

脾臟細胞와 血清을 移入 받은 햄스터에서 肝吸虫 感染에
대한 免疫應答*

啓明大學校 醫科大學 外科學教室

林 台 鎮 · 朴 永 寬

慶北大學校 醫科大學 外科學教室, 寄生蟲學教室

黃 一 愚 · 崔 東 翊

=Abstract=

Immune Response to *Clonorchis Sinensis* Infection in Golden Hamsters Given Spleen Cells and Serum*

Tae Jin Lim, MD; Young Kwan Park, MD

*Department of Surgery, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

Ill Woo Whang, MD; Dong Wik Choi, MD

*Department of Surgery, and Parasitology Kyungpook National University
School of Medicine, Taegu, Korea*

The purpose of this study was to estimate the role of of spleen cell and serum in the transfer of immunity against *Clonorchis sinensis* in the inbred golden hamsters.

The donor hamsters (DH) were divided into 2 groups. One group was infected orally with the metacercaria of *C. sinensis*, and the other group was injected intraperitoneally with the excysted metacercaria of the fluke.

Forty days after sensitization, the hamsters were killed by anesthesia and the serum and spleen cells were collected.

Recipient hamsters (RH) were divided into 6 groups.

The hamsters of Group 1 were injected intraperitoneally (IP) with 2×10^6 spleen cells (SC) of the DH infected orally (Group I donor), those of Group 2 were injected IP with 2×10^6 SC of the DH injected excysted metacercariae IP (Group II donors), those of Group 3 were injected IP with 2×10^6 SC and 1ml of serum from Group I donors, and those of Group 4 were injected IP with 2×10^6 SC and 1ml of serum from Group II donors.

The hamsters of Group 5 were injected IP with 2×10^6 SC and those of Group 6 were injected IP with 2×10^6 SC and 1ml of serum from non-sensitized controls.

* 이 논문은 계명대학교 교내 각종연구비로 이루어졌음.

Seven days after primary sensitization, recipient hamsters were challenged orally with 30 metacercariae and Eggs per Gram (EpG) of fecal samples were counted from 15 to 49 days after challenge.

RH were killed 50 days after challenge, and the transfer of immunity to the RH was determined by significant differences in EpG, mean worm burdens, and immune cells per spleen sensitized and non-sensitized groups. The eggs of *C. sinensis* in the all recipient groups appeared in the 15th day by the formalin-ether sedimentation, and EpG noted the 16th day by Stoll's egg counting techniques after challenge.

The sudden increase of EpG, which assumed to be expelled the fluke into the intestinal tract, was noted in the 28th day in Groups 1,3,4 and the 31th day in Group 2. However there was no sudden increase of EpG in non-sensitized control Groups 5 and 6.

The hamsters of Gropus 3 and 4 harbored less flukes than those of Groups 1,2,5, and 6 and the differences in mean worm burdens were significant by the paired T-test.

The relatively small numbers of plaque forming cells were found in Groups 1,2,3, and 4, but no cells in Groups 5 and 6.

It is assumed that the intraperitoneal injection of spleen cells and serum from the donor hamster infected orally with the metacercariae or injected intraperitoneally with the excysted larvae of *C. sinensis* caused the transfer of protective immunity to the recipient hamsters

緒 論

蠕虫에 感染 또는 感作된 實驗動物에서 脾藏細胞를 分離 採集하여 非感染動物에 免疫을 移入코지 일찍 試圖되어 왔다.

Kim¹⁾은 guinea-pig를 모델로 하여 施毛虫(*Trichinella spiralis*)의 遲延型過敏症이 脾藏細胞의 注入으로 recipient에 移入됨을 陽性皮膚反應으로 確認하였다. Larsh²⁾은 施毛虫의 幼虫을 破壞하여 遠沈한 上清과 Freund's adjuvant의 混合物을 2回注射한 donor 마우스의 脾藏細胞를 移入받은 recipient 마우스는 對照群에 比하여 成虫數가 有意的으로 적었다고 報告한 바가 있으며 Larsh³⁻⁵⁾은 施毛虫抗原의 注入은 challenge 後 成虫의 有意的排出을 惹起하였으며 이렇게 處理한 마우스의 脾藏細胞도 비슷한 排虫效果를 나타내었다고 報告한 바가 있다.

Cypess⁶⁾는 마우스에 *Nematospirospiroides dubius*의 抗血清과 脾藏細胞를 移入한 10日後에 Challenge 感染시켰던 바 16日後에 脾藏細胞를 移入 받은 마우스에서 發見된 成虫數는 正常對照群보다 有意的으로 적었다고 하였으며 Love⁷⁾는 *Nippostrongylus brasiliensis*로 感作한 마우스의 脾藏細胞 또는 腸間膜細胞와 抗血清을 注入한 마우스에서의 損傷된 虫體는 正常虫體보다 빨리 排出되었으

므로 마우스에서 *N. brasiliensis*의 排出에는 抗體와 細胞가 協同作用하는 것을 示唆하였다.

그러나 Hunter⁸⁾ 및 Leigh는 *Nippostrongylus muris*로 感作된 白鼠의 脾藏細胞와 淋巴節細胞는 recipient 白鼠에 免疫을 移入하지 못하였다고 하며 Wakelin⁹⁾ 및 Lloyd는 施毛虫에 感染된 마우스의 腸間膜淋巴節細胞 또는 血清을 單獨注入하였을 때는 効果的免疫이 移入되지 않았으나 함께 注入하면 免疫의 移入(虫體 排出의 顯著한 促進)을 認定할 수 있었다고 하며 Flavell¹⁰⁾은 타이肝吸虫(*Opisthorchis viverrini*)에 感染된 햄스터의 脾藏細胞와 血清을 recipient 햄스터의 腹腔內注入한 後 challenge 感染시켰던 바 worm burden에는 非感染對照群과 有意的의 差가 없었으나 卵排出率에는 有意的의 感少를 나타내었다. 따라서 脾藏細胞에 의한 免疫의 移入은 成功的이라 할 수 없다고 하였으며 Dawkins¹¹⁾ 및 Groove는 感作脾藏細胞를 *Strongyloides ratti* 感染마우스에 注入하였던 바 그 成虫의 排出에 減少된 招來하였다고 한다.

