

폐흡충(*Paragonimus westermani*) 감염시의 세포 면역학적 방어 기전

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 원광대학교 의과대학 기생충학교실*

鄭坪林·張在景·蘇鎮璋*

요 약 : 폐흡충(*Paragonimus westermani*) 초기 감염시의 숙주 면역 기전을 알아보기 위하여 폐흡충 피낭유충을 백서에 감염시켜 주별(週別)로 항원형을 분리하고 동일 백서에서 복강 대식세포(homologous rat peritoneal macrophage)를 얻은 다음, 이들과 폐흡충 탈낭유충 및 숙주 조직 이행 중인 유약충으로 effector system을 조작하여 폐흡충 유충에 대한 항체 의존성 대식세포 공격기전을 관찰하였다. 백서 복강 대식세포는 항원형 출현 시에만 폐흡충 탈낭유충에 대한 세포부착 반응(cell adherence reaction)을 보였고 이 반응에는 보체가 관여하지 않았다. 폐흡충 감염 1주에서 8주까지의 백서 항원형 중 2주째에 분리한 항원형 실험군에서 100%의 세포부착 반응을 나타내었고 사멸된 충체를 관찰할 수 있었으며, 세포부착 반응은 탈낭 유충기에서만 나타나는 반면 조직이행 유약충에서는 전혀 그 반응을 인정할 수 없어 폐흡충 감염에 따른 항체 의존성 숙주 세포 매개독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)은 발육단계별 특이성을 보였다. 한편, 대식세포의 공격에 의하여 사멸된 폐흡충 탈낭유충의 형태학적 특징은 대식세포와 유충 사이에 형성되는 fuzzy material, tegumental syncytium 내의 미세구조의 변성 및 syncytium과 근육층을 연결하는 tubular tunnel의 형성 등이었다.

Key words: *Paragonimus westermani*, macrophage, cell adherence reaction, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, TEM

서 론

폐흡충(*Paragonimus westermani*)은 인체에 기생하여 흉부 폐흡충증(pulmonary paragonimiasis)과 이소기생에 의한 흉부의 폐흡충증(extra-pulmonary paragonimiasis)을 유발하는 중요한 기생 흡충류의 하나로서 극동 지방과 아시아지역에 광범위하게 분포되어 있음이 일찍부터 알려져 왔으며 근년에는 Africa와 중남미 지역에서 그 유행이 밝혀져 왔다(Miyazaki and Vajrasthira, 1967; Miyazaki, 1974; Kum and Nchinda, 1982).

우리 나라에서는 폐흡충증이 풍토병의 하나로서 일찍부터 그 유행이 있어 왔으며 중간숙주인 개와 가재의 식습관에 따라 근년에 이르기까지 전국적인 만연을 가져 왔고 아마도 자연숙주의 다양성에 따라 인체의 생활환(extra-human natural cycle)이 유지되고 있어

기회가 있을 때마다 언제든지 그 유행이 일어날 가능성을 갖고 있다(Walton and Chyu, 1959; Soh, 1962; 金 및 梁, 1964; 盧, 1966; Seo, 1969; 金 등, 1979; Chung, 1983; Yong *et al.*, 1987).

폐흡충 감염에 대한 공중 위생학적 중요성에 비추어 그동안 역학적 조사연구와 면역학적 진단법에 관한 연구는 활발했던 반면, 폐흡충 감염시 숙주 체내에서 일어나는 면역 기전에 관한 연구가 부진하여 실제 숙주 저항력 생성에 대한 기전을 정확히 알 수 없다. 인체 기생 흡충류에 대한 숙주의 방어 기전에 관한 연구는 주로 주혈흡충류(schistosomes)를 대상으로 수행되었는 바 그 이유는 첫째, 그 분포 지역이 아프리카, 중동 및 남미 등지를 포함하여 광범위하고, 둘째, 그 감염 경로가 짧고 수인성이어서 자연 이환율이 높아 malaria 다음으로 중요한 세계 보건문제로 등장하였다는 점이다. 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)의 경우에는 schistosomule인 시기에 항체 의존성 숙주세포 매개독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC)이 있음이 인정되었고 주효세포(effector cell)로는 호중구, 호산구, 대식세포 등이 참여하는 것으로 알려져 왔다(Dean *et al.*, 1974 & 1975; But-

* 본 실험은 1983년도 연세대학교 의과대학 교수연구비로 수행되었으며 연구결과는 1987년도 대한기생충학회 제29회 학술대회에서 발표되었음.

terworth *et al.*, 1976; Chung *et al.*, 1982).

폐흡충은 감염 즉시 피낭유충이 소장에서 탈낭한 다음 소장벽을 뚫고 복강 내로 미입하여 폐장에 정착한 다음 worm cyst를 형성하여 기생하는 조직 기생충이라 할 수 있다(Chatterjee, 1980). 실제 숙주의 조직 내에 기생하는 폐흡충으로서는 만손주혈흡충의 경우와 같이 숙주로부터 ADCC 기구에 의한 공격을 받을 것이 예측되며 임 등(1982)은 폐흡충의 표피 미세구조에 미치는 praziquantel의 작용을 관찰하는 과정에서 숙주의 백혈구가 충체의 구흡반 및 복흡반 주변에 부착됨을 본 바도 있다.

본 실험은 폐흡충 감염 백서로부터 얻은 항혈청과 동일 숙주로부터 채취한 대식세포(macrophage)로 구성되는 effector system 하에서 조직 미입 폐흡충 유충에 대한 ADCC 기전이 일어날 수 있는지를 규명한 것이다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 동물 및 대상 기생충

1) 실험동물 : 폐흡충 감염 숙주로서 항혈청과 복강 대식세포(peritoneal macrophage)를 얻기 위하여 체중 약 200 g 내외의 백서(Wistar 주)를 실험동물로 하였다.

2) 대상 기생충 : 전라남도 완도군 보길도 계곡에서 채집한 참가재(*Cambaroides similis*)로부터 분리한 폐흡충(*P. westermani*) 피낭유충을 대상 기생충으로 하였다.

2. 피낭유충의 분리 및 탈낭

李 및 南(1977)의 방법에 따라 참가재로부터 피낭유충을 분리하고 탈낭시켜 유리된 유약 폐흡충을 실험 재료로 사용하였다. 즉, 폐흡충에 자연 감염된 참가재를 인공 위액을 사용하지 않고 분쇄기로 분쇄하여 1.5 mm의 체에 걸러 참가재의 조잡물을 제거하고 2 l 삼각플라스크에서 수세와 침전을 수차 반복한 후 침사를 입체 배부 현미경 하에서 관찰하여 피낭유충을 초자모세관으로 분리, 생리 식염수에 집충하여 4°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

피낭유충의 탈낭은 Oshima(1956)의 방법에 준하였던 바, 수집된 피낭유충을 적당량의 Tyrode액(pH 8.0)과 혼합하여 42°C의 항온 수조에서 약 30분 내지 1시간 동안 열처리함으로써 탈낭유충(excysted metacercaria)을 얻었다.

