

# 면역억압 또는 면역활성된 마우스에 간질(*Fasciola hepatica*)을 감염시킨 후 관찰되는 약물요법과 숙주의 면역기전과의 상호협력관계

신 성 식 · 김 철 희\*

전남대학교 수의과대학 수의학과 및 동물의학연구소  
광주광역시 보건환경연구원 가축위생연구부\*  
(2000년 6월 10일 게재승인)

The cooperative relationship between chemotherapy and the host  
immune response in immunosuppressed or immunostimulated mice  
infected with *Fasciola hepatica*

Sung-shik Shin, Cheol-hee Kim\*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University  
Kwangju City Institute of Health & Environment Department of Veterinary Research\*

(Accepted by Jun 10, 2000)

**Abstract** : This study was performed to observe the influence of host immune response on the chemotherapy of mice experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Following immunosuppression with prednisolone or immunoenhancement with Freund's complete adjuvant(FCA), mice were experimentally infected with 3 *Fasciola hepatica* metacercariae and treated with closantel at 1 week post infection. In the group of mice infected with metacercariae alone, 2 mice of 10 were dead at 10 weeks post infection(20% mortality), and adult flukes were recovered from the liver and the peritoneal cavity of the remaining 8 mice(100% infectivity). In the group of mice treated with prednisolone and infected with metacercariae, 8 of 10 mice died before euthanasia with a mean time of death earlier than the control group ( $p<0.05$ ). In the group of immunosuppressed mice infected with metacercariae and treated with closantel 20mg/kg, 4 of 10 mice died before sacrifice. In the group of mice infected and treated with closantel 20mg/kg, mortality and infectivity was 10% and 30%, respectively. Similar results were observed in mice infected and treated with closantel 5mg/kg which resulted in 10% and 50% mortality and infectivity, respectively. These results indicated that the efficacy of closantel treatment was decreased in immunosuppressed mice, while the pathogenicity was increased. In immunoenhanced mice infected

---

이 논문은 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비(PRT-ID : KRA427, 과제번호 : 04-G-0029)에 의하여 연구되었음.  
Address reprint requests to Dr. Sung-shik Shin, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Republic of Korea.

with metacercariae, on the other hand, the efficacy of chemotherapy with both 5mg/kg or 20mg/kg closantel resulted in only 10% infectivity. The results shown in this study strongly suggest that a close interaction between chemotherapy against *F. hepatica* with closantel and the host immune system exists. Considering that fascioliasis is a zoonosis, treatment regimen against the infection to immunosuppressed patients may require a concurrent prescription of an appropriate immuno-enhancing adjuvant.

**Key words :** *Fasciola hepatica*, chemotherapy, immunosuppression, closantel, immuno-enhancement.

## 서 론

간질(*Fasciola hepatica*)은 사람을 포함하여 거의 모든 포유동물의 간에 감염을 일으켜 숙주에 피해를 주는 기생충이다. 이 기생충은 특히 소나 염소 또는 양과 같은 반추류 가축에 많이 기생하여 세계 여러 나라에서 상당한 경제적 손실을 초래하며<sup>1</sup>, 사람에도 감염하여<sup>2</sup> 공중보건학상으로도 중요하다. 간질은 우리나라 전역에 분포해 있으며 가축에서의 감염률은 축종과 검사방법 및 지역에 따라 차이는 있으나 높게는 약 87%에서 낮게는 약 11%가 감염되어 있는 것으로 나타났다<sup>3</sup>. 외국에서는 간질이 초래하는 경제적인 손실과 이 기생충의 복잡한 생활사가 불러일으키는 학문적인 흥미 때문에 많은 연구가 수행되어 왔으며 우리나라에도 종숙주의 감염률 조사와 자연감염우에 대한 간질용 구충제 적용시험과 중간숙주 애기물달팽이의 생태조사 등에 관한 연구가 시행되었다<sup>4</sup>. 가축에서의 간질감염증에 대한 숙주의 면역반응은 완전한 방어면역을 형성하지 못하므로<sup>5-7</sup> 현재로서는 간질증의 치료 및 관리는 화학요법에 의존하고 있다.

병원성 미생물에 의해 야기된 질병의 치료과정에 있어서 숙주의 면역계는 약물요법에 의한 치료 기전에 깊숙이 관련되어 있으며 따라서 약물요법시 숙주 면역계의 상태를 고려해야 한다는 것이 최근 AIDS에 관한 많은 연구에서 시사되고 있다. 특히 기생충증에 대한 약물요법은 숙주의존성이 강한 경향이 있으며, 때문에 HIV에 감염된 환자의 기생충증에 대한 치료는 실패하거나 재발하는 경우가 많다<sup>8</sup>. 실례로 AIDS에 걸린 환자가 리

시마니아증(leishmaniasis)에 걸렸을 경우 치료제인 antimony계 약물에 반응하지 않거나 매우 미약하게 반응한다는 것이 알려져 있고<sup>9,10</sup>, 많은 항바이러스제들이 AIDS 환자들이 급증하기 시작한 이후 개발되고 있으나 항바이러스의 효과를 얻기 위해서는 정상적인 숙주의 면역반응을 필요로 하는 경우가 대부분이다. 예를 들면 HIV-1에 감염된 환자가 acyclovirus 또는 ganciclovirus에 감염되었을 경우 zidovudine의 치료에 반응하기 위해서는 CD4+ 림프구가 존재해야 하며, 바이러스 감염에 대한 감마인터페론요법 역시 숙주의 정상적인 면역반응이 필요하다는 것이 보고가 있다<sup>11</sup>. 면역억압된 개체에 기생충을 감염시킨 후 치료용량 이하의 약을 투여하면 정상개체에서와는 달리 그 약에 내성을 가지는 기생충이 형성되는 경우가 있는 반면<sup>12,13</sup> 어떤 종류의 구충제들은 Freund's complete adjuvant(FCA)나 5-fluorouracil과 같은 면역활성제를 함께 투여할 경우 투여된 약물과 상가작용을 하여 구충제만 투여할 때보다 구충효과가 높게 나타난다는 보고가 있다<sup>14,15</sup>. 이와같은 보고들은 감염성 질병의 치료에 있어서 약물요법과 숙주의 면역기전 사이에는 서로 밀접한 상호 협력관계가 있음을 강력히 시사한다.