最近 Haddow¹²⁾은 感作된 脾藏細胞는 쥐糞線虫(*Strongyloides ratti*)의 自然宿主인 白鼠에서 細胞性免疫을 移入하였다고 하며 崔¹³⁾ 및 殷는 肝吸虫의 代謝產物과 虫體構造物을 Freund's incomplete adjuvant와 混合하여 感作한 마우스의 脾藏에서 免疫(plaque)形成細胞를 少數 檢出할 수 있었다고 報告하였고 崔¹⁴⁾ 및 林은 ICR 마우스를 使用하여

肝吸虫으로 感作한 脾臟細胞와 血清이 免疫을 移入 하는지 그 與否를 究明하였던 바 脾臟細胞를 移入 받은 마우스群은 血清移入群과 對照群에 比하여 Eggs per Gram 은 減少되었으나 worm burden 에서는 差를 認定할 수 없었다고 報告하였다.

마우스는 肝吸虫의 感染期間이 40日内外로 大端히 짧고 胆道內 寄生成虫數는 5마리以下로서 肝吸虫의 免疫實驗에 不適合하나 랩스터는 그 感染期間이 길고 胆道內寄生成虫數도 많아 適合한 好適宿主라는 報告(崔 및 李¹⁵⁾)가 있어 肝吸虫 被囊幼虫의 經口 感染 또는 脫囊幼虫의 腹腔內注入으로 感作한 랩스터의 脾臟細胞와 血清이 recipient 랩스터에 免疫을 移入하는지 그 與否를 究明하였기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

供試動物：國立保健院에서 分讓받아 繁殖시킨 近交系 golden 랩스터, 體重 110—120g 을 使用하였다.

肝吸虫 被囊幼虫：慶北 清道郡 清道川에서 잡봉어 (*Pseudorasbora parva*)를 採集하여 肝吸虫 被囊幼虫을 立體顯微鏡下에서 分離하였다.

肝吸虫 脫囊幼虫：Komiya¹⁴⁾ 및 Tajimi 法에 따라서 魚肉을 人工胃液(稀醇鹽酸 3.0, pepsin 0.3, 蒸溜水 100)에 1對 1의 比率로 넣어 37°C 恒溫槽內에서 消化시켜 被囊幼虫을 分離 採集한 다음 이를 人工腸液(Sodium bicarbonate 0.2, trypsin 0.5, 生理的 食鹽水 50.0)에 넣고 37~39°C 恒溫槽內에서 脫囊시켰다. 이 幼虫은 即時 生理的 食鹽水로 3回 洗滌한 後 冷 M-199 溶液에 넣어 冷藏庫에 保管하였다.

Donor 랩스터의 感作：랩스터(生後 13~15 週된 숫컷) 10마리를 5마리씩 2群으로 나누어 第 I 群에는 30마리의 肝吸虫 被囊幼虫을 經口 感染시키고 第 II 群에는 30마리의 肝吸虫 脫囊幼虫을 1.0ml 의 M-199溶液이 들어있는 tuberculin 注射器內로 浮遊시켜 腹腔內注入하였고 2週後에 同數의 脫囊幼虫을 같은 方法으로 再注入하였다.

虫卵計算：challenge 經口 感染 第15日後부터 第17日까지는 每日 그 後는 3日間隔으로 formalin-ether 集卵法(Ritchie¹⁷⁾)으로 肝吸虫의 感染을 確認한 다음 Stoll¹⁸⁾氏 虫卵計算法으로 算定 그 感染程度를 推定하였다.

랩스터 血清의 分離：經口 感染 40日後(脫囊幼虫을

腹腔內 注入한 20日後)에 全 donor 랩스터를 ether 로 麻醉하여 心臟穿刺로 採血하여 血清을 分離하였다.

脾臟細胞의 採集：血清을 採取한 랩스터를 麻醉시켜 70% ethanol 에 全身을 담근 다음 滅菌된 종이타올위에 左側顔面이 위를 向하도록 놓고 鼠蹊部의 表皮를 가위로 切斷한 다음 有鉤 핀셋으로 당기면서 메스로 腹膜壁이 充分히 露出되도록 表皮를 벗겼다. 腹膜壁에 附着된 털을 除去하기 위해 70% alcohol 을 흘려보낸 다음 滅菌된 有鉤 핀셋으로 腹膜壁을 집어들어 가위로 크게 切斷하여 forceps 로 脾臟을 들어 내었다. 脾臟에 附着되어 있는 血管과 結締組織을 가위로 베어 除去한 後 5ml 의 冷 M-199이 들어있는 Falcon plastic petri-dish(13×100 mm)內의 Stainless steel screen (100mesh) 위에 놓고 rubber policeman(Difco, Detroit, Michigan)으로 문질러 細胞浮遊液을 만들었다.

生存細胞數의 計算：脾臟細胞浮遊液에서 살아있는 細胞數를 計算하기 위해 4容량의 0.2% trypan blue 와 1容량의 5倍 生理的 食鹽水(4.25% NaCl)를 혼합한 後 細胞浮遊液 1容량에 같은 量의 trypan blue saline 溶液을 加한 다음 血球計算板에 넣어 染色되지 않은(生存)細胞數와 染色된(死滅)細胞數를 各各 새어 生存細胞數와 總細胞數를 計算하였다.