이 때 사용된 Tyrode액의 처방은 다음과 같다 : NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, CaCl₂·2 H₂O 0.25 g, MgCl₂ 0.1 g, NaH₂PO₄·2H₂O 0.05 g, glucose 1.0 g, distilled water 950 ml. 이상의 용액을 증기 멸균(15 lbs, 15분)한 다음 별도로 증기 멸균된 중조액(NaHCO₃ 0.7 g+D.W. 150 ml)을 가하면서 pH 8.0으로 맞추었다.

3. 조직 이행 유충의 검출 및 항혈청 채취

총 10 마리의 백서에 마리당 50개의 폐흡충 피낭유충을 “카테터”를 이용하여 경구 감염시키고 주별로 백서를 희생시켜 심장으로부터 채혈, 폐흡충 항혈청을 분리하였다. 분리된 항혈청은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

일면 조직 이행 유약충(juvenile worm)을 얻기 위하여 채혈 후의 백서는 내장을 제거하고 전 근육 부위를 도마 위에서 저미어서 0.85% 생리식염수 내에 담구고 37°C 항온기 내에서 1시간 동안 두었다.

4. 백서 복강 대식세포(peritoneal macrophage)의 수집

폐흡충 피낭유충에 감염되지 않은 정상 백서 복강 내로 대식세포 유도제로서 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 1%가 되도록 만든 oyster glycogen (Type II, Sigma Chemical Co.) 용액 5 ml를 각 백서에 주사하였다. 주사 4일 후 백서를 ether로 마취시키고 복강 내로 유입될 수 있는 적혈구를 감소시키기 위하여 심장을 천자하여 혈액을 모두 뽑아낸 다음 20 ml의 비등화된 10% fetal calf serum(FCS), 2 IU/ml heparin, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 함유된 HBSS를 복강 내로 주사하였다. 백서 복면을 약 2분간 서서히 닦아내 준 다음 개복하여 복강액을 소독된 튜브에 수집하였다. 모든 과정은 얼음가루 위에서 행해졌으며 수집된 복강세포들은 상기 HBSS로 2회 세척하였다. 세척된 복강 삼출세포로부터 대식세포만을 선별 수집하기 위하여 복강 삼출세포들을 10% FCS가 함유된 Eagle's minimum essential medium(MEM/FCS)이 담긴 조직세포 배양용 plastic petri dish (Lab-Tek, No. 4036, 60×20 mm)에 분주하여 36°C에서 3시간 동안 배양하였다. 이 때 MEM/FCS에 부유된 복강 삼출세포의 수는 대략 1×10⁷/ml이었으며 배양 후 HBSS로 2회 씻어 비부착 세포를 제거하고 배양 접시 하면에 부착된 세포만을 rubber policeman으로 수집하여 실험에 사용하였다. 수집된 부착세포들을 Giemsa 염색하여 본 마 96% 정도가 대식세포였다.

5. 탈낭유충 및 조직 이행 유약충에 대한 대식세포의 반응 실험

탈낭유충 및 조직 이행 유약충에 대한 항체 의존성 숙주세포 매개 독성(ADCC)을 관찰하기 위한 실험 조작은 Chung *et al.* (1982)의 방법을 일부 수정하여 적용하였다. 즉, 탈낭유충인 경우에는 flat-bottomed microtiter plate(Linbro)의 각 well 내에 실제 2마리의 유충이 함유되도록 조작한 0.1 ml의 MEM/FCS를 분주해 넣고, 다시 감염 주별로 분리한 폐흡충 항혈청 및 건강 대조 혈청을 56°C에서 30분간 비등화하여 각기 0.1 ml씩을 혼합하였다. 백서 복강 대식세포는 MEM/FCS 1 ml 당 1×10⁷개가 함유되도록 조작하였고 이 대식세포 부유액 0.1 ml(1×10⁶ cells/0.1 ml)씩

을 각 well에 분주해 넣어 실제 유충:대식세포의 비율이 1:5×10⁵이 되도록 하였다. 조직 이행 유약충의 경우에는 유약충:대식세포의 비율은 탈낭유충의 경우와 같으나 항혈청은 반감하여 혼합하였다.

폐흡충 탈낭유충 및 조직 이행 유충, 항혈청 및 건강 대조 혈청, 그리고 백서 복강 대식세포가 일정량씩 함유되도록 조작한 위의 microtiter plate는 마르지 않도록 해부용 팬에 넣어 이를 5% CO₂가 함유된 37°C 항온기 내에서 18시간 동안 방치하였다. 배양 18시간 후 각 well 내의 부유액은 Sedgwick-Rafter counting chamber 내에 옮기고 즉시 위상차 현미경 하에서 유충의 생사 판정을 하였다.

각 effector system 내에서 처리된 유충의 생사 판정은 두가지의 기준에 따랐다. 즉, 첫째는 총체 표면에 부착된 대식세포의 수로서 그 수가 대조군과 비교하여 5개 이상일 때 세포부착으로 계산하였다. 둘째는 총체 운동 여부 및 trypan blue 액의 흡착성 여부로 생사 판정을 하였던 바, 외부 자극에 반응이 없는 총체는 다시 0.4% trypan blue액(Sigma Chemical Co.) 0.05 ml 내에 총체를 옮기고 5분간 방치하였다가 강한 염색 반응을 보인 경우 죽은 총체로 간주하였다.

6. 투과 전자현미경적 관찰

대식세포 부착 유충의 총체 손상 과정을 형태학적으로 관찰하기 위하여 강한 대식세포 부착반응을 보이는 총체들을 pasteur 피펫으로 모아 0.85% 생리식염수로 일차 세척한 다음 투과 전자현미경 관찰을 위한 조작을 시행하였다. 세척된 총체들은 3% glutaraldehyde에 고정하고 0.1 M PBS액으로 세척한 다음, 60%에서 무수알콜까지의 알콜 계열에 탈수하였고 propylene

oxide에 처리하였다. 처리된 각 총체는 epoxy resin에 포매하였으며 Sorvall MT-2B ultramicrotome을 사용, 유리칼로 후절편(thick section; 1 μm)을 만들고 toluidine blue로 염색한 후 자를 부위를 정하였다. 이 부위를 60 nm 두께의 박절편(thin section)을 만들고 이것을 copper grid(#300)에 올려 놓아 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 Hitachi-500형 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

실 험 성 적

1. 조직 이행 폐흡충 유약충(juvenile worm)의 검출률

백서 한 마리당 50개의 폐흡충 피낭유충을 경구 감

Table 1. Mean worm recoveries from five rats infected with 50 *Paragonimus* metacercariae per animal*

Weeks after infection	No. of rats infected	No. of worms recovered (X±S.D.)	Worm recovery rate (%)
1st	2	18.0±1.0	36
2nd	2	19.5±1.5	39
3rd	1	10.0±0	20

* *Paragonimus* metacercariae were inoculated *per os* into the rats.

