韓家衛誌 第31卷 第1號
Kor J Vet Serv (2008) 31(1) : 93-100.

Korean Journal
of Veterinary Service

랫드에서 아니사키스 유충에 대한 이버멕틴과 도라멕틴의 운동성 억제효과

이승환, 지차호*
충북대학교 수의과대학 수의학과
(접수 2008. 3. 4. 게재승인 2008. 3. 26)

Effect of ivermectin and doramectin for larval(*Anisakis* spp) migratory inhibition in rats

Seung-Hwan Lee, Cha-Ho Jee*

College of Veterinary Medicine & Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
(Received 4 March, accepted in revised from 26 March 2008)

Abstract

This experiment has been investigated in order to examine the effect of ivermectin and doramectin for laval migratory inhibition in rats. *Anisakis* spp larvae were obtained from the mackerels in fish market in Cheongju. A total of 225 rats were classified with 3 groups with the same number (3×75 rats); group I was control divided into 3 subgroups including 25 rats in each one, others (test groups) were treated subcutaneously with ivermectin and doramectin by 3 kinds of concentrations (200μg/kg, 400, 800), respectively. At 15 minutes after treating, 10 larvae were taken orally into each rat of 6 subgroups in test, and 5 rats were necropsied at 0.5, 1, 2, 4 and 8 hours after oral administration. The recovered larvae were used in larval migration inhibition (LMI). Ivermectin is significantly more effective than doramectin. In rats, the inhibitory effect of ivermectin and doramectin is slightly less than *in vitro*.

Key words: Larval migration inhibition(LMI), *Anisakis*, ivermectin, doramectin

*Corresponding author
Phone : +82-43-261-2985
E-mail : chjee@cbnu.ac.kr

서 론

Anisakis spp는 *Anisakis*속, *Contracaeum*속, *Pseudoterranova*속[1]에 포함되는 종으로 고등어, 명태, 대구, 붕장어, 광어 등과 같은 해산어류나 오징어 등의 두족류를 제2중간 숙주로 하고 고래, 돌고래, 물개 등의 해양포유류를 종숙주로 하는 선충류로서 실제로는 가축과 인체의 이소기생감염증이 더 큰 문제가 되는 실정이다.

Anisakiasis[2]는 고래회충감염증을 일컫는 말로서 정의되며 사람이 아니사키스 3기 유충에 의해 감염된 해산어류나 두족류를 생식할 때나 설 익혀 먹을 때 인체 감염으로 이어진다. 인체로 들어온 유충은 성충까지 성장될 수는 없으나 유충상태로 위나 장점막을 뚫어 복부에 통증을 일으킨다. 임상증상으로는 간질성 부종, 오심, 구토 등이 나타난다. 병리소견으로 위벽에 호산구성 육아종이 나타날 수 있고 이는 위궤양, 위암 등으로 진전될 수 있다. 또한 제거되지 않은 죽은 충체나 충체의 대사산물이 숙주에서 알러지 반응을 일으키기도 한다[3].

고래회충 유충(*Anisakis* larvae)에 의한 인체감염은 1960년 Van Thiel 등[2]에 의해 네델란드에서 처음 보고된 이후, 세계 각지에서 보고되었다[4-8]. 국내에서는 1971년 김 등[9]의 보고 이후 240례가 보고되었으나 실제 감염은 더 많을 것으로 추정된다[10-12].

적절한 치료제가 없는 실정이며 심하게 급성 감염된 경우에는 외과적인 방법(gastric removement)이 더 많이 사용된다. 고래회충감염증은 주로 급성으로 진행되나 숙주의 상태, 충체의 종에 따라 만성화로 진행되는 예도 적지 않게 있는 실정이다. 이러한 경우 아니사키스 유충이 장내에 있는 상태에서 조기에 진단이 이루어지면 구충제가 증상완화에 큰 효과를 발휘할 수 있을 것으로 기대되어 시험관내에서 이버멕틴, 도라멕틴, 에타놀에 대한 아니사키스 유충의 운동성 억제효과의 실험이 진행된바 있다[13]. 그 결과 이버멕틴과 도라멕틴에 대한 아니사키스 유충의 운동성 억제효과가 유의성 있게 나타났다. 우리는 이 실험을 토대로 랫드에서 이버멕틴, 도라멕틴에 대한 아니사키스 유충의 운동성 억제효과를 알아보는 실험을 계획했다.