그러나 간질증에 대한 약물요법에 숙주면역계가 미치는 영향은 국내는 물론이고 외국에서도 아직까지 구체적인 연구가 실시되지 않은 상태이다. 다만 부분적으로 숙주의 면역반응이 간질 감염초기에 영향을 미친다는 보고가 있으며 감염이전에 면역억압제를 투여한 경우 대조군에 비해 부검시 더 많은 충체가 회수되었으며<sup>16</sup> 반대로 면역활성제를 투여한 경우 대조군에 비해 부검시 더 적은 충체가 회수되었다는 것이 알려졌다<sup>17</sup>. 이는 숙주면역계가 간질에 대해 완벽한 방어면역을 형성하지

는 못하지만 감염초기에 간질에 대한 감수성에 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸다. 잠재적으로 간질에 감염된 가축 또는 사람이 어떤 원인에 의해 면역계가 억압되어 있을 경우 화학요법이 반응하지 않거나 미약하다면 숙주 면역계의 영향을 받지 않는 새로운 약의 개발이 필요하게 될 것이며, 반대로 면역계를 활성화시킴으로 인해 구충제의 효능이 월등하게 뛰어나면 구충제를 투여할 때 면역강화제를 함께 처방함으로써 더 높은 구충효과를 기대할 수 있게 될 것이다. 따라서 본 연구는 면역억압 또는 활성화된 마우스에서 실험적 간질 감염에 대한 치료제의 반응을 관찰함으로써 숙주면역계가 화학요법에 의한 간질의 치료기전에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**피낭유충의 생산 :** 애기물달팽이(*Lymnaea viridis*)는 이등<sup>4</sup>의 방법으로 사육하였다. 간질 충란을 실험적으로 감염시킨 토끼의 담낭에서 채취하여 부화시킨 다음 달팽이 한 마리당 3개의 miracidia를 감염시켜 피낭유충을 생산하였고, 생산된 피낭유충은 4℃의 냉장고에 보관하여 사용하였다.

**실험동물 :** 대한실험동물센터에서 구입한 SPF 마우스로서 생후 10주된 Institute of Cancer Research(ICR)계 암컷 마우스를 사용하였다. 실험을 시작하기 직전의 평균 마우스 체중은 30g/mouse였다. 마우스는 각 군당 10마리씩 하나의 케이지(rat cage, 대종기기상사)에 사육하였으며 사료(실험동물용 마우스사료)와 물은 마음대로 먹을 수 있도록 공급하였다.

**간질 피낭유충(metacercaria)의 감염 :** 마우스에 피낭유충을 경구 감염시키기 위하여 23g scalp vein set를 needle 끝이 무디도록 개조하여 사용하였다. 마우스당 피낭유충 3개씩을 증류수와 함께 식도 내로 주입하여 감염하였다.

**면역조절제 :** 면역활성제로는 Freund's complete adjuvant (FCA, Sigma, USA)를 감염전 1주일과 감염 당일에 각각 1회씩 총 2회 투여하였다. 투여량은 모든 마우스에 균일하게 100 µl/mouse를 복강내로 투여하였다. 면역억압제로는 prednisolone(삼우화학공업(주))을 사용하였으며 감염전 4일부터 부검할 때까지 이틀에 1회 15mg/kg/mouse를 피하주사하였다.

**간질 구충제 :** Closantel(Flukiver<sup>TM</sup>, Janssen Pharmaceutica,

Beerse, Belgium)을 감염후 1주일째에 실험군에 따라 5mg/kg 또는 20mg/kg을 증류수 0.2ml에 희석하여 1회 경구 투여하였다. Closantel의 투여용량중 20mg/kg은 랫드에서의 치료적 용량으로 보고된 것이며<sup>18</sup>, 치료적 용량 이하로서 5mg/kg을 임의로 설정하여 투여하였다.

**실험군 설계 :** 실험군 및 대조군은 Table 1과 같이 설정하였다. 이 실험은 비슷한 조건에서 2회 반복하였으며, 그중 대표적인 결과를 제시하였다.

**IL-5 and INF-γ의 측정 :** 감염 3주째에 각 군별로 5마리를 무작위로 선정하여 미정맥으로부터 채혈하여 혈청을 분리한 후 마우스용 interleukin 5(IL-5), gamma interferon (INF-γ) ELISA kit(Endogen, Inc, USA)를 사용하여 측정하였다.

**부검 :** 실험도중 폐사한 마우스는 폐사 즉시 부검하였고 감염후 10주까지 폐사하지 않은 마우스의 경우 ether로 마취후 안락사시켜 부검하였다. 부검시 간질에 의해 나타날 수 있는 소견인 전신성 황달, 복강내 출혈, 간의 손상정도, 충체의 유무 등을 집중적으로 관찰하였다. 복강 및 간실질 내에 있는 간질의 회수를 위해 복강을 노출시킨 즉시 복강내 모든 장기를 생리식염수에 넣고 다시 간을 따로 분리하여 다른 생리식염수에 넣은 후, 세절하여 간질 충체의 유무를 해부현미경으로 관찰하였다. 유충과 성충의 감별은 담낭, 장 내용물 또는 충체 내에 성숙충란의 유무를 확인하여 결정하였다.

**감수성 지표(Susceptibility Index) :** 면역 억압 또는 활성화된 마우스에서 간질 감염에 대한 병원성과 간질 구충제에 의한 치료효과를 하나의 숫자로 표현하기 위해 충체 또는 병변유무와 마우스의 기간별 폐사여부를 아래와 같은 임의적인 기준으로 각 개체별로 점수를 부가한 후 평균을 낸 값을 감수성 지표로 표현하였다.

감수성 지표(SI) = 각 마우스당 부검시 충체 또는 병변 유무(40점)에 기간별 폐사여부(60점)를 합한 값의 평균.

