

肝吸虫 感染 마우스의 血清과 淋巴系細胞에 의한 色疫移入

高神大學 醫學部 寄生虫學教室

玉美善

Transfer of Immunity by Serum and lymphoid cells immunized with *Clonorchis sinensis*

Mee-Sun Ock

*Department of Parasitology
Kosin Medical College, Pusan 602-030, Korea*

= Abstract =

To study the transfer of immunity against the *Clonorchis sinensis*, the oriental liver fluke, in ICR mice, 30 donor mice were received per os and intraperitoneally with 20 metacercariae and excysted larvae.

All donor mice were killed by the neck dislocation after 30 days, and then serum and lymphoid cells were made from each donor group.

Four groups of the recipient mice were immunized with serum and lymphoid cells from the donor group I and II. 1 day after the primary immunization, all recipient mice were challenged orally with 20 metacercariae of *C. sinensis*, and killed 30 days after the challenge infection.

The obtained results from this study were as follows.

1. The serum provided from the donor group I(per os infection) and II(I. p. infection) did not transfer the immunity to the same kind of mice.
2. The lymphoid cells obtained from the donor group I also could not protect the recipient mice from the challenge infection to worm burden and Eggs Per Gram in the feces.
3. Significant protection against the challenge infection with 20 metacercariae of *C. sinensis* was conferred on the same kind of ICR

mice by the passive transfer of the lymphoid cells derived from the donor group II.

4. Number of plaque forming cells per spleen (PFC/spleen) accorded with the results of the transfer study.

I. 緒 論

寄生虫 感染으로 생기는 免疫反應에는 細胞性免疫(Cell-mediated Immunity)이 關여할 것 이라고 Larsh 等(1964 a, b)이 처음으로 報告한 이래 細胞性免疫은 寄生虫 感染時 宿主의 防禦機轉의 基本으로 여겨져 왔다.^{1, 13, 14, 15, 24)}

Larsh 等(1964 a, b)은 感作된 donor로부터 얻은 淋巴系細胞를 他動物에 移入하면 免疫의 移入이 可能하다 하였으며, Sun 및 Gibson (1969)은 肝吸虫의 代謝產物은 急性感染時에 効果인 抗原으로 作用하였으나, 人工免疫으로는 예방되지 않을 뿐만 아니라 形成된 抗體는 防禦效果가 없었다 한다.²²⁾

그러나 여러研究者들의 實驗結果는 吸虫類 感染時 發生하는 免疫應答이 感染시킨 吸虫類의 種(Species)과 實驗動物 Model, 그리고 donor의 感作程度에 따라 상당한 差가 있음을 示唆하고 있다.^{5, 8, 17, 25)}

著者는 肝吸虫으로 感作된 마우스의 淋巴系細胞와 血清을 非感染마우스에 移入함으로써 移入免疫이 形成되는지 그 與否와 程度를 究明하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

마우스

國立보건원에서 分讓받은 近交系 ICR마우스, 生後 15~20週, 體重 30~40 g 을 全實驗에 使用하였다.

肝吸虫 被囊幼虫 및 脫囊幼虫

慶南 金海市 仙岩川에서 採集한 참붕어 (Pseudorasbora parva)에서 Komiya 및 Taji-

mi法(1941)에 따라서 被囊幼虫을 分離하였다. 魚肉을 人工胃液(희석 HCl 3.0ml, Pepsin 0.3 g, 蒸溜水 100ml)에 넣어 37℃ 恒温槽에서 消化시켜 被囊幼虫을 얻었다. 이 幼虫을 人工腸液(Sodium Bicarbonate 0.2 g, Trypsin 0.5 g, 生理食鹽水 50.0ml)에서 脫囊시켜 脫囊幼虫을 얻은 다음 M-199(Gibco, U. S. A., Penicillin 100 units/ml, Streptomycin 100 μg/ml)에 보관하여 實驗에 使用하였다.

Donor 마우스의 感作

ICR 마우스 生後 15~20週, 體重 30~40 g, 40마리를 2群으로 나누어, 제1群 마우스에는 20마리의 肝吸虫 被囊幼虫을 經口感染시켰다. 제2群 마우스에는 20마리의 脫囊幼虫을 M-199에 부유시켜 복강內 주사한 다음 1週後에 같은 方法으로 再注射하였다. (Table 1)

淋巴系細胞의 製法

頸部骨折로 屠殺한 마우스의 脾臟, 腸間膜 淋巴節과 鼠蹊部淋巴節을 들어내었다. 脾臟은 附着되어 있는 血管과 結締組織을 除去한 後 5ml의 冷 M-199이 들어있는 Falcon Plastic Petri-dish(13×100mm) 內의 Stainless Steel Screen(100 mesh) 위에 놓고 Rubber Police-person(Difco, Detroit, Michigan)으로 문질러 脾臟細胞浮游液을 만들었다. 腸間膜淋巴節과 鼠蹊部淋巴節은 組織마쇄기(Ground-glass tissue grinder, Tokyo, Japan)에 넣어 浮游液을 만들었다.