Ivermectin은 1979년 Burg 등[14]에 의해 토양세균인 *Streptomyces avermitilis*의 발효 산물로 추출된 avermectin B1의 합성유도체이다. 개, 고양이, 말, 소, 양 및 돼지에 기생하는 내, 외부 기생충에 대해 효과적으로 사용되고 있으며, 구충기전은 선충류와 절족동물의 신경계통에 작용하여 억제성 신경전달물질인 GABA의 분비를 촉진시켜 신경전달을 방해하여 충체를 마비, 사멸시킨다고 한다[15,16]. Doramectin은 ivermectin과 같은 기전으로 작용하며, 내, 외부 기생충 구제에 쓰이는 종합 구충제로써 위, 장관내의 기생충 감염에 효과가 있다고 한다.

유충 운동성 억제 실험(larval migration inhibition bio-assays)은 구충제의 효과를 평가하기위해 고안된 방법[17,18]으로서 양에서 위장관내에 감염된 항기생충제의 효과를 알아보기 위해서도 사용되었다[19,20]. 본 실험은 아니사키스 3기 유충에 대한 ivermectin, doramectin의 유충 운동성 억제효과를 알아보기 위하여 랫드에 피하주사한 후, 경구 투여한 아니사키스 3기 유충을 분리해 시험관내에서 유충 운동성 억제 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

재 료

SD 랫드(12wks, 350g, male) 25마리씩 9군 총 225마리를 사용했다.

청주시 수산시장에서 구입한 고등어의 내장을 분리하여 2% 펩신 소화액을 첨가하여

37℃에 12시간 소화시킨 후 핀셋을 사용하여 아니사키스 L_3 를 분리하였다. 채취한 아니사키스 유충은 생리식염수로 2~3번 세척하여 탈초(exsheathment)하였다. 실험 시작 전에는 증류수로 세척하였다.

약물로는 ivermectin (200, 400, 800㎍/kg)을 corn oil에 10배 희석하여 사용하였고 doramectin을 같은 농도로 희석하여 사용하였다.

플라스틱 카테터를 이용해 아니사키스 3기 유충을 랫드에게 경구투여 하였다. 유충의 운동성을 평가하기 위하여 스테인레스 철망(직경 600 ㎛)을 실험에 사용하였다.

Table 1. Experimental design of the kinds of drugs, concentrations and number of SD rat

Group treated with	Sub-group	Con(㎍/kg) of drug	No of rats
Vehicle (corn oil)	1	200	25
	2	400	25
	3	800	25
Ivermectin	4	200	25
	5	400	25
	6	800	25
Doramectin	7	200	25
	8	400	25
	9	800	25

방 법

대조군에는 랫드에게 corn oil(200, 400, 800㎕/kg)을 피하주사 하였고, 실험군에는 ivermectin(200, 400, 800㎍/kg)을 농도별로 피하주사 하였다. Doramectin도 ivermectin과 같은 농도와 방법으로 피하주사 하였다. 혈중농도가 가장 높아지는 시점인 15분 후[1]에 고등어 내장에서 분리한 아니사키스 3기 유충을 한 군당 10마리씩 랫드에게 경구투여 하였다. 각 군에서 임의로 선택한 5마리의 랫드를 0.5, 1, 2, 4, 8시간 후 각각 부검하여 아니사키스를 분리하였다. 분리한 아니사키스는 RPMI1640 배지 40㎖가 들어있는 페트리디쉬에 넣고 0.5, 1, 2, 4, 8시간 후에 통과한 마리수를 관찰하였다(Table 1).

결과의 판정

철망을 통과한 유충의 마리수와 철망에 남아있는 유충 수를 계산하였다. 이것을 대조군과 비교해 봄으로써 약물의 효과를 평가하였다. 유충의 운동성 억제 실험(larval migration inhibition : LMI)은 다음 공식을 적용하여 구할 수 있다.

LMI(%) = 100 × (A-B)/A, A = RPMI 1640 배지에 약물을 첨가하지 않은 대조군에서 철망을 통과한 마리수, B= RPMI 1640 배지에 약물을 첨가 했을 때 철망을 통과한 마리수.