Recipient 랩스터에 移入(第1次 感作)：〈表 1〉과 같이 랩스터 26마리를 感作群 4群, 1群 5마리씩 合계 20마리, 非感作對照 랩스터의 脾臟細胞 注入群 3마리 및 非感作對照 랩스터의 脾臟細胞 및 血清 注入群 3마리의 6群으로 나누었다.

感作群 랩스터 20마리중 第1群에는 肝吸虫 被囊幼虫 30마리를 經口 感染시킨 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 을, 第2群에는 本脫囊幼虫 30마리를 腹腔內注入한 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 을 第3群에는 本被囊幼虫을 經口 感染시킨 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 과 血清 1ml 를, 第4群에는 本脫囊幼虫을 腹腔內注入한 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 과 血清 1ml 를 腹腔內 注入하였다.

第5群에는 非感作對照 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 을, 第6群에는 非感作對照 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 과 血清 1ml 를 腹腔內 注入 하였다.

Recipient 랩스터에 Challenge 感染：感作 7日後에 6群 26마리의 recipient 랩스터에 肝吸虫 被囊幼虫 30마리씩 經口的으로 challenge 感染시켜 50日後에 屠殺하였다.

Worm burden(負荷虫體數)計算：랩스터 胆道內

에 있는 肝吸虫 成虫의 計數에는 肝을 메스로 2cm 두께로 切斷하여 두장의 유리板(9×12cm)사이에 놓고 壓迫하여 立體顯微鏡으로 虫體數를 세었다.

Agar: Bacto-agar(Difco, Detroit, Michigan)을 M-199에 0.7%가 되도록 溶解시켰다. Agar의 抗補體作用을 相殺하기위해 10% DEAE-Dextran(Pharmacia, Fine Chemicals, Sweden) 0.1ml를 各 20ml의 0.7% agar에 加하였다.

Trinitrophenol (TNP)-羊赤血球 (SRBC) 接合: Cacodylate buffer 7.0ml에 TNP 20mg을 溶解시켜 여기에 Packed 羊赤血球(SRBC) 1ml를 適下하면서 加하여 磁石 stirrer를 서서히 回轉시키면서 10分間 混合하였다. 50ml의 遠心管에 옮기고 여기에 modified barbital buffer(MBB)를 가득 차도록 加하여 2,000rpm 10分間 遠沈한 다음 上清은 버렸고 沈渣에 7.3mg glycyl-glycine 이 包含되어 있는 MBB를 加하였다. 沈渣에 이 造作을 한번 더 되풀이 하였다. 35~50ml의 MBB로 원심세척한 후 눈금遠心管에서 하룻밤 洗滌하여 balanced salt solution으로 1/15로 稀釋하였다. 이 SRBC는 conjugation buffer에 3~4日間 保存된다.

培養液 M-199의 製法: M-199粉末 細胞培養培地(Gibco, Grand Island, New York)를 蒸溜水(Gibco, Grand Island, N.Y.) 500ml에 溶解시켜 培地の pH가 알칼리인 진한 Orange red 색이 되도록 7% Sodium bicarbonate液을 가하여 調節하였다. 이 M-199 溶液이 ml當 Pot. PenicillinG 50 unit, Streptomycin sulfate 50μg 되도록 Penicillin-Streptomycin mixture (Whittaker M. A. Bioproduct, Walkersville, Md)를 가하여 2倍 原液을 만들었다.

Rabbit anti-hamster Ig의 製法: 램스터에 肝吸虫 被囊幼虫 30마리를 經口感染시켜 30日 經過한 後에 心臟穿刺로 血液을 採集하여 血清을 分離하였다. 冷抱和 ammonium sulfate 溶液(pH 7.0) 1容量을 遠心管에 넣고 흔들면서 1容量의 램스터血清을 滴下하면서 加하여 冷藏庫內에서 30分間두었다. 이것을 3,000rpm *3分間 遠沈하여 上清을 버렸고 沈渣에 蒸溜水를 加하여 溶解시켜 半透膜內에 넣고 冷藏庫內에서 phosphate buffered saline으로 透析하였다. 透析한 immunoglobulin에 同量의 Freund's incomplete adjuvant를 加하여 充分히 混合한 다음 토끼의 한쪽 등에 皮上注射하였고 3週經過한 後 再次 다른쪽 등에 booster 注射하였다. 1週後부터 必要時에 토끼의 耳靜脈에서 採血하여 血清을 分離하였다.

免疫(脾臟)細胞浮遊液: 램스터의 脾臟을 꺼내어 5ml의 冷 M-199가 들어있는 Falcon plastic Petri-dish(13×100mm)내의 Stainless steel screen (100 mesh) 위에 넣고 rubber policeman(Difco, Michigan)으로 문질러 細胞浮遊液을 만들어 이 液 0.5ml를 1.5ml의 M-199에 넣어 assay에 使用하였다.

Slide: one end frosted microscopic slides (American Scientific products)을 使用하였다. slide는 使用하기 前에 0.1% agar를 말라서 agar층이 slide 表面에 잘 붙도록 하였고 agarcell mixture를 붓기 前에 slide는 hot-plate 위에서 42~45°C로 加溫하였다.

補體: Lyophilized guinea-pig complement(Gibco, Grand Island, N.Y.)를 5ml의 蒸溜水로 溶解시킨 다음 M-199으로 10倍 稀釋液을 만들어 使用하였다.

間接 Jerne plaque assay: Zaleski¹⁹⁾가 修正한 方法을 썼다.