血清의 製法

感染 4週된 각 群의 마우스에서 Cate(1969)의 Orbital Bleeding Procedure(眼球出血法)로³⁾ 血液을 採取하여 凝固시킨 다음 4,000 rpm,

Table 1. Experimental protocol to study the role of lymphoid cells and serum in transferring immunity against *C. sinensis* in ICR mice.

donor mice		recipient mice		challenge
group	immunization	group No. mice	primary immunization	infection
I	per os with 20 metacercariae	I 10	0.5ml serum of donor group I	1 day after
II	I. P. with 20 excysted larvae	II 10	0.5ml serum of donor group II	primary immunization, all mice
		III 10	2×10^6 lymphoid cells of donor group I	challenged 20 metacercariae
		IV 10	2×10^6 lymphoid cells of donor group II	per os, and
		V 10	no treatment	killed 30 days after.

I. P. : intraperitoneally

30分 遠沈하여 血清을 分離하였다.

生存細胞數의 計算

脾臟細胞浮游液과 淋巴節細胞부유액에서 살아있는 細胞數를 計算하기 위해 Trypan Blue Exclusion法(Mishell 및 Shiigi, 1980)에 따랐다.¹⁸⁾

Recipient 마우스에 移入

ICR마우스 40마리를 10마리씩 4群으로 나누었다. 1群의 마우스에는 0.5ml의 제1群 Donor의 血清을 I. P. 로 注入하였다. 제2群은 제2群 Donor의 血清을, 제3群은 제1群 Donor 마우스 淋巴系細胞부유액 2×10^6 개를 I. P. 로 注入하였으며, 4群은 제2群 Donor의 細胞를 주입하였다. (Table 1)

Recipient 마우스에 Challenge 感染

Donor마우스의 淋巴系細胞와 血清을 移入한 1日後에 全群의 마우스에 肝吸虫被囊幼虫 20마리씩을 經口로 Challenge 感染시켰다.

Worm Burden, E. P. G. 計算과 統計分析

마우스의 Worm Burden을 計算하기 위하여 肝組織을 1~2cm로 절단하여 2枚의 Glass板 사이에 놓고 壓迫하여 立體顯微鏡으로 虫體數를 헤아렸다. E. P. G는 Stoll's Egg-counting

technique으로 計算하였다.

Indirect Hemolytic Plaque Assay

Challenge 感染한 마우스脾臟細胞의 容血性 Plaque 形成에 관한 실험은 Henry 및 North (1980)의 방법에 準하였다.¹⁸⁾

Table 2. Effects of ICR mice serum immunized per os and I.P. on mean worm recovery and E.P.G.

group	worm recovery		mean Eggs per Gram
	No.	%	
I	11.4	57.0	1,840
II	10.8	50.4	1,560
V	11.8	59.0	1,600

III. 結 果

肝吸虫 被囊幼虫 20마리를 經口感染시킨 Donor 마우스로부터 얻은 血清과 腹腔內에 20마리의 脫囊幼虫을 注入한 Donor에서 얻은 血清이 Challenge 感染時時 肝吸虫의 Worm Burden과 E. P. G에 미치는 影響은 Table 2에

Table 3. Effects of ICR mice lymphoid cells immunized per os and I.P. on worm recovery and mean E.P.G.

group	No. of lymphoid cells (10^6)	worm recovery		mean E. P. G
		No.	%	
III	2,007	9.0	45.0	1,280
IV	1,999	4.8	24.0	400
V		11.8	59.0	1,600

Table 4. Mean worm burden and Eggs per Gram in four experimental groups and a control group.

group	No. mice	mean E. P. G	worm recovery		t-test
			No.	%	
I	10	1,840	11.4	57.0	$p > 0.05$
II	10	1,560	10.8	54.0	$p > 0.05$
III	10	1,280	9.0	45.0	$p > 0.05$
IV	10	400	4.8	24.0	$p < 0.05$
V	10	1,600	11.8	59.0	

Table 5. Plaque forming cells in four groups of immunized ICR mice and a group of control.

group	No. of mice	% viable cells		No. of PFC/spleen
		No. (10^6)	%	
I	10	1.804	88.3	800
II	10	1.813	90.2	800
III	10	1.788	85.8	1,000
IV	10	1.796	86.7	1,800
V	10	1.798	87.3	0

나타낸 바와 같이 對照群(第5群)의 平均 虫體回收率 59.0%, 11.8마리에 비해 Recipient群 I, II는 虫體回收率 57.0%, 11.4마리, 50.4%, 10.8마리로써 對照群과 거의 유사하였으며, E.P.G도 對照群 1,600에 비해 1,840과 1,560으로 거의 차가 없었다.

