

肝吸蟲 脫囊幼蟲의 代謝產物로 感作한 햄스터  
腹腔滲出細胞의 免疫移入\*

慶明大學校醫科大學 外科學教室

趙 元 頽 · 朴 永 寬

慶北大學校 醫科大學 寄生虫學教室

崔 東 翔

=Abstract=

Transfer of Immunity to *Clonorchis sinensis* in Golden Hamsters  
Given Peritoneal Exudate Cells Sensitized by Metabolite of  
Its Excysted Metacercariae\*

Won Hyun Cho, MD; Young Kwan Park, MD

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

Dong Wik Choi, MD

Department of Parasitology, Kyungpook National University  
School of Medicine, Taegu, Korea

In order to evaluate the role of peritoneal exudate cells (PEC) and serum in the transfer of immunity against *Clonorchis sinensis*, the donor golden hamsters were sensitized with the metabolite of excysted metacercaria of *C. sinensis*.

The donor hamsters (DH) were divided into two groups. One group (Group I) was sensitized with two injections of the admixture of the metabolic products of the excysted *C. sinensis* metacercariae and Freund's incomplete adjuvant into footpads at two weeks interval, and the other group (Group II) injected intraperitoneally with the admixture.

Two weeks after sensitization, the PEC and serum were collected from the DH under deep anesthesia.

Recipient hamsters (RH) were divided into 6 groups. The hamsters of Group 1 were injected intraperitoneally (IP) with  $5 \times 10^5$  PEC from Group I DH, those of Group 2 were injected IP with 1.0ml of serum from Group I DH, those of Group 3 were injected IP with  $5 \times 10^6$  PEC from Group

\* Athesis submitted to the Committee of the Graduate School of Kyungpook National University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Medical Science in June, 1988.

\* 이 논문은 1988년도 계명대학교 갑종연구비로 이루어졌음.

II DH, and those of Group 4 were injected IP with 1.0ml of serum from Group II DH. The hamsters of Group 5 were injected IP with  $5 \times 10^5$  PEC and those of Group 6 were administered IP with 1.0ml of serum from non-sensitized controls.

Seven days after primary sensitization, RH were challenged orally with 20 metacercariae and Eggs per Gram (EpG) of fecal samples were counted from 13 to 49 days after challenge. The RH were killed 50 days after challenge, and the transfer of immunity to the RH was estimated by significant differences in mean worm burdens and plaque forming cells per spleen between sensitized and non-sensitized groups.

The eggs of *C. sinensis* appeared in the 14 days after challenge in Groups 2, 4, 5 and 6, and in the 15 days in Groups 1 and 2 by the formalin-ether sedimentation, and EpG noted in the 15 and 16 days by Stoll's egg counting techniques.

No significant difference was observed in EpG between the sensitized groups and the nonsensitized controls. The hamsters given sensitized PEC harbored fewer flukes than the control groups.

The differences in mean worm burdens between the groups given PEC and the control groups were significant by the paired *t*-test. Whereas no significant differences were found in mean worm burdens between the groups given immune serum and the control group.

There were more plaque forming cells in the groups given immune serum than in those given sensitized PEC. However, no plaque forming cells were encountered in the non-sensitized groups.

### 緒 論

吸蟲類의 免疫移入 實驗에서 崔 및 林(1986)은 肝吸蟲 脱囊幼蟲을 腹腔内注入하여 感作한 ICR 마우스의 脾臟細胞가 recipient 同系마우스에 免疫의 移入與否를 究明하였던 바 免疫의 移入은 되지 않았다고 報告하였다.

權等(1987)은 肝吸蟲 脱囊幼蟲의 腹腔内注入으로 感作한 BALB/c 마우스의 腹腔滲出細胞를 同系마우스의 腹腔内에 注入한 結果 免疫이 移入되었다고 하였으며 崔等(1987a)은 肝吸蟲 被囊幼蟲의 經口感染과 脱囊幼蟲의 腹腔内注入으로 感作한 golden hamster(햄스터)의 腹腔滲出細胞와 抗血清을 각각 別途로 同系햄스터의 腹腔内注入하였던 바 肝吸蟲 脱囊幼蟲으로 感作한 腹腔滲出細胞를 腹腔内 注入받은 햄스터에서는 免疫이 移入되었으나 經口感染으로 感作한 햄스터의 腹腔滲出細胞로는 免疫의 移入을 認定할 수 없었다 한다.

崔等(1987b)은 肝吸蟲의 代謝產物과 adjuvant의 混合物로 感作한 近交系 BALB/c 마우스와 햄스터의 腹腔滲出細胞를 同系마우스와 햄스터의 腹腔内에 注入하여 肝吸蟲에 對한 免疫이 어느 動物에서 잘 移入되고 適合한지 比較하였던 바 마우스는 肝吸蟲의 感染期間이 約 40日로 짧고 虫體回收率도 4~6%로 낮아 不適合한데 比하여 햄스터는 그 感染期間이

길고 虫體回收率이 높기 때문에 肝吸蟲에 對한 免疫移入實驗에는 마우스보다 햄스터가 더 適合한 動物이라고 報告한 바가 있다.

崔 및 朴(1987)은 肝吸蟲의 代謝產物 및 虫體構成物을 adjuvant와 混合하여 햄스터의 footpad에 皮內注射로 感作한 다음 그 腹腔滲出細胞 혹은 脾臟細胞를 抗血清과 함께 同系햄스터의 腹腔内注入한 結果 肝吸蟲에 對한 免疫이 移入됨을 究明하였으며 林等(1987)은 肝吸蟲 被囊幼蟲의 經口感染과 脱囊幼蟲의 腹腔内注入으로 感作한 햄스터의 脾臟細胞와 抗血清을 함께 同系햄스터의 腹腔内에 注入함으로써 肝吸蟲에 對한 免疫이 移入됨을 報告하였다.

이 研究는 肝吸蟲 脱囊幼蟲의 代謝產物로 感作한 햄스터의 腹腔滲出細胞가 同系햄스터에 免疫을 移入하는지 與否를 紛明할 目的으로 施行하였다.

### 材料 및 方法

供試動物：國立保健院에서 近交系 golden hamster(햄스터)를 分譲받아 慶北大醫大寄生蟲學教室의 飼育室에서 兄妹交配를 5代 繼續한 것, 體重 120~160g을 使用하였다.