• The whole bodies of rats, from which the viscera were removed, were minced and incubated in 0.85% saline solution at 37°C for one hour for the detection of excysted worms of *Paragonimus*.

Table 2. Yield of rat peritoneal macrophages (Mφ) according to stimulators employed

Stimulator	Experiment No.	Supernatant cell count (#/mm ³)		Difference* (# Mφ/mm ³)
		Before culture [†]	After culture	
Mineral oil	1	1,250	650	600
	2	2,800	1,000	1,800
	X̄±S.D.	2,025±1,096	825±248	1,200±849
Oyster glycogen	1	2,750	600	1,250
	2	1,300	300	1,000
	X̄±S.D.	2,025±1,025	450±212	1,125±177
Freund's adjuvant	1	5,100	2,550	2,550
	2	3,650	2,600	1,050
	X̄±S.D.	4,375±1,025	2,575±35	1,800±1,061

X̄±S.D. = mean ± standard deviation.

† In order to enrich for macrophages, the peritoneal cell exudate was cultured in plastic petri dishes and processed as described in Experimental Procedures.

* Difference between "before culture" and "after culture" counts represents an approximation of the number of adherent cells (macrophages) selected.

염시키고 주별로 감염백서를 희생시켜 조직 이행중인 유약층을 검출한 바 감염 제 1 주에는 백서 한마리당 평균 18마리의 유약층이 검출되어 36%의 검출률을 보였으며, 감염 제 2 주에는 평균 20마리의 유약층이 검출되어 39%의 검출률을, 감염 제 3 주에는 10마리의 유약층이 검출되어 20%의 검출률을 나타내었다(Table 1).

2. 백서 복강 대식세포 자극제 (stimulator)의 선별

실험에 적합한 대식세포 자극제를 선별하기 위하여 mineral oil (Sigma Chemical Co.), 1% oyster gly-

cogen/HBSS (Type II, Sigma Chemical Co.), complete Freund's adjuvant (CFA) 등 3종을 택하여 실험하였던 바 mineral oil인 경우 배양액 MEM/FCS mm³당 평균 1,200개의 대식세포가 배양되었고, oyster glycogen인 경우 1,125개의 대식세포가, CFA인 경우에는 1,800개의 대식세포가 배양되어 대식세포 생산 숫자만으로 보아 CFA가 가장 좋은 자극제로 간주되었다 (Table 2).

그러나 CFA로 자극된 백서 복강 대식세포의 생산 숫자가 실험 때마다 변화가 심하였고 CFA와 mineral

Table 3. Cell adherence and death of excysted metacercariae of *P. westermani* after an 18-hour culture with immune sera collected from rats at one-week intervals*

Week	Effector systems	No. worms observed	No. and (%) of metacercariae		No. and (%) of dead metacercariae
			with >5 cells	Totally covered with cells	
1st	NRS+Mφ+Mc	6	0	0	0
	IRS+Mφ+Mc	6	2(33.3)	0	0
	IRS+MEM+Mc	6	0	0	0
	MEM+Mφ+Mc	6	0	0	0
2nd	NRS+Mφ+Mc	6	0	0	0
	IRS+Mφ+Mc	6	6(100.0)	2(33.3)	1(16.7)
	IRS+MEM+Mc	6	0	0	0
	MEM+Mφ+Mc	6	0	0	0
3rd	NRS+Mφ+Mc	6	0	0	0
	IRS+Mφ+Mc	6	3(50.0)	1(16.7)	0
	IRS+MEM+Mc	6	0	0	0
	MEM+Mφ+Mc	6	0	0	0
4th	NRS+Mφ+Mc	6	0	0	0
	IRS+Mφ+Mc	6	3(50.0)	0	0
	IRS+MEM+Mc	6	0	0	0
	MEM+Mφ+Mc	6	0	0	0
5th	NRS+Mφ+Mc	6	0	0	0
	IRS+Mφ+Mc	6	4(66.7)	0	0
	IRS+MEM+Mc	6	0	0	0
	MEM+Mφ+Mc	6	0	0	0
6th	NRS+Mφ+Mc	6	0	0	0
	IRS+Mφ+Mc	6	3(50.0)	0	0
	IRS+MEM+Mc	6	0	0	0
	MEM+Mφ+Mc	6	0	0	0
7th	NRS+Mφ+Mc	6	0	0	0
	IRS+Mφ+Mc	6	2(33.3)	0	0
	IRS+MEM+Mc	6	0	0	0
	MEM+Mφ+Mc	6	0	0	0
8th	NRS+Mφ+Mc	6	0	0	0
	IRS+Mφ+Mc	6	2(33.3)	0	0
	IRS+MEM+Mc	6	0	0	0
	MEM+Mφ+Mc	6	0	0	0

* NRS=normal rat serum; IRS=immune rat serum; Mφ=macrophage; Mc=metacercaria; MEM=minimum essential medium

oil은 점도가 높아 실제 사용에 불편이 있었기 때문에 본 실험 전 과정에서는 대식세포 자극제로 oyster gly-cogen을 선택 사용하였다.

3. 폐흡충 탈낭유충에 대한 대식세포의 부착 (cell adherence reaction; CAR)

정상 백서 혈청과 폐흡충 감염 백서 항혈청의 출현 하에 탈낭유충에 대한 동일 백서 복강 대식세포(homologous peritoneal macrophage)의 부착실험 결과는 Fig. 1 및 Table 3에서와 같다.

세포부착의 등급은 0에서 Ⅱ까지로 하여 관찰하였다. 즉, 세포 부착 반응을 볼 수 없는 경우는 0, 최소한 5개 이상의 세포가 부착된 경우는 +, 유충 표면 전체가 세포로 clumping된 경우는 Ⅱ로 기록하였다. 전 실험 과정 중 세포 부착 반응(CAR)을 나타낸 실험군은 모두 폐흡충 항혈청 출현군이었으며 비면역 정상 백서 혈청에는 CAR 반응을 볼 수 없었다. CAR은 비동화시킨 항혈청이나 비동화시키지 않은 항혈청 출현군 모두에서 나타남을 예비실험을 통하여 알 수 있었기 때문에 모든 항혈청은 비동화시켜 실험하였으므로 CAR 반응에는 보체가 관여하지 않음을 알 수 있었다.

폐흡충 감염 1주체에 채취된 항혈청 출현군에서는 6마리의 탈낭유충 중 2마리가 CAR 양성반응(>5 Mφ)을 보여 양성률은 33.3%였으나 총체 전체가 세포로 둘러싸인 총체나(CAR Ⅱ) 사멸한 총체는 관찰되지 않았다. 그러나 감염 2주체에 채취된 항혈청 출현군에서는 관찰된 6마리의 탈낭유충 전체가 CAR 반응 양

성이어서 100%의 양성률을 보였고 총체 전체가 세포로 둘러싸인 유충은 6마리 중 2마리(33.3%)였으며 완전 사멸한 총체도 1마리 관찰되었다. 그 이후 감염 3주에서 8주까지 주별로 채취된 항혈청 출현군들에서는 33.3%~66.7%의 CAR 양성률을 기록하였으나 총체 전체가 세포로 둘러싸인 탈낭유충은 제 3주 실험군을 제외하고는(16.7%) 찾아 볼 수 없었으며 사멸한 총체도 없었다.

