

## 간질(*Fasciola hepatica*) 피낭유충의 생존성 및 감염성에 관한 연구

김지호\* · 김종택 · 조신형 · 이정길

국립동물검역소\*  
전남대학교 수의과대학  
(1998년 2월 17일 접수)

### Studies on the viability and infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae

Ji-ho Kim\* , Jong-taek Kim, Shin-hyeong Cho, Chung-gil Lee,

National Animal Quarantine Service\*  
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University  
(Received Feb 17, 1998)

**Abstract** : *Fasciola hepatica* eggs were obtained from the bile of infected cattle at a local abattoir. Metacercariae(MC) were produced using *Lymnaea viridis*, the intermediate host of the parasite. They were stored in distilled water at refrigerator(3~5°C) and at room temperature(22~27°C). The viability and infectivity of the MC were determined at monthly intervals for 12 months. The viability was determined by both microscope and excystation, and the infectivity by infecting mice.

The MC stored at room temperature had a high viability up until 60 days, and thereafter the viability declined rapidly; at day 120, only 2.5% of the MC were excysted. Most of the MC stored at refrigerator retained the viability up until 90 days, and thereafter the viability declined slowly; about half of them were viable at day 210 and 5% of them retained the viability until day 270. The survival rates of the MC determined by microscope were always higher than those determined by excystation( $p < 0.05$ ).

The infectivity of the MC closely followed the viability at the two different storage temperatures. Most of the mice infected orally with the MC died within 3~9 weeks of acute fasciolosis.

**Key words** : *Fasciola hepatica*, *Lymnaea viridis*, viability, infectivity, excystation.

## 서 론

간질은 세계적인 분포를 가지면서 주요 가축과 사람에게 감염을 일으켜 큰 손실을 초래하는 기생충이다. 이 기생충의 생활사 가운데 피낭유충은 달팽이가 배출한 유미유충이 수초 등에 부착하여 피낭한 것으로서 피낭 후 몇시간 이내에는 감염성이 없으나 12시간이 지나면 소수의 피낭유충이 감염성을 지니게 되며<sup>1</sup>, 피낭후 48시간에는 대부분의 피낭유충이 감염성을 지니게 된다<sup>2</sup>. 피낭유충의 형태는 반구형으로 크기는 196.9~307.3×192.1~213.4 $\mu$ m이고<sup>3</sup>, 낭은 4개의 층으로 구성되어 있다<sup>4</sup> 가장 밖에 있는 제1층은 두꺼운 단백질 tanned protein이고, 제2층은 mucoprotein과 acid mucopolysaccharide이며, 제3층과 제4층은 neutral mucopolysaccharide인데 아래쪽 가운데가 비교적 두껍게 되어 있어(ventral plug) 이곳을 통하여 탈낭하는 것으로 알려져 있다<sup>4</sup>. 이렇게 낭의 구조가 밝혀짐으로써 탈낭시험에 관한 본격적인 연구가 수행되었고, 이러한 연구를 토대로 한 탈낭시험은 간질증의 역학 및 생태학, 생화학, 면역학적인 연구를 수행하는데 기초가 된다<sup>5</sup>.

외국에서는 오래전부터 간질에 관한 연구를 꾸준히 수행해왔으나 우리나라에서는 간질증의 발생률도 높고 피해가 많음에도 불구하고 이에 관한 연구가 외국의 그것과 비교하면 매우 미흡하였다. 이 연구에서는 간질증의 역학상 중요한 피낭유충의 생태를 알아보고자 실험실에서 인공감염시킨 애기물달팽이를 이용하여 피낭유충을 대량 생산한 다음, 냉장고와 실온에 보관하면서 피낭유충의 생존성과 실험동물에서의 감염성을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

**피낭유충의 생산** : 실험에 사용한 피낭유충은 Lee *et al*<sup>6</sup>의 방법에 따라 실험실에서 계대사육중인 애기물달팽이 *Lymnaea viridis*에 간질의 miracidia를 감염시켜 생산하였다. 감염된 달팽이는 30일부터 cercaria를 배출하기 시작하였으며 피낭이 형성된 후 48시간에 피낭유충을 수거하여 총 26개의 멸균된 증류수가 있는 시험관에 각각 80~100개씩의 피낭유충을 넣은 뒤 실온(22~27℃)과 냉장고(3~5℃)에 각각 보관하였다. 피낭유충은 1995년 3월초에 생산되었으며, 실온은 연중 22~27℃로 유지하

였다.