肝吸蟲 被囊幼蟲：琴湖江(慶北 永川市附近)에서 캡봉이(*Pseudorasbora parva*)를 사발모자로 採集하여 魚肉에서 肝吸蟲 被囊幼蟲을 立體顯微鏡下에서 計數分離하였다.

肝吸蟲 脱囊幼蟲: 魚肉을 Komiya 및 Tajimi (1940)法에 따랐서 人工胃液(稀釋鹽酸 3.0, pepsin 0.3, 蒸溜水 100)에 1對 1의 比率로 넣고 37°C 恒溫槽에서 消化시켜 被囊幼蟲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 脱囊시켰다. 이 幼蟲은 即時 生理的食鹽水로 3回 洗滌한 다음 冷 M-199溶液에 넣어 冷藏器에 保管하였다.

Medium-199의 製法: Medium-199 粉末 細胞培養用 培地(Gibco, Grand Island, New York)를 蒸溜水(Gibco, Grand Island, N.Y.) 500ml에 溶解시켜 培地가 弱 '암칼리'인 친한 orange red色이 되도록 7% sodium bicarbonate 液을 넣어 調節하였다. 이 M-199溶液이 ml當 pot. penicillin G 50 unit와 streptomycin sulfate 50 $\mu$ g을 含有하도록 penicillin-streptomycin mixture(Whittaker, M.A. Bioproducts, Walkersville, Md)를 넣어 2倍 原液을 만들었다.

肝吸蟲 脱囊幼蟲의 代謝産物: Sun法에 따랐서 Medium-199(M-199)가 0.5ml 들어있는 Falcon-tube(17×100mm 크기)에 脱囊幼蟲 20마리씩 넣고 相對濕度 100% CO<sub>2</sub>濃度 5%로 調節한 37°C 培養器내에서 5日間 生存시켰다.

代謝産物과 adjuvant 混合物의 製法: 幼蟲을 培養한 Falcon-tube에서 1ml의 M-199을 1回用 plastic 注射器로 취하여 50ml의 beaker에 注入하고

同量의 Freund's incomplete adjuvant를 넣어서 注射器로 混合하여 乳白色의 混合物을 만들었다.

Donor 햄스터의 感作: 生後 13~16週, 숫컷 햄스터 10마리를 5마리씩 2群으로 나누어 第I群에는 肝吸蟲 脱囊幼蟲의 代謝産物과 incomplete adjuvant의 同量 混合液 0.1ml를 footpad에 皮內注射한 다음 2週後에 再注射하였고 第II群에는 그 混合液 0.1ml를 둑같은 間隔으로 2回 腹腔內注入하였다.

最終注射 2週後에 10마리의 햄스터에서 腹腔滲出細胞와 抗血清을 採集하였다.

腹腔滲出細胞의 採集: 햄스터를 ether로 麻醉하여 腹部를 70% ethanol로 消毒한 다음 滅菌된 종이타을 위에서 腹部가 옆을 향하도록 하여 約 4.5ml의 M-199溶液을 腹腔內에 注入하고 注射器를 끊어둔 채 腹部를 手指로 막사지한 뒤에 그 注射器를 도로 당기면서 腹腔滲出細胞를 採集하였다.

抗血清의 分離: 腹腔滲出細胞를 採集한 햄스터는 ether로 再麻醉시켜 心臟穿刺로 採集하여 血清을 分離하였다.

生存細胞數의 計算: 腹腔滲出細胞 및 脾臓細胞 중生存細胞數의 計算에는 trypan blue exclusion法을 使用하였다. 計算하는 當日에 4容量의 trypan blue液과 1容量의 5倍 生理的食鹽水를 混合한 다음 1容量의 trypan blue-saline溶液에 同量의 腹腔滲出細胞 혹은 脾臓細胞 浮遊液을 가하여 血球計算盤위에 넣고 非染色生存細胞와 染色死滅細胞의 數를 合하여 200個의 세어서 1ml當 細胞數를 換算하였다.

Table 1. Design of experiments to study the effect of peritoneal exudate cells and sera in sensitization against *Clonorchis sinensis* in golden hamsters

Donor hamsters			Recipient hamsters			Challenging infection
Group	No. of hamsters	Sensitization	Group	No. of hamsters	Primary sensitization	
I	5	0.1ml of metabolites of excysted metacercaria and adjuvant admixtures injected into footpads, twice at two-week interval.	1	5	5×10 <sup>6</sup> PEC** from Group I donor hamsters injected IP.	20 metacercariae infected orally
			2	5	1ml of serum from Group I injected IP.	20 metacercariae infected orally
II	5	0.1ml of metabolites of excysted metacercaria and adjuvant admixtures injected IP*, twice at two-week interval.	3	5	5×10 <sup>6</sup> PEC from Group II injected IP.	20 metacercariae infected orally
			4	5	1ml of serum from Group II injected IP.	20 metacercariae infected orally
			5	5	5×10 <sup>6</sup> PEC from nonsensitized hamsters injected IP.	20 metacercariae infected orally
			6	5	1ml of serum from nonsensitized hamsters injected IP.	20 metacercariae infected orally

\*IP means intraperitoneally. \*\*PEC means peritoneal exudate cells.

Recipient 햄스터의 第1次感作：表 1과 같이 햄스터 30마리를 5마리씩 6群으로 나누었다.

第1群에는 肝吸蟲 脱囊幼蟲의 代謝產物과 adjuvant의 同量 混合物을 footpad에 皮內注射로 感作한 第I群 donor 햄스터의 腹腔滲出細胞  $5 \times 10^5$ 을, 第2群에는 第I群 donor 햄스터의 抗血清 1ml를, 第3群에는 肝吸蟲 脱囊幼蟲의 代謝產物과 adjuvant의 同量 混合物을 腹腔內에 注入하여 感作한 第II群 donor 햄스터의 腹腔滲出細胞  $5 \times 10^5$ 을, 第4群에는 第II群 donor 햄스터의 抗血清 1ml를 腹腔內에 注入하였다.

第5群 햄스터에는 非感作對照햄스터의 腹腔滲出細胞  $5 \times 10^5$ 을 第6群에는 非感作對照햄스터의 血清 1ml를 腹腔內에 注入하였다.

Recipient 햄스터에 challenge感染：第1次感作 7日後에 6群 30마리의 recipient 햄스터에 肝吸蟲 被囊幼蟲 20마리씩을 經口의으로 challenge 感染시켰다.

