

## 시험관내에서 돼지회충(*Ascaris suum*) 합자충란(L<sub>2</sub>)의 인공배양

지 차 호 · 박 승 준

충북대학교 수의과대학  
(1997년 10월 24일 접수)

### *In vitro* cultivation for development of *Ascaris suum* from the decoated and embryonated eggs(second-stage larva)

Cha-ho Jee, Seung-jun Park

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

(Received Oct 24, 1997)

**Abstract** : The cultivation for development of *Ascaris suum* from the second-stage larvae(L<sub>2</sub>) embryonated egg and the third-stage of rat-derived larvae(L<sub>3</sub>) recovered from lung of rats were performed to use the screening test of anthelmintics *in vitro*. The preparations of larvae for cultivation were that the artificially-hatched L<sub>2</sub> incubated the embryonated eggs of *Ascaris suum* in 0.1% formalin solution at 25°C for 28 days and the rat-derived larvae(L<sub>3</sub>) recovered from the lung of rat infected with the embryonated eggs of *Ascaris suum* on 7 days after infection(DAI). The cultivation for development of *Ascaris suum* from the embryonated eggs(L<sub>2</sub>) and the rat-derived larvae(L<sub>3</sub>) for 14 days in RPMI medium 1640(with 5% bovine calf serum) were as follows :

1. The sizes of the liberated larvae(L<sub>2</sub>) which were artificially hatched from embryonated eggs with glass beads(diameter 5mm) were 190~250µm on 1 days in culture(DIC). The second-stage larvae were molted into third-stage larvae(early L<sub>3</sub>; 250~300µm) and the features of these larvae were first observed such as cephalic cuticle, esophageal lumen and anus etc. on 5 DIC and the sizes of late third-stage larvae were 250~450µm on 10 DIC. The sizes of early fourth-stage larvae(L<sub>4</sub>) were 500~700µm and the features of these larvae were more pronounced in internal organs on 15 DIC.

2. The sizes of third-stage larvae(L<sub>3</sub>) recovered from the lung of rats were 1,340~1,370µm and the features of cephalic cuticle, esophageal lumen, intestine, rectum, anus were visualized by inverted microscope on 1 DIC. The fourth-stage larva(L<sub>4</sub>) completed by third ecdysis were recognizable and sizes of early fourth-stage larvae were developed as 1,400~2,200µm on 5 DIC. The sizes of middle fourth-stage of larva were 1,900~2,300µm and the thickened epithelial

rectum was observed on 10 DIC. The rectum and anus of late fourth-stage larva(L<sub>4</sub>, 2,500~3,200 $\mu$ m) had developed completely in RPMI medium 1640 on 15 DIC.

**Key words :** *In vitro* cultivation, embryonated egg of *Ascaris suum*, artificial hatching, RPMI medium 1640.

## 서 론

기생충의 인공배양법은 1980년대부터 본격적으로 발전하기 시작하였기 때문에 세균, 바이러스의 인공배양법보다는 매우 늦게 개발되었고 발전되어 왔었다<sup>12</sup>. 그 이유는 기생충이 숙주에서 필요한 까다로운 환경, 복잡한 영양조건 등을 밝히고 인공배양시험을 완성시키는데 많은 시행착오가 있었기 때문이다.

돼지 회충에 대한 시험관내의 배양법은 오랫동안 많은 학자들에 의하여 시도되어 왔었다<sup>2,5,9,11,14-17</sup>. 인공배양 방법의 변천은 공기 중에서 정치배양병(stationary culture-bottles)에 의한 방법<sup>4</sup>, Roller-culture system<sup>11</sup>, stationary multi-well plate system<sup>15</sup> 및 tissue culture flask<sup>5</sup> 등으로 발달되어 왔었다. 이러한 인공배양법을 이용한 연구분야는 새롭게 개발한 구충물질에 대한 구충효과를 확인하는 선발시험(screening test)과<sup>6,8,9</sup> 자충이나 성충의 인공배양액에서 추출한 배설-분비항원(excretory-secretory antigen ; E/S Ag.)을 이용한 기생충의 진단법<sup>3</sup> 및 백신의 산업화<sup>13</sup>도 고려할 수 있다. 지금까지 기생충 항원은 세균, 바이러스에 비하여 복잡하여 면역학적 연구가 활발히 이루어지지 않았으나 항원의 구조가 밝혀지고, 인공배양법이 발달하면서 면역학적 연구가 많이 이루어지고 있는 실정이다<sup>7</sup>.

본 연구에서는 돼지 회충란을 28일간 배양하여 감염력 있는 합자충란(L<sub>2</sub>)을 직접 인공배지에서 배양한 방법과 감염력 있는 합자충란을 랫트에 감염시킨 후 폐에서 회수한 제3기 자충(L<sub>3</sub>)을 배지에서 배양한 방법으로 나누어 실시하면서 배양결과를 비교 분석하였다. 이러한 시험관내 배양법을 연구발전시키면 실험동물에 의한 실험횟수와 실험기간을 단축할 수 있어 실험경비와 연구인력절약 등의 잇점이 있으며, 구충효능 선발시험을 시험관내에서 배양한 기생충의 자충에 실시함으로써 검사

할 많은 수의 약제를 한꺼번에, 소량의 구충물질로서 구충력이 있는 물질을 선발할 수 있다<sup>9</sup>. 또한 선충류를 인공배지에서 배양하여 배설-분비항원을 분리, 정제하여 미성숙 선충류에 의한 기생충성 질병진단과 감염력 있는 자충을 배양하여 항원생산에 의한 백신개발이 가능하며, 기생충학 분야의 새로운 면역학적 연구를 수행할 수 있는 기술방법도 확립할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

**실험동물 :** 돼지 회충의 합자충란(L<sub>2</sub>)을 시험관내에서 인공배양하는 방법과 랫드(250g의 4주령)에 합자충란을 인공감염시킨 7일 후에 폐에서 회수한 제3기 자충(L<sub>3</sub>)을 인공배양하는 방법과 비교하기 위하여 랫드를 사용하였다.