한 免疫細胞 浮遊液으로 2個의 Sample slide를 만들어 檢査하였다. 45°C 恒溫槽內에 미리 加溫한 Falcon-tude(17×100mm 크기)에 0.3ml의 liquid agar를 넣어 이어서 0.05ml의 標的細胞 浮遊液과 0.05ml의 免疫細胞浮遊液을 넣어서 손바닥사이에서 tube를 돌리면서 混合하여 45°C로 加溫된 slide 위에 부어 피지게 한 다음 室溫에서 agar를 凝固시켰다. 凝固된 agar가 있는 面을 밑으로 하여 特製 tray 위에 놓고 그 사이에 M-199을 注入하여 37°C, 5% CO₂ 培養器內에서 60分間 두었다가 tray에서 slide를 들어내고 M-199을 버린 다음 다시 tray 위에 slide를 놓고 새로 만든 10倍 稀釋 guinea-pig serum complement에 300倍 稀釋液이 되도록 rabbit anti-hamster Ig를 加한 混合液을 注入하여 다시 培養器內에 60分間 두었다. 培養器에서 slide를 들어내어 Fuji 등²⁰⁾의 方法에 準하여 扇風器로 20分間 乾燥시킨 다음 95% ethanol에 15分間 固定하고 蒸溜水로 洗滌한 후 室溫에서 乾燥시켜 permanent slide를 만들었다. 이렇게 하여 形成된 plaque를 헤아렸다.

成 積

Recipient 램스터에 肝吸虫 被囊幼虫 30마리씩을 challenge 感染시킨 後 第14日에서 第49日까지 感染群 즉 肝吸虫 被囊幼虫의 經口感染과 그 脫囊幼

虫의 腹腔内注入으로 感作한 랩스터와 非感作對照群 랩스터의 脾臟細胞 單獨 또는 脾臟細胞와 血清의 複合腹腔内注入이 肝吸虫의 生卵에 미치는 영향은 <表 2>와 같다.

肝吸虫 被囊幼虫의 經口感染으로 感作한 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 을 移入 받은 第1群 recipient 랩스터에서는 challenge 感染後 第15日째에 formalin-ether 集卵法으로 肝吸虫卵이 檢出되었고 第16日째에 Stoll 氏 虫卵計算法으로 EpG 가 나타났으며 그 後 漸次로 增加되어 第28日과 第34日째에 急激한 增加가 있었다.

肝吸虫 脫囊幼虫을 腹腔内注入하여 感作한 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 을 移入 받은 第2群 recipient 랩스터에서는 challenge 感染後 第15日째에 虫卵이 檢出되었고 第16日째부터 EpG 가 나타났으며 第31日째에 急激한 增加가 나타났다.

第 I 群 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 과 血清 1ml 를 함께 腹腔内注入 받은 第3群 recipient 랩스터와 第 II 群 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 과 血清 1ml 를 함께 腹腔内注入 받은 第4群 recipient 랩스터에서는 challenge 感染後 第15日에 虫卵이, 第16日째에 EpG 가 나타났으며 第28日에 急激한 增加가 있었다.

이에 比하여 非感作對照群 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 을 腹腔内注入 받은 第5群과 非感作對照群의 脾臟

細胞 2×10^6 과 血清 1ml 를 腹腔内注入 받은 第6群 랩스터에서는 Challenge 感染後 第15日째에 虫卵이 第16日째에 EpG 가 나타났으나 急激한 增加를 나타내지 않고 漸次로 增加되었다.

感作 및 非感作 脾臟細胞와 血清이 recipient 랩스터에서 肝吸虫의 worm burden 에 미치는 영향은 <表 3>과 같이 donor 랩스터의 脾臟細胞와 血清을 함께 腹腔内注入 받은 第3群 recipient 랩스터에서는 Challenge 感染後 第50日째에 平均成虫數 14.4, 虫體回收率은 48.0%, 第4群 recipient 랩스터에서는 平均成虫數 95.2, 虫體回收率 50.7% 있는데 比하여 非感作 랩스터의 脾臟細胞와 血清을 함께 腹腔内注入 받은 第6群 랩스터에서는 平均成虫數 19.3, 虫體回收率 50.7%로서 第3群 및 第4群과의 worm burden (平均成虫數)에 有意的 差를 認定할 수 있었다 ($p < 0.05$).

그러나 donor 랩스터의 脾臟細胞만을 腹腔内注入 받은 第1 및 第2群 recipient 랩스터에서의 平均成虫數는 各各 19.2 및 18.6, 虫體回收率은 各各 64.0% 및 62%, 非感作 랩스터의 脾臟細胞만 注入한 第5群 랩스터에서는 平均成虫數 19.0, 虫體回收率 63.3%로 第1 및 第2群과 第5群과의 worm burden (平均成虫數)에 有意的 差를 認定할 수 없었다 ($p > 0.05$).

<表 4>는 肝吸虫 被囊幼虫을 challenge 感染시킨

Table 1. Design of experiments to study the effect of sensitized spleen cells and sera on *Clonorchis sinensis* infection in golden hamsters

Donor hamsters			Recipient hamsters			Challenging infection
Group	No. of hamsters	Sensitization	Group	No. of hamsters	Primary sensitization	
I	5	30 metacercariae infected orally	1	5	2×10^6 SC** from Group I donor hamsters injected IP	30 metacercariae infected orally
II	5	30 excysted metacercariae injected IP*	2	5	2×10^6 SC from Group II donor hamsters injected IP	
			3	5	2×10^6 SC and 1ml of serum from Group I hamsters injected IP	
			4	5	2×10^6 SC and 1ml of serum from Group II hamsters injected IP	
			5	3	2×10^6 SC from hamsters non-sensitized controls injected IP	
			6	3	2×10^6 SC and 1ml of serum from hamsters nonsensitized controls injected IP	

* IP means intraperitoneally. ** SC means spleen cells.