蟲卵計算：經口 challenge 感染後 第10日부터 每日 formalin-ether 集卵法(Ritchie, 1948)으로 蠕卵排出을 調查하여 蠕卵이 檢出된 날부터 Stoll 氏蟲卵計算法(Stoll, 1923)으로 屍殺하는 날까지 3日間隔으로 各群 햄스터에서 肝吸蟲의 產卵能力을 調査하였다.

負荷蟲體數(worm burden)計算：햄스터 胆道內에 있는 肝吸蟲 成蟲의 計數에는 肝을 メス로 2cm 두께로 切斷하여 두장의 유리板( $9 \times 12\text{cm}$ ) 사이에 놓고 壓迫하여 立體顯微鏡으로 蠕體數를 세었다.

間接 Jerne plaque assay用 agar : Bacto-agar(Difco, Detroit, Michigan)를 M-199에 0.7%가 되도록 溶解시켰다. Agar의 抗補體作用을 相殺하기 위해 10% DEAE-Dextran(Pharmacia, Fine Chemicals, Sweden) 0.1ml를 각 20ml의 0.7% agar에 加하였다.

Trinitrophenol(TNP)-一羊赤血球(SRBC)接合：Cacodylate buffer 7.0ml에 TNP 20mg을 溶解시켜 여기에 packed 羊赤血球(SRBC) 1ml를 滴下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 2,000 rpm 10分間 遠沈한 다음 上清液은 버리고 沈渣에 7.3mg glycylglycin이 包含되어 있는 MBB를 加하였다. 沈渣에 이 造作을 한번 더 되풀이하였다. 35~50ml의 MBB로 遠心洗滌한 후 눈금遠心管에서 하룻밤 洗滌하여 balanced salt solution으로 15倍 稀釋하였다.

Rabbit-anti-hamster Ig의 製法：햄스터에 肝吸

蟲 被囊幼蟲 20마리를 經口感染시켜 30日 經過한 후에 心臟穿刺로 血液을 採集하여 血清을 分離하였다. 冷飽和 ammonium sulfate 溶液(pH7.0) 1容量을 速心管에 넣고 혼들면서 1容量의 햄스터 血清을 滴下하면서 加하여 冷藏庫内에 30分間 두었다. 이것을 3,000rpm 3分間 遠沈하여 上清液은 버리고沈渣에 蒸溜水를 加하여 溶解시켜 半透膜内에 넣고 冷藏庫内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 皮下注射하였고 3週 經過한 後 다른 쪽의 등에 booster 注射하였다. 1週後부터 必要時に 토끼의 耳靜脈에서 採血하여 血清을 分離하였다.

免疫(脾臓)細胞浮遊液：햄스터의 脾臓을 꺼내어 5ml의 冷 M-199에 들어있는 Falcon plastic petri-dish( $13 \times 100\text{mm}$ )에의 stainless steel screen( $100\text{ mesh}$ ) 위에 놓고 rubber policeman(Difco, Michigan)으로 문질러 細胞浮遊液을 만들어 이 液 0.5ml를 1.5ml의 M-199에 넣어 總 2.0ml를 assay에 사용하였다.

Slide : One end frosted microscopic slides(American Scientific Products)를 使用하였다. Slide는 使用하기 前에 0.1% agar를 滾라서 agar 층이 slide表面에 잘 불도록 하였고 agar-cell mixture를 봇기 전에 slide를 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: Zaleski(1981)가 修正한 方法을 썼다.

한 免疫細胞浮遊液으로 2個의 sample slide를 만들어 檢查하였다. 45°C 恒溫槽内에서 미리 加溫한 Falcon-tube( $17 \times 100\text{mm}$  크기)에 0.3ml의 liquid agar를 넣고 이어서 0.05ml의 標的細胞浮遊液과 0.05 ml의 脾臓細胞浮遊液을 넣어서 손바닥 사이에서 tube를 돌리면서 混合하여 45°C로 加溫된 slide 위에 부어 펴지게 한 다음 室溫에서 agar를 凝固시켰다. 凝固된 agar가 있는 面을 밀으로 하여 特製 complement tray(Dept. Bacteriology, Sch. Med., State Univ. New York, Buffalo) 위에 놓고 그 사이에 M-199를 注入하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養器内에서 60分間 두다가 tray에서 slide를 들어내고 M-199를 버린 다음 다시 tray 위에 slide를 놓고 새로 만든 10倍稀釋 guinea-pig serum complement

에 300倍 稀釋液이 되도록 rabbit-anti-hamster Ig를 加한 混合液을 注入하여 다시 培養器内에 60分間 두 있다. 培養器에서 slide 를 들어내어 Fuji等(1971)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 形成된 plaque 數를 세었다.

統計分析: 感作群과 非感作對照群 햄스터에서 얻은 worm burden 및 plaque 形成細胞의 差에 대한 統計學的有意性은 paired *t*-test로 檢定하였다.

### 成績

肝吸蟲 脱囊幼蟲의 代謝産物과 adjuvant 混合物을 footpad에 皮內注射한 第 I 群 donor 햄스터와 그 混合物을 腹腔內注入한 第 II 群 donor 햄스터 및 非感作對照 햄스터의 腹腔滲出細胞의 生存率은 表 2와 같이 最低 91.1%, 最高 93.5%, 平均 92.4%로서 大部分의 腹腔滲出細胞가 生存하여 있었다.

表 3은 肝吸蟲 被囊幼蟲 20마리씩을 challenge 感染시킨 6群의 recipient 햄스터에서 challenge後 第 13日부터 第 49日까지의 사이에 感作 및 非感作 햄스터의 腹腔滲出細胞 또는 血清이 肝吸蟲의 産卵에 미치는 影響을 提示한 것이다.

Table 2. Proportion of viable cells per ml of peritoneal exudate cells of donor golden hamsters by trypan blue exclusion

Group	No. of hamsters	Peritoneal exudate cells in primary sensitization			
		Total No. of cells ( $\times 10^5$ )	Mean No. of viable cells ( $\times 10^5$ )	Viable cells%	
I	5	2.15	2.01		93.5
II	5	2.24	2.04		91.1
Control	5	2.18	2.02		92.7
Mean		2.19	2.02		92.4

Table 3. Effect of peritoneal exudate cells and sera sensitized with metabolic products of excysted metacercaria of *C. sinensis* on Eggs per Gram in hamsters after challenge

No. of hamsters	No. of cysts challenged(ea)	Mean Eggs per Gram of feces on 13 to 49 days after challenge ( $\times 100$ )																
		13	14	15	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49		
1	5	20	-*	-	+	5	15	13	16	94	146	180	135	588	342	249	370	
2	5	20	-	-	+	7	14	15	11	112	131	292	216	232	388	192	213	
3	5	20	-	+	**	4	9	14	17	15	97	96	249	358	397	266	411	357
4	5	20	-	+	11	8	15	14	11	134	288	224	196	372	312	311	175	
5	5	20	-	+	7	5	13	17	38	152	181	178	252	345	321	386	371	
6	5	20	-	+	3	7	11	21	41	94	165	167	218	335	355	347	389	

\*- means negative by formalin-ether sedimentation technique.