**배지 및 시약 :** 일반적으로 기생충의 인공배양에 사용되는 배지는 학자에 따라 그 조성이 많이 다르고 또한 실험실에서 조제하여 사용하기 불편하고 그 배지를 보관하기 어렵다. 본 시험에서는 이러한 단점을 해소하려고 상업적으로 조제배양에 이용되고 있는 배지와 선충류의 필수영양요소를 첨가하여 배양에 편리성을 확보하고자 하였다. 본 연구에 사용한 배지 및 시약은 아래와 같다.

- ① RPMI Medium 1640(GIBCO Cat. No. 13200-076 ; with L-glutamine and without phenol red and sodium bicarbonate)
- ② D-PBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline GibcoBRL Cat.No. 21300-025)
- ③ Antibiotic-Antimycotic(GibcoBRL Cat.No. 15240-062)
- ④ Gentamicin(GibcoBRL Cat.No. 15710-023)
- ⑤ Bovine calf serum(GibcoBRL Cat.No. 26170-043)
- ⑥ 5.25% sodium hypochlorite solution
- ⑦ 0.1% formalin solution

방 법 : 돼지 회충란에서 제4기 자충(L<sub>4</sub>)까지 시험관 내에서 인공배양한 방법과 순서는 아래와 같았다.

1) 인공배양을 위한 감염자충의 준비

① 도축장에서 성충의 암낭자충에서 돼지 회충란을 회수하고 0.5N NaOH로 회충란의 단백막을 벗기고 사용할 때까지 0.1% formalin 용액에 넣어 냉장고에 보관하였다.

② 돼지 회충란을 0.1% formalin 용액, 25℃에서 4주 동안 air pumping 하면서 제2기 자충(L<sub>2</sub>)으로 배양된 합자충란을 현미경하에서 확인하였다.

2) 합자충란의 시험관내 인공부화 및 배양

① 5.25% 차아염소산 용액(sodium hypochlorite solution)과 생리식염수로 세척하고 0.5N NaOH로 회충란의 단백막을 분리한 후 배양된 합자충란을 glass beads(직경 5mm)로 부화시키고 D-PBS로 5회 세척후, RPMI medium 1640에서 배양하였다.

② 랫드(250g)에 15,000개의 감염자충란을 경구투여한 후 7일째 부검하여 폐에서 제3기 자충(L<sub>3</sub>)을 Baerman apparatus로 회수하고 D-PBS로 세척후, RPMI Medium 1640 에서 배양하였다.

3) 자충을 배양할 배지 및 배양조건

① 배양배지 : RPMI medium 1640(with L-glutamine

and without phenol red and sodium bicarbonate)에 5% bovine calf serum을 첨가하고 항생제-항곰팡이제(Penicillin G sodium 10,000 units, Streptomycin sulfate 10,000units/ml, Amphotericin B 25µm/ml)를 첨가하였다(최종 pH 6.8).

② 배양조건 : 배양온도는 37.0℃, 이산화탄소가스 함유기 (5% CO<sub>2</sub>와 95% air)에서 14일간 배양하였으며, 배양배지(RPMI medium 1640) 1ml당 100마리의 자충비율로 배양하면서 3일마다 배지를 교환하였다.

결 과

돼지 회충란을 25℃, 0.1% formalin 용액에서 28일간 배양하여 감염력 있는 합자충란을 glass beads (diameter 5mm)로 부화시킨 제2기 자충(L<sub>2</sub>)과 랫드에 감염시킨 후 폐에서 회수한 제3기 자충(L<sub>3</sub>)을 배양배지(RPMI medium 1640)에서 14일간 배양한 결과는 다음과 같았다.

합자충란을 인공부화한 제2기 자충의 시험관내 배양 : 돼지 회충란의 단백막을 0.5N NaOH로 벗기고 감염력 있는 합자충란을 5% 송아지혈청(bovine calf serum)을 첨가한 RPMI medium 1640에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 중에서 14일간 배양하면서 관찰한 결과는 Table 1과 같았고, 돼지에 인공감염시킨 후 자충발육상태를 자충의 크기, 발육장

Table 1. The *in vitro* cultivation for development of *Ascaris suum* from the embryonated eggs(L<sub>2</sub>) in RPMI medium 1640\*

Days in culture	<i>In vitro</i> development of <i>A suum</i> from L <sub>2</sub> of artificial hatching to L <sub>4</sub>	Larval development <i>in vivo</i> (Douvres <i>et al</i> , 1969) <sup>†</sup>
1	Artificial hatching of embryonated eggs by glass beads (φ 5mm) for 30 min(Fig 1-1 & 1-2) egg : 50~75 × 40~50µm, L <sub>2</sub> : 190~250µm (undifferentiated organs)	Early L <sub>2</sub> in intestine ; 235~256µm Late L <sub>2</sub> in liver : 199~276µm
3	After washing in D-PBS, culture medium was changed	Early L <sub>3</sub> in liver : 204~308µm
5	Wrinkled sheath of L <sub>2</sub> →second molt(Fig 1-3, 1-4) →early L <sub>3</sub> (250~300µm) : cephalic cuticle, esophageal lumen	Middle L <sub>3</sub> in lung : 749~979µm
6	After washing in D-PBS, culture medium was changed	
7	Size of L <sub>3</sub> (250~350µm) labial(cephalic) cuticle, anus	Late L <sub>3</sub> in lung : 979~1,685µm
9	After washing in D-PBS, culture medium was changed	Late L <sub>3</sub> in intestine : 1,771~1,973µm
10	Late L <sub>3</sub> : 250~450µm cephalic cuticle, esophageal lumen, intestine(Fig 1-5)	Third molt(L <sub>4</sub> ) in intestine : 1,690µm Early L <sub>4</sub> in intestine : 1,944~2,448µm
12	After washing in D-PBS, culture medium was changed.	
15	Early L <sub>4</sub> (500~700µm) : rectum, anus(Fig 1-6).	