이로서 감염 2주체에 분리한 폐흡충 항혈청이 가장 강한 CAR 반응을 보였으며 총체를 사멸시킬 수도 있음을 알 수 있었다.

4. 조직 이행 유약충에 대한 대식세포의 부착

백서 한 마리당 50개씩의 폐흡충 피낭유충을 경구 감염시키고 감염 2주체에 혈청을 분리한 다음, 체표와 내장을 제거한 전 백서를 저미어 얻은 조직 이행 유약충을 재료로 하여 백서 복강 대식세포의 부착 여부와 총체의 생사를 관찰하였다. 폐흡충 항혈청 출현 effector system 내에서는 대조로 두었던 탈낭유충의 경우 100%의 CAR 양성을 보였고 5 마리의 피낭유충 중 2 마리가 완전 사멸하여 60%의 생존률을 기록하였으나, 조직 이행 유약충인 경우에는 전혀 CAR 반응을 보이지 않았고 사멸한 유충도 관찰되지 않았다. 일면, 비동화시킨 정상 백서혈청이나 비동화시키지 않은 정상 백서 혈청 모두에서도 CAR 반응이나 사멸된 총체를 관찰할 수 없었다(Table 4).

이로써 CAR 반응은 피낭유충 시기에서만 나타나는

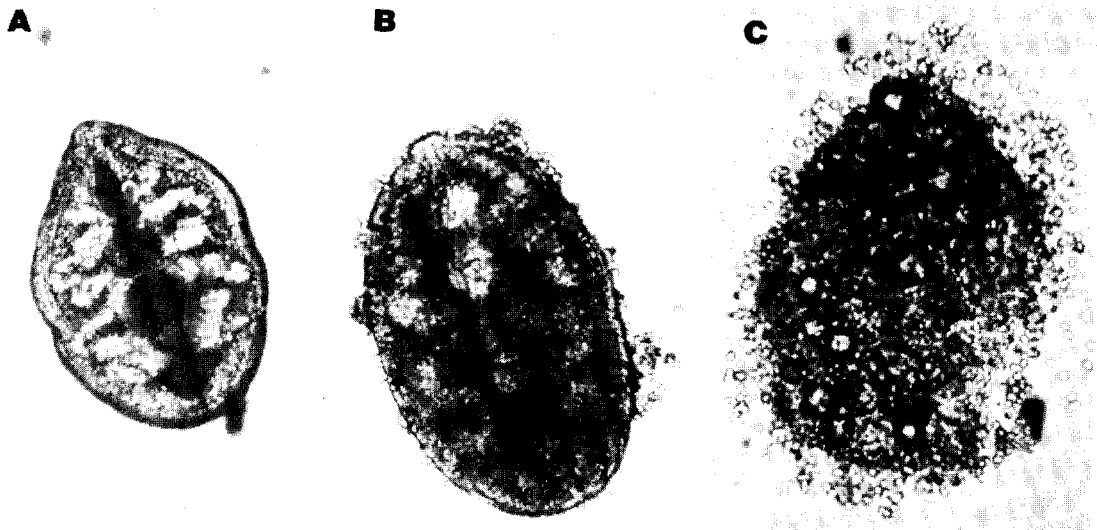


Fig. 1. Antibody-dependent adherence of rat peritoneal macrophages to the excysted metacercariae of *P. westermani*. (A) in the presence of macrophages and sera from uninfected normal rats, the excysted metacercariae appear normal and cells do not adhere to worms; (B) in the presence of sera from infected rats and macrophages, cells adhere to the surface of worms; (C) blebbing of the tegument with strong cell adherence reaction appears on the surface of dead worm, in the presence of sera from the rats 2 weeks after infection. (×100).

Table 4. Cell adherence and viability of juvenile worms (=adolescariae) of *P. westermani* in various effector system*

Effector systems	Adolescariae and Metacercariae		Viability	No. and (%) of worms with cell adherence
	Alive	Dead		
IRS+Mφ+Adol.	5	0	100	0
NRS+Mφ+Adol.	5	0	100	0
F.NRS+Mφ+Adol.	5	0	100	0
IRS+Mφ+Mc	5	2	60	5(100.0)
NRS+Mφ+Mc	5	0	100	0
F.NRS+Mφ+Mc	5	0	100	0

- *1) Mφ suspension; 5×10^6 cells/ml
 2) Worm suspension; 5 worms in 1 ml of culture medium.
 3) IRS was collected from rats infected with 50 metacercariae for 2 weeks.
 4) Effector systems; 1 ml of Mφ suspension + 1 ml of worm suspension (5 worms) + 0.5 ml of serum samples. Systems were incubated for 18 hours. (IRS=immune rat serum; NRS=normal rat serum; F.NRS=normal rat serum without heating; Mφ=macrophage; Adol.=adolescaria; Mc=metacercaria)

반면, 조직 이행 유충시기에는 전혀 그 반응을 인정할 수 없어 폐흡충 감염에 대한 항체의 의존성 숙주 대식세포 공격은 폐흡충의 발육 단계별로 특이성이 있음을 알 수 있었다.

5. 투과 전자현미경적 소견

폐흡충 항원청 출현 하에서 백서 복강 대식세포의 표적 탈낭유충에 대한 공격기전을 투과 전자현미경으로 관찰하여 몇가지 소견을 얻었다. 정상 대조 충체의 표피구조를 보면 tegumental ridge가 잘 발달된 tegumental syncytium은 표피 내면의 basement membrane으로 둘러싸여 있고 mitochondria와 small ovoidal dense granule이 산재해 있었다. Tegumental syncy-

tium 하면은 longitudinal muscle과 circular muscle 층으로 구성되었다(Fig. 2).

Effector system 내에서 약 2시간 동안 배양된 충체는 부착된 대식세포와 체표면 사이에 fuzzy material이 형성되어 있었으나 dense granule의 변성은 인정할 수 없었다(Fig. 3). 배양 후기(18 hr)에는 수많은 pseudopodia를 낸 부착 대식세포가 관찰되었고 충체 표면에서는 거의 tegumental ridge를 관찰할 수 없었으며 dense granule들은 적은 vesicle로 둘러 싸여 변성된 양상을 보였다(Fig. 4). 이 때 충체와 대식세포 사이의 fuzzy material은 현저히 증가하였고 부착 대식세포 세포질 내에는 phagosome-like vacuole의 수가 증가하여 있었다(Fig. 5).

대식세포가 충체 체표에 clumping 되면서 (CAR ++) 사멸하였던 충체의 경우에는 tegumental syncytium과 muscle layer를 연결하는 tubular tunnel의 출현이 특징적이었으며 syncytium의 미세구조는 거의 파괴되었다(Fig. 6).