감수성 지표를 계산하는데 있어 충체가 회수되었거나 폐사된 마우스로부터 충체를 찾지 못하였더라도 전형적인 간질유충에 의한 부검소견이 인정되었을 경우 40점을 부가하였다. 기간별 폐사여부는 폐사여부(40점)와 폐사시기(20점)를 합한 값으로서 감염된 마우스가 실험기간동안 폐사하였을 경우 일률적으로 40점을 부가하였으며 여기에 폐사 시기에 따라 0에서 20점을 추가하였는데 감염후 5주에 죽었을 경우 20점, 6주에 죽었을 경우 16점, 7주: 12점, 8주: 8점, 9주: 4점 그리고 부검일인 10주째

Table 1. Experimental design and treatment protocol

Group ID	Treatment
N	Uninfected, non-treated control
I	<i>F. hepatica</i> metacercaria(MC) infection <sup>a</sup> control
P	Prednisolone <sup>b</sup> only
I+P	Prednisolone+MC infection
A	Adjuvant <sup>c</sup> only
A+I	Adjuvant+MC infection
C	Closantel <sup>d</sup> 2mg/kg only
C5+I	Closantel 5mg/kg+MC infection
C20+I	Closantel 20mg/kg+MC infection
P+C20	Prednisolone+Closantel 20mg/kg
I+P+C20	Prednisolone+Closantel 20mg/kg+MC infection
I+P+C5	Prednisolone+Closantel 5mg/kg+MC infection
A+C5	Adjuvant+Closantel 5mg/kg
I+A+C5	Adjuvant+Closantel 5mg/kg+MC infection
A+C20	Adjuvant+Closantel 20mg/kg
I+A+C20	Adjuvant+Closantel 20mg/kg+MC infection

<sup>a</sup> Each mouse was inoculated with 3 metacercaria of *F. hepatica per os*.

<sup>b</sup> Mice were treated with prednisolone (15mg/kg) via the i.p. route every other day from 4 days before infection until sacrificed.

<sup>c</sup> Mice were injected with 100 µl of Freund's complete adjuvant (Sigma) via the subcutaneous route twice at 1 week before and at the time of experimental infection with *Fasciola hepatica* metacercaria.

<sup>d</sup> Mice were treated once with closantel (Flukiver<sup>TM</sup>, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium, either 5mg/kg or 20mg/kg) at 1 week post infection *per os*.

까지 생존해 있을 경우 0점을 추가하였다. 위의 기준으로 계산한 감수성 지표는 한 군의 마우스가 감염후 5주째에 모두 폐사하고 폐사한 모든 개체에서 간질 총체가 회수되었거나 전형적인 간질 유충에 의한 병변이 관찰되었을 경우 100이 되며 반대로 실험종료일인 감염후 10주째에 모두 살아있고 간질 총체가 전혀 회수되지 않았으며 아무런 병변이 관찰되지 않았을 경우에는 0이 되도록 하였다. 감염후 5주를 폐사기점으로 삼은 이유는 본 실험 및 예비실험에서 간질에 감염된 마우스가 5주째부터 폐사하기 시작하였기 때문이다.

통계: 그룹간 혈중 IL-5 및 IFN-γ의 유의성 검정은 비모수적인 방법으로 분산분석을 행하였으며 각 그룹간 폐사율에 대한 통계는 비모수적인 방법으로 Wilcoxon test를 적용하였고, 치료율에 대한 그룹간 통계는 모비율

의 차에 대한 z-검정을 실시하였다.

## 결 과

면역억압 또는 향상된 개체의 간질 감염에 대한 감수성: Prednisolone에 의해 면역억압 또는 면역향상된 마우스의 실험적 간질감염에 대한 결과를 Table 2에 제시하였다. 면역억압이 되지 않은 대조군(Gr. I)의 경우 피낭유충을 감염시킨 결과 감염후 7주와 9주째에 각각 1마리씩 폐사하였으며 부검한 결과 급성간질증 소견이 관찰되었다. 또한 폐사한 마우스로부터는 각각 1마리의 유충이 복강에서 회수되었다. 그러나 나머지 8마리는 감염후 10주째 부검할 때까지 생존해 있었으며, 8마리로부터 각각 1마리씩의 성충이 회수되어 결과적으로 감염군 모두

Table 2. Susceptibility of immunomodulated mice against experimental infection with *Fasciola hepatica*

Treatment	Week post Infection						Mean time of death (week)	Mortality (%)	Worm recovery rate (%)	Susceptibility Index
	5	6	7	8	9	10				
P <sup>1</sup>						10 alive	-	0	0	0
A <sup>2</sup>						10 alive	-	0	0	0
I <sup>3</sup>			1 dead (1 imm <sup>4</sup> )		1 dead (1 imm)	8 alive (8 ad <sup>5</sup> )	8	20	100	49.6
I+P	1 dead (imm)	5 dead (3 imm, 2 PC <sup>6</sup> )	1 dead (1 imm)	1 dead (1 imm)		2 alive (0 ad)	6.25	80	80	76.0
I+A						10 alive (3 ad)	-	0	30	12.0

<sup>1</sup> Prednisolone control; mice were treated with prednisolone (15mg/kg) via subcutaneous route every other day from 4 days before infection until sacrificed.

<sup>2</sup> Adjuvant control; mice were injected with 100 µl of Freund's complete adjuvant (Sigma) via subcutaneous route twice at 1 week before and at the time of experimental infection with *Fasciola hepatica* metacercaria.

<sup>3</sup> Infection control; each mouse was inoculated with 3 metacercaria of *Fasciola hepatica* per os.

<sup>4</sup> Number of mice with immature worms.

<sup>5</sup> Number of mice with adult worms.

<sup>6</sup> No. worms recovered, but pathologic changes due to *F hepatica* infection were present.

Refer to Table 1 for abbreviation of each group and experimental design.