\*\*+ means positive by formalin-ether sedimentation technique.

第 I 群 donor 햄스터의 腹腔滲出細胞  $5 \times 10^5$  을 腹腔內注入받은 第 1 群과 그 血清 1.0ml를 腹腔內注入받은 第 2 群 햄스터에서는 challenge 感染後 第 15 日에 formalin-ether 集卵法으로 肝吸蟲卵을 檢出할 수 있었으며 第 16 日에 EpG 가 처음으로 計算되었으며 그 平均值는 第 1 群 햄스터 500, 第 2 群 햄스터 700이었다.

이에 比하여 第 II 群 donor 햄스터의 腹腔滲出細胞  $5 \times 10^5$  과 그 血清 1.0ml를 따로 腹腔內注入 받은 第 3 群 및 第 4 群 햄스터에서는 challenge 感染後 第 14 日에 肝吸蟲卵이 檢出되었고 第 15 日의 EpG 는 第 3 群에서는 平均 400, 第 4 群에서는 平均 1,100이었다.

非感作對照群의 腹腔滲出細胞  $5 \times 10^5$  과 그 血清을 別途로 腹腔內注入받은 第 5 群과 第 6 群에서도 第 3 및 第 4 群과 마찬가지로 第 14 日에 처음으로 肝吸蟲卵이 檢出되었고 EpG 는 第 15 日에 第 5 群 平均 700, 第 6 群 平均 300이었다.

EpG 的 變動樣相은 非感作對照群인 第 5 및 第 6 群 햄스터에서는 challenge 感染後 第 15 日부터 計測되었고 서서히 增加되어 第 28 日에 急速히 增加되었으며 그 以後에는 큰 起伏 없이 漸次로 增加되었다. 이에 比하여 感作群인 第 1, 第 2, 第 3 및 第 4 群 햄

Table 4. Effect of peritoneal exudate cells and sera sensitized with metabolic products of excysted metacercaria on worm burden of *C. sinensis* in hamsters

Group	No. of hamsters	No. of cysts challenged(ea)	Interval between challenge and necropsy (day)	Adult worm recovered					Worm recovery rate(%)	Significance
				H*1	H2	H3	H4	H5	Mean	
1	5	20	50	11	12	12	13	14°	12.4	p<0.05
2	5	20	50	12	13	11	11	14°°	12.2	p>0.05
3	5	20	50	12	13	11	10	10°°°	11.2	p<0.05
4	5	20	50	11	13	14	13	12**	12.6	p>0.05
5	5	20	50	14	15	14	13	15***	14.2	71.0
6	5	20	50	14	15	15	13	13**	14.0	70.0

\*H means Hamster

°, °°, °°°, \*\*and \*\*\*: The hamsters died on the 25th, 28th, 38th, 36th and 19th days of infection, respectively.

스터에서는 第14 혹은 第15日부터 서서히 增加되어 第28日에 急速히 增加되었고 그 以後에는 起伏을 나타내면서 增加되었다. 즉 EpG는 感作群과 非感作對照群 햄스터間に 有的의 差를 認定할 수 없었다.

表 4는 肝吸蟲 脱囊幼蟲의 代謝産物과 adjuvant 混合物로 感作한 햄스터의 腹腔滲出細胞와 血清이 肝吸蟲 被囊幼蟲 20마리 쪽을 challenge 感染시켜 50日째의 햄스터에서의 肝吸蟲 worm burden에 미치는 影響을 나타낸 것이다.

非感作對照群의 腹腔滲出細胞를 腹腔内注入받은 第5群 햄스터에서의 膽道內 成蟲 平均值는 14.2, 그 蠕體回收率은 71.0%였는데 比하여 感作群인 第1群에서의 그 平均值는 12.4, 그 回收率은 62.0% ( $P<0.05$ ), 第3群에서의 그 値는 11.2, 그 率은 56.0% ( $P<0.05$ )로서 感作群은 非感作群 햄스터에 比하여 有의의으로 成蟲數가 적었다.

非感作對照群 햄스터의 血清을 腹腔内注入받은 第6群 햄스터의 膽道內 肝吸蟲 平均值는 14.0, 그 蠕體回收率은 70%였고 感作群 햄스터의 血清을 腹腔内注入받은 第2群 및 第4群 햄스터에서의 蠕體平

均值는 각각 12.2 및 12.6, 그 回收率은 각각 61.0 % 및 63.0% (兩群 모두  $P>0.05$ )로서 感作群과 非感作對照群 햄스터間의 蠕體數에는 有의의 差를 認定할 수 없었다.

表 5는 肝吸蟲 被囊幼蟲 20마리 쪽을 challenge 感染시킨 햄스터에서 細胞浮遊液 ml當 脾臟細胞數와 生存細胞率 및 脾臟當 plaque forming細胞數를 나타낸 것이다.

脾臟細胞浮遊液 ml當 細胞數는 最少  $1.104 \times 10^6$ , 最多  $1.384 \times 10^6$ 이 있고 그 生存細胞率은 最低 85.4 %, 最高 92.0%였다.

Plaque forming細胞는 非感作對照群인 第5 및 第6群 햄스터의 脾臟에서 찾을 수 없었으나 全感作群 햄스터에서 찾을 수 있었다. 즉 脾臟當 plaque forming細胞數는 腹腔滲出細胞를 腹腔内注入받은 第1 및 第3群에서 각각 1,200 및 1,600이 있는데 比하여 血清을 腹腔内注入받은 第2 및 第4群에서는 각각 2,600 및 2,900으로서 第1 및 第3群보다 第2 및 第4群에서 그 數가 많았다.

