 단편적인 반응 결과를

보았는데, 앞으로 간흡충을 투여한 후 기간에 따른 다양한 항원성의 특성 규명과 단선허원에 대한 세부적인 분자구조 및 항체 발현 여부에 대해서도 연구가 있어야 하겠다.

참 고 문 헌

1. Anderson C, Rezuze WN, Kosciol CM, Pastuszak WT and Cartun RW(1991): Identification of T-cell lymphomas in paraffin embedded tissues using polyclonal anti-CD3 antibody: comparison with frozen section immunotyping and genotypic analysis. *Modern Pathology*, **4**: 358-62
2. Baird LG and Kaplan AM(1977): Macrophage regulation of mitogen-induced blastogenesis. 1. Demonstration of inhibitory cells in the spleens and peritoneal exudates of mice. *Cell Immunol*, **28**: 22-35
3. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JLM, Reed S and Rocha A(1985): Cell mediated immunity in american cutaneous and mucosal *lishimaniasis*. *J Immunol*, **135**: 4144-4148
4. Colley DG(1971): *Schistosoma* egg antigen-induced lymphocyte blastogenesis in experimental murine *Schistosoma mansoni* infection. *J Immunol*, **107**: 1477-1480
5. Dembic Z, Hass W, Zamoyska R, Parnes J, Steinmetz M and van Boehmer H(1987): Transfection of the CD8 gene enhances T cell recognition. *Nature*, **326**: 510-511
6. eGazzinelli RT, Xu Y, Heieny S, Cheever A and Sher A(1992): Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, **149**: 175-180
7. Goyal M, Ganguly NK and Mahaian RC(1989): Immunological response in experimentally reactivated *Toxoplasmosis* in mice. *Med Microbiol Immunol*, **178**: 269-278
8. Jayawardena AN and Waksman BN(1977): Suppressor cells in experimental *Trypanosomiasis*. *Nature*, **265**: 539-541
9. Jones TC, Alkan S and Erb P(1986): Spleen

- and lymph node cell population in vitro cell proliferation and Interferon production during the primary immune response to *Toxoplasma gondii* parasite. *Immunology*, **8**: 619-629
10. Ketonja TC, Hammerberg C and Schuring G (1987): Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Teania taeniaeformis*. *Parasitol Res*, **73**: 265-270
 11. Lightowers MW and Rickard MD(1988): Excretory-secretory products of heminth parasite: effects on host immune responses. *Parasitology*, **96**: S123-166
 12. Maddson PJ, Dalglish AG, MacDougal JS, Clapham PR and Weiss RA(1986): The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell*, **42**: 93-104
 13. McLeod R, Eisenhauer P, Mack D, Brown C, Filice G and Spitaling G(1989): Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, **142**: 3247-3255
 14. Oldman G and Williams L(1985): Cell mediated immunity to liver fluke antigens during experimental *Fasciola hepatica* infection of cattle. *Parasite Immunol*,: 503-516
 15. Pelley RD, Ruffier JJ and Warren KS(1976): Suppressive effect of a chronic heminth infection *Schistosoma mansoni* on the in vitro responses of spleen and lymph node cells to the T cell mitogens phytohemagglutinin and concanavalin. *Inf Immunol*, **13**: 1176-1183
 16. Ryang YS, Shin IS and Ahn YK(1996): Flow cytometry characterization of lymphocyte subpopulations in mice infected with *Clonorchis sinensis*. *Korean J Biomed Lab Sci*, **2**(1): 13-20
 17. Sklenar I, Jones TC, Alkan S and Erb P(1989): Association of symptomatic human infection with *Toxoplasma gondii* with imbalance of monocytes and antigen specific T cell subsets. *J Infect Dis*, **153**: 315-324
 18. Weiss A, Omboden J, Hardy J, Manger B, Terhorst C and Stobo J(1986): The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Ann Rev Immunol*, **4**: 593-619
 19. Weyand CM, Goronzi J and Fathman CG(1987): Modulation of CD4 by antigenic activation. *J Immunol*, **138**: 1351-1354
 20. Williams AF and Barclay NA(1988): The immunoglobulin superfamily-Domains for cell surface recognition. *Ann Rev Immunol*, **6**: 381-405
 21. Wilson MS, Weiss LM, Gatter KC, Mason DT, Dorfman RF, Warnke RA(1990): A reassessment of cases previously reported in 1975 based on paraffin section immunophenotyping studies, *Cancer*, **66**: 530-536
 22. Wongratanacheewin S, Rattanasiriwilai W, Priwan R and Sirisinha S(1987): Immunodepression in hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. *J Helminthol*, **61**: 151-156
 23. Yano A, Norose K and Yamahsita K(1987): Immune response to *Toxoplasma gondii* analysis of suppressor T cells in a patient with symptomatic acute *Toxoplasmosis*. *J Parasitol*, **73**: 954-961
 24. Yong TS, Kim TS, Lee JS, Lee OY and Kim DC(1987): Detection of circulating antigens in rats experimentally infected with *Paragonimus westermani* by ELISA. *Korean J Parasit*, **25**: 41-48
 25. Zimmerman GL, Kerkvliet NI, Brauner JA and Cerro JE(1983): Modulation of host immune responses by *Fasciola hepatica*: responses of peripheral lymphocytes to mitogens during liver fluke infections of sheep. *J Parasit*, **69**: 473-477