에서 유충 또는 성충이 회수되었다. 성충이 회수된 마우스들은 외관상 감염시키지 않은 개체들과 큰 차이가 없었으며 유의성 있는 체중감소도 관찰되지 않았다. 성충들은 모두 총담관에서 기생하고 있음이 관찰되었는데 성충이 들어 있는 총담관은 정상 총담관과 비교하여 크게 확장되어 있었고 두텁고 질긴 섬유소성 결합조직으로 구성되어 있었으며 주위의 간실질 조직과의 뚜렷한 구별이 관찰되었다. 반면에 폐사한 개체들은 폐사되기 2-3일 전부터 피모가 거칠어지고 칙음한 상태였으며, 부검시 전형적인 간질 감염의 소견인 황달, 간실질조직의 파열 등이 관찰되었다. 또한 간실질조직엔 유충의 이행으로 인한 섬유소성 결합조직이 형성되어 있었으며, 심한 복강내 출혈이 관찰되어 폐사의 주 원인으로 추측되었다. Prednisolone을 투여하고 감염을 시키지 않은 대조군(Gr. P)의 마우스들은 10주째에 실시한 부검 때까지 모두 생존하여 prednisolone에 의한 독성으로는 폐사하지 않는다는 것을 보여주었다.

이에 반해 prednisolone을 MC 감염전 4일째부터 감염 후 10주까지 이틀에 한번씩 15mg/kg을 투여한 군(Gr. I+P)은 감염 후 5주째에 1마리, 6주째에 5마리, 7주째에 1마

리, 8주째에 1마리 등 총 8마리(80%)가 폐사하여 대조군(Gr. I)에 비해 폐사율이 유의성 있게 높았을 뿐만 아니라 평균 폐사시기도 6.3주로서 대조군에 비해 유의성 있게 단축된 것으로 나타났다(p<0.05). 폐사한 마우스들은 모두 전형적인 간질 감염의 소견을 나타냈으며, 회수된 유충들은 부검시 복강 또는 간실질에서 검출되었다. 폐사한 마우스 6마리에서 각각 1마리씩의 유충이 회수되었으며, 감염 6주째에 폐사한 마우스중 2마리에서는 충체를 발견하지 못하였으나 전형적인 간질 감염에 의한 폐사소견인 황달, 복강내 출혈 등이 관찰되었다. 폐사율, 폐사시기 및 총체 회수율로 구성된 감수성 지표(SI)는 대조군에서는 49.6임에 비해 면역억압된 군은 76.0으로서, 전 실험군중 가장 높은 지표를 나타냈다.

FCA로 면역활성시킨 마우스(Gr. I+A)의 경우, 2마리가 폐사하고 전 군에서 총체가 모두 회수된 감염 대조군(Gr. I, SI=49.6)에 비해 면역활성된 마우스에 감염시킨 군(Gr. I+A)에서는 한 마리도 폐사되지 않았다. 뿐만 아니라 감염 후 10주째에 실시한 부검결과 단지 3마리에서 성충이 회수되어(SI=12.0), 감염대조군(Gr. I)과 비교하였을 때 폐사율과 총체회수율 모두가 유의성 있게 감소

하였으며( $p < 0.05$ ), FCA에 의한 면역계의 활성화만으로도 간질 감염에 대한 치료효과가 있음이 관찰되었다. 면역 활성화만 시킨 대조군(Gr. A)의 마우스들은 외관상 비감염 대조군(Gr. N)과 차이가 없이 건강해 보였으며, 체중도 비감염대조군과 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

면역억압 또는 활성화된 개체에서 간질구충제의 치료효과 : Prednisolone의 투여로 인해 면역계가 억압된 마우스에서 간질 감염에 대한 closantel의 효능을 Table 3에 제시하였다. 간질을 감염시켰으나 면역억압을 시키지 않은 마우스에 closantel 5mg/kg 을 투여한 군(I+C5)에서는 감염후 8주째에 1마리가 폐사되었으며, 감염 10주째 실시한 부검에서는 생존해 있던 9마리중 1마리에서 유충이, 그리고 3마리에서 성충이 검출되어(SI = 24.8), 감염 대조군(SI = 49.6)과 면역억압 대조군(SI = 76.0)에 비해 현저하게 높은 치료효율을 나타냈다. Closantel 20mg/kg을 투여한 군의 경우, 감염후 9주째에 1마리가 폐사하고 10주째 실시한 부검에서 2마리에서 유충이 회수되었다(SI = 16.4). 그러나 면역계가 억압된 마우스의 경우 closantel 5mg/kg을 투여한 군은 감염 6주째에 6마리가 폐사되었으며(SI = 57.6), closantel 20mg/kg을 투여한 군에서

는 감염 7주와 8주째에 2마리가 각각 폐사하여(SI = 36.0) 면역계가 억압되었을 경우 closantel의 간질 감염에 대한 치료효율이 현저하게 감소하는 것이 관찰되었다.

이와는 대조적으로 Freund's complete adjuvant를 투여한 군의 경우, 5mg/kg 및 20mg/kg 투여군 모두 감염후 10주째 실시한 부검시 각각 한 마리에서 유충이 회수되어(SI = 4.0) 8주째에 1마리가 폐사하고 50%의 총체회수율을 나타낸 5mg/kg 대조군(SI = 24.8)과 9주째에 1마리가 폐사하고 30%의 총체회수율을 나타낸 20mg/kg 대조군(SI = 16.4)에 비해 closantel에 의한 치료효율이 상승되는 결과를 나타냈다.