Table 2. Effect of sensitized spleen cells and sera on Eggs per Gram in hamsters after challenging infection with *C. sinensis*

Group	No. of hamsters	No. of cysts challenged (ea)	Mean Eggs per Gram of feces on 14 to 49 days after challenging infection												
			14	15	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46
1	5	30	—* +**	100	2,300	2,200	5,100	14,900	17,700	45,000	70,300	61,800	63,100	71,200	52,100
2	5	30	— +	700	3,600	4,000	9,600	12,600	39,000	42,400	38,100	39,600	56,600	72,100	63,000
3	5	30	— +	900	5,200	2,100	7,200	16,900	24,000	25,100	36,900	29,500	23,000	15,200	45,100
4	5	30	— +	2,600	4,600	4,200	3,600	15,200	16,400	24,600	25,600	24,200	26,400	38,400	34,000
5	3	30	— +	300	500	1,400	3,800	6,100	4,500	8,900	10,200	9,400	15,200	19,400	24,600
6	3	30	— +	400	1,900	2,800	5,200	9,400	8,100	10,400	13,200	14,000	12,200	20,600	23,100

* — means negative by formalin-ether sedimentation technique.
 ** + means positive by formalin-ether sedimentation technique.

Table 3. Effect of sensitized spleen cells and sera on worm burdens of *C. sinensis* in golden hamsters

Group	No. of hamsters	No. of cysts challenged (ea)	Interval between challenged and necropsy (day)	Adult worm recovered					Worm recovery rate(%)	Significance	
				H*1	H2	H3	H4	H5			
1	5	30	50	17	17	24	18	20	19.2	64.0	p>0.05
2	5	30	50	19	17	24	20	13	18.6	62.0	p>0.05
3	5	30	50	14	13	16	15	14	14.4	48.0	p<0.05
4	5	30	50	14	15	14	16	17	15.2	50.7	p<0.05
5	3	30	50	16	20	21	—	—	19.0	63.3	
6	3	30	50	17	19	22	—	—	19.3	64.4	

* H means hamster.

Table 4. Spleen cells and plaque forming cells per spleen in recipient hamsters after challenging infection with *C. sinensis*

Group	Spleen cells per ml			No. of plaque forming cells per spleen					
	Mean No. of cells (X10 ⁶)	Mean No. of viable cells (X10 ⁶)	Viable cells (%)	H*1	H2	H3	H4	H5	Mean
1	1,368	1,227	89.7	2,200	1,600	3,200	1,400	3,600	2,400
2	1,237	1,108	89.6	400	1,600	1,800	2,800	1,400	1,600
3	1,164	1,018	87.5	1,200	400	800	2,000	1,600	1,200
4	1,273	1,119	87.9	600	2,200	3,000	1,400	1,800	1,800
5	1,425	1,221	85.7	0	0	0	—	—	0
6	1,412	1,210	85.7	0	0	0	—	—	0

* H means hamster.

50日後에 recipient 햄스터에서의 脾臟細胞浮遊液 ml 당 細胞數는 1.018~1.227×10⁶ 이었으며 그 生存細胞率은 85.7~89.7% 였다.

plaque 形成細胞는 非感染對照群인 第5, 第6群의 햄스터의 脾臟細胞에서는 찾아 볼 수 없었는데 比하여 感作群인 第1, 第2, 第3 및 第4群의 햄스터에

서는 各各 平均 2,400, 1,600, 1,200 및 1,800의 plaque 形成細胞를 찾아 볼 수 있었다.

考 察

이번 實驗에서 肝吸虫의 被囊幼虫의 經口感染과

脫囊幼虫의 腹腔內注入으로 感作한 近交系 donor 랫스터의 脾臟細胞와 血清은 recipient 랫스터에 免疫을 移入하는데 成功하였다.

즉 胆道에서 肝吸虫의 排出로 推定되는 EpG의 急激한 增加는 脾臟細胞 單獨 또는 脾臟細胞와 血清을 함께 腹腔內注入한 感作群 랫스터에서는 Challenge 感染後 28日과 31日째에 나타났는데 比하여 非感作對照群 랫스터에서는 이 傾向을 認定할 수 없었고 worm burden은 非感作對照群보다 脾臟細胞와 血清을 注入한 群에서 有意的으로 적었다. 免疫形成細胞는 全感作群의 랫스터 脾臟에서 少數 檢出할 수 있었으나 脾臟細胞 單獨 注入群과 脾臟細胞와 血清 注入群사이에서 有意的 差를 認定할 수 없었다.

이 成績은 感作脾臟細胞와 血清을 함께 注入하여 免疫의 移入에 成功하였다는 報告(Armour²¹⁾ 및 Dargie, 1974; Cypess⁶⁾, Love⁷⁾, Wakelin 및 Dineen²²⁾ Wakelin⁹⁾ 및 Lloyd, 1976; Haddow, 1984)와 符合된다.

Armour²¹⁾ 및 Dargie는 肝蛭에 感染된 쥐에서 採集한 淋巴系細胞와 血清을 recipient 쥐의 腹腔內 注入하였던 바 肝蛭感染에 대한 防禦免疫이 形成되었으며 防禦程度는 移入細胞量과 抗原의 刺戟持續性에 關係되는 것 같다고 報告한 바가 있다.