고 찰

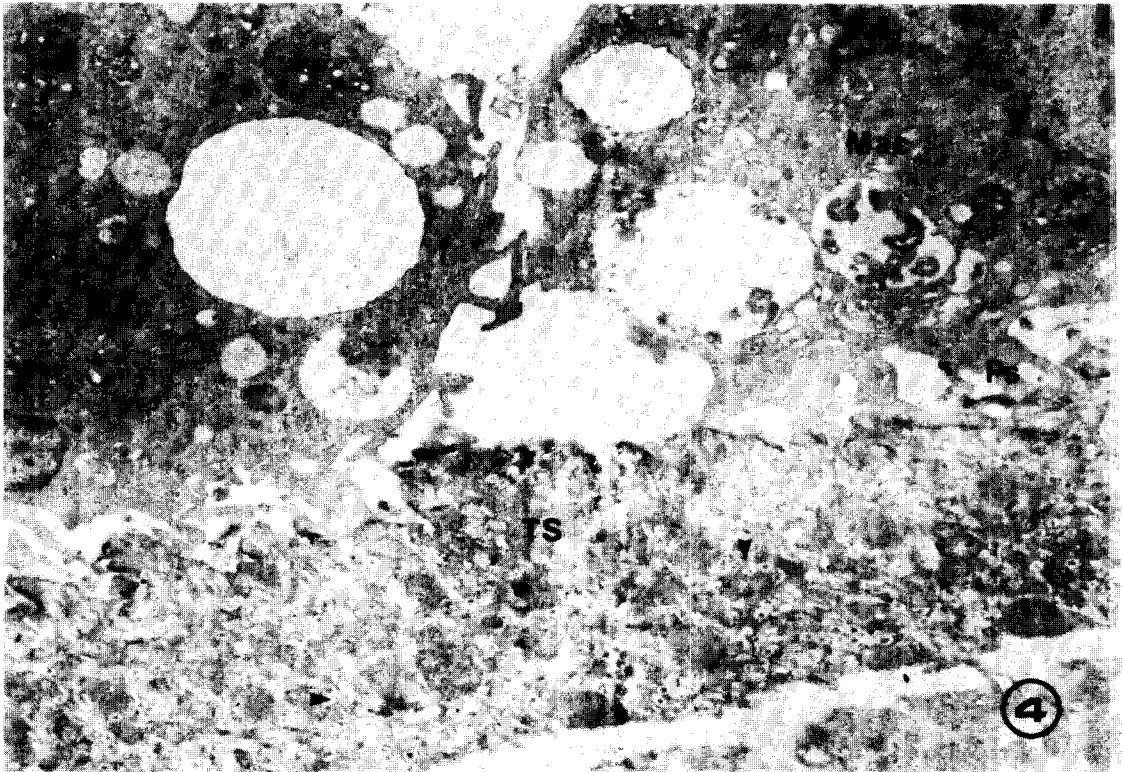
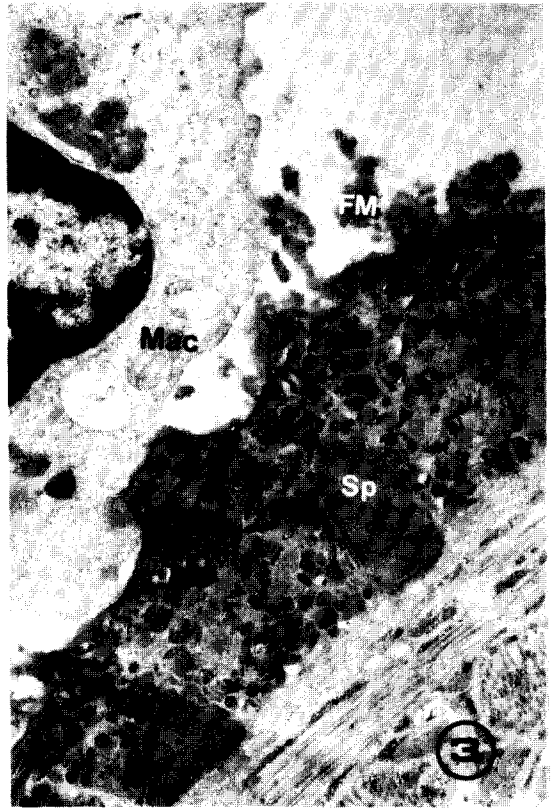
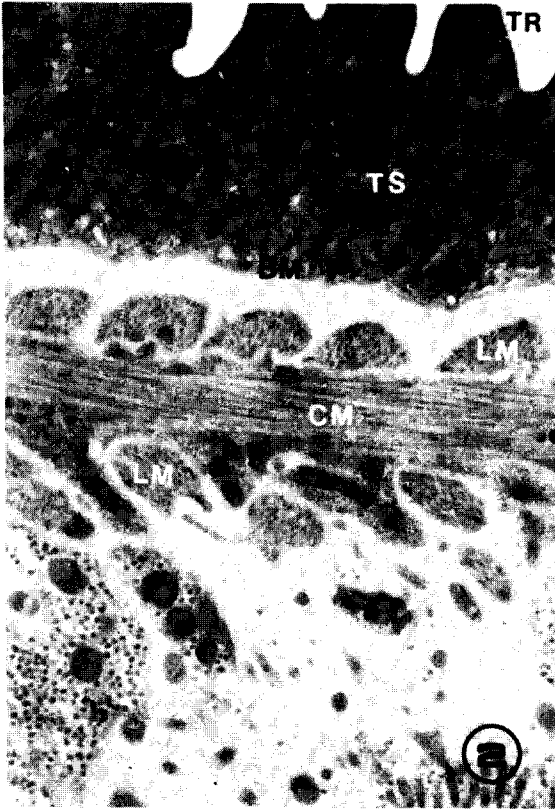
대식세포(macrophage)가 탐식작용 촉진 항체(opsonizing antibody)의 출현 하에 대상 기생충을 공격한다는 사실은 일찍부터 알려져 왔다. 즉, Perez(1974)와 Perez and Smithers(1977)는 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)의 schistosomula에 항원청을 3시간 동안 감작시킨 다음 백서 복강 대식세포와 작용시켰던 마 대식세포가 배양 24시간 이내에 충체 표면에 부착됨을 관찰하였고, 반대로 대식세포에 항원청을 감작시킨 다음 schistosomula에 작용시킨 결과도 동일함을 보고한 바 있다. 이들은 다시 이 만손주혈흡충의 백서 항원청을 sephadex QAE column에 걸어 두번째 분획에서 대식세포 부착 촉진 작용이 있음을 확인하였다. 일면 Capron *et al.*(1975)은 백서 항원청을 56°C에서 3시간 동안 비동화시킨 경우 대식세포 부착 반응이 일어나지 않음으로 보아 이 항체는 열처리에 약하며(thermo-