간질 감염시 혈중 IFN- $\gamma$  와 IL-5의 변화 : 간질을 감염시킨 후 3주째에 각 군당 5마리의 혈청을 채취하여 혈중 IFN- $\gamma$ 와 IL-5 농도를 측정된 결과를 Fig 1과 2에 각각 제시하였다. 혈중 IFN- $\gamma$  함량은 비감염대조군(N)과 비교하였을 때 FCA로 면역 향상시킨 마우스를 간질 감염시킨 후 closantel 5mg/kg(I+A+C5) 또는 20mg/kg(I+A+C20)으로 치료를 실시한 군과 FCA로 면역향상을 유발하였으나 간질 감염은 시키지 않고 closantel 20mg/kg만을 투여한 군(A+C20)에서 유의성 있는 증가( $p < 0.01$ )가 관찰되

Table 3. Efficacy of closantel against *Fasciola hepatica* infection in immunomodulated mice

Treatment	Week post infection						Mean time of death (week)	Mortality (%)	Worm recovery rate (%)	Susceptibility Index
	5	6	7	8	9	10				
I+C5 <sup>1</sup>				1 dead (1 imm)		9 alive (1 imm 3 ad <sup>2</sup> )	8	10	50	24.8
I+C20 <sup>3</sup>					1 dead (1 imm)	9 alive (2 imm)	9	10	30	16.4
I+P+C5		6 dead (6 imm)				4 alive	6	60	60	57.6
I+P+C20			2 dead (2 imm)	2 dead (1 imm & 1 PC)		6 alive	7.5	40	40	36.0
I+A+C5						10 alive (1 imm)	-	0	10	4.0
I+A+C20						10 alive (1 imm)	-	0	10	4.0

<sup>1</sup> Mice were treated once with closantel 5mg/kg (Flukiver<sup>TM</sup>, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) at 1 week post infection *per os*.

<sup>2</sup> Number of mice with adult worms.

<sup>3</sup> Mice were treated once with closantel 20mg/kg at 1 week post infection *per os*.

All mice treated with prednisolone alone were alive at the time of euthanasia.

Refer to Table 1 for abbreviation of each group and experimental design.

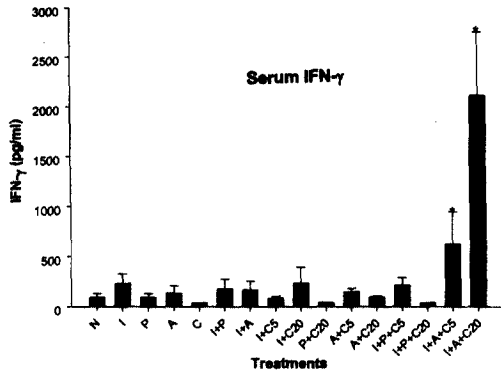


Fig 1. Serum interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) of immunosuppressed or immunoenhanced mice infected with *Fasciola hepatica* and treated with closantel. Blood from 5 mice were withdrawn from the tail vein at 3 weeks after infection with *F hepatica* metacercaria to measure the serum IFN- $\gamma$  using an ELISA kit. Refer to the Materials and Methods section for legends and details. Error bar represents the standard error, and the asterisk(\*) means that the value differs significantly from the uninfected non-treated control(N) group( $p < 0.05$ ).

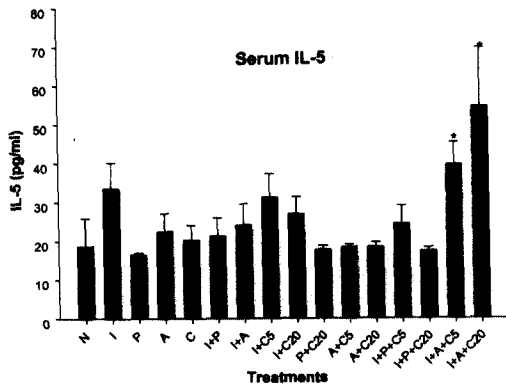


Fig 2. Serum interleukin 5(IL-5) of immunosuppressed or immunoenhanced mice infected with *Fasciola hepatica* and treated with closantel. Blood from 5 mice were withdrawn from the tail vein at 3 weeks after infection with *F hepatica* metacercaria to measure the serum IL-5 using an ELISA kit. Refer to the Materials and Methods section for legends and details. Error bar represents the standard error, and the asterisk(\*) means that the value differs significantly from the uninfected non-treated control(N) group( $p < 0.05$ ).

었다. 특히 면역향상된 마우스에 간질을 감염시키고 closantel 5mg/kg 또는 20mg/kg으로 치료한 군은 비감염대조

군과 비교하여 각각 6.7배 및 22.8배의 증가를 나타냈다.

혈중 IL-5 함량은 비감염대조군과 비교하였을 때 IFN- $\gamma$ 의 경우와 같이 FCA로 면역 향상시킨 마우스를 간질 감염시킨 후 closantel 5mg/kg(I+A+C5) 또는 20mg/kg(I+A+C20)으로 치료를 실시한 군에서 유의성 있는 증가가 관찰되었으며( $p = 0.03$ ), 그 외에 감염시킨 후 closantel 5 mg/kg으로 치료한 군에서도 유의성 있는 증가가 관찰되었다( $p = 0.02$ ).

## 고 찰

이 연구는 간질에 감염된 마우스가 면역 억압 또는 강화된 상태에서 구충제인 closantel에 의한 치료효능의 변화를 관찰한 결과, 면역억압이 된 마우스에서는 closantel에 의한 치료효과가 대조군에 비해 매우 낮은 반면, 면역강화된 마우스에서는 상대적으로 높은 치료효능을 나타냄을 관찰하였다. 또한 면역억압이 된 마우스가 간질에 감염시 폐사율 및 총체회수율 모두가 높아진 반면, 면역활성된 마우스는 대조군에 비해 폐사율 및 총체회수율 모두가 낮았다. 이 같은 결과는 closantel의 간질 감염에 대한 치료기전에 있어 숙주의 면역계가 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것을 시사한다.