Table 5. Spleen cells and plague forming cells per spleen in recipient hamsters after challenge infection with *C. sinensis*

Group	Spleen cells per ml			Plaque forming cells per spleen (ea)				
	Mean No. of cells( $\times 10^6$ )	Mean No. of viable cells( $\times 10^6$ )	Viable cell %	H*1	H2	H3	H4	Mean
1	1.104	1.016	92.0	2,200	0	1,800	800	1,200
2	1.384	1.182	85.4	3,400	2,000	2,400	2,600	2,600
3	1,320	1.136	86.1	2,800	1,600	2,000	0	1,600
4	1.244	1.123	90.3	3,200	2,800	3,400	2,200	2,900
5	1.294	1.117	86.3	0	0	0	0	0
6	1.224	1.078	88.1	0	0	0	0	0

\*H means hamster.

## 考 察

蠕蟲類(helminths) 感染時 免疫의 獲得現象은 成蟲으로 不完全한 發育과 그 發育의 遲延, 生殖力(產卵力)의 抑制, 蠕蟲의 自然排出 및 再感染에 대한 抵抗等을 列舉할 수 있다.

人體寄生蟲에서 免疫의 移入實驗은 Larsh 및 Race(1964)에 의해 처음으로 試圖되어 成功하였다. 즉 旋毛蟲에 感染된 마우스의 腹腔滲出細胞를 同系마우스의 腹腔內注入하였던 바 小腸內 成蟲數는 對照群 마우스에 比해 적었다고 하였으며 Lang等(1967)은 實驗的 肝蛭症 마우스의 腹腔滲出細胞를 腹腔內注入 받은 同系마우스는 對照群마우스보다 腸道內에 有意의으로 적은 數의 肝蛭이 寄生되어 있었다 한다.

Dodd 및 Nuallain(1969)은 anti-rabbit lymphocyte serum은 肝蛭 感染時에 肝의 正常 細胞性應答을 抑制하였는데 반하여 對照群에서의 T細胞의 應答은 肝損傷의 擴大를 抑制하고 回復시키는 것으로 나타났다. 이 所見으로 肝蛭症의 hepatic granuloma의 T細胞은 防禦的役割을 하는 것으로 解析되었다. 그러나 Warren(1972)은 住血吸蟲症에 관한 오랜 研究後에 細胞性免疫(遲延型過敏症)은 宿主에 有益하게 作用하는 免疫과는 關係가 없고 오히려 有害하게 作用한다고 主張하였다.

Larsh 및 Weatherly(1974)에 의하면 Chase(1954)가 細胞性免疫(遲延型過敏症)의 移入은 血中抗體에 의해서는 되지 않으나 感作淋巴系細胞에 의해서는 이루어진다고 報告한 以來 細胞性免疫은 遲延型過敏症과 發生機轉이 거의 같은 것으로 알려졌고 처음에는 生體組織에 破壞的役割만 하는 것으로 着做되었으나 最近에는 防禦的役割도 한다는 것이 報告되어 있다(Milgrom等, 1981).

Corba等(1971)은 肝蛭에 感染된 白鼠의 淋巴節細胞와 脾臟細胞를 同系 白鼠의 腹腔內注入한 後 challenge 感染시켰던 바 防禦效果가 있었다고 報告하였다.

以上의 成績과는 反對로 Sinclair(1971)는 肝蛭感染 緬羊의 淋巴節細胞와 脾臟細胞를 實驗的 感染直前의 緬羊의 腹腔內注入하였으나 worm burden에는 아무런 影響을 미치지 않았으므로 免疫이 移入되지 않았다고 報告하였다.

그러나 Vernes等(1972)은 肝蛭 感染後 第15日에 遲延型過敏症이 나타났으며 感作된 T細胞는 試驗管內에서 macrophage migration inhibition factor에

陽性反應을 나타내었다고 發表한 以後 吸蟲類에 대한 細胞性免疫의 研究가 活氣를 띠게 되었다.

Armour 및 Dargie(1974)는 肝蛭에 感染된 白鼠의 淋巴系細胞 및 血清은 同系 recipient 白鼠에 免疫을 移入하였던 바 그 防禦程度는 感作細胞의 移入量과 donor 白鼠에서의 抗原刺載의 持續性에 左右되며 免疫血清에 의한 免疫의 移入程度는 그 移入量에 依存한다고 報告한 바가 있다.

Wakelin 및 Lloyd(1976)는 實驗的 旋毛蟲症 마우스의 腸間膜淋巴節細胞와 血清을 함께 recipient 마우스에 注入하였던 바 蠕蟲體의 排出이 顯著하게 促進되었으나 腸間膜淋巴節細胞 또는 血清을 單獨注入하였을 때는 免疫이 移入되지 않았다 한다.

寄生蟲免疫은宿主組織寄生蟲과宿主의粘膜에 損傷을 起起하여 抗原인 蠕蟲代謝產物을宿主의組織內에侵透시키는寄生蟲에서는顯著하게形成되나腸內寄生蟲으로서抗原性成分을體外로排出하는寄生蟲에서는形成되지않든지아주弱하게形成되는것으로알려져있다.

宿主의 膽道에 寄生하는 肝吸蟲의 獲得免疫에對하여 Sun(1969)과 Sun 및 Gibson(1969)은 肝吸蟲의 代謝產物은 蠕蟲構成物보다 効果的抗原이었으며 蠕卵은抗原性이 없었고 그 實驗的感染은 再感染을豫防하지 못할 뿐만 아니라 血清抗體는 防禦作用을 나타내지 않았다 하며 Sun(1969)은 免疫家兔血清과 肝吸蟲症患者의抗血清은 試驗管內에서 蠕蟲周圍에沈澱物을形成하며殺蟲效果를 나타내었다 한다.

Goh(1969)는 白鼠에 肝吸蟲抗原을 2回皮下注射한 다음 肝吸蟲被囊幼蟲을 challenge 感染시켰던 바 非感作對照群에 比하여 蠕體回收率이 낮으므로 獲得免疫의 生成을 認定하였다.

그러나 Flavell等(1980a)과 Sirisinha等(1983)은 타이肝吸蟲에 感染되어 있는 햅스터는 同一吸蟲의 再感染과 重複感染에 防禦效果를 나타내지 않았다고 하였으나 趙等(1984)은 白鼠에서 肝吸蟲體의 크기에單獨感染과 重複感染에 有意의 差를 認定할 수 없었으나 重複感染된 白鼠에서의 蠕體回收率은 對照群에 比해 낮으므로 再感染에 대한抵抗을 獲得하는 것으로 認定하여도 無防하다고 推定하였다.