**시험관내에서의 생존성 검사** : 피낭유충의 생존성은 피낭 직후인 3일과 30일에, 그 후에는 30일 간격으로 360일까지 검사하였다. 검사할 때마다 실온과 냉장고에 보관된 시험관 하나씩을 꺼내어 각 시험관의 피낭유충 중에 40개씩을 무작위로 선정하여 탈낭시험에 사용하였고, 나머지는 감염성 조사에 사용하였다. 생존성은 직접 탈낭법을 통하여 검사하였으며, 부가적으로 현미경을 통한 형태학적인 생존성 평가방법을 병행하였다. 현미경을 통한 생존성 검사에는 확인이 용이한 Boray<sup>7</sup>의 방법을 적용하였으며, 탈낭시험을 통한 생존성 검사에는 Wikerhauser<sup>8</sup>의 방법을 적용하였다.

탈낭시험에 사용된 용액의 구성은 다음과 같다.

**Pepsin 용액** :

Pepsin 0.5g(activity 1 : 3,000 USP, Sigma Chemical Co. USA).

NaCl 0.8g(Duksan Pharmaceutical Co, LTD, Korea)

1/20N HCl(Kanto Chemical Co, LTD, Japan)

Distilled water 100ml

**Trypsin 용액** :

Trypsin 0.4g(activity 1 : 250 USP, Difco Lab, USA)

NaCl 0.8g(Duksan Pharmaceutical Co, LTD, Korea)

NaHCO<sub>3</sub> 1.0g(Sigma Chemical Co, USA)

Distilled water 100ml

**Ox bile 20%**

탈낭시험에서는 플라스틱 petri dish에 각각 40개씩의 피낭유충을 넣고 38℃에서 10분간 incubation한 pepsin 용액을 부어 3시간 배양시켰다. 그런 다음 pepsin 용액을 제거하고 ox bile이 포함된 trypsin 용액(20%)으로 대체하여 다시 3시간을 배양한 후 도립현미경하에서 탈낭된 유충(Fig 1)을 확인하였다.

**실험동물에 대한 감염성 검사** : 피낭유충의 감염성은 생존성의 조사와 동일한 날짜에 6주령의 Institute of Cancer Research(ICR)계 마우스(평균 체중 26g)에 접종시켜 검사하였다. 각 시험관에 6마리의 마우스를 암·수 구별하지 않고 배정한 다음, 마우스당 각 5개씩의 피낭유충을 경구적으로 접종시키고 대조군의 마우스 3마리에는 증류수를 투여하였다. 피낭유충은 마우스의 구강내 투여가 용이하도록 23gauge scalp vein set를 개조한 것을 사용하였다<sup>9</sup>. 접종후 마우스는 감염전과 같은 사육장 내에서 사료와 음수가 부족하지 않도록 충분히 공급하

## 결 과

피낭유충의 생존성 : 간질 피낭유충을 냉장온도와 실온에 보관하면서 피낭후 12개월동안 생존성을 검사한 결과를 Fig 2에 요약하였다.

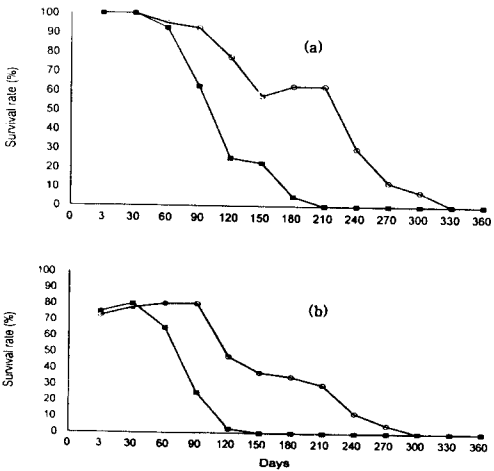


Fig 2. Survival rates of *Fasciola hepatica* metacercariae at room temperature(■-■-) and refrigerator(○-○-) sequentially determined for a year by microscope(a) and excystation(b).