\*RPMI medium 1640 with 5% bovine calf serum(without phenol red and sodium bicarbonate).

소, 감염후 일자별로 인공배양시와 비교하기 위하여 Douvres *et al*<sup>4</sup>의 시험결과를 참고하였다(Table 1).

합자충란을 인공부화시킨 제2기 자충의 크기는 190~250 $\mu$ m이었고(Fig 1~2), 시험관내 인공배양 5일에서 제2기 자충은 제3기 자충(early L<sub>3</sub>)으로 탈피하고 있는 것이 관찰되었으며, 크기는 250~300 $\mu$ m로서 발육상태는 cephalic cuticle과 esophageal lumen이 형성되는 중이었다(Fig 1-3, 1-4). 그러나 생체내 인공감염에 의한 결과는 3일째 간(liver)에서 분리된 제3기 자충(early L<sub>3</sub>)의 크기는 315~390 $\mu$ m이고, 5일째 폐에서 관찰된 제3기 자충(middle L<sub>3</sub>)의 크기는 749-979 $\mu$ m로서 시험관내에서 발육된 자충의 크기 보다 3배 정도 더 발육된 것으로 나타났다.

시험관내 인공배양 7일에서 제3기 자충의 크기는 250~350 $\mu$ m로서 충란크기의 4~5배 정도로 발육되었고, 발육상태는 labial(cephalic) cuticle과 anus 형성이 확인되었다. 생체내 인공감염에 의한 결과는 7일째 폐에서 관찰된 제3기 자충(late L<sub>3</sub>)의 크기는 979~1,685 $\mu$ m로 발육되었으며, 생체내 9일째 장(intestine)에서 관찰된 제3기 자충(late L<sub>3</sub>)의 크기는 1,771~1,973 $\mu$ m로 시험관내 인공배양의 자충발육보다는 자충의 크기에서 4배 정도의 차가 인정되었다. 시험관내 인공배양에서 10일째 제3기 자충(late L<sub>3</sub>)의 크기는 250~450 $\mu$ m로 발육되었고, labial(ce-

phalic) cuticle, esophageal lumen, intestine, anus, rectum 등의 형태가 확인되었다(Fig 1-5). 생체내 10일째 장(intestine)에서 세번째 탈피한 자충(L<sub>4</sub>)의 크기는 1,570~1,871(1,690) $\mu$ m로서 제3기 자충(9일 1,771~1,973 $\mu$ m)보다 크기가 작았다. 시험관내 인공배양 15일째에는 제4기 자충(early L<sub>4</sub>)의 크기는 500~700 $\mu$ m이고, cephalic cuticle, rectum, anus 등이 확인되었다(Fig 1-6).

랫드의 폐에서 회수한 제3기 자충(L<sub>3</sub>)의 시험관내 배양 : 돼지 회충란의 단백막을 0.5N NaOH로 벗기고 감염력 있는 합자충란을 랫드(15,000개)에 감염시킨 후 7일째 폐에서 회수한 제3기 자충(L<sub>3</sub>)을 5% 송아지 혈청을 첨가한 RPMI medium 1640에서 37 $^{\circ}$ C, 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub> 중에서 14일간 배양하면서 관찰한 결과는 Table 2와 같았고, 돼지에 인공감염시킨 후 돼지 회충의 자충 발육상태를 자충의 크기 및 발육장소를 감염후 일자별로 인공배양시와 비교하기 위하여 Douvres *et al*<sup>4</sup>의 시험결과를 참고하였다(Table 2).

감염력 있는 돼지 회충의 합자충란을 랫드에 감염시킨 후 7일째 폐에서 회수한 제3기 자충의 크기는 1,340~1,370 $\mu$ m이었고, sheath와 underlying cuticle의 형태가 분명하게 관찰되고, esophageal lumen *et al*의 장기가 형성된 것이 확인되었다(Fig 2-1). 생체내 7일째 돼지 폐에서 발

Table 2. The *in vitro* cultivation for development of *Ascaris suum* from the third-stage larva(L<sub>3</sub>) of rat-derived in RPMI medium 1640\*

Days in culture	<i>In vitro</i> development of <i>A suum</i> from L <sub>3</sub> of rat-derived	Larval development <i>in vivo</i> (Douvres <i>et al</i> 1969)
1	L <sub>3</sub> derived from rat-lung by Baerman apparatus 7 DAI* L <sub>3</sub> : 1,340-1,370 $\mu$ m : sheath, underlying cuticle, esophagus lumen(Fig 2-1)	Early L <sub>2</sub> in intestine : 235~256 $\mu$ m
3	After washing in D-PBS, culture medium was changed	Early L <sub>3</sub> in liver : 204~308 $\mu$ m
5	Third molt of L <sub>3</sub> →L <sub>4</sub> (1,400~2,200 $\mu$ m)	Middle L <sub>3</sub> in lung : 749~979 $\mu$ m
6	After washing in D-PBS, culture medium was changed	
8	visible sheath, esophageal lumen, lateral ala(Fig 2-2)	Late L <sub>3</sub> in lung : 979~1,685 $\mu$ m
9	After washing in D-PBS, culture medium was changed	
10	Size of middle L <sub>4</sub> : 1,900~2,300 $\mu$ m thickened epithelial rectum(Fig 2-3)	Late L <sub>3</sub> in intestine : 1,771~1,973 $\mu$ m Emerging L <sub>4</sub> in intestine : 1,742~1,929 $\mu$ m
12	After washing in D-PBS, culture medium was changed	Early L <sub>4</sub> in intestine : 1,944~2,448 $\mu$ m
15	Late L <sub>4</sub> (2,500~3,200 $\mu$ m) rectum, anus(Fig 2-4)	

\*RPMI medium 1640 with 5% bovine calf serum(without phenol red and sodium bicarbonate).