Table 3은 各 Donor群에서 얻은 淋巴系細胞가 E.P.G와 虫體回收率에 미치는 영향을 요약한 것이다. 第III群은 虫體回收率 45.0%, 9.0마리로써 對照群과 유사하였으나 第IV群은 24.0%, 4.8마리로써 현저한 差를 보였으며, Table 4에 나타낸 바와 같이 $P < 0.05$ 로써 有

意的인 방어효과가 있음을 示唆하고 있다.

感作시킨 血清과 淋巴系細胞를 移入받은 群의 마우스에서 脾臟의 Antibody-Forming Cells의 數를 알아보기 위한 Plaque Assay의 結果(Table 5), 脫囊幼虫을 腹腔內 注入한 後 Challenge 感染시킨 第IV群에서 1,800으로 가장 많았고 第III群에서 1,000, I, II群은 各各 800으로 나타났다.

IV. 考 察

이번 實驗의 結果, ICR마우스에서는 肝吸

虫의 脫囊幼虫으로 感作시킨 淋巴系細胞의 移入時에만 防禦효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 成績은 Flavell 等(1980)이 *Opisthorchis viverrini*로 感染시킨 Donor에서 얻은 血清과 脾臟細胞는 Recipient 햄스터에 免疫을 移入하지 못하였다는 報告와 符合된다. 그러나 本實驗에서는 肝吸虫의 脫囊幼虫으로 感作시킨 淋巴系細胞의 移入時에는 E. P. G의 減少는 물론 虫體回收率에서도 有意的인 差가 認定되는 반면, Flavell 等(1980)의 實驗에서는 感作된 脾臟細胞를 移入받은 群에서도 E. P. G만이 有意的인 減소를 보였고, 平均 虫體負荷는 差가 없는 것으로 나타났다.⁷⁾ 이러한 差는 Donor群의 感作方法에 따른 것으로 思料된다.

Howell 等(1977)은 肝蛭(*Fasciola hepatica*)을 感染시킨 Rat 血清을 移入받은 同種 Rat에서 有意的인 수준의 方禦효과가 있었다고 하였으나,¹²⁾ 肝蛭는 肝실질을 貫通하나 肝吸虫은 組織內에 침입하지 않고 총수담관을 통하여 膽道에 도달하므로(Sun 等, 1968)²³⁾ 兩者의 免疫形成程度에 差가 있을 것으로 推測된다.

本實驗에서는 血清移入에 의한 효과는 거의 없는 것으로 나타났으나, Sun(1969)과 Sun 및 Gibson(1969)은 實驗的 肝吸虫症 토끼의 血清은 試驗管內에서 肝吸虫 成體에 殺傷효과가 있다고 報告하였으며,^{21, 22)} *O. viverrini*도 유사한 結果를 보였다.⁶⁾ 그러나 吸虫類의 試驗管內에서의 免疫反應이 生體內에서도 일어나는지는 알 수 없으며, 本實驗에서도 實驗群 마우스의 虫體負荷와 E. P. G가 對照群과 비슷하므로 肝吸虫에서는 血清을 他動物에 移入한 효과는 거의 없는 것 같다.

免疫移入에 影響을 미치는 여러가지 요인 中 하나로 Hayes 等(1974 b, c)은 移入된 血清의 量이 많을수록 방어효과도 크다고 報告하였으며,^{9, 10)} Larsh 等(1970 a)은 Challenge 感染 時期를 달리하면 差가 있는 것으로 보고하였으나,¹¹⁾ 移入되는 血清의 量과 Challen-

ge 感染時期 等은¹⁶⁾ 추후 보다 상세히 연구되어야 할 과제로 생각되어진다.

肝吸虫에서의 獲得 저항 形成與否를 알아보기 위해 趙 等(1984)은 白鼠에 肝吸虫被囊幼虫을 1회 또는 重復感染시킨 虫體回收率과 成長度를 基準으로 하여 조사하였던 바, 虫體의 크기는 單回感染과 重復感染시킨 白鼠에서의 虫體回收率이 對照群보다 낮았으므로 獲得 저항이 作用하는 것으로 보아 무방하다 하였으나,²⁾ *O. viverrini*-햄스터 모델(Model)에서는 효과적인 방어면역을 나타내지 못하였다 하므로,²⁰⁾ 肝吸虫의 獲得 저항에 關係서는 보다 다양한 모델을 이용한 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

感作된 마우스의 脾臟에서 Plaque 形成細胞를 檢出할 수 있었으나, 肝吸虫-토끼 모델, 또는 肝吸虫-Rat 모델에서 볼 수 있는 바와 같이^{4, 19)} 單回感染時에는 肝吸虫에 의한 숙주의 항체형성이 虫體回收率에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보아 Plaque 形成細胞와 血清, 그리고 肝吸虫 感染時에 防禦效果와의 관계는 앞으로의 研究課題가 될 것이다.