면서 관찰하였다. 마우스가 간질에 감염되면 대부분 폐사를 일으키기 때문에<sup>9</sup> 감염후 임상증상을 나타내면서 폐사할 때까지 사육하였으며, 살아남은 마우스는 접종 후 70일에 안락사 시켰다. 감염후 폐사한 마우스는 일반적인 부검술식에 의하여 각 실질장기를 검사하였으며, 특히 간질의 주 병변장기인 간장을 집중적으로 관찰하였다. 부검시에 간의 담관을 따라 절개하면서 간질의 회수를 시도하였으나 대부분은 복강내에서 발견되었다. 특히 폐사후 부검시간이 지연된 경우에는 대부분 복강내에서 간질이 회수되었다. 또한 간실질내에 미성숙충이 남아있는가를 확인하기 위하여 간을 세절하여 38℃의 생리식염수에 넣어 12시간동안 방치한 후 미성숙충의 완전한 회수를 시도하였다.

보존용액의 오염여부 : 냉장고와 실온에 보관한 피낭유충의 보존용액인 증류수의 오염여부를 알아보기 위하여 매월 실험이 끝난 후 보존용액을 원침하여 상층액과 침전물을 면봉으로 따서 혈액배지에 심은 후 48시간 배양하였다.

통 계 : 피낭유충의 보관온도에 따른 생존성과 감염성의 유의성은 PCSAS의 Wilcoxon signed rank test와 Wilcoxon signed ranksum test를 이용하여 측정하였다.

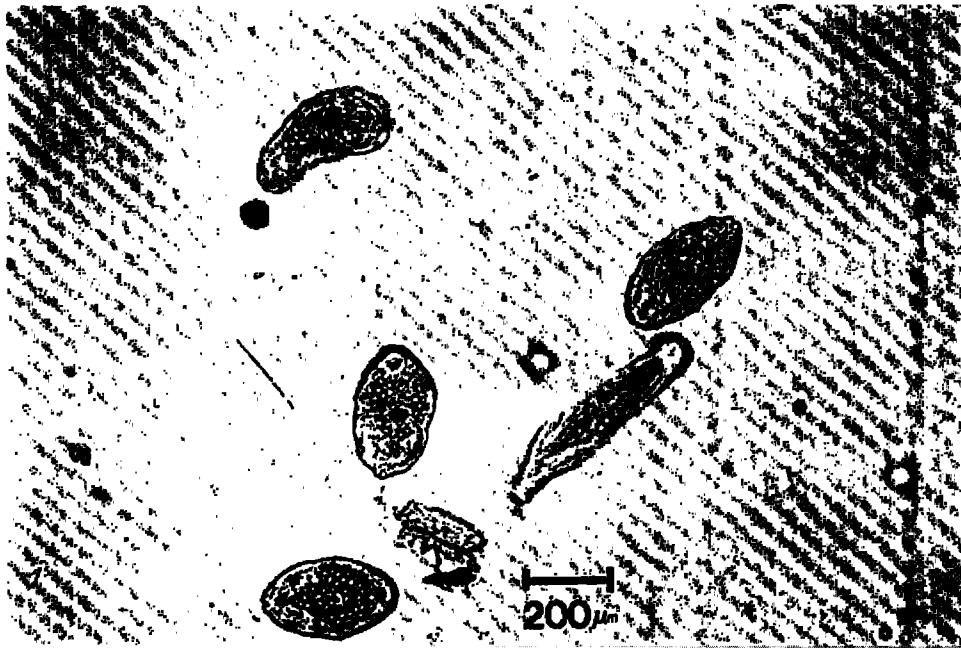


Fig 1. Newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica*.

실온과 냉장고에 보관한 피낭유충은 피낭후 30일까지의 생존율에서 거의 차이를 보이지 않았다. 그러나 실온에 보관한 피낭유충의 경우 60일까지는 65%의 비교적 높은 생존율을 보였으나 그 이후로는 급격히 감소하여 90일에는 25%, 120일에는 2.5%만의 생존율을 보여 대부분의 피낭유충이 생존성을 상실하였다. 반면 냉장고에

보관한 피낭유충은 피낭후 90일까지는 80% 이상의 높은 생존율을 보였으나 이후에는 급격히 감소하여 210일까지 30% 이상의 생존율을 보이다가 270일에는 5%의 피낭유충만이 생존하여 대부분의 피낭유충이 생존성을 상실하였다. 검사기간중 실온에서는 120일, 냉장온도에서는 270일 이후에 모든 피낭유충의 생존성이 상실되었다.