#DAI : Days after Infection.

견된 제3기 자충(late L<sub>3</sub>)의 크기는 979~1,685 $\mu$ m로서 감염 7일째 고유숙주(돼지)나 비고유숙주(토끼, 랫드)의 폐에서 회수한 제3기 자충은 비슷한 크기와 발육상태로 나타났다<sup>18-20</sup>.

시험관내에서 인공배양 5일째 세번 탈피한 제4기 자충의 크기는 1,400~2,200 $\mu$ m이었고, 생체내 5일째 돼지 폐에서 발견된 제3기 자충의 크기는 749~979 $\mu$ m로서 시험관내 인공배양한 5일째의 자충보다 발육상태가 저조하였다. 시험관내 인공배양 8일째 제4기 자충의 발육상태는 visible sheath, esophageal lumen, lateral ala 등의 장기 및 구조물이 형성된 것을 확인하였다(Fig 2-2). 생체내 7일째 돼지 폐의 제3기 자충(후기)의 크기는 979~1,685 $\mu$ m이었으며, 9일째 장에 있는 제3기 자충(late L<sub>3</sub>)의 크기는 1,771~1,973 $\mu$ m이었다. 시험관내 인공배양 10일째의 제4기 자충의 크기는 1,900~2,300 $\mu$ m이었고, 두터워진 상피성 직장(rectum)이 발견되었다(Fig 2-3). 생체내 돼지 장에서 감염 10일째 갓 탈피한 제4기 자충의 크기는 1,742~1,929 $\mu$ m이며, 제4기 자충(초기 ; early L<sub>4</sub>)의 크기는

1,944~2,448 $\mu$ m이었다. 시험관내 인공배양 15일째에는 직장과 항문이 완전 발육된 제4기 자충(late L<sub>4</sub>)이 관찰되었으며(Fig 2-4), 그 크기는 2,500~3,200 $\mu$ m이었다.

Table 3에서 보는 바와 같이 합자충란부터 제4기 자충까지 배양한 것(L<sub>2</sub>~L<sub>4</sub>)은 제3기 자충(L<sub>3</sub>)부터 제4기 자충(late L<sub>4</sub>)까지 배양한 것(L<sub>3</sub>~L<sub>4</sub>)보다 자충의 발육상태(자충의 크기, 장기분화 등)가 저조하였다. 시험관내 인공배양 1일에 합자충란을 glass beads로 부화시킨 제2기 자충의 크기는 190~250 $\mu$ m이었고, 폐에서 인공감염후 7일에 회수한 제3기 자충은 1,340~1,370 $\mu$ m이었다.

시험관내 인공배양 5일에 L<sub>2</sub>~L<sub>4</sub> 배양에서는 제2기 자충이 탈피하고 있는 제3기 자충이 관찰되었으며, 갓 탈피한 제3기 자충(emerging L<sub>3</sub>)의 크기는 250~300 $\mu$ m이었고, 자충의 앞부분은 cephalic cuticle과 esophageal lumen 등이 확인되었으며, 뒷부분에서는 피막(sheath)이 분리되는 과정이 관찰되었다(Fig 1-3, 1-4). 인공감염후 폐에서 회수한 자충(Fig 2-1)의 시험관내 배양(L<sub>3</sub>-late L<sub>4</sub>)에서도 제3기 자충이 탈피하여 제4기 자충이 되었으며, 그 크기

Table 3. The comparison of *in vitro* cultivation of *Ascaris suum* between second-stage larva(L<sub>2</sub>) of the artificial hatching and the third-stage larval(L<sub>3</sub>) of rat-lung in RPMI medium 1640

Days in culture	<i>In vitro</i> development of <i>A suum</i> from L <sub>2</sub> of artificial hatching to L <sub>4</sub>	<i>In vitro</i> development of <i>A suum</i> from L <sub>3</sub> of artificial hatching to L <sub>4</sub>
1	Artificial hatching of decoated, embryonated eggs by glass beads( $\phi$ 5mm) for 30 min (Fig 1-1 & 1-2) egg : 50~75 $\times$ 40~50 $\mu$ m, L <sub>2</sub> : 1909~250 $\mu$ m (undifferentiated organs)	L <sub>3</sub> derived from rat lung by Baerman apparatus and cultivated after 7 days of artificial infection L <sub>3</sub> (1,340~1,370 $\mu$ m) : sheath, underlying cuticle, esophageal lumen(Fig 2-1)
3	After washing in D-PBS, culture medium was changed	
5	Wrinkled sheath of L <sub>2</sub> →Second molt (Fig 1-3, 1-4)→early L <sub>3</sub> (250~300 $\mu$ m) : cephalic cuticle, esophageal lumen	Third molt of L <sub>3</sub> →L <sub>4</sub> (1,400~2,200 $\mu$ m)
6	After washing in D-PBS, culture medium was changed	
7	Size of L <sub>3</sub> (250~350 $\mu$ m) labial(cephalic) cuticle, anus	L <sub>4</sub> larvae : above 70%/total cultured larvae
8		visible sheath, esophageal lumen, lateral ala (Fig 2-2)
9	After washing in D-PBS, culture medium was changed	
10	Late L <sub>3</sub> : 250~450 $\mu$ m cephalic cuticle, esophageal lumen, intestine (Fig 1-5)	L <sub>4</sub> (1,900~2,300 $\mu$ m) thickened epithelial rectum (Fig 2-3)
12	After washing in D-PBS, culture medium was changed	
13	Early L <sub>4</sub> (500~700 $\mu$ m) : rectum, anus(Fig 1-6)	Late L <sub>4</sub> (2,500~3,200 $\mu$ m) : rectum, anus(Fig 2-4)

는 1,400~2,200 $\mu$ m이었다.