그러나 崔¹⁴⁾ 및 林은 ICR 마우스를 모델로 한 實驗에서 肝吸虫의 脫囊幼蟲으로 感作한 마우스의 脾臟細胞는 recipient 마우스에 免疫을 移入하지 못하였다고 하며 그들의 實驗에서 感作脾臟細胞를 腹腔內 注入 받은 마우스는 對照群 마우스보다 EpG의 減少를 認定할 수 있었으나 worm burden은 兩群間에 有意的 差를 認定할 수 없었고 免疫血清과 凍結溶解시킨 脾臟細胞를 移入받은 마우스에서의 EpG와 worm burden도 對照群과 비슷하게 나타났다.

Flavell 등¹⁰⁾도 타이 肝吸虫에 感染된 랫스터의 脾臟細胞와 血清은 recipient 랫스터에 再感染에 대한 防禦免疫을 移入하지 못하였다고 報告하였다.

崔等^{15,20)}은 마우스와 랫스터의 肝吸虫에 대한 免疫應答의 比較實驗에서 마우스의 肝吸虫 感染期間은 40日内外로 짧고 感染成虫數도 5마리 以下로서 免疫形成能力이 弱한데 比하여 랫스터는 感染期間이 길고 胆道內成虫數도 20마리 内外로 肝吸虫의 實驗에 適合한 動物로 認定되며 同一한 數의 肝吸虫 被囊幼虫을 感染시켰을 境遇 EpG의 急激한 增加는 랫스터에서만 나타나며 屠殺後 胆道內成虫數는 이 現象이 없는 群에 比하여 적으므로 胆道에서 成虫의 早期排出로 解釋된다고 報告하였다.

肝吸虫은 宿主의 十二指腸에서 脫囊한 幼虫이 Oddi 括約筋을 통하여 總輸胆管을 따라 移行하여 胆道內에 도달하기 때문에 組織內에 侵入하거나 組織의 實質과 直接觸하지 않는다. 따라서 肝吸虫은 宿主에 免疫應答을 惹起하는 能力 즉 抗原性에 弱하다.

肝吸虫의 獲得免疫에 대한 研究에서 Sun²⁴⁾ 및 Gibson은 肝吸虫의 代謝產物은 抗原性이 있으나 虫卵은 抗原性이 없다고 하였으며 Sun²⁵⁾은 肝吸虫 感作血清은 虫體周圍에 沈澱物을 形成하며 肝吸虫에 損傷을 惹起하였다고 報告하였다.

Goh²⁶⁾은 肝吸虫 抗原을 白鼠에 2回 皮下注入한 後 肝吸虫 被囊幼虫을 challenge 感染시킨 結果 對照群에 比하여 成虫數가 적으므로 獲得免疫이 生成된다고 報告하였으며 趙等²⁷⁾은 白鼠에서 肝吸虫에 대한 獲得免疫의 生成與否를 究明하였던 바 虫體의 크기에는 單回感染과 重復感染에 有意的 差를 나타내지 않았으나 重復感染시킨 虫體回收率은 對照群에 比해 낮으므로 抵抗性을 獲得하는 것으로 보아도 無妨하다고 推定하였다.

이에 反하여 Flavell¹⁰⁾ 등과 Sirisinha²⁸⁾ 등은 實驗의 타이 肝吸虫症 랫스터에서의 獲得免疫의 生成與否를 알아보았던 바 肝吸虫에 感染되어있는 랫스터는 同一한 吸虫의 再感染과 重復感染에 認定할 만한 防禦免疫이 나타나지 않는다고 報告하였다.

最近, Hayashi 등²⁹⁾은 Brugie malayi vaccine을 接種한 마우스에서 얻은 血清과 脾臟細胞가 正常마우스에 防禦免疫을 受動移入하는지 調査하였던 바 接種한 마우스의 脾臟細胞를 注入받은 recipient에서는 전혀 B. malayi 幼虫이 回收되지 않았으나 非接種 donor에서 얻은 脾臟細胞를 注入받은 마우스에서는 25.9%의 生存한 幼虫이 回收되었고 미리 10% 免疫血清에서 培養한 幼虫으로 Challenge 感染하면 虫體回收率이 增加되는 것을 알았다. 이와 같은 成績은 抗體依存性 免疫의 增強作用이 일어났을 것으로 생각된다고 示唆하였다.

Kayes³⁰⁾는 大蛔虫에 感染된 CBA/J 마우스에서는 感染後 第6日째에 非感染對照群에 比해 體重對脾臟의 重量比가 3.5倍 以上이었고 感染 第14日째에는 그 比가 5.0으로 最高值를 나타내었으며 그 後 第36日까지 徐徐히 減少되었다고 한다. 이 脾臟肥大는 受動的 門脈充血때문에 脾臟에 赤血球가 鬱血되어 생긴다는 過去의 推想과는 달리 White pulp의 增殖에 起因하는 것으로 밝혀졌다. 一般적으로 感作된 淋巴系細胞는 非感作 正常動物에 免疫을 移入할 수 있으나 感作血清은 잘 移入하지 못하는 것으로

알려져 있다.

吸虫類의 細胞性免疫에 대한 實驗에서 崔¹³⁾ 및 殷은 肝吸虫의 代謝產物 및 虫體構成物과 Freund 不完全 adjuvant 와의 emulsion 으로 感作한 近交系 마우스의 脾臟에서 plaque 形成細胞를 찾아볼 수 있었으며 朴等³¹⁾은 橫川吸虫의 代謝產物로 鄭等³²⁾은 肺吸虫의 代謝產物로 感作한 마우스에서 plaque 形成細胞를 찾아볼 수 있었다. 따라서 吸虫類의 感作時에 免疫形成細胞에서 만들어진 抗體樣 receptor 또는 抗體가 肝吸虫 感染時에 防禦作用을 나타내는 지는 아직 究明되지 못하고 있다.