Kayes(1984)는 大蛔蟲에 感染된 마우스는 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 感染後 第14日에 그 比가 5.0으로 最大值를 나타내었다가 그後 서서히 低下되었다고 하며 이 脾臟肥大는 white pulp의增殖에起因한다고報告하였다. Hayashi等(1984)은 *Brugia malayi* vaccine을

接種한 마우스의 脾臟細胞를 注入받은 마우스에서는 *B. malayi* 幼蟲이 回收되지 않았으나 對照群마우스에서는 25.9%의 幼蟲이 回收되었고 10% 免疫血清中에 培養한 幼蟲으로 challenge 感染하면 그回收率이增加되었다. 이 成績은 抗體依存性 免疫의 增強作用이 있는 것으로 推定된다고 報告하였다.

免疫의 移入實驗에 있어서 Flavell等(1980a)은 타이肝吸蟲에 感染된 햄스터의 脾臟細胞와 血清은 모두 recipient 햄스터에 再感染에 대한 防禦作用(免疫)을 移入하지 못하였다고 하였으며 崔 및 林(1986)도 肝吸蟲 脱囊幼蟲의 腹腔內注入으로 感作한 마우스의 脾臟細胞는 recipient 마우스에서 對照群에 比하여 EpG의 減少를 認定하였으나 worm burden에는 兩群間에 有意의 差를 認定할 수 없었으므로 免疫의 移入은 成功하지 못하였다 한다.

權等(1987)은 肝吸蟲의 脱囊幼蟲으로 感作한 마우스의 腹腔滲出細胞는 recipient 마우스에 免疫을 移入하였으나 肝吸蟲 被囊幼蟲을 經口感染시킨 마우스의 腹腔滲出細胞는 免疫이 移入하지 않았다 한다.

이것은 肝吸蟲 被囊幼蟲을 經口感染시키면宿主의 十二指腸에서 脱囊한 幼蟲이 Oddi括約筋을 통과하여 總輸膽管을 따라 移行하여 胆道에 到達하기 때문에 組織內 侵入하거나 組織의 實質과 바로 接觸하지 않는다. 따라서 肝吸蟲 感染時에는宿主에 免疫應答을 일으키는 能力이 弱하다는 것은 周知의 事實이다.

崔等(1987b)은 肝吸蟲의 免疫移入實驗에 마우스와 햄스터의 成績을 比較하였던 바 마우스의 肝吸蟲 感染期間은 40日 内外로 짧고 胆道內 成蟲數도 5마리以下로 적은데 比하여 햄스터는 感染期間이 100日以上으로 길고 그 成蟲數도 20마리 内外로 햄스터는 마우스보다 肝吸蟲의 免疫移入實驗에 適合한 動物이라고 主張하였으며 崔等(1987a, b)은 우리 나라에서 처음으로 近交系햄스터를 使用하여 肝吸蟲의 免疫移入實驗을 施行하였다. 즉 donor 햄스터의 感作에는 權等(1987)의 方法에 準하여 肝吸蟲 被囊幼蟲의 經口感染과 脱囊幼蟲의 腹腔內注入의 2가지 方法을 使用하였으며 recipient 햄스터의 第1次感作에는 感作腹腔滲出細胞와 抗血清을 使用하였던 바 肝吸蟲 脱囊幼蟲으로 感作한 腹腔滲出細胞를 腹腔內注入받은 햄스터에서는 免疫이 移入되었으나 抗血清의 腹腔內注入으로는 免疫이 移入되지 않음을 究明하였다.

崔 및 朴(1987)은 肝吸蟲의 代謝產物과 虫體構成物을 foot pad에 皮內注射하여 感作한 햄스터의 腹腔滲出細胞와 抗血清 혹은 脾臟細胞와 抗血清을 함께 recipient 햄스터의 腹腔內注入하였을 때는 免疫이 移

入되었다 한다. 이 成績은 前記한 Wakelin 및 Lloyd(1976)의 旋毛蟲에서의 報告와 符合되었으며 Hayashi等(1984)이 指摘한 바와 같이 免疫의 移入에 生存細胞와 感作血清을 함께 注入하면 細胞性免疫에 抗體依存性免疫의 增強作用이 일어나기 때문이라고 생각된다.

한편 崔 및 林(1986)의 마우스를 모델로 한 實驗에서 感作한 脾臟細胞 및 抗血清은 免疫을 移入하지 못하였는데 反하여 林等(1988)은 肝吸蟲 被囊幼蟲의 經口感染과 脱囊幼蟲의 腹腔內注入으로 感作한 햄스터의 脾臟細胞 및 抗血清을 함께 腹腔內注入하였을 때는 免疫의 移入을 認定할 수 있었다 한다.

Mitchison(1969)에 의하면 腹腔滲出細胞가 마우스에서 第1次免疫應答을 일으키는 能力은 腹腔滲出細胞에 結合된 蛋白抗原이 血中 遊離蛋白抗原보다 強力하다고 한다. 이번 研究에서는 肝吸蟲 脱囊幼蟲의 直接腹腔內注入으로 感作하지 않고 脱囊幼蟲을 組織培養器內에서 5日間 培養하여 그 幼蟲 代謝產物을 만들어 donor 햄스터의 footpad에 皮內注射와 腹腔內注入의 2가지 方法으로 感作하였으며 이 兩方法으로 感作된 donor 햄스터의 腹腔滲出細胞를 腹腔內注入받은 햄스터에서는 免疫의 移入을 認定하였으나 感作血清을 腹腔內注入받은 群에서는 免疫이 移入되지 않았다. 이 成績은 肝吸蟲 成蟲으로 實驗한 崔等(1987a), 崔等(1987b) 및 崔 및 朴(1987)의 成績과 符合되며 肝吸蟲 脱囊幼蟲의 代謝產物도 成蟲의 것과 마찬가지로 免疫의 移入實驗에 使用할 수 있음을 나타내었다.