시험관내 인공배양 10일에 L<sub>2</sub>~L<sub>4</sub> 배양에서 제3기 자충(후기)의 크기는 250~450 $\mu$ m 이었고, cephalic cuticle, esophageal lumen, intestine(Fig 1-5) 등이 관찰되고 확인되었다. 시험관내 인공배양 10일에 L<sub>3</sub>~late L<sub>4</sub> 배양에서 제4기 자충의 크기는 1,900~2,300 $\mu$ m로 발육되었고 두터워진 상피성 직장이 관찰되었다(Fig 2-3). 시험관내 인공배양 15일에 L<sub>2</sub>~L<sub>4</sub> 배양에서 제4기 자충(초기; early L<sub>4</sub>)의 크기는 500~700 $\mu$ m로 측정되었고 rectum, anus 등이 확인되었다(Fig 1-6). 배양 15일에는 L<sub>3</sub>~late L<sub>4</sub> 배양에서 제4기 자충(late L<sub>4</sub>)이 2,500~3,200 $\mu$ m로 발육되었고 직장과 항문이 완전 발육되었다(Fig 2-4).

## 고 찰

시험관내에서 돼지 회충을 한가지 인공배양법으로 생활환을 배양하려고 많은 학자들이 시도하였지만 성공하지 못한 현실이다<sup>5</sup>. 본 시험에서 배양한 방법과 배양 배지는 이산화탄소가스(5%) 항온기에서 37 $^{\circ}$ C의 배양조건과 RPMI medium 1640을 각각 사용하였다.

기생충 인공배양의 종합배지는 API(Animal Parasitology Institute) media<sup>12</sup>부터 사용하기 시작하였는데 이 배지는 사용할 때마다 33종류의 stock solutions을 혼합, 첨가하여야 하는 불편한 점이 많았으며, 생체내 기생충의 영양요구량에 미흡되어 인공배양에 만족치 못한 배지이었다. 이런 불편한 점을 보완하고 기생충의 영양요구량을 충족시킬 수 있는 조직배양용 배지를 이용하려는 시도가 수행되었다. 조직배양용 배지로서 기생충의 인공배양을 시도한 배지는 Medium 199(originally formulated for nutritional studies of chick embryo fibroblast), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media ; growth of a broad spectrum of mammalian cell lines), RPMI 1640(enriched formulations with extensive applications for mammalian cells) 등이 사용되고 있다. 본 시험에서 돼지 회충의 자충별 배양에는 RPMI medium 1640이 적합한 배지로 선택되었다<sup>5</sup>. 이러한 배지들도 조금씩 그 성분을 보강하여 배양하려는 기생충에 적합한 배지로 사용하고 있다. 예를 들면 돼지 회충의 자충을 배양할 목적으로 D-MEM 배지의 아미노산과 비타민의 성분을 4배 첨가하여 사용하여 효과가 있었다는 보고가 있으며<sup>4</sup>, 본 시험에 사용할 목적으로 RPMI medium 1640과 Medium 199, D-MEM의 아미

노산과 비타민 성분을 비교해본 결과, 아미노산 종류에서 L-alanine은 RPMI 200mg/L, M199 25mg/L, D-MEM 84mg/L ; L-asparagine(free base) RPMI 50mg/L, M199 0mg/L, D-MEM 0mg/L 이고, 비타민류에서는 i-Inositol은 RPMI 35mg/L, M199 0.5mg/L, D-MEM 7.2mg/L 등으로 일부 아미노산 및 비타민류는 RPMI medium 1640이 Medium 199과 D-MEM 배지보다 함량이 높았다(Gibco BRL Products Guide, 1997~1998). 이러한 배지성분 외에도 송아지 혈청(bovine calf serum), 돼지 혈청(swine serum), 기니아 피그 혈청(guinea pig serum) 등이 사용되었으나 송아지 혈청을 첨가하는 것이 좋았고, 첨가수준도 처음에는 M199 배지에 20% 송아지 혈청을 첨가했고<sup>2</sup>, 최근에는 RPMI 1640에 5% 송아지 혈청을 첨가하는 것이 돼지 회충의 인공배양에 효과적이라고 하였다<sup>3,5</sup>. 배양조건도 많은 변천이 있었지만 공기 중에서 5% CO<sub>2</sub>가 돼지 회충의 제3, 4기 자충의 인공배양에 억제효과가 나타나지 않았다고 보고하였다<sup>14</sup>. 그래서 본 시험에서도 RPMI medium 1640에 5% bovine calf serum을 첨가한 배지와 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C의 배양조건을 적용하였다.

일반적으로 실험동물(비교유숙주)<sup>18-20</sup>이나 돼지 폐에서 7일에 회수한 제3기 자충부터 제4기 자충의 발육한 크기는 돼지 생체내에서 발육한 크기와 유사하였지만<sup>4</sup>, 시험관내 배양방법에서 성적 분화(sexual differentiation)가 생체내에서 성적 분화보다 늦었고 특히 제4기 자충의 성장이 지체되었다<sup>5</sup>. 본 시험의 제2기 자충부터 시험관내 RPMI 1640 배지에서 배양한 성적(Table 1)은 제3기 자충부터 시험관내 인공배양한 성적(Table 2)보다 발육정도(발육된 자충의 크기)는 미약하였다. 생체내(돼지)에 인공감염후 10일까지 발육성적<sup>4</sup>은 시험관내 배양성적과 비교하기가 적당치 않으나 배양기간 10일째까지 비교하면 제3기 자충부터 배양한 자충의 크기는 비슷하였지만 제3기 자충부터 배양한 것은 실험동물의 폐에서 이미 7일간 발육된 제3기 자충을 배양한 자충이기 때문에 7일간 실험동물의 폐에서 발육된 성적<sup>4</sup>이 추가되었다. 제2기 자충부터 배양한 자충의 크기는 이 두가지 성적과는 비교가 되지 않을 정도(1/4~1/5)로 자충의 발육성적이 좋지 않은 결과로 나타났다.