결 과

*Ivermectin*과 *doramectin*의 유충운동성 억제효과

Ivermectin을 투여한 군에서 30분 후 관찰하였을 때는 200, 400, 800㎍/kg 모두 유충운동성 억제율이 0%로 나타났다. 1시간 후 200㎍/kg에서 12.2%, 400㎍/kg에서 22%, 800㎍/kg에서 16.3%의 유충운동성 억제율을 보였으며 모든 군에서 유충운동성 억제효과가 나타났다(Fig 1, 2).

2시간 후 200㎍/kg에서 22%, 400㎍/kg에서 28%, 800㎍/kg에서 25%의 유충운동성 억제율을 나타내었다. 4시간 후 200㎍/kg에서 34.04%, 400㎍/kg에서 33.33%, 800㎍/kg에서 39.13%의 유충운동성 억제효과를 나타내었다. 8시간 후 200㎍/kg에서 30.43%, 400㎍/kg에서 27.08%, 800㎍/kg에서 43.75 %의 유충운동성 억제율을 나타내었다(Table 3).

Doramectin을 투여한 군에서 30분 후, 1시간 후에 관찰하였을 때는 200, 400, 800㎍/kg 모두 유충운동성 억제율이 0%로 나타났다. 2시간 후 200㎍/kg에서 8%, 400㎍/kg에서 6 %,

800㎍/kg에서 10.42%의 유충운동성 억제율을 보였으며 모든 군에서 유충운동성 억제효과가 나타났다. 4시간 후 200㎍/kg에서 10.64%, 400㎍/kg에서 10.42%, 800㎍/kg에서 15.22%의 유충운동성 억제율을 나타내었다. 8시간 후 200㎍/kg에서 10.87%, 400㎍/kg에서 6.25%, 800㎍/kg에서 12.5%의 유충운동성 억제효과를 나타내었다(Table 4). 모든 농도의 실험에서 이버멕틴이 도라멕틴에 비해 유충운동성 억제효과가 높은 것을 확인할 수 있다(Fig 4, 5, 6).

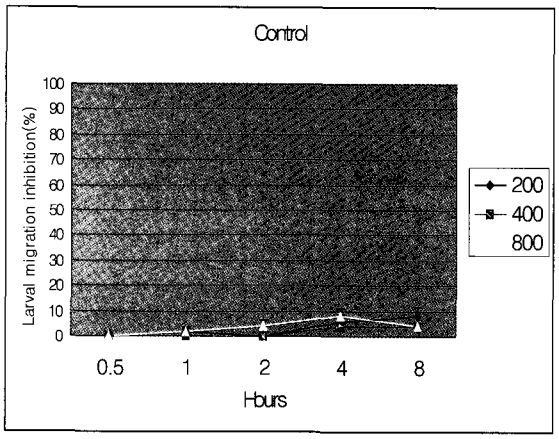

Fig 1. The results of control in larval migratory inhibition

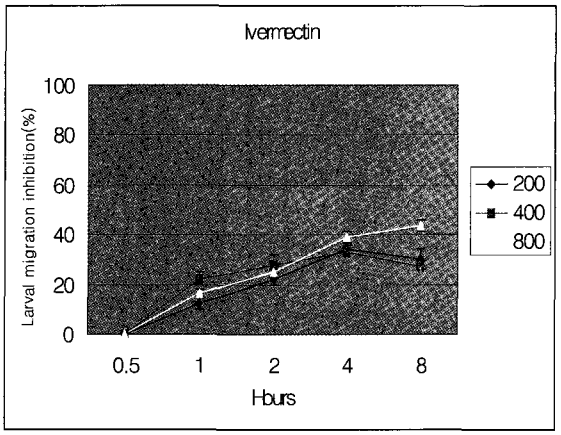

Fig 2. Ivermectin effect for larval migratory inhibition

Table 2. Larval migration inhibition activity of the control group

Corn oil (㎍/kg)	Time (hours)				
	0.5	1	2	4	8
200	0(0/50)	2(1/50)	0(0/50)	6(3/50)	8(4/50)
400	0(0/50)	0(0/50)	0(0/50)	4(2/50)	4(2/50)
800	0(0/50)	2(1/50)	4(2/50)	8(4/50)	4(2/50)

* Percentage LMI = 100 × (A−B)/A, in which A = total number of larvae, and B = the number of larvae which were migrated through the mesh in the test wells (corn oil).