**Table 1.** Infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae stored at room temperature in mice

Storage (days)	No. of mice inoculated*	No. of mice	No. of parasites recovered	Parasite recovery rate(%)
3	6	6	10	33.3
30	6	6	7	23.3
60	6	3	4	13.3
90	6	4	5	16.7
120	6	1	1	3.3
150	6	0	0	0
180	6	0	0	0
210	6	0	0	0
240	6	0	0	0
270	6	0	0	0
300	6	0	0	0
330	6	0	0	0
360	6	0	0	0

\* Each mouse was inoculated with 5 metacercariae.

**Table 2.** Infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae stored at refrigerator in mice

Storage (days)	No. of mice inoculated*	No. of mice	No. of parasites recovered	Parasite recovery rate(%)
3	6	6	8	26.7
30	6	6	10	33.3
60	6	5	10	33.3
90	6	6	11	36.7
120	6	4	7	23.3
150	6	5	7	23.3
180	6	6	10	33.3
210	6	5	8	26.7
240	6	2	3	10.0
270	6	1	1	3.3
300	6	0	0	0
330	6	0	0	0
360	6	0	0	0

\* Each mouse was inoculated with 5 metacercariae.

한편 현미경을 통하여 판단한 생존성은 직접 탈낭시험을 통한 생존성과 약간의 차이를 나타내었다. 실온에 보관한 피낭유충의 경우 현미경적으로 판단한 것은 180일까지 생존성이 인정되었으나 탈낭시험에서는 120일까지 생존하였다. 냉장온도에 보관한 피낭유충의 경우에는 현미경을 통한 생존성에서 300일까지도 7.5%의 피낭유충이 살아있다고 판단되었으나 탈낭시험에서는 270일까지 5%의 피낭유충만이 탈낭을 하였다. 탈낭법과 현미경으로 검사한 피낭유충의 생존성 간에는 차이가 있었다 ( $p < 0.05$ ).

**피낭유충의 감염성 :** 실험동물에 대한 피낭유충의 감염성 시험을 시험관내의 생존성 시험과 병행하였다. 두 온도그룹에 대하여 조사한 감염성의 결과를 Table 1과 2에 각각 나타냈다. 감염성이 인정되는 기간은 실온에서 120일, 냉장온도에서는 270일까지도 나타났다. 두 온도그룹 사이에서 피낭후 보존기간에 따른 미성숙충의 회수율 사이에서 유의성 있는 차이가 인정되었다( $p < 0.05$ ).

감염된 마우스는 19일에서 59일 사이(평균 42일)에 폐사하였고, 전형적인 급성간질증을 나타냈다. 실험기간중 폐사한 마우스를 부검한 결과 한마리의 마우스에서 1~3마리의 간질 미성숙충이 회수되었다.

간질에 감염되어 폐사한 마우스의 담즙과 직장내의 분변을 검사하여 마우스에서 간질충의 성숙도달여부도 알아보았으나 총란은 발견되지 않았다. 감염후 70일까지 생존한 마우스는 임상증상을 나타내지 않았으며, 안락사 후 부검을 실시하여 간질의 감염여부를 확인하였으나 미성숙간질을 발견할 수 없었으며 감염의 흔적도 관찰되지 않았다.

보존용액에 대한 오염여부를 검사하기 위하여 세균분리를 시도하였으나 혈액배지에서는 어떠한 세균집락도 관찰되지 않았다.

## 고 찰

간질증의 역학상 중요한 피낭유충의 생태를 알아보고

자 실험실에서 인공감염시킨 애기물달팽이에서 피낭유충을 대량생산하여 냉장고와 실온에 보관하면서 피낭유충의 생존성과 실험동물에서의 감염성을 1년간 1개월 간격으로 관찰하였다. 냉장고에 보관한 피낭유충이 실온의 경우보다 2배 이상 오랫동안 생존하였다.