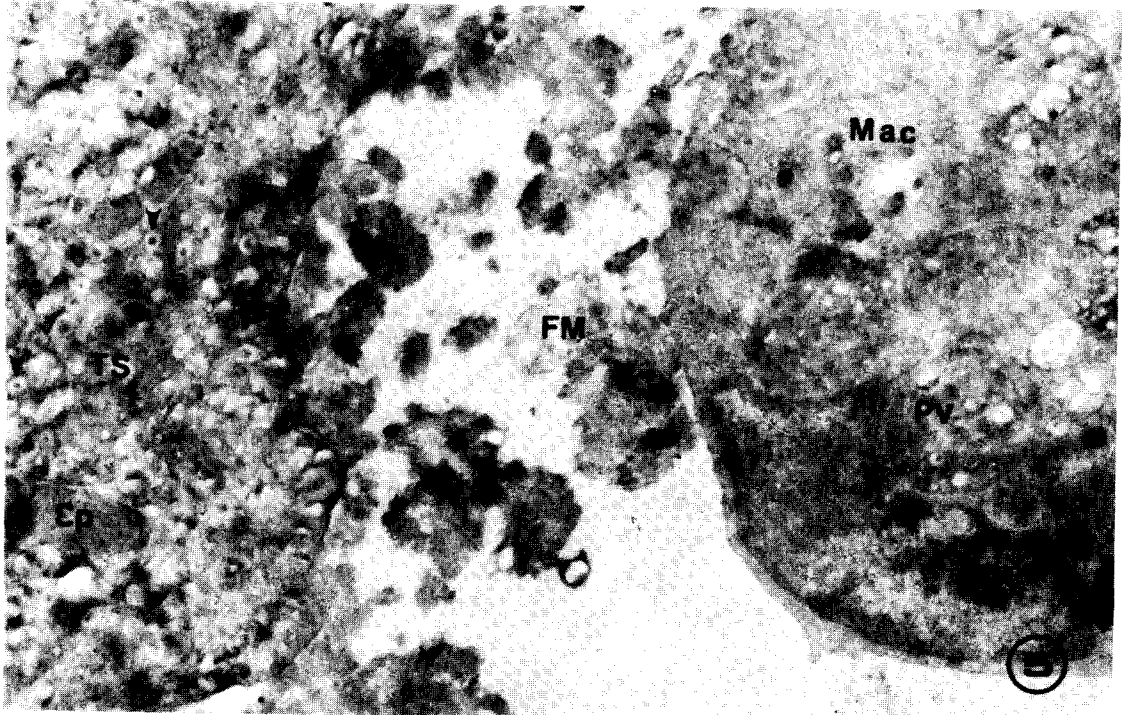
(→)

Fig. 2. An excysted metacercaria of *P. westermani* after incubation in media containing sera from uninfected rats shows the normal, intact structural features such as tegumental ridges (TR), tegumental syncytium (TS) containing mitochondria (Mi) and small ovoidal dense granules, circular muscles (CM), and longitudinal muscle (LM) layers just underneath the basement membrane (BM) of the tegumental syncytium ($\times 12,500$).

Fig. 3. Appearance of an excysted metacercaria after 2-hr incubation in media containing macrophages (Mac) from uninfected and sera from infected rats. Note deposition of electron-dense fuzzy material (FM) onto the tegument. Syncytial cytoplasm contains spines (Sp) and intact dense granules (arrow heads) ($\times 10,000$).

Fig. 4. Antibody-dependent adherence of macrophages and damage to the excysted worm. The excysted metacercariae were incubated for 18 hrs in the presence of macrophages (Mac) from uninfected rats and serum from infected rats. Note macrophages with a great number of pseudopodia (Ps) onto the tegumental surface and dense granules surrounded by small vesicles in the syncytial cytoplasm (arrow heads). No tegumental ridges were observed ($\times 7,500$).





labile), mercaptoethanol 처리시 역시 부착반응 억제 현상이 있으므로 보아 대식세포 탐식작용 촉진 항체는 IgE이거나 IgE-항원 복합체일 것임을 시사한 바 있다.

주효세포(effector cell)로는 대식세포 외에 mast cell, eosinophil, neutrophil, helper T cell이 관여됨을 알 수 있는 바(McLaren, 1980) 이들은 모두 주혈흡충에 대한 공격기전을 밝히는 과정 중 알려진 것들이고 대식세포를 비롯한 이들 주효세포들이 기타 흡충류 감염에 대하여도 관여하는지는 거의 알려진 바 없다. 주혈흡충증에 대한 ADCC 기전을 밝힘에도 대부분 rat model을 사용하며 mouse model을 사용하지 않고 있음을 알 수 있는데, 이는 주혈흡충에 대한 민감성(susceptibility) 때문으로 사료된다. 즉 백서는 주혈흡충에 대한 자가 치료적 현상(self-cure phenomena)이 있고, 마우스는 주혈흡충 감염에 대한 높은 민감성(full susceptibility)과 장기간 감염이 유지되는 특성 때문이다(Chung *et al.*, 1982).

Mouse model을 이용한 만손주혈흡충 감염시의 ADCC 기전을 밝힌 연구로는 Chung *et al.* (1982)의 보고를 들 수 있다. 이들은 BALB/c와 CD-1 마우스에 만손주혈흡충을 감염시키고 그 항혈청과 각 마우스계의 복강 대식세포를 schistosomule에 혼합시켰던 바 강한 CAR 반응과 사멸 schistosomule을 관찰할 수 있었다. 또한 이 ADCC 기전은 보체가 관여되지 않았으며 만손주혈흡충 성충에는 CAR 반응이 없어 발육단계별 특이성이 있음을 알았다. 주효세포인 대식세포는 동일 마우스의 것(homologous Mφ)이나 타 마우스의 것(heterologous Mφ) 모두에서 동일한 양상의 ADCC 현상을 나타내었다.

본 실험은 주혈흡충류 감염에 대한 ADCC 기전을 밝힌 연구 업적들의 역사적 배경에 근거하여 우리나라 풍토병 중의 하나인 폐흡충 감염시에도 동일한 현상이 재현될 가능성에 초점을 맞추어 시행하였던 바 다소의 차이는 있었으나 만손주혈흡충을 대상으로 한 Chung *et al.*(1982)의 실험 결과와 유사하였다. 즉, CAR 반응은 폐흡충 항혈청 출현 하에서만 일어났고 정상 백서의 혈청 출현 하에서는 CAR 반응을 전혀 인정할 수 없었으며 56°C에서 30분간 비동화시킨 항혈청이나 비동화시키지 않은 항혈청 첨가군 모두에서 CAR 반응이 일어난 점으로 보아 본 실험의 대식세포에 의