Table 3. Larval migration inhibition activity of ivermectin by concentration(㎍/kg)

Ivermectin (㎍/kg)	Time(hours)				
	0.5	1	2	4	8
200	0(0/50)	12.2(6/49)	22(11/50)	34.04(16/47)	30.43(14/46)
400	0(0/50)	22(11/50)	28(14/50)	33.33(16/48)	27.08(13/48)
800	0(0/50)	16.3(8/49)	25(12/48)	39.13(18/46)	43.75(21/48)

* Percentage LMI = 100 × (A−B)/A, in which A = the number of larvae which were migrated through the mesh in the negative control wells, and B = the number of larvae which were migrated through the mesh in the test wells (ivermectin).

Table 4. Larval migration inhibition activity of doramectin according to the concentration (μg/kg)

Doramectin (μg/kg)	Time (hours)				
	0.5	1	2	4	8
200	0 (0/50)	0 (0/49)	8 (4/50)	10.64 (5/47)	10.87 (5/46)
400	0 (0/50)	0 (0/50)	6 (3/50)	10.42 (5/48)	6.25 (3/48)
800	0 (0/50)	0 (0/49)	10.42 (5/48)	15.22 (7/46)	12.5 (6/48)

* Percentage LMI = 100 × (A−B)/A, in which A = the number of larvae which were migrated through the mesh in the negative control wells, and B = the number of larvae which were migrated through the mesh in the test wells (doramectin).

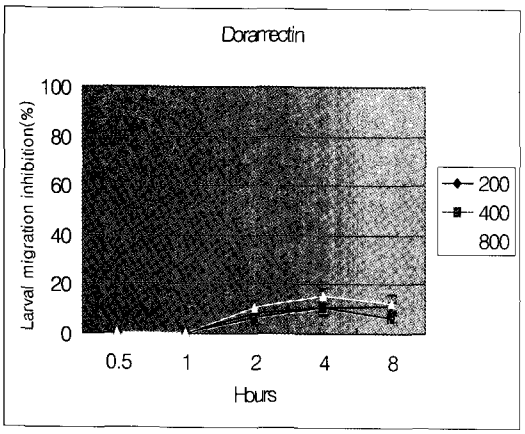

Fig 3. Doramectin effect for larval migratory inhibition by concentration

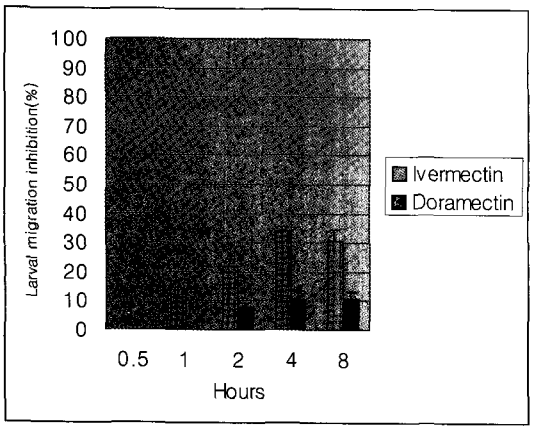

Fig 4. Compare of larval migration inhibition(%) at 200μg/kg between 2 drugs
*: Significantly different from ivermectin ($P < .05$) by ANOVA

고 찰

아니사키스증(Anisakiasis)은 아직 적절한 치료제가 없는 실정으로서 급성 중감염된 경우에는 외과적인 방법(gastric removement)이 더 많이 사용된다. 이러한 경우 아니사키스 유충이 장내에 있는 상태에서 조기에 진단이 이루어지면 구충제가 증상완화에 큰 효과를 발휘할 수 있을 것으로 기대되어 시험관내에서 이버멕틴, 도라멕틴, 에타놀에 대한 아니사키스 유충의 운동성 억제효과의 실험이 진행된바 있다[13]. 그 결과 이버멕틴과 도라멕틴에 대한 아니사키스 유충의 운동성 억제효과가 유의성 있게 나타났다. 우리는 이 실험을 토대로 랫드에서 이버멕틴, 도라멕틴에 대한 아니사키스 유충의 운동성 억제효과를 알아보는 실험을 계획했다. 아니사키스 3기 유충에 대한 이버멕틴, 도라멕틴의 약효를 알아보기 위해 랫드에 약물투여 후 경구투여한 아니사키스를 분리해 유충 운동성 억제 실험을 실시하였다. 이버멕틴을 투여한 군에서 시간에 따라 유충운동성 억제효과가 점진적으로 높게 나타났다. 도라멕틴의 경우도 시간에 비례해 유충운동성 억제효과가 어느 정도 나타난 것으로 볼 수 있지만 이버멕틴에 비해 그 효과가 덜 나타난 것을 볼 수 있다.