많은 종류의 약들이 살균, 살바이러스 또는 살충효과를 발휘하기 위해서는 숙주의 정상적인 면역계의 협력이 필요하다는 것이 알려졌다<sup>19,20</sup>, 특히 많은 항바이러스제들이 AIDS 환자들이 급증하기 시작한 이후 개발되고 있으나 항바이러스의 효과를 얻기 위해서는 정상적인 숙주의 면역반응을 필요로 하는 경우가 대부분이다<sup>11</sup>. 이와같은 사실은 숙주면역능이 억압된 AIDS 환자에서 기생충 감염증을 치료하기 위해선 정상인에 투여하는 구충제 보다 훨씬 많은 용량을 투여해야 하거나 아예 치료가 되지 않는 경우도 있다는 보고와도 일치하며<sup>8,11</sup>. 이는 구충제의 효능이 개체마다 조금씩 다른 결과로 나타나는 원인이 내성균주에 기인하기도 하겠지만 숙주면역능의 저하로 인한 것일 수도 있다는 것을 시사한다<sup>21</sup>. 기생충증에 대한 약물요법이 숙주의 면역반응과 밀접하게 연관되어 있다는 것은 adjuvant(Freund's complete adjuvant)가 *Brugia malayi* 감염에 대한 diethylcarbamazine(DEC)의 구충작용을 향상시킨다는 보고<sup>14</sup>에서도 확인이 되었다. 또한 ivermectin은 cotton rat에 감염된 *Liomosoides carinii*의 암컷에 대해서는 구충효과가 있으나 성충에 대해서

는 제거하지 못하지만 ivermectin과 함께 FCA, picroliv, tuftsin 등의 adjuvant와 함께 투여할 경우 성충도 죽이는 효과를 나타내었다<sup>15</sup>. 이 adjuvant therapy는 사람의 항암 요법에서는 광범위하게 쓰이고 있는 것으로서 예를 들어 직장암 제3기 환자에게는 수술후 5-fluorouracil(5-FU) 및 levamisole을 이용한 adjuvant therapy를 실시하는 것이 보편화되어 있으며 그 결과 암으로 인한 사망율도 32%로 감소한다<sup>22</sup>. 그러나 간질증에서 약물요법에 의한 치료기전과 숙주의 면역반응의 관계에 대하여는 지금까지 보고된 것이 없다.

본 연구의 결과 가축의 간질증 치료제로 개발된 closantel<sup>23</sup>도 효과적인 간질 구충을 위하여는 숙주의 정상적인 면역반응이 절대적으로 필요하다는 것이 입증되었다. 또한 감염된 마우스의 면역계를 강화시키기만 하여도 closantel 20mg/kg을 투여한 군과 같은 효과를 나타냈기 때문에 closantel의 효능을 보다 강화시키기 위한 방법으로서 적절한 면역강화제를 함께 투여하는 것이 바람직한 것으로 추정되었다. Baeza와 Poitou<sup>16</sup>도 간질을 Wistar furth rats에 감염시키기 직전과 직후에 pro-inflammatory treatments를 하여본 결과 대조군에 비해 부검시 더 적은 수의 간질충을 발견하였다고 보고하여 adjuvant 등과 같은 면역활성물질이 간질의 감염초기에 감염성 및 병원성을 감소시킬 수 있음을 시사하였다.

본 연구에서는 면역활성제로 FCA를 사용하였으나 면역활성작용도 함께 가지고 있는 타 구충제와 closantel을 혼합하여 투여할 경우의 치료효율에 대한 결과가 주목된다. 그 이유는 몇몇 구충제들은 숙주의 면역반응을 변형시킨다는 것이 알려져 있기 때문이다<sup>24</sup>. 실제로 가축의 장내 선충류 구충제로 쓰이는 levamisole과 같은 약물은 면역자극제로서도 잘 알려져 있으며 항암요법에 널리 쓰이며<sup>22</sup>, 5-fluorouracil과 함께 직장암 환자에 투여할 경우 재발율을 줄이고 임프구 아세포들의 분포율에 변화를 초래한다<sup>25</sup>. 또한 *Schistosoma mansoni*에 감염된 마우스에서 RO11-3128과 같은 약은 antigen presentation 능력을 향상시킨다는 것이 보고되었고<sup>26</sup>, 약물치료에 의해 인공감염을 중지시킨 후 재감염시 면역능을 가진다는 것은 여러 기생충 감염에서 보고되었다<sup>27</sup>. 반면에 *Leishmania mexicana*에 감염된 마우스는 meglumine antimonate로 치료한 후 면역억압제인 cyclophosphamide나 hydrocortisone 등을 투여하면 감수성 있는 마우스 및 저항성을 지닌 마우스 모두에서 병소가 재발한다<sup>28</sup>. Metro-

nidazole은 *Trichomonas*, *Giardia* 및 *Entamoeba* 등의 치료에 쓰이는 약으로서 세포면역계를 억압하는 작용이 있다<sup>29</sup>. American trypanosomiasis의 치료에 널리 쓰이는 Nifurtimox도 면역계를 억압하는 것으로 보고되었다<sup>30</sup>.

비록 prednisolone 이외의 면역억압제를 가지고 추가실험을 하여 확인해야 할 내용이지만 본 연구의 결과로 미루어 보아 closantel을 투여할 때 스테로이드제제와 같은 항염증제를 함께 투여하여 치료할 대상의 면역계를 억압시키지 않아야 할 것으로 사료되며, 심하게 면역억압된 개체에서는 closantel을 사용하지 않도록 하거나 투여량을 증가해야 할 것으로 사료된다. Baeza와 Poitou<sup>17</sup>도 면역억압제를 투여하고 간질을 Wistar rat에 감염시킨 후 부검한 실험에서 면역억압제를 투여한 경우 대조군보다 부검시 더 많은 간질이 검출되었다고 보고하여 본 연구에서 관찰된 간질에 대한 면역계의 방어작용과 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

본 연구에서 면역억압된 개체가 간질에 감염되면 대조군에 비해 폐사기간이 단축되는 것이 관찰되었다. 폐사된 마우스들을 부검한 결과 대부분의 개체에서 유충들이 간 실질내에 또는 복강내에서 발견되었고, 심한 복강내 출혈, 황달 및 간실질의 파열 등이 관찰되었다. 이러한 부검소견으로 미루어 보아 마우스들의 폐사원인은 유충에 의한 물리적인 간조직의 파괴와 이로 인한 출혈이 직접적인 원인일 것으로 사료된다. 이와는 반대로 면역억압을 시키지 않은 대조군의 경우 2마리가 폐사되었을 뿐 나머지 8마리에서는 총담관내에 완전히 성숙한 성충이 존재하였고 감염된 마우스는 외관상 비감염대조군과 비교해 어떠한 병적 변화도 관찰되지 않았다. 이 같은 결과로 미루어 보아 면역억압된 개체가 조기에 폐사한 원인은 혈류를 따라 간으로 이행한 간질유충이 간실질을 이행할 때 숙주조직의 섬유소성 결합조직 형성이 억제되어 충체가 물리적으로 간실질을 파열시키는 것을 막지 못하였기 때문일 것으로 추정된다.