자충의 성적 분화(sexual differentiation)에 대하여 Urban과 Douvres<sup>14</sup>는 생체내(in vivo)에서 인공감염 14일후(자충크기 5.1mm), 21일후(자충크기 19.6mm)에 암·수의 구별이 되었고, 시험관내 배양 21일(자충크기 3.2mm),

28일(3.3mm)에 암·수의 구별이 가능하였다고 보고하였다. 제4기 자충에 난원형의 생식원기(genital primordium)가 제4기 자충의 배양 21일(자충크기 3.0mm)에 성적 구별이 되었고, 제4기 자충 암놈의 생식원기는 원시음문(primitive vulva), 원시질(primitive vagina) 각각 한 쌍의 원시자궁(uteri)과 원시난소(ovaries)로 구성되었고, 수놈의 생식기 원기는 다세포, 길쭉한 클립모양의 형태로 암·수 구별이 가능하였으며, 제일 큰 제4기 암·수 자충은 9.2mm이었다고 보고하였다<sup>14</sup>. 본 시험에서는 배양기간이 14일로서 제4기 자충의 성적 분화는 관찰하지 못하였다. Douvres *et al*<sup>4</sup>에 의하면 돼지 생체내에서 돼지 회충을 인공감염시킨 후(8~9일) 제3기 자충(후기; trachea) 또는 제4기 자충(초기; intestine)에서 생식원기(genital primordium)를 관찰하였지만 암·수 구별은 불가능하였다.

시험관내 인공배양에서 배양일자별 자충의 탈피 및 발육정도에 많은 차이가 있는 것으로 보고된 바 있다. Urban과 Douvres<sup>14</sup>는 돼지 폐에서 회수한 제3기 자충(300마리)을 배양한지 7일, 14일, 28일에 배양한 자충의 발육상태를 조사한 결과, 7일째 살아있는 자충 89% 중에서 제3기 자충 32%, 세번째 탈피자충 28%, 제4기 자충 40%로 관찰되었다고 보고하였다. 세번째 탈피(third molt) 후에 제4기 자충은 많은 량의 표피단백질(cuticlin)을 합성해야 하는데 이러한 표피합성이 인공배양 7일째 제4기 자충에서 가장 많았기 때문에 자충발육에 필요한 비표피성 단백질(noncuticular protein)합성이 상대적으로 적기 때문이라고 보고하였다<sup>5</sup>.

본 시험에서 성충으로부터 회수된 함자충란(L<sub>2</sub>)과 랫드의 폐에서 회수한 제3기 자충(L<sub>3</sub>)을 인공배양하는 방법을 이용하여 더 연구할 수 있는 응용연구분야는 새롭게 개발한 구충물질의 구충효과를 확인하는 선발시험(screening test), 자충이나 성충을 배양한 배지에서 추출한 배설-분비항원(excretory-secretory antigen; E/S Ag.)을 이용한 기생충의 진단법(ELISA) 및 백신화, 인공배양한 기생충에 대한 면역학적 연구 등이 있다. 생체내 인공감염이나 시험관내 인공배양에 의한 발육한 자충이 분비, 배설하는 대사산물(분비-배설 항원)이 시험관내에서 T-

임파구의 유사분열을 촉진(mitogen)하여 blastogenesis를 일으키는 자극이 비슷하였다<sup>14</sup>는 연구결과로 보아 시험관내 자충배양에 의한 항원분리 및 백신화에 대한 연구는 생체시험을 하지 않고도 시험관내 시험으로 대체할 수 있다고 사료된다. 생체시험은 시험동물비 및 사육비, 사료비, 시험기간의 장기화 등이 시험관내 시험보다 경제적, 노력, 시험기간 등에서 불리한 시험방법이다. 그러므로 시험관내 기생충의 인공배양에 의한 연구는 기생충학 분야에 새로운 연구와 많은 연구결과에 공헌하는 바가 클 것으로 기대된다.

## 결 론

구충물질의 구충효능 확인에 대한 선발시험을 시험관내에서 실시할 목적으로 돼지 회충의 자충을 시험관내에서 배양하려고 돼지 회충란을 감염력 있는 함자충란으로 배양하고 glass beads(diameter 5mm)로 함자충란을 인공부화시킨 제2기 자충(L<sub>2</sub>)과 함자충란을 랫드에 감염시킨 후, 7일에 폐에서 회수한 제3기 자충을 RPMI medium 1640에서 각각 14일간 배양한 결과는 다음과 같았다.

1. 배양 1일에 함자충란에서 인공부화시킨 제2기 자충의 크기는 190~250 $\mu$ m이었고, 내부장기(organs)는 분화되지 않았으며, 배양 5일에는 제2기 자충(L<sub>2</sub>)이 탈피하여 제3기 자충(early L<sub>3</sub>; 250~300 $\mu$ m)으로 발육되었고 cephalic cuticle, anus 등을 확인할 수 있었다. 배양 10일에 제3기 자충(late L<sub>3</sub>)이 250~450 $\mu$ m로 발육되었고, 배양 15일에는 제4기 자충(early L<sub>4</sub>; 500~700 $\mu$ m)의 앞뒤의 장기 형태가 확인할 수 있을 정도로 성장되었다.

2. 배양 1일에 폐에서 회수한 제3기 자충(1,340~1,370 $\mu$ m)은 sheath, underlying cuticle, esophageal lumen의 확인이 가능하였고, 배양 5일에는 제3기 자충(L<sub>3</sub>)이 탈피하여 제4기 자충(early L<sub>4</sub>; 1,400~2,200 $\mu$ m)으로 성장하였다. 배양 10일에 제4기 자충(middle L<sub>4</sub>)은 1,900~2,300 $\mu$ m로 성장하였으며, 두터워진 상피성 직장이 관찰되었다. 배양 15일에는 제4기 자충(late L<sub>4</sub>)은 2,500~3,200 $\mu$ m로 성장되었고, 완전발육된 직장과 항문이 발견되었다.

## Legends for figures

Fig 1-1. Embryonated egg of *Ascaris suum* with 0.5N NaOH, x 1,000.