FIGURE LEGEND

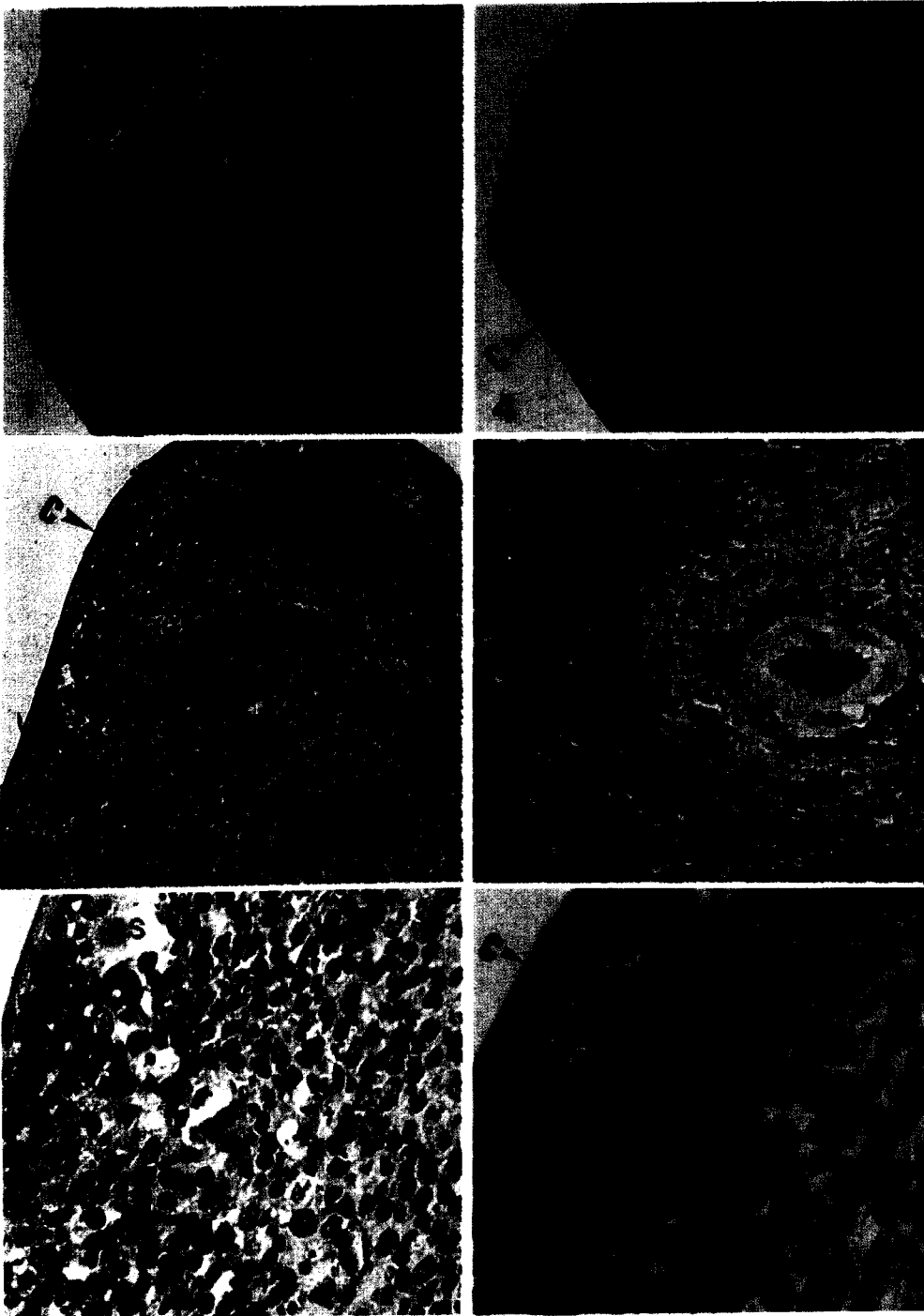


Fig. 1-3. Micrograph shows a longitudinal spleen. Hematoxylin-Eosin stained, fig. 1 $\times 40$, fig. 2 $\times 100$, fig. 3 $\times 400$. C, capsule; GC, germinal cell; MZ, marginals zone; RP, red pulp; WP, white pulp; VS, venous sinus.
Fig. 4-6. Micrograph shows a longitudinal spleen after the intraperitoneally antigens *Clonorchis sinensis*. Localization of CD3 monoclonal antibodies in tissues of spleen ABC immunohistochemistry method, fig. 4 $\times 40$, fig. 5 $\times 400$, fig. 6 $\times 1000$. M, macrophages; P, parenchyma.