면역억압이 된 개체가 간질에 감염시 유충에 의한 간실질의 파열을 주 원인으로 한 심한 복강내 출혈로 인해 사망한다는 사실은 간질이 인수공통성 기생충이기 때문에 잠재적으로 심각한 결과를 초래할 수 있다. 간질은 전 세계적으로 150례 이상의 인체감염 보고가 있으며, 국내에서도 11례 이상이 보고되었다<sup>4</sup>. 만일 어떠한 이유로 인해 간질 상재지역에 거주하는 사람중 면역억압이 된 환자가 간질에 감염되었을 경우 야기되는 병원성은



정상인의 경우보다 훨씬 심할 것으로 여겨지며 심지어는 복강내 출혈의 가능성도 배제할 수 없을 것으로 본다.

본 연구에서 closantel을 투여한 군들에서는 감염 10주째에 실시한 부검에서 유충이 검출되기도 하였는데 이는 함께 실시한 감염대조군에서 모두 성충들이 회수된 것과는 다른 결과였다. Closantel의 투여시기가 피낭유충 감염후 1주째 였기 때문에 감염 10주째 closantel 투여군에서 성충이 아닌 유충이 회수된 사실은 closantel이 간질의 발육을 억제하거나 또는 지연시키는 기능을 포함하고 있음을 시사한다. Closantel은 간질의 미토콘드리아에서 일어나는 oxidative phosphorylation의 강력한 uncoupling 작용을 함으로써 구충효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며<sup>31</sup> *Haemonchus placei*, *H contortus*, *Bunostomum phlebotomum*, *Oesophagostomum radiatum*, *O columbianum* 등의 기생충에 대해 실험적으로 감염시키기 2-4주전에 투약하였을 때도 우수한 구충효과가 있어 예방적 효과가 있음이 보고되었으나 간질의 발육을 억제하거나 지연시키는지의 여부는 알려지지 않았다. 다만 Jorge<sup>18</sup>는 closantel이 성충에서는 뛰어난 치료효과를 나타내지만 유충에 대하여서는 그 효과가 떨어진다고 보고하였는데 본 실험에서 adjuvant에 의한 면역활성이 간질에 대한 저항성 및 closantel의 치료효과 상승이 있음을 시사하였기 때문에 간질증의 치료시엔 closantel과 adjuvant를 동시에 투여함으로써 성충 뿐만이 아니라 유충에서도 더 높은 구충효과를 발휘할 수 있을 것으로 생각된다.

이 연구에서 IFN- $\gamma$ 와 IL-5의 혈중함량은 면역활성된 마우스에 간질을 감염시킨 후 closantel로 치료를 시도한 군에서 일관성 있게 증가하는 경향을 보였다. 이는 마우스의 면역계가 closantel에 의한 치료기전과 밀접한 관계를 가지고 있다는 증거로서 주로 T helper 1(TH1) 세포 및 natural killer cell에서 분비되는 IFN- $\gamma$ 와 T helper 2(TH2) 세포에서 분비되는 IL-5의 혈중함량이 같이 증가되는 것으로 보아 세포성 면역계 및 체액성 면역계 모두가 활성화하여 closantel과 함께 간질을 제거하는 것으로 추정되었다. 이 실험에서는 간질치료제로서 closantel 한가지만 사용하였기 때문에 타 간질구충제들의 치료기전에 숙주의 면역계가 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 알 수 없었다.

## 결 론

본 연구는 기생충증에 대한 약물요법에 숙주면역계가 미치는 영향을 면역억압제나 면역활성제를 투여한 후 간질(*Fasciola hepatica*)에 감염시킨 마우스 모델에서 흡충류 구충제인 closantel의 투여에 따른 임상증세, 폐사율, 폐사시기, 총체회수율 및 cytokine 분비의 변화를 관찰함으로써 간질 감염증의 치료에 미치는 숙주면역계의 중요성을 조사하였다. Prednisolone의 투여로 인해 면역억압이 된 마우스에 간질 피낭유충을 감염시킨 결과 면역억압이 되지 않은 대조군에 비해 폐사율이 높았을 뿐 아니라 폐사하는 기간도 단축되었다. 폐사한 마우스들은 모두 간질질을 이행하는 유충에 의한 간조직의 물리적 파열과 이로 인한 복강내 출혈이 주요 폐사 원인이었으며, 이는 대부분 총담관에서 단단한 섬유소성 결합조직으로 둘러싸인 낭 속에서 성충으로까지 자란 대조군에서와는 달리 숙주의 면역세포에 의한 결합조직의 형성이 억압되어 폐사한 것으로 추정되었다. 이와는 반대로 Freund's Complete Adjuvant에 의해 면역활성이 된 마우스에서는 폐사예가 전혀 관찰되지 않은데다가 총체회수율도 30%로 나타나 대조군(100%)에 비해 간질에 대한 저항성이 크게 증가한 것으로 관찰되었다. 간질에 감염된 마우스에 간질치료제로 사용되는 closantel을 투여한 결과 면역 억압된 개체의 경우 closantel 5mg/kg 및 20mg/kg 투여군 모두 대조군에 비해 폐사율이 증가하고 폐사 기간도 단축된 반면 총체회수율은 증가하여 면역계가 억압됨으로 말미암아 closantel의 치료효율이 저하됨을 알 수 있었다. 이와는 반대로 면역활성이 된 마우스에 간질을 감염시킨 후 closantel 5mg/kg 및 20mg/kg으로 치료한 군에서는 폐사한 개체가 전혀 없었을 뿐만 아니라 총체회수율도 감염군중 가장 낮게 나타났다. 간질을 감염시킨 후 3주째에 혈중 IFN- $\gamma$  및 IL-5를 측정할 결과, 면역항상이 된 상태에서 간질 피낭유충을 감염시킨 후 closantel로 치료한 군(20mg/kg)에서 동일하게 가장 높게 나타났다.