한 폐흡충 탈낭유충 공격기전은 보체 비의존성임을 알 수 있었다. Butterworth *et al.* (1975 & 1977)은 사람의 eosinophil을 재료로 하여 만손주혈흡충의 schistosomule에 대한 항체의존성-eosinophil 매개 공격기전을 밝힌 바 있고, Ramalho-Pinto *et al.* (1978)은 정상 백서의 eosinophil이 정상 백서 혈청의 출현 하에서 만손주혈흡충의 schistosomule에 부착, 배양 18시간 내에 대부분의 충체를 사멸시킴을 관찰한 바 있다. 진자에서의 같이 항체의존성인 경우에는 항체와 주효세포 세포막에 존재하는 Fc 수용체(Fc receptor)의 역할이 고려될 수 있으나 후자인 경우에는 주효세포 세포막이나 충체 표면의 보체수용체(C3 receptor)의 역할이 보다 큰 것으로 논의되고 있다. 본 실험에서는 진술한 바와 같이 보체 비의존성임이 입증됨으로서 대식세포 세포막에 존재하는 C3 수용체 보다는 Fc 수용체의 매개가 보다 논리적이라 할 수 있다. 이는 주효세포의 하나인 mast cell의 경우와는 다르다. Sher (1976)는 schistosomula를 순수 분리한 백서 mast cell, 비동화시키지 않은 백서 항혈청과 혼합 배양했을 경우 충체 표면에 rosette형의 mast cell 부착을 관찰하였고 항혈청 내의 부착 촉진 요소는 비동화시켰을 때 사라지며 zymosan, cobra venom 및 EDTA에 처리했을 경우 역시 소멸됨으로 보아 항체 자체라기보다는 보체임을 강조하고 있다.

민 등(1990)은 폐흡충 피낭유충에 대한 백서 대식세포의 세포독성에 있어 항체 및 보체의 역할에 대하여 보고한 바 있다. 즉, 폐흡충 감염 혈청을 56°C에서 30분간 가열하였을 때 IgE 항체 변성에 의해 세포독성이 저하되며 비감염 정상 혈청 출현 하에서도 대식세포는 배양 6시간 후에 51.5%의 부착률을 보여 보체 관여의 여지를 배제하지 않고 있다. 위에서 언급한 바와 같이 Capron *et al.* (1975)은 56°C에서 3시간 동안 항혈청을 열처리하여서만 IgE를 제거한 바 있고, 본 실험에서 정상 백서 혈청의 출현은 CAR 반응에 아무런 영향을 끼치지 않은 결과와는 대조를 이루고 있다. 세포 부착 촉진 요소의 추출 및 폐흡충에 대한 대식세포 공격기전에 있어 보체 관여 여부에 대한 정밀한 실험이 앞으로 요망된다.

Chung *et al.* (1982)은 BALB/c 마우스로부터 6주째에 분리한 만손주혈흡충 항혈청에서 가장 높은 대식세포 부착반응을 보였으며 민 등(1990)도 폐흡충 감염

(←)

Fig. 5. An excysted metacercaria and a macrophage incubated in the same effector system as in Fig. 4. The increased amount of fuzzy material (FM) between macrophage and tegumental surface of worm, and phagosome-like vacuoles (PV) in the macrophage were remarkable. Dense granules denatured in the small vesicles were also enlarged ($\times 12,500$).

Fig. 6. A dead worm incubated for 18 hrs in the presence of homologous macrophages and serum obtained from rats 2 weeks after infection. Tubular tunnels (Tt; arrow heads) formed between the basement membrane and muscle layers of a damaged parasite were noticeable. The fine structures in the tegumental syncytium were almost destroyed ($\times 10,000$).

6주째에 분리한 백서 항혈청으로 대식세포 부착반응을 실험하였다. 본 실험에서는 폐흡충 감염 1주에서부터 8주까지의 백서에서 항혈청을 분리하여 실험하였던 마제 2주째의 항혈청에서 100%의 CAR 반응과 사멸된 충체를 관찰할 수 있었다. 감염 기생충의 종류 또는 그 숙주에 따라 항혈청 내의 세포 부착 촉진 물질의 생성 시기가 서로 다름을 알 수 있으며 이 차이는 주효세포나 항체생성의 유전적 차이에 기인된 것인지의 여부도 현재로서는 알 수 없으며 차후의 면밀한 연구가 요망된다.

Smithers and Terry(1976)는 schistosomule이 숙주조직을 미입할 때 숙주로부터의 항원, 특히 적혈구와 연관된 항원이 충체 체표면에 흡착되어 숙주 면역 기전으로부터 보호받을 수 있다고 하였고, 실제 Kassis *et al.*(1979)은 schistosomule을 마우스 적혈구에 4일 동안 전치치하여 effector system을 조작하였을 경우 이 충체는 항체의존성 주효세포(eosinophil과 macrophage)의 공격을 피할 수 있음을 밝힌 바 있다. Chung *et al.*(1982)도 만손주혈흡충에 대한 대식세포의 공격이 schistosomule인 경우에만 가능하고 일단 성충이 된 다음에는 ADCC의 현상이 나타나지 않음을 보고한 바 있다. 이는 만손주혈흡충인 경우 그 유충이 어느 경로이든 감염 초기 숙주방어기전을 피하여 성충이 되면 숙주로부터의 면역학적 공격을 방어할 수 있는 능력을 갖출 수 있음을 시사하는 것이다. 본 연구에서도 폐흡충 탈낭유충인 경우에는 항체 출현 하에 대식세포의 공격이 입증되나 조직 이행 유약충인 경우에는 ADCC 현상을 볼 수가 없었다. 이미 조직 이행 중인 폐흡충 유약충은 만손주혈흡충의 경우에서와 같이 숙주 면역 체계로부터 탈출할 수 있는 어떤 능력을 갖추게 되는 것인지는 현재로서는 설명하기 어려우나 폐흡충 감염시 숙주 대식세포의 공격은 특히 항체 출현 하에서도 감염 초기에만 가능함을 처음 알았으며 앞으로의 면밀한 추사가 있어야 할 것으로 사료된다.

폐흡충 탈낭유충에 대한 ADCC 기전을 투과 전자현미경적으로 관찰한 바 충체의 초기 반응과 사멸 과정이 전반적으로 만손주혈흡충의 경우와 흡사하였다. Chung *et al.*(1982)은 반응 초기에 mitochondria가 산재한 충체의 tegumental syncytium 외부로 electron-dense material이 뿜어지면서 배양 시간의 경과에 따라 피하의 근육조직의 파괴와 충체로부터의 과립상물질의 방출, 그리고 일곱 겹으로 된 충체 외막(heptalamellate surface membrane)의 이탈로 schistosomule이 사망에 이른다고 하였다. 본 실험에서는 반응 초기에 (2 hrs) 대식세포와 탈낭유충 사이에 fuzzy coat의 형성을 볼 수 있었고 반응 후기에는 syncytium의 파괴와 syncytium과 근육층을 연결하는 tubular tunnel이 형성되면서 충체는 사망하게 되었다. 만손주혈흡충과 폐흡충은 그 형태학적 구조는 다르나 tegumental syncytium의 파괴에 이어 근육층 손상으로 사망에 이

르는 점은 동일하며 본 실험에서의 fuzzy material과 tubular tunnel의 기능은 알 수 없었다.