이버멕틴은 선충류와 절족동물의 신경계통에 작용하여 억제성 신경전달물질인 GABA의 분비를 촉진시켜 신경전달을 방해하여 충체를

마비시키는 기전으로 구충효과가 있다[15,16]. 이번 실험에서 유충운동성 억제효과를 나타낸 것도 이와 같은 구충기전에 의한 것으로 보인다. 도라멕틴은 이버멕틴과 같은 기전으로 작용하지만 피하주사는 물론 근육주사도 가능할 수 있게 제조되어 약물이 혈중에 오래 남아있게 하여 약효를 장시간 지속시킬 목적으로 만들어졌다[1].

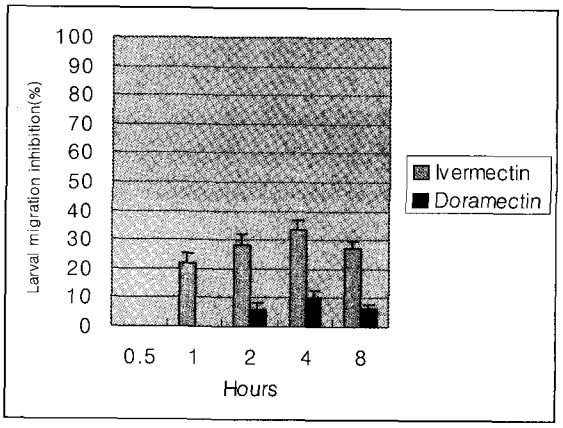

Fig 5. Compare of larval migration inhibition(%) between 2 drugs at 400μg/kg
*: Significantly different from ivermectin ($P < .05$) by ANOVA

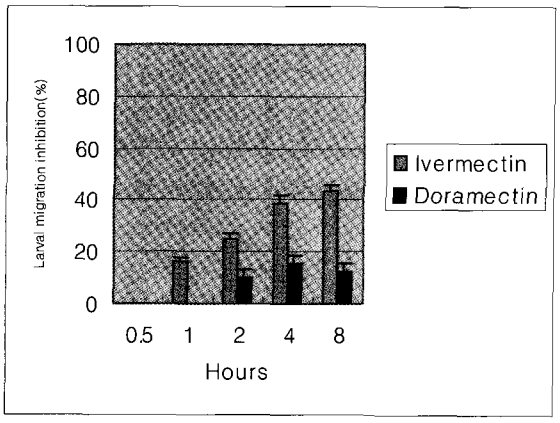

Fig 6. Compare of larval migration inhibition(%) between 2 drugs at 800μg/kg
*: Significantly different from ivermectin ($P < .05$) by ANOVA

이번 실험에서 약물을 피하주사로 실시하였는데 이로 인해 도라멕틴의 유충운동성 억제효과가 덜 나타난 것으로 추정된다. 또한 도라멕틴의 약효는 장시간 지속시킬 목적으로 만들었으므로 투여경로를 근육주사로 하고 유충운동성 억제실험 측정 시간을 늘려, 약효시간이 더욱 지속될 수 있는 가능성을 감안해 실험한다면 도라멕틴의 더 좋은 효과가 기대될 수 있을 것이다.

결 론

랫드에서 이버멕틴, 도라멕틴에 대한 아니사키스 3기유충의 운동성 억제효과가 있는지 알아보려고 실험을 실시하였다.