REFERENCES

1. Bloom BR : Games parasites play : how parasites evade immune surveillance. *Nature*, 279 : 21, 1979
2. 趙星煥, 朱炘煥, 林漢鍾 : 白鼠에 있어서 肝吸虫感染에 대한 獲得抵抗에 관한 研究. *高醫大論集*. 21(3) : 29, 1984
3. Cate CC : A successful method for exsanguinating unanesthetized mice. *Lab Care*. 19 : 256, 1969
4. Chang DS, Rim HJ : Studies on the effect of bile duct injuring to the injection and development of *Clonorchis sinensis* in rat. *高醫大論集* 18 : 427, 1981
5. Dawkins JHS, Grove DI : Transfer by serum and cells of resistance to infection with *Strongyloides ratti* in mice. *Im-*

- munol., 43 : 317, 1981
6. Flavell DJ : The in vitro effects of serum on the adults, metacercariae, and eggs of *Opisthorchis viverrini*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 75 : 825, 1981
7. Flavell DJ, Pattanapanyasat K, Flavell S : *Opisthorchis viverrini* : Partial success in adoptively transferring immunity with spleen cells and serum in the hamster. J Parasitol, 54 : 191, 1980
8. Haddow WJ, Moqbel R, Wakelin D : Transfer of immunity against *Strongyloides ratti* in mice. Immunol, 43 : 317, 1981
9. Hayes TJ, Bailer J, Mitrovic M : Serum transfer of immunity to *Fasciola hepatica* in rats. J Parasitol, 60 : 722, 1974b
10. Hayes TJ, Bailer J, Mitrovic M : Studies on the serum transfer of immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. J Parasitol., 60 : 930, 1974c
11. Hou PC : The pathology of *Clonorchis sinensis* infestation of the liver. J Path Bact., 70 : 53, 1955
12. Howell MJ, Sandeman, RM, Rajasekariah, GR : In vivo and in vitro studies of the effects of immune rat serum on *Fasciola hepatica*. Int J Parasitol., 7 : 363, 1977
13. Jung SG, Whang IW, Choi DW, Ock Ms : Cell-mediated immunity to *Paragonimus westermani* in inbred mice (ICR strain). 慶北醫大誌, 26 : 270, 1985
14. Larsh JE Jr, Goulson HT, Weatherly NW : Studies on delayed (cellular) hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis*. I. Transfer of lymph node cells. J Elisha Mitchell Sci Soc., 80 : 133, 1964a
15. Larsh JE Jr, Goulson HT, Weatherly NW : Studies on delayed (cellular) hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis*. II. Transfer of peritoneal exudate cells. J Parasitol., 50 : 496, 1964b
16. Larsh JE, Goulson HT, Weatherly NF, Chaffee, EF : Studies on delayed (cellular) hypersensitivity in mice with *Trichinella spiralis*. V. Tests in recipients injected with donor spleen cells 1, 3, 7, 14 or 21 days before infection. J Parasitol., 56 : 1970a
17. Love RJ : *Nippostrongylus brasiliensis* in mice : the immunological basis of worm expulsion. Parasitol., 70 : 11, 1975
18. Mishell BB, Shiigi SM : Selected methods in cellular immunology. 1st ed. W. H. Freeman and Company, 1980, pp 69~114
19. Rim HJ, Lyu KS, Lee JS, Joo KH : Clinical evaluation of the therapeutic efficacy of praziquantel (Embay 8440) against *Clonorchis sinensis* infection in man. Ann Trop Med Parasit., 75 : 27, 1981
20. Sirisinha S, Tuti S, Tawatisin A, Vichasri S, Upatham, ES, Bunnag, D : Attempts to induce protective immunity in hamsters against infection by liver fluke of man (*Opisthorchis viverrini*.) Parasitol., 86 : 127, 1983
21. Sun T : The in vitro action of antisera on the adults of *Clonorchis sinensis*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg., 63 : 582, 1969
22. Sun T, Gibson JB : Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infections. An analysis by gel-diffusion technique. Am J Trop Med Hyg., 18 : 241, 1969
23. Sun T, Chou ST, Gibson JB : Route of

- entry of *Clonorchis sinensis* to the mammalian liver. Exp Parasitol., 22 : 346, 1968
24. Soulsby E.J.L. : Immune responses in parasitic infections : Immunology, immunopathology, and immunoprophylaxis. 1st ed. Florida, CRC Press Inc., 1987, pp 91~
- 114
25. Wakelin D, Dineen SK : The cellular transfer of immunity to *Trichostrogylus colubriformis* in an isogenic strain of guinea-pig. Aust J Exp Biol. Med Sci., 43 : 429, 1965
-