참 고 문 헌

Butterworth, A.E., David, J.R., Franks, D., Mahmoud, A.A.F., David, P.H., Sturrock, R.F. and Houba, V.(1977) Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labelled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: Damage by purified eosinophils. *J. Exp. Med.*, 145:136-150.

Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Houba, V. and Taylor, R.(1976) *Schistosoma mansoni* in baboons: Antibody-dependent cell-mediated damage to ⁵¹Cr-labelled schistosomula. *Clin. Exp. Immunol.*, 25: 95-102.

Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Houba, V., Mahmoud, A.A.F., Sher, A. and Rees, P.H.(1975) Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*, 256:727-729.

Capron, A., Desaint, J.P., Capron, M. and Bazin, H. (1975) Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*, 253:474-475.

Chatterjee, K.D.(1982) Parasitology. 12th Ed., Chatterjee Medical Publishers, Calcutta.

Chung, P.R. (1983) Review and problems on *Paragonimus* and paragonimiasis with special reference to its intermediate and natural final hosts. *Yonsei Rep. Trop. Med.*, 14(1):44-56.

Chung, P.R., Asch, H.L. and Bruce, J.I. (1982) Antibody-dependent murine macrophage-mediated damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Cell. Immunol.*, 74:243-259.

Dean, D.A., Wistar, R. and Chen, P. (1975) Immune response of guinea pigs to *Schistosoma mansoni*. I. *In vitro* effects of antibody and neutrophils, eosinophils and macrophages on schistosomula. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24:74-82.

Dean, D.A., Wistar, R. and Murrell, K.D.(1974) Combined *in vitro* effects of rat antibody and neutrophilic leukocytes on schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23: 420-428.

Kassis, A.I., Aikawa, M. and Mahmoud, A.A.F. (1979) Mouse antibody-dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 122(2):398-405.

金東燦·梁漢慶(1964) 濟州道 地方의 肺 및 肝디스트

- 마증의 疫學的 調査. 國立保健院報, 1:181-187.
- 金東燦·鄭義範·李溫永(1979) 肺吸蟲症의 疫學的 研究—河東地方의 肺吸蟲症의 流行相. 국립보건연구원보, 16:339-344.
- Kum, P.N. and Nchinda, T.C. (1982) Pulmonary paragonimiasis in Cameroon. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76(6):768-772.
- 李溫永·南相烈(1977) 食鹽이 肺吸蟲 被囊幼蟲의 致死에 미치는 영향—계장內의 被囊幼蟲을 中心으로—. 국립보건연구원보, 14:203-218.
- McLaren, D.J. (1980) *Schistosoma mansoni*: The parasite surface in relation to host immunity. Research Studies Press, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, New York, Brisbane, Toronto.
- 민득영·안명희·김경민·임미혜·박순용(1990) 폐흡충(*Paragonimus westermani*) 피낭유충에 대한 대식세포의 세포독성에 있어서 항체 및 보체가 미치는 영향. 기생충학잡지, 28(2):91-100.
- Miyazaki, I. (1974) Occurrence of the lung fluke, *Paragonimus peruvianus* in Costa Rica. *Jpn. J. Parasitol.*, 23(5):280-284.
- Miyazaki, I. and Vajrasthira, S. (1967) Occurrence of the lung fluke *Paragonimus heterotremus* Chen et Hsia, 1964 in Thailand. *J. Parasitol.*, 53:207.
- Oshima, T. (1956) Studies on the excystation of the metacercariae of *Paragonimus westermani*. *Jpn. J. Parasitol.*, 5:403-415 (in Japanese).
- Perez, H. (1974) Investigation on the mechanism of protective immunity to *Schistosoma mansoni* in the rat. Ph. D. Thesis, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, England.
- Perez, H. and Smithers, S.R. (1977) *Schistosoma mansoni* in the rat: the adherence of macrophages to schistosomula *in vitro* after sensitization with immune serum. *Int. J. Parasit.*, 7:315-320.
- Ramalho-Pinto, F.J., McLaren, D.J. and Smithers, S.R. (1978) Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 147:147-156.
- 盧忍圭(1966) 우리나라 吸蟲症의 感染源에 關한 研究. 第三篇. 가제 및 참계의 調理操作과 肺吸蟲感染에 關한 實驗의 研究. 公衆保健雜誌, 3(1):15-21.
- 林漢鍾·曲華星·金洙鎭(1982) 肺吸蟲의 體表 微細構造에 미치는 Praziquantel의 作用. 대한기생충학회 제24회 학술대회 초록집, p. 22.
- Seo, B.S. (1969) Paragonimiasis in Korea. Proceedings of the 4th Southeast Asian Seminar on Parasitology and Tropical Medicine, Schistosomiasis and Other Snail-transmitted Helminthiasis, Manila, 24-27, Feb., pp. 281-284.
- Sher, A. (1976) Complement-dependent adherence of mast cells to schistosomula. *Nature*, 263:334-336.
- Smithers, S.R. and Terry, R.J. (1976) The immunology of schistosomiasis. *Advances in Parasitology* (ed. Ben Dowes), Academic Press, London & New York, 14:399-422.
- Soh, C.T. (1962) Paragonimiasis in Korea. *Yonsei Med. J.*, 3(1):79-84.
- Walton, B.C. and Chyu, I. (1959) Clonorchiasis and paragonimiasis in the Republic of Korea. *Bull. WHO*, 21:721-726.
- Yong, T.S., Kim, T.S., Lee, J.S., Lee, O.Y. and Kim, D.C. (1987) Detection of circulating antigens in rats experimentally infected with *Paragonimus westermani* by ELISA. *Korean J. Parasit.*, 25(2):141-148.

=Abstract=

Antibody-dependent rat macrophage-mediated damage [to the excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* in vitro

Pyung-Rim Chung, Jae-Kyung Chang and Chin-Thack Soh*

Department of Parasitology and Institute of Tropical Medicine,

College of Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752 and

Department of Parasitology, College of Medicine,*

Wonkwang University, Iri 570-749, Korea

An *in vitro* immune effector mechanism against the target excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* was demonstrated in the rat system. Peritoneal exudate cells, mainly macrophages from normal rats, showed adherence to and killing of excysted metacercariae of *P. westermani* in the presence of complement-independent serum from rats infected with *Paragonimus* metacercariae. These reactions were specific for the excysted metacercariae, as tissue-migrating juvenile worms were not affected.

Damage of excysted metacercariae of *P. westermani* due to antibody and macrophages was assessed by morphological observation, by cell adherence reaction and by the use of vital dyes. Trypan blue dye exclusion proved to be a reliable indicator of judging metacercarial viability. Electron microscopic studies demonstrated that macrophages reacted with fuzzy material on the tegumental surface and fine structures in the syncytium of the parasites. The tubular tunnels formed between the basement membrane and muscle layers of the damaged parasites were also noticeable. The relevance of these findings to cellular immunity in the early paragonimiasis was discussed.

[*Korean J. Parasit.*, 29(1):43-54, March 1991]