대조군에는 랫드에게 corn oil(200, 400, 800μℓ/kg)을 피하주사 하였고, 실험 군에는 이버멕틴(200, 400, 800μg/kg)을 농도별로 피하주사 했다. 도라멕틴도 이버멕틴과 같은 농도와 방법으로 피하주사 하였다. 혈중농도가 가장 높아지는 시점인 15분 후에 고등어 내장에서 분리한 아니사키스 3기 유충을 한 군당 10마리씩 랫드에게 경구투여 하였으며 각 군에서 임의로 선택한 5마리의 랫드를 0.5, 1, 2, 4, 8시간 후 각각 부검해 아니사키스 3기 유충을 분리했다. 분리한 아니사키스유충은 RPMI1640 배지 40mℓ가 들어있는 페트리 디쉬에 넣고 0.5, 1, 2, 4, 8시간 후에 유충의 운동성 억제(larval migration inhibition)실험을 실시했다. 이버멕틴을 투여한 군의 경우 시간에 비례해 유충운동성 억제효과가 점진적으로 증가했다. 도라멕틴을 투여한 군의 경우도 유충운동성억제효과가 나타났지만 이버멕틴보다 훨씬 효과가 좋은 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Papich MG. 2002. *Saunders handbook of veterinary drugs*. Saunders, North Carolina : 180.
2. Van Thiel PH, Kuipers FC, Roskam RT. 1960. A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop Geogr Med* 2 : 97-113.
3. Smith JW, Wootten R. 1978. Anisakis and anisakiasis. *Adv Parasitol* 16 : 93-163.
4. Besprozvannykh VV, Ermolenko AV, Kammer VD. 2004. Peter-the Great Gulf fishes are a source of human invasion of the nematode *Anisakis simplex* (the family Anisakidae). *Med Parazitol* (Mosk) 3 : 21-24.
5. Koyama T. 1982. Clinical, epidemiological and morphological studies on 150 cases of acute gastric anisakiasis in Fukuoda prefecture. *Jpn J Parasitol* 33 : 73-92.
6. Lòpez-Serrano MC, Gomez AA, Daschner A, et al. 2000. Gastroallergic anisakiasis: Findings in 22 patients. *J Gastro Hepatol* 15 : 503-506.
7. Pampiglion S, Rivasi F, Criscuolo M, et al. 2002. Human anisakiasis in Italy a report of eleven new cases. *Pathol Res Pract* 198 : 429-434.
8. Skimisson K. 2006. *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) larvae reported from human in Iceland after consumption of insufficiently cooked fish. *Laeknabladid* 92 : 21-25.
9. Kim CH, Chung BS, Moon YI, et al. 1971. A case report on human infection with *Anisakis* sp. *Korean J Parasitol* 9 : 39-43.
10. Cho SY, Chi JG, Kim IS. 1980. A case human anisakiasis in Korea. *Seoul Med* 21 : 203-208.
11. Im KI, Yong TS, Shin HJ, et al. 1990. Gastric anisakiasis in Korea. *Yonsei Rep Trop Med* 21 : 1-7.
12. Jin SJ, Suk DS. 1984. A case of human gastric anisakiasis in Korea. *Inje Med J* 5 : 359-363.
13. 전재형, 지차호. 2007. 시험관내에서 이버멕틴, 도라멕틴, 에타놀에 대한 아니키스 유충의 운동성 억제효과. 대한수의학회지 47(2) : 197-202.
14. Burg RM, Miller BM, Baker EE. 1979. Avermectin, a new family of potent anthelmintic agent: Producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother* 15 : 361-372.
15. 류판동, 최진규, 이문한. 1990. IVM의 임상약리학. 대한수의학회지 30 : 588-591.
16. Cambell WC, Fisher MH, Stapley EO. 1983. Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. *Science* 221 : 823-828.
17. Douch PGC, Morum PE. 1994. The effect of anthelmintics on ovine larval nematode parasite migration *in vitro*. *Int J Parasitol* 24 : 321-326.
18. Wagland BM, Jones WO, Hribar L, et al. 1992. A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int J Parasitol* 22 : 1183-1185.
19. Douch PGC, Harrison GBL, Buchanan LL, et al. 1983. *In vitro* bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralysing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int J Parasitol* 13 : 207-212.
20. Jones WO, Emery DL, Mcclure SJ, et al. 1994. Changes in inflammation

mediators and larval inhibitory activity in intestinal contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 24 : 519-525.