위와 같은 결과는 마우스의 간질 감염에 대한 감수성이 숙주 면역계의 활성화 여부에 따라 차이가 있으며, 간질 치료제의 치료 효능 역시 숙주 면역계의 영향을 받는 것을 시사한다. 따라서 간질감염증을 치료할 때 구충제와 함께 면역 강화제를 함께 투여함으로써 더 높은 치료효과를 기대할 수 있는 반면, 면역 억압된 개체에서는 정상 개체에 투여하는 양보다 더 많은 용량을 투여해야 할 것으로 사료되었다.

## 참 고 문 헌

1. Malone JB. Fascioliasis and cestodiasis in cattle. *Vet Clin North Am (Food Anim Prac)*, 2:261-275, 1986.
2. Bendezu P, Frame A, Hillyer GV. Human fascioliasis in Corozal, Puerto Rico. *J Parasitol*, 68:297-299, 1982.
3. Lee CG. Fascioliasis in Korea : a review. *Korean J Vet Res*, 33(3):555-565, 1993.
4. Lee CG, Kim SK, Lee CY. Rapid growth of *Lymnaea viridis*, the intermediate host of *Fasciola hepatica*, under laboratory conditions. *Vet Parasitology*, 51:327-331, 1994.
5. Doyle JJ. The relationship between the duration of a primary infection and the subsequent development of an acquired resistance to experimental infections with *Fasciola hepatica* in calves. 1973. *Res Vet Sci*, 14:97-103, 1973.
6. Tahir EM, Haroun GV. Resistance to Fascioliasis-A review. *Vet Parasitol*, 20:63-93, 1986.
7. Alain C, Genevieve B, Chantal B. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int J Parasitol*, 25:1227-1241, 1995.
8. Zumla A, Croft SL. Chemotherapy and immunity in opportunistic parasitic infections in AIDS. *Parasitology*, 105:S93-S101, 1992.
9. Alvar J, Blazquez R, Najera R. Association of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus infections. *J Infect Dis*, 160:560-561, 1989.
10. Peters BS, Fish D, Golden R, et al. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. *Q J Med*, 77:1101-1111, 1990.
11. Koziel MJ, Walker BD. Viruses, chemotherapy and immunity. *Parasitology*, 105:S85-S92, 1992.
12. Abdullahi SO, Jennings FW, Holmes PH. The rapid development drug-resistance by *Trypanosoma evansi* in immunosuppressed mice. *Acta Tropica*, 50:249-257, 1992.
13. Doenhoff MJ, Davies AJS. Hypothesis : impaired immunity as a factor which contributes to the spread of drug-resistance. *Parasitology*, 105:S103--S105, 1992.
14. Tyagi K, Murthy PK, Chatterjee RK. *Brugia malayi* in *Mastomys natalensis*-Influence of immunostimulators on exertion of antifilarial activity of diethylcarbamazine. *Trop Med Parasitology*, 45:24-26, 1994.
15. Fatma N, Mathur KB, Chatterjee RK. Chemotherapy of experimental filariasis-Enhancement of activity profile of ivermectin with immunomodulators. *Acta Tropica*, 57:55-67, 1994.
16. Baeza E, Poitou I. Influence of anti-inflammatory treatments on experimental infection of rats with *Fasciola hepatica*: changes in serum levels of inflammatory markers during the early stages of fasciolosis. *Res Vet Sci*, 57:172-179, 1994.
17. Baeza E, Poitou I. Influence of pro-inflammatory treatments on experimental infection of rats with *Fasciola hepatica*: changes in serum levels of inflammatory markers during the early stages of fasciolosis. *Res Vet Sci*, 57:180-187, 1994.
18. Jorge G. Closantel: A review of its antiparasitic activity. *Prev Vet Med*; 2:317-327, 1984.
19. Cox FEG. Interaction between chemotherapy and immunity in bovine theileriosis. *Parasitology*, 105:S79-S84, 1992.
20. Berger BJ, Fairlamb AH. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. *Parasitology*, 105:71-S78, 1992.
21. Osman AS, Jennings FW, Holmes PH. The rapid development of drug-resistance by *Trypanosoma evansi* in immunosuppressed mice. *Acta Tropica*, 50:249-257, 1992.
22. Kohnewompner CH, Schoffski P, Schmoll HJ. Adjuvant therapy for colon adenocarcinoma-Current status of clinical investigation, *Annals of Oncology*, 5:S97-S104, 1994.
23. Guerrero J. Closantel : A review of its antiparasitic activity. *Preventive Vet Med*, 2:817-827, 1984.
24. Hanson WL. Chemotherapy and the immune response in protozoal infections. *J Protozool*, 28:27-30, 1981.
25. Holcombe RF, Stewart RM, Betzing KW, et al. Al-

- teration in lymphocyte phenotype associated with administration of adjuvant levamisole and 5-fluorouracil. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 38:394-398, 1994.
26. Smith DA, Bickle QD, Kaye PM. Resistance induced by drug abbreviated *Schistosoma mansoni* infections- Treatment with the drug Ro11-3128 leads to enhanced antigen presentation. *Immunology*, 82:419-426, 1994.
27. Horii Y, Makimura S. Protective immunity against multiple challenges of *Brugia pahangi* in mongolian gerbils induced by drug-abbreviated infection. *J Vet Med Sci*, 56:803-804, 1994.
28. Derossell RA, Deduran RD, Rossell O, *et al.* Is leishmaniasis ever cured. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 86:252-253, 1992.
29. Grove DI, Mahmoud AAF, Warren KS. Suppression of cell-mediated immunity by metronidazole. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 54:422-427, 1977.
30. Lelchuk R, Cardoni RL, Fuks AS. Cell-mediated immunity in Chagas' disease: alterations induced by treatment with a trypanocidal drug (nifurtimox). *Clin Exp Immunol*, 30:434-438, 1977.
31. Van den Bossche H, Verhoeven H, Vanparijs O, *et al.* Closantel, a new antiparasitic hydrogen ionophore. *Arch Int Physiol Biochem*, 87:851~852, 1979.
-