햄스터에 吸蟲類를 challenge 經口感染시킬 때 그 成蟲數(量)에 있어서 Bhamarapratvi等(1978)은 타이肝吸蟲症 햄스터에서의 肝의 病理學的 變化를 究明하기 위해 햄스터 솟곳에 100마리 쪽의 타이肝吸蟲 被囊幼蟲을 投與하였으며 Flavell等(1980a)은 타이肝吸蟲으로 感作한 脾臟細胞와 血清을 投與한 3群의 햄스터에 각각 25마리 쪽의 被囊幼蟲을 challenge 感染시켰고, Flavell等(1980b)은 다른 實驗에서 50마리 쪽의 本被囊幼蟲을 感染시킨 바가 있다. Sirisinha等(1983)은 타이肝吸蟲에 感染된 햄스터에서의 獲得免疫의 形成與否를 究明하기 위해 햄스터에 처음에는 타이肝吸蟲 被囊幼蟲을 少數 感染시킨 다음 challenge 感染시에는 本幼蟲을 50 또는 80마리 쪽을 投與하였다.

以上的 投與量을 參考하여 肝吸蟲의 challenge 經口感染時에 崔等(1987a) 및 崔等(1987b)은 햄스터에 처음 50마리 쪽 投與하였고 崔 및 朴(1987), 林

및 黃(1988)은 30마리씩을 投與하였으나 Chung 및 Choi(1988)가 햄스터에서의 肝吸蟲의 適切한 感染量을 決定한 實驗에서 20마리의 本被囊幼蟲의 投與가 가장 適切한 數量으로 報告되었기 때문에 이번 實驗에는 20마리의 肝吸蟲 被囊幼蟲을 challenge 感染시켰다.

이번 間接 Jerne plaque assay(Jerne 및 Nordin 1963; Fuji 等, 1970; Zaleski, 1981)에서는 感作된 腹腔滲出細胞를 腹腔內注入받은 햄스터에서 보다 感作血清을 腹腔內注入받은 群에서 plaque 形成細胞를 더 多이 찾을 수 있었다. 從來 마우스와 햄스터를 肝吸蟲으로 感作하면 抗原性이 微生物等에 比하여 월등하게 弱하기 때문에 plaque 形成細胞數가 적으며 相異한 感作群 사이에도 認定할 만한 有的 差가 없었다(崔 및 殷, 1985; 鄭等, 1985; 朴等, 1985; 崔 및 林, 1986; 樂等, 1987; 崔等, 1987a.b; 林等 1987).

Plaque 形成細胞의 出現要因에는 抗原의 種類, 投與量, 修飾 및 感作方法等을 들 수 있으나(崔等, 1987) 앞으로 더 追試하여 볼 作定이다.

## 要 約

肝吸蟲 脱囊幼蟲의 代謝產物로 感作한 近交系 golden 햄스터의 腹腔滲出細胞 및 血清이 recipient 햄스터에 免疫을 移入하는지 追究하였다.

donor 햄스터는 5마리씩 2群으로 나누어 第 I 群에는 0.1ml의 脱囊幼蟲 代謝產物과 Freund's incomplete adjuvant의 同量混合物을 footpad에 2週 間隔으로 2回 皮內注射하였고 第 II 群에는 그混合物을 腹腔內에 2週 間隔으로 2回 注入하였다. 이어서 2週後에 麻醉시켜 腹腔滲出細胞와 血清을 採取하여 recipient 햄스터의 腹腔內注入하였다.

Recipient 햄스터는 5마리씩 6群으로 나누어 第 1群에는 第 I 群 donor 햄스터의 腹腔滲出細胞  $5 \times 10^6$  을, 第 2群에는 第 I 群 햄스터의 血清 1.0ml를, 第 3群에는 第 II 群 donor 햄스터의 腹腔滲出細胞  $5 \times 10^6$  을, 第 4群에는 第 II 群 햄스터의 血清 1.0ml를, 第 5群에는 非感作對照群 햄스터의 腹腔滲出細胞  $5 \times 10^6$  을, 第 6群에는 對照群 햄스터의 血清 1.0ml를 각각 腹腔內에 注入하여 第 1次 感作하였다.

7日 經過한 후 6群의 全햄스터에 肝吸蟲 被囊幼蟲을 20마리씩 經口 challenge 感染시켜 第 13日부터 EpG 를 求하였으며 challenge 後 第 50日에 全햄스터를 屠殺하여 對照群 햄스터의 worm burden과 脾臟

當 plaque 形成細胞數量 基準으로 하여 感作群 햄스터에 有的 差를 나타내는지 즉 免疫이 移入되는지 追究하였다.

Challenge 感染後 感作群 및 非感作對照群 햄스터에서 第 14日에 肝吸蟲卵이 formalin-ether 集卵法으로 나타났고 Eggs per Gram 은 第 15日부터 計測할 수 있었다.

그러나 感作群과 非感作對照群 햄스터間의 EpG의 變動에는 有的 差를 認定할 수 有였다.

感作群 donor 햄스터의 腹腔滲出細胞量 腹腔內注入받은 햄스터의 worm burden은 非感作對照群 햄스터에 比하여 有的으로 적었으나 그 血清을 腹腔內注入받은 햄스터에서는 對照群 햄스터와의 사이에 有의 差를 認定할 수 有없었다.

脾臟에서 plaque 形成細胞數는 腹腔滲出細胞를 腹腔內注入받은 群보다 血清을 腹腔內注入받은 群에서 더 多았다. 그러나 非感作對照群 햄스터에서는 plaque 形成細胞를 檢出할 수 有없었다.

## 參 考 文 獻

1. Armour J, JD Dargie: Immunity to *Fasciola hepatica* in the rats: Successful transfer of immunity by lymphoid cells and serum. *Exp Parasit* 1974; 35: 381-388.
2. Bhamarapravati N, W Thammavit, S Vajrathira: Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 787-794.
3. Chase MW: The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1954; 59: 134-135.
4. 崔東翊, 殷鍾大: 肝吸蟲 代謝產物과 蠕體構成物로 感作한 마우스에서의 細胞性免疫. 慶北醫大誌 1985; 26: 318-326.
5. 崔東翊, 林建: 脾臟細胞를 移入받은 마우스에서의 肝吸蟲에 대한 免疫 移入의 試圖. 慶北醫大誌 1986; 27: 146-152.
6. 崔東翊, 金重洛, 趙龍勳: 腹腔滲出細胞와 血清을 移入받은 햄스터에서 肝吸蟲 免疫의 移入. 慶北醫大誌 1987; 28: 194-202.
7. 崔東翊, 鄭東一, 李龍宰: 腹腔滲出細胞를 移入받은 마우스와 햄스터에서 肝吸蟲에 대한 免疫應答의 比較. 慶北醫大誌 1987; 28: 135-142.