Fig 1-2. Artificial hatching of the embryonated egg with glass beads, x 400.

Fig 1-3. Early third-stage larva(fore-view) of *A suum* which were emerging second ecdysis, 5 Days In Culture(DIC), x 1,000.

Fig 1-4. Early third-stage larva(hind-view) of *A suum* which were emerging second ecdysis, 5 DIC, x 1,000.

Fig 1-5. Late third-stage larva(fore-view) of *A suum* which were incubated *in vitro* on 10 DIC, x 1,000.

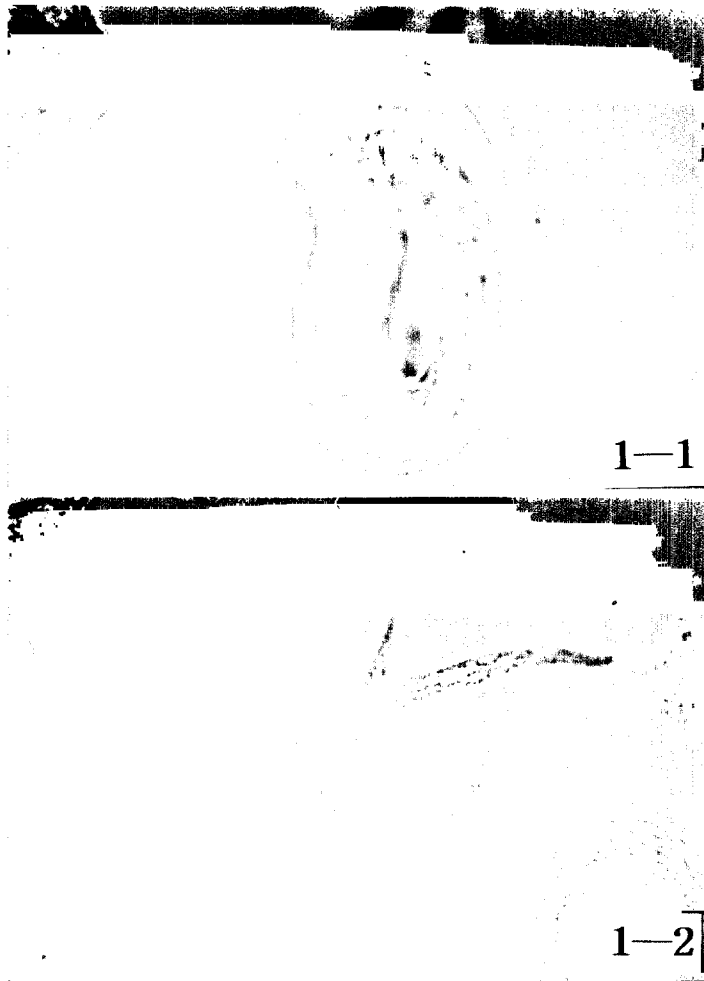
Fig 1-6. Early fourth-stage larva(hind-view) of *A suum* which were incubated *in vitro* on 15 DIC, x 1,000.

Fig 2-1. Third-stage larva of *A suum* which were recovered from the lung of rabbit on 7 Days After Infection(DAI), sheath, esophageal lumen and underlying cuticle were first noted, x 1,000.

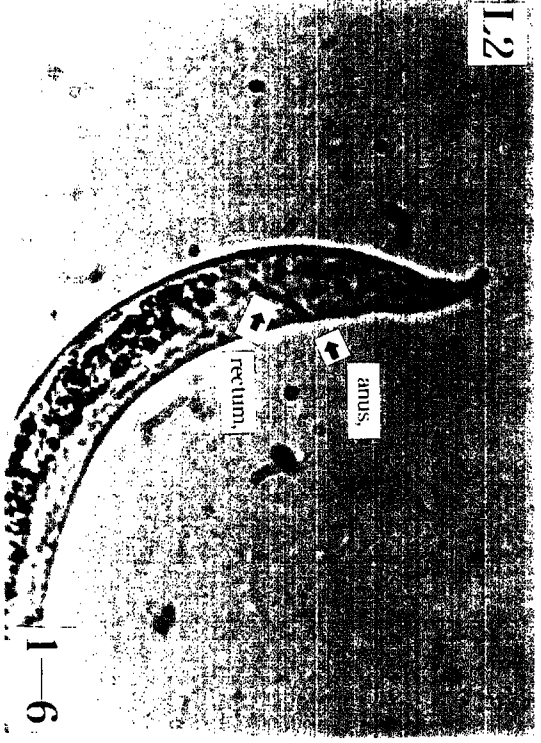
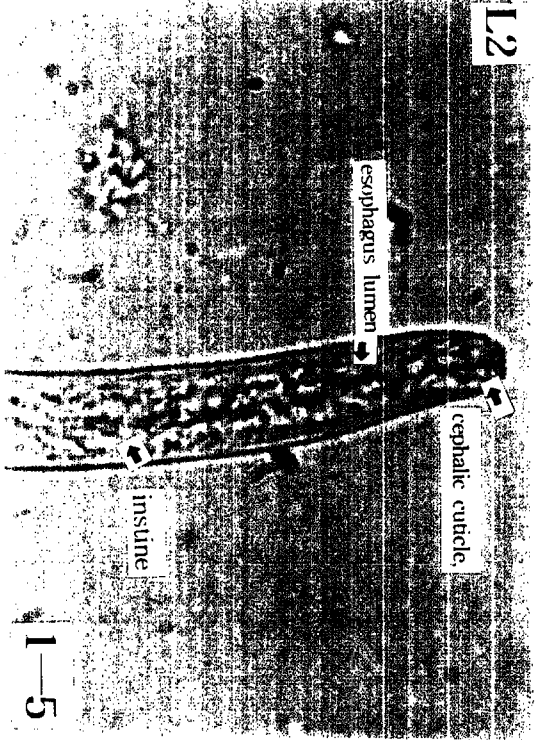
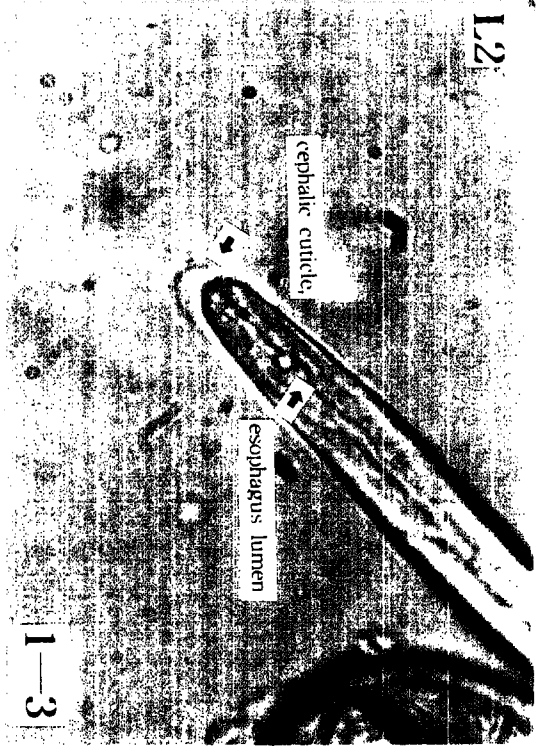
Fig 2-2. Third-ecdysis larva of *A suum* 5 DIC, lateral alae, visible sheath and esophageal lumen, x 1,000.