간질피낭유충의 경우 Shirai<sup>1</sup>는 22~30℃의 물에서 80일, Ono *et al*<sup>10</sup>은 20℃의 물에서 240일간 생존성을 지닌다고 하였다. 거대간질의 경우 Alicata<sup>11</sup>는 22~24℃에서 63일간 생존성을 유지한다고 하였으며, 사슴간질의 경우에서 Griffiths와 Christenesn<sup>12</sup>은 105일까지 생존성을 지닌다고 하였다. 냉장고에 보관한 피낭유충의 경우에 간질은 365일<sup>13</sup>과 335일<sup>14</sup>, 거대간질의 경우에는 실험실내에서 조사된 것은 없지만 Kimura와 Shimizu<sup>15,16</sup>가 겨울철에 야외에서 수거한 피낭유충을 대상으로 토끼에 감염시켰을 때 120일까지는 감염성이 있지만 150일에는 감염성을 상실한다고 보고하였다. 또한 사슴간질의 경우에는 냉장고에 보관했을 때 238일까지 감염성을 유지하는 것으로 보고된 바 있다<sup>12</sup>. 이미 보고된 이러한 결과들과 비교하여 이 실험의 결과가 차이를 보이는 것은 Suazo *et al*<sup>17</sup>이 언급하였던 것처럼 종란의 origin, 피낭유충을 생산한 달팽이의 종(species), 그밖의 여러 환경인자의 영향이라 사료된다.

한편 Wikerhauser<sup>10</sup>은 짧은 기간동안에 여러조건을 주어 생존성과 감염성을 조사하였는데 생존성이 있는 기간에서는 감염성도 있는 것으로 나타났다. 그러나 생존성이 있는 모든 피낭유충이 동물에 대한 감염성을 지니는지는 앞으로 연구가 되어야 할 부분이라고 결론을 지었다. 또한 Suazo *et al*<sup>17</sup>은 냉장온도에 피낭유충을 보관하면서 현미경하의 생존성과 랫트에서의 감염성을 동시에 조사한 결과 현미경하에서 판단한 생존성은 유의성 있게 변화하였으나 랫트에 대한 감염성에서는 유의성이 없음을 보고하였다. 그러나 Suazo *et al*<sup>17</sup>이 보고한 현미경하의 생존성은 이 실험의 결과에서 나타났듯이 실제의 생존성과는 상당한 차이( $p < 0.05$ )가 있기 때문에 진정한 생존성의 결과로 볼 수가 없을 것이다.

현미경으로 판정한 생존성은 피낭후 30일까지 100%에 달한데 반해 탈낭에 의한 생존성 즉, 탈낭률은 약 80%에 달하였다(Fig 2). 이러한 본 실험의 결과는 피낭유충이 모두 탈낭능력을 가지는 것은 아님을 나타내주는 것으로서 앞으로 보다 정밀한 연구가 수행되어야 확실한 자료를 얻을 수 있을 것이다.

피낭유충의 생존성과 감염성은 엄밀한 의미에서는 다르다. 그러나 시험관내에서 탈낭하지 못하는 피낭유충은 실험동물에 감염도 일으키지 못하기 때문에<sup>19</sup> 지금까지의 여러 연구에서는 이 두가지를 구분하지 않고 사용한 것으로 생각된다. 본 연구의 결과에서도 피낭유충이 탈낭을 하는 시점까지는 마우스에 감염을 일으켰다. 이 연구의 결과 현미경으로 판정한 생존기간이 탈낭에 의한 생존기간보다 길었다. 이러한 결과는 피낭유충을 이용하는 실험에서 참고하여야 할 것으로 보인다.

간질의 피낭유충은 충분한 습도를 유지해주면서 냉장고에 보관하면 피낭후 270일까지 비록 낮은 비율이기는 하나 살아남아서 숙주에 감염을 일으켰다. 달팽이의 활동이 가능한 늦여름부터 생산된 피낭유충은 곧바로 소나 염소에 섭취되지 않는다고 하더라도 습하면서 추운 우리나라의 겨울은 온도와 습도가 이들의 생존에 아주 적합하여 이 실험의 결과로 미루어 볼 때 다음 해의 늦봄까지 감염성을 가지는 것이 분명하다. 이러한 결과는 간질구충사육에 하나의 중요한 지침이 되리라 믿는다.

## 결 론

보존기간 및 온도의 차이에 따른 우리나라 간질 피낭유충의 생존성과 실험동물에 대한 감염성을 알아보기 위하여 실온과 냉장온도에 보관하면서 30일 간격으로 1년동안 생존성과 감염성을 조사하였다.