8. 崔東翊, 朴武吉: 肝吸蟲 代謝產物과 蟲體構成物로 感作한 햄스터에서 免疫의 移入. 廣北醫大誌 1987 ; 28 : 263—273.
9. 崔東翊, 韓明子, 李健秀: 數種 마우스와 試藥이 間接 Jerne plaque assay에 미치는 影響. 廣北醫大誌 1987 ; 28 : 7—14.
10. Chung DI, DW Choi: Intensity of infection and development of adult *Clonorchis sinensis* in hamsters. *Korean J Parasitol* in press, 1988.
11. Corba J, J Armour, RJ Roberts, GM Urquhart: Transfer of immunity to *Fasciola hepatica* infection by lymphoid cells. *Res Vet Sci* 1971 ; 12 : 292—295.
12. Dodd K, TO Nuallain: Effect of antilymphocyte sera on the histopathology of *Fasciola hepatica* infestation in rabbits. *J Path* 1969 ; 99 : 335—337.
13. Flavell DJ, K Pattanapanyast, S Flavell: *Opisthorchis viverrini*: Partial success in adoptively transferring immunity with spleen cells and serum in the hamster. *J Helminth* 1980 ; 54 : 191—197.
14. Flavell DJ, K Pattanapanyasat, SB Lucas, V Vongsangnak: liver changes in golden hamsters maintained on high and low protein diets. *Acta Tropica* 1980 ; 37 : 337—350.
15. Fuji H, RT Schultz, F Milgrom: Cytolysis in agar of thymus cells by antibody-forming cells. *Proc Soc Exptl Med Biol* 1970 ; 133 : 180—182.
16. Fuji H, M Zaleski, F Milgrom: Immune response to alloantigens of thymus studied in mice with plaque assay. *J Immunol* 1971 ; 106 : 56—64.
17. Goh YH: Acquired immunity in albino rats to *Clonorchis sinensis*. *Korean J Parasitol* 1969 ; 7 : 32—41.
18. Hayashi Y, S Nogami, M Nakamura, A Shirasaka, K Noda: Passive transfer of protective immunity against *Brugia malayi* in BALB/c mice. *Japan J Exp Med* 1984 ; 54 : 183—187.
19. Jerne NK, AA Nordin: Plaque formation in agar by single antibody producing cells. *Science* 1963 ; 140 : 405.
20. 趙星煥, 朱炅煥, 林漢鍾: 白鼠에 있어서 肝吸蟲 感染에 대한 獲得抵抗에 관한 研究. 高麗醫大論文集 1984 ; 21 : 29—38.
21. 鄭守基, 黃一愚, 王美善, 崔東翊: 肺吸蟲으로 感作한 마우스에서의 細胞性免疫. 廣北醫大誌 1985 ; 26 : 270—278.
22. Kayes SG: Spleen cell responses in experimental murine toxocariasis. *J Parasitol* 1984 ; 70 : 522—529.
23. Komiya Y, T Tajimi: Study of *Clonorchis sinensis* in the district of Shanghai. 5. The cercaria and metacercaria of *Clonorchis sinensis* with special reference to their excretory system. *J Shanghai Sci Inst* 1940 ; 5 : 91—106.
24. 樂泰燦, 姜真無, 崔東翊: 腹腔滲出細胞을 移入 받은 마우스에서의 肝吸蟲에 대한 免疫應答. 寄生蟲學雜誌 1987 ; 25 : 45—50.
25. Lang BZ, JE Larsh, NF Weatherly, HT Goulson: Demonstration of immunity to *Fasciola hepatica* in recipient mice given peritoneal exudate cells. *J Parasitol* 1967 ; 53 : 208—209.
26. Larsh JE, GJ Race: A histologic study of the anterior small intestine of immunized and nonimmunized mice infected with *Trichinella spiralis*. *J Infect Dis* 1964 ; 94 : 262—272.
27. Larsh JE, Weatherly NF: Cell mediated immunity in certain parasitic infection. *Current topics in Microbiology and Immunology* (Berlin). 1974 ; 67 : 113—137.
28. 林台鎮, 朴永寬, 黃一愚, 崔東翊: 脾臘細胞斗血清을 移入 받은 햄스터에서 肝吸蟲 感染에 대한 免疫應答. 啓明醫大論文集 1987 ; 6 : 167—176.
29. Milgrom F, CJ Abeyounis, K Kano: Cellular immunity. In *Principles of immunological diagnosis in Medicine*, Lea and Fediger, London Philadelphia, 1981, pp 7—8.
30. Mitchison NA: The immunogenic capacity of antigen taken up by peritoneal exudate cells: *Immunology* 1969 ; 16 : 1—14.
31. 朴尚均, 玉美善, 崔東翊: Jerne plaque assay에 의한 橫川吸蟲의 細胞性免疫. 廣北醫大誌 1985 ; 26 : 302—311.

32. Ritchie LS: An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull US Army Med Dept* 1948; 8: 326.
33. Sinclair KB: Resistance to *Fasciola hepatica* in sheep: Attempts to transfer resistance with lymph node and spleen homogenates. *Br Vet J* 1971; 127: 408—418.
34. Sirisinha S, S Tutia, A Tawatsin, S Vichasri, ES Upatham, D Bummag: Attempts to induce protective immunity in hamsters against infection by a liver fluke of man (*Opisthorchis viverrini*). *Parasitol* 1982; 86: 127—136.
35. Stoll NR: Investigation of the control of hookworm disease. IV. An effective method of counting hookworm eggs in feces. *Am J Hyg* 1923; 3: 59—70.
36. Sun T: The in vitro action of anti-sera on the adults of *Clonorchis sinensis*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1969; 63: 582—590.
37. Sun T, JB Gibson: Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infec-tions: An analysis of gel diffusion technique. *Am J Trop Med Hyg* 1969; 18: 241—252.
38. Vernes A, F Floc'h, J Biquet: L'hypersensi-tibilité de type retardé au cours de la bilhar-ziose expérimentale à *Schistosoma mansoni*. I. Etude in vitro chez la souris CBA. *Annals Inst Pasteur* 1972; 123: 707—720.
39. Wakelin D, M Lloyd: Immunity to primary and challenge infections of *Trichinella spiralis* in mice. A. reexamination of conventional parameters. *Parasitology* 1976; 72: 173—182.
40. Warren KS: The immunopathogenesis for schistosomiasis: A multidisciplinary approach. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1972; 66: 417—434.
41. 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, pp 1—6.