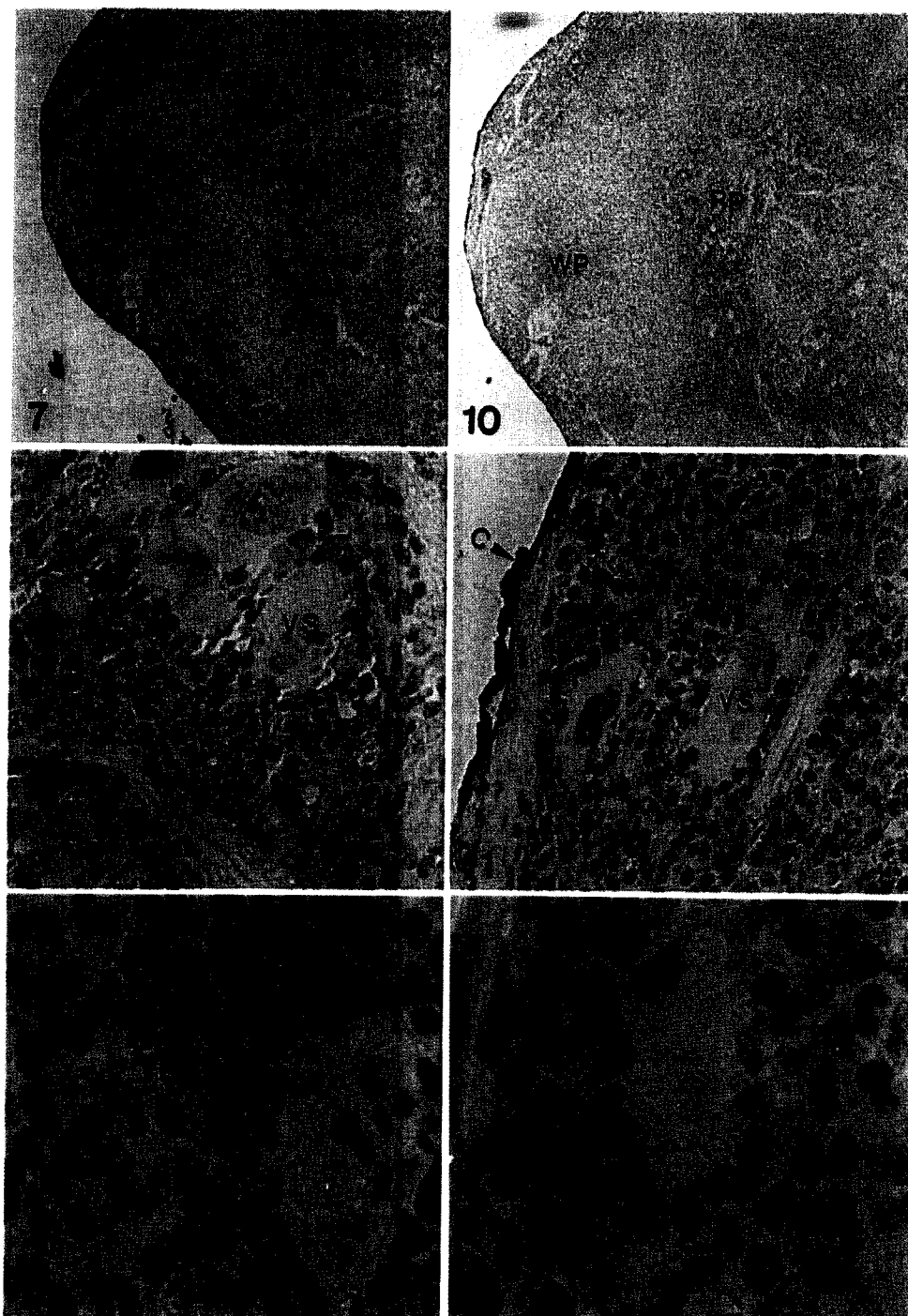


Fig. 7-9. Micrograph shows a longitudinal spleen after the intraperitoneally injected antigens *Clonorchis sinensis*. Localization of CD4 monoclonal antibodies in tissues of spleen by ABC immunohistochemistry method, fig. 7 \times 40, fig. 8 \times 400, fig. 9 \times 1000.

Fig. 10-12. Micrograph shows a longitudinal spleen after the intraperitoneally injected antigens *Clonorchis sinensis*. Localization of CD8 monoclonal antibodies in tissues of spleen by ABC immunohistochemistry method, fig. 10 \times 40, fig. 11 \times 40, fig. 12 \times 1000.

= Abstracts =

***Clonorchis sinensis*: Analysis of the Characterization of Somatic and Metabolic Antigens (1) Immunohistochemical Characteristics of the Spleen in Mice When Intraperitoneally Injected with Antigens**

Yong-Suk Ryang[†], Jang-Keun Ryu*, Nan-Young Ju and Kang-Won Song**

Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University, Kangwon-Do 220-701, Korea, Department of Health Science, Kyungsan University, KyongBuk 712-240, Korea, Department of histopathology, Hanyang University Hospital, Seoul, 133-792, Korea***

The authors inquired into what reactions comprise the response of mice(as a model) CD3, CD4 and CD8 monoclonal antibodies in spleen tissue when injected intraperitoneally by antigens of *Clonorchis sinensis*. The author is objective was focused on investigating the property of cellular immunity for liver fluke. In particular, the results of having examined the phenotype of the tissue of spleen were revealed as follows: a certain length of time after having been intraperitoneally injected with antigens of *Clonorchis sinensis* and Freund's adjuvant, the tissue of spleen was embedded and immunohistochemically stained by the avidin-biotin complex method. A strong reaction in response to CD3, while a feeble reaction resulted from CD4 and CD8. The tissue region showed a positive reaction to all antibodies, especially from capsules, vascular areas, white pulps and membrane of blood cells.

Key Words: *Clonorchis sinensis*, monoclonal antibodies, CD3, CD4, CD8, mouse spleen, avidin biotin complex stain.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(2): 275~282, December 1996]

[†]Corresponding author