실온에 보관한 피낭유충은 피낭후 60일까지 탈낭시험에 의하여 65% 이상의 높은 생존율을 보였으나 120일에는 2.5%의 생존율만을 보였다. 그러나 현미경적으로 판단한 생존성은 180일까지도 살아있다고 인정되었으나 150일부터 탈낭은 일으키지 않았다. 또한 탈낭하지 않았던 기간에서는 마우스에 감염을 일으키지 못했다.

냉장온도에 보관한 피낭유충은 270일까지 탈낭시험에 의한 생존성이 인정되었으며, 현미경적으로는 300일까지 생존성이 인정되었다. 탈낭시험에 의한 생존율의 변화에서 피낭후 90일까지는 80% 이상의 높은 생존율을 보였으나 이후 점차 감소에서 240일에는 12.5%, 270일에는 5%의 생존율을 보였다. 그러나 실험동물에 대한 감염성 검사에서는 실온의 경우와 마찬가지로 탈낭을 보이지 않았던 기간에서는 마우스에 감염을 일으키지 못했다.

## 참 고 문 헌

1. Shirai M. The biological observation on the cysts of *Fasciola hepatica* and the route of migration of the young worms in the final host. *Sci Repts Govt Inst Infect Dis Tokyo Univ* . 6:511-523, 1927.
2. Daws B, Hughes DL. Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Adv Parasitol* , 2:97-168, 1964.
3. Kamiharako Y, Itagaki T, Itagaki H. The snail host of *Fasciola* sp in the Tempoku district of Hokkaido. *Jap J Vet Sci* , 48:323-329, 1986.
4. Dixon KE. The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* , 55:215-226, 1965.
5. Fried B. Metacercarial excystment of trematodes. *Adv Parasitol* , 32:91-144, 1994.
6. Lee CG, Cho SH, Lee CY. Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica* . *Vet Parasitol* , 58:313-318, 1995.
7. Boray JC. Standardization of techniques for pathological and anthelmintic studies with *Fasciola* spp. *Aust J Zool* , 2:217-230, 1964.
8. Wikerhauser T. A rapid method for determining the viability of *Fasciola hepatica* metacercariae. *Am J Vet Res* , 21:895-897, 1960.
9. Taylor EL, Parffit JW. Mouse test for the infectivity of metacercariae with particular reference to metacercariae in snail feces. *Trans Am Micr Soc* , 76:327-328, 1957.
10. Ono Y, Isoda M, Mutsumura S. Preventive study of *Fasciola hepatica* infection. II. Effects on metacercariae of various environmental conditions and drugs(In Japanese). *J Jap Vet Med Assoc* , 7:153, 1954.
11. Alicata JE. Observations on the life history of *Fasciola gigantica* , the common liver fluke of cattle in Hawaii, and the intermediate host, *Fossaria ollula* . *Hawaii Agr Exp Sta Bul No* , 80:1-22, 1938.
12. Griffiths HJ, Christensen CA. Survival of metacercariae of *Fascioloides magna* in water at room temperature and under refrigeration. *J Parasit* , 58:404-405, 1972.
13. Boray JC. The ecology of *Fasciola hepatica* with particular reference to its intermediate host in Australia. *Proc 17th Wld Vet Congr, Hanover* , 1:709-715, 1963.
14. Shaw JN. Studies of the liver fluke(*Fasciola hepatica* ). *J Am Vet Med Assoc* , 81:76-82, 1932.
15. Kimura S, Shimizu A. Pathological studies on fascioliasis. II. Pathological changes in the liver of goats experimentally infected with *Fasciola* sp. *Sci Rept Fac Agr Kobe Univ* , 13:167-173, 1978.
16. Kimura S, Shimizu A. Studies on the survival and infectivity of *Fasciola gigantica* metacercariae. *Sci Rept Fac Agr Kobe Univ* , 13:347-349, 1979.
17. Suazo FM, Velarde FI, Flores-Crespo. Evaluacion de la viabilidad e infectividad de metacercarias de *Fasciola hepatica* a diferentes edades. *Tecnica Pecuaria* , 41:73-75, 1981.
18. Wikerhauser T. O utjecaju rendgenskog zracenja na metacerkarije metilja *F hepatica* . *Vet Arch* , 31:229-236, 1961.
19. Wikerhauser T. On experimental studies of the longevity and resistance of *Fasciola hepatica* metacercariae. *Proc 1st Int Congr Parasit Rome* , 882-883, 1964.