肝吸虫免疫의 移入에 대한 權³³⁾ 및 崔는 肝吸虫의 脫囊幼虫으로 感作한 腹腔滲出細胞를 腹腔內注入한 마우스에서는 免疫이 移入됨을 究明하였으나 崔 및 林¹⁴⁾은 肝吸虫 脫囊幼虫을 腹腔內注入하여 感作한 마우스의 脾臟細胞를 recipient 마우스에 注入하였으나 効果的 免疫의 移入이 되지 않았다.

이런 實驗에서 recipient 랩스터를 第1次感作한 後 7日째에 Challenge 感染시킨 理由는 Kelly³⁴⁾ 및 Dineen 이 Nippostrongylus brasiliensis 에 대한 細胞性 免疫의 移入實驗에서 感染後 10日 또는 그 以後에 移入한 免疫細胞는 防禦效果가 지든지 거의 없었다고 報告하였기 때문이며 感作한 脾臟細胞와 血清을 함께 移入받은 랩스터에서만 worm burden 이 有意적으로 적은 것은 Hayashi 등²⁹⁾이指摘한 바와 같이 細胞性免疫에 抗體依存性 免疫의 增強作用이 일어났기 때문이라 생각된다.

要 約

肝吸虫 被囊幼虫의 經口感染과 脫囊幼虫을 腹腔內注入한 近交系 golden 랩스터의 脾臟細胞와 血清이 recipient 랩스터에 免疫을 移入하는지 實驗하였다.

donor 랩스터는 5마리씩 2群으로 나누어 第 I 群에는 肝吸虫 被囊幼虫 30마리를 經口感染시켰고 第 II 群에는 脫囊幼虫 30마리를 腹腔內注入한 다음 40日 後에 麻醉死시켜 脾臟細胞와 血清을 採集하여 recipient 랩스터의 腹腔內에 注入하였다.

recipient 랩스터는 5마리 혹은 3마리씩 6群으로 나누어 第1群에는 第 I 群 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 을, 第2群에는 第 II 群 donor 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 을, 第3群에는 第 I 群 donor 의 脾臟細胞 2×10^6 과 血清 1ml 를, 第4群에는 第 II 群의 脾臟細胞 2×10^6 과 血清 1ml 를, 第5群에는 非感作對

照群 랩스터의 脾臟細胞 2×10^6 을, 第6群에는 對照群의 脾臟細胞 2×10^6 과 血清 1ml 를 各各 腹腔內에 注入하여 第1次 感作하였다.

第1次 感作 7日 後 全 랩스터의 肝吸虫 被囊幼虫 30마리를 challenge 經口感染시켜 15日째부터 虫卵計算 하였고 challenge 感染 50日 後에 모두 屠殺하여 對照群의 EpG, worm burden 및 脾臟當 plaque 形成細胞數를 基準으로 하여 脾臟細胞 單獨 또는 脾臟細胞와 血清의 注入이 recipient 랩스터에 免疫을 移入하는지 그 與否를 判定하였다.

Challenge 感染後 全群의 랩스터에 formalin-ether 法으로 肝吸虫卵이 第15日째에 나타났으며 Stoll 氏¹⁸⁾ 計算法으로 Eggs per Gram 은 第16日째에 나타났고 胆道에서 肝吸虫의 排出로 推定되는 EpG 의 急激한 增加는 感作群인 第1, 第3 및 第4群 랩스터에서는 28日째에 第2群 랩스터에서는 第31日째에 나타났다. 그러나 非感作對照群인 第5 및 第6群 랩스터에서는 EpG 의 急激한 增加를 認定할 수 없었다.

感作한 脾臟細胞와 血清을 함께 腹腔內注入 받은 第3群 및 第4群 랩스터와 非感作對照群 랩스터와의 worm burden 에는 有意的 差를 認定할 수 있었으나 脾臟細胞만 注入한 第1 및 第2群 랩스터와 非感作對照群 랩스터 사이의 worm burden 에는 有意的 差를 認定할 수 없었다.

免疫形成細胞를 全感作群의 랩스터 脾臟에서 少數 檢出할 수 있었는데 比하여 非感作對照群 랩스터에서는 檢出할 수 없었다.

이 成績으로 肝吸虫 被囊幼虫의 經口感染과 脫囊幼虫의 腹腔內注入으로 感作한 랩스터의 脾臟細胞와 血清의 近交系 랩스터 腹腔內注入은 免疫을 移入함을 보였다.

參 考 文 獻

1. Kim CW: Delayed hypersensitivity to larval antigens of *Trichinella spiralis*. *J Infect Dis* 1966; 11: 208-214.
2. Larsh JE, Goulson HT, Weatherly NF, Chaffee EF: Studies on delayed (cellular) hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis* V. Artificial sensitization of donors. *J Parasitol* 1969; 55: 726-729.
3. Larsh JE, Goulson HT, Weatherly NF, Chaffee EF: Studies on delayed (cellular)

- hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis* V. Tests in recipients injected with donor spleen cells 1,3,7,14, or 21 days before infection. *J Parasitol* 1970 ; 56 : 978—981.
4. Larsh JE, Goulson HT, Weatherly NF, Chaffee EF: Studies on delayed (cellular) hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis* VI. Results in recipients injected with antiserum or "Freeze-thaw" spleen cells. *J Parasitol* 1970;56:1206—1209.
 5. Larsh JE, Race GJ, Martin HJ, Weatherly NF: Studies on delayed (cellular) hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis*. VII. Serologic and histopathologic responses of recipients injected with spleen cells from donors suppressed with ATS. *J Parasitol* 1974 ; 60 : 99—109.
 6. Cypess R: Demonstration of immunity to *Nematospiroides dubius* in recipient mice given spleen cells. *J Parasitol (Res. Not)* 1970 ; 56 : 119—209.
 7. Love RJ: *Nippostrongylus brasiliensis* in mice: the immunological basis of worm expulsion. *Parasitology* 1975 ; 70 : 11—18.
 8. Hunter GC, Leigh LC: Studies on the resistance of rats to the nematode *Nippostrongylus muris*(Yokogaiwa, 1920). III. Attempt to transfer immunity adoptively. *Parasitology* 1961 ; 51 : 357—366.
 9. Wakelin D, Lloyed M: Immunity to primary and challenge infections of *Trichinella spiralis* in mice a re-examination of conventional parameters. *Parasitology* 1976 ; 72 : 182.
 10. Flavell DJ, Pattananyasat K, Flavell S: *Opisthorchis viverrini*: Partial success in adoptively transferring immunity with spleen cells and serum in the hamster. *J Helminthol* 1980 ; 54 : 191—197.
 11. Dawkins HJS, Grove DI: Transfer by serum and cells of resistance to infection with *Strongyloides ratti* in mice. *Immunology* 1981 ; 43 : 317—322.
 12. Haddow WJ, Moqbel R, Wakelin D: Transfer of immunity against *Strongyloides ratti*(Nematoda)using immune spleen cells. *J Parasitol* 1984 ; 70 : 187—189.
 13. 崔東翊, 殷鍾大: 肝吸虫 代謝產物과 虫體構成物로 感作한 마우스에서의 細胞性 免疫. 慶北醫大雜誌 1985 ; 26 : 318—326.
 14. 崔東翊, 林建: 脾臟細胞를 移入 받은 마우스에서의 肝吸虫에 대한 免疫移入의 試圖. 慶北醫大雜誌 1986 ; 27 : 146—152.
 15. 崔東翊, 鄭東一, 李龍宰: 腹腔滲出細胞를 移入 받은 마우스와 햄스터에서 肝吸虫에 대한 免疫應答의 比較. 慶北醫大雜誌 1987 ; 28 : 135—142.
 16. Komiya Y, Tajimi T: Metacercariae from Chinese *Pseudorasbora parva* TEMMINCK and SCHLEGEL with special reference to their excretory system I. *J Shanghai Sci Inst* 1941 ; 5 : 69—106.
 17. Ritchie LS: An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull US Army Med Dept* 1948 ; 8 : 326.
 18. Stoll NR: Investigation on the control of hookworm disease. XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces. *Am J Hyg* 1923 ; 3 : 59—70.
 19. Zaleski M: Jerne plaque assay. Leaflet printed in the department of microbiology. School of Medicine and Dentistry. State University of New York at Buffalo, USA 1981 ; 1—6.
 20. Fuji H, Schultz RT, Milgrom F: Cytolysis in agar of thymus cells by antibody-forming cells. *Proc Soc Exp Med Biol* 1970 ; 133 : 188—182.
 21. Armour J, Dargie JD: Immunity to *Fasciola hepatica* in rats: Successful transfer of immunity by lymphoid cells and serum. *Exp Parasitol* 1974 ; 35 : 181—188.
 22. Wakelin D, Dineen SK: The cellular transfer of immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in an isogenic strain of guinea-pig. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1965 ; 43 : 429—438.
 23. 崔東翊, 金重洛, 趙龍勳: 腹腔滲出細胞와 血清을 移入 받은 햄스터에서 肝吸虫 免疫의 移入.

- 慶北醫大雜誌 1987 ; 28 : 194—202.
24. Sun T, Gibson JB: Antisera of clonorchis sinensis in experimental and human infections. *Am J Trop Med Hyg* 1969 ; 18 : 241—252.
25. Sun T: The in vitro action of antisera on the adults of clonorchis sinensis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1969 ; 63(5) : 582—590.
26. Goh YH: Acquired immunity in albino rats to clonorchis sinensis. *Korean J Parasitology* 1969 ; 7 : 32—41.
27. 趙星煥, 朱晙煥, 林漢鍾: 白鼠에 있어서 肝吸虫 感染에 대한 獲得抵抗에 관한 研究. 高麗醫大 論文集 1984 ; 21(3) : 29—38.
28. Sirishinha S, Tuti S, Tawatsin A, Upatham S, Bunnag D: Attempts to induce protective immunity in hamsters against infection by a liver fluke of man (*Opisthorchis viverrini*). *Parasitology* 1983 ; 86 : 127—136.
29. Hayashi Y, Nogami S, Nakamura M, Shirasake A, Noda K: Passive transfer of protective immunity against *Brugia malayi* in BABC/C Mice. *Tapan J Exp Med* 1984 ; 54(4) : 183—187.
30. Kayes SG: Spleen cell responses in experimental murine toxo-cariasis. *J Parasitol* 1984 ; 70 : 522—529.
31. 朴尚均, 玉美善, 崔東翊: Jerne plaque assay 에 의한 橫川吸虫의 細胞性免疫. 慶北醫大雜誌 1985 ; 26 : 302—311.
32. 鄭守基, 黃一愚, 玉美善, 崔東翊: 肝吸虫으로 感作한 마우스에서의 細胞性 免疫. 慶北醫大雜誌 1985 ; 26 : 270—278.
33. 權泰燦, 姜眞無, 崔東翊: 腹腔渗出 細胞를 移入 받은 마우스에서의 肝吸虫에 대한 免疫應答. 寄生虫學雜誌 1987 ; 25(1) : 45—50.
34. Kelly JD, Dineen JK: The cellular transfer of immunity to *Nippostrongylus brasiliensis* in inbred rats (Lewis strain). *Immunology* 1972 ; 22 : 199—210.