Fig 2-3. Middle fourth-stage of *A suum* 10 DIC, rectum consists of thickened epithelial layer, x 1,000.

Fig 2-4. Late fourth-stage of *A suum* 15 DIC, x 1,000.







**L3**

couplings linen



Sheath



underlying cuticle

**L3**

lateral ala



couplings linen



visible sheath



2-1

**L3**

rectum,



anus,



2-3

**L3**

rectum,



anus,



2-4

2-2

## 참 고 문 헌

1. Assonville JA, Janovsky E, Verster A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. *Vet Parasitol*, 61:73-80, 1996.
2. Cleeland R. The effects of different atmosphere and various supplements on the *in vitro* survival and growth of *Ascaris suum* larvae. *J Parasitol*, 49:64-68, 1963.
3. Dolores EH, Robert DR, Joseph F, et al. A *Trichuris* specific diagnostic antigen from culture fluids of *Trichuris suis* adult worms. *Vet Parasitol*, 68:91-102, 1997.
4. Douvres FW, Tromba FG, Malakatis GM. Morphogenesis and migration of *Ascaris suum* larvae developing to fourth stage in swine. *J Parasitol*, 55:689-712, 1969.
5. Fetterer RH. Growth and cuticular synthesis in *Ascaris suum* larvae during development from third to fourth stage *in vitro*. *Vet Parasitol*, 65:275-282, 1996.
6. Jenkins DC, Carrington TS. An *in vitro* screen for anthelmintics employing *Nippostrongylus brasiliensis* in a defined medium. *Vet Parasitol*, 11:223-230, 1982.
7. Maizels RM, Selkirk ME. Immunobiology of Nematode Antigens, in *The Biology of Parasitism*, Alan R. Liss, Inc., New York, p 285-308, 1988.
8. Rapson EB, Jenkins DC, Topley P. *Trichostrongylus colubriformis*; *in vitro* culture of parasitic stages and their use for the evaluation of anthelmintics. *Res Vet Sci*, 39:90-94, 1985.
9. Rew RS, Urban JF Jr, Douvres FW. Screen for anthelmintics, using larvae of *Ascaris suum*. *Am J Vet Res*, 47:869-873, 1986.
10. Stringfellow F. Cultivation of *Haemonchus contortus* from infective larvae to the adult male and egg-laying female. *J Parasitol*, 72:339-345, 1986.
11. Sylk SR, Stromberg BE, Soulsby E. Development of *Ascaris suum* larvae from the third to fourth stage *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 4: 261-265, 1974.
12. Taylor AEL, Baker JR. *In vitro* methods for parasite cultivation, Academic Press, London, pp. 465, 1987.
13. Urban JF Jr. The epidemiology and control of swine parasites : Immunity and vaccines. *Veterinary Clinics of North America ; Food Animal Practice*, 2:765-778, 1986.
14. Urban JF Jr, Douvres FW. *In vitro* development of *Ascaris suum* from third-to-fourth-stage larvae and detection of metabolic antigens in multi-well culture systems. *J Parasitol*, 67:800-806, 1981.
15. Urban JF Jr, Douvres FW, Xu S. Culture requirements of *Ascaris suum* larvae using a stationary multi-well system : Increased survival, development and growth with cholesterol. *Vet Parasitol*, 14:33-42, 1984.
16. Urban JF Jr, Romanowski RD. *Ascaris suum* : Protective immunity in pigs immunized with products from eggs and larvae. *Experimental Parasitol*, 60:245-254, 1985.
17. Urban JF Jr, Tromba FG. Development of immune responsiveness to *Ascaris suum* antigens in pigs vaccinated with ultraviolet-attenuated eggs. *Vet Immunol & Immunopathology*, 3:399-409, 1982.
18. 이재구, 이창현, 박배근, 이상복. 비고유숙주에 있어서 면역억제가 돼지 회충의 감염에 미치는 영향. I. 집토끼에서의 실험소견. *대한수의학회지*, 33: 679-691, 1993.
19. 이재구, 이창현, 박배근, 이상복. 비고유숙주에 있어서 면역억제가 돼지 회충의 감염에 미치는 영향. II. 햄스터에서의 실험소견. *대한수의학회지*, 34: 127-134, 1994.
20. 이재구, 이창현, 박배근, 이상복. 비고유숙주에 있어서 면역억제가 돼지회충의 감염에 미치는 영향. III. 마우스에서의 실험소견. *대한수의학회지*, 34:559-567, 1994.