

시험관내에서 인공배양한 제3기 자충 및 성충을 이용한 구충효능 선발시험

지 차 호 · 박 승 준

충북대학교 수의과대학
(1998년 5월 11일 접수)

The screening test on the efficacy of anthelmintics by using third-stage larvae and adult of cultivation *in vitro*

Cha-ho Jee, Seungjun Park

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University
(Received May 11, 1998)

Abstract : The *in vitro* screening tests against the *in vitro* cultivated L₃ of *Ascaris suum* (*in vitro* L₃), which were cultivated from the embryonated egg to third-stage larva on 7 days in culture(DIC) and the *in vivo* rat's lung-derived L₃ of *Ascaris suum* (*in vivo* L₃), which were recovered from the lungs of rat on 7 days after infection, carried out in order to compare the anthelmintic efficacy of *in vitro* L₃ and that of *in vivo* L₃ in RPMI medium 1640 with 5% bovine calf serum. And also a screening test of efficacy against adult worms of *Trichuris suis* performed. The efficacies of screening tests were as follows :

1. The screening efficacies of abamectin and ivermectin against the *in vitro* L₃ were all 100% at the 10ppm concentration in RPMI medium 1640 on 5 DIC.
2. The screening efficacies of abamectin and ivermectin against the *in vivo* L₃ were all 100% at the 20ppm on 5 DIC or at 40ppm on 3 DIC.
3. The screening efficacies of abamectin and ivermectin against the adult worms of *Trichuris suis* were all 100% at 20ppm on 4 DIC.

And therefore, the *in vitro* cultivated L₃ of *Ascaris suum* were used in the screening test as well as the *in vivo* rat's lung-derived L₃ of *Ascaris suum*. And also the adult worms such as *Trichuris suis* and filaroids which is small size and difficult to cultivate *in vitro*, were used in the screening test *in vitro*.

Key words : *In vitro* screening test, *in vitro* cultivated third-stage larva of *Ascaris suum*, RPMI medium 1640.

이 논문은 1997년 농림부 특정과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Cha-ho Jee, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Chungju 361-763, Republic of Korea.

서 론

구충효능이 있다고 추측되는 물질에 대한 구충효능 선발시험(screening test)은 시험관내에서(*in vitro*) 실시하는 것이 생체내에서(*in vivo*) 시험하는 것보다 숙주내의 복잡한 약물 동력학적 장애(pharmacokinetic barrier)없이 구충물질 자체만의 효능을 검사할 수 있고, 경제적으로 한번에 많은 합성물질에 대한 구충효능 선발시험을 실시할 수 있으며 또한 시험기간이 단축되는 장점이 있다^{4,10,13}. 그러므로 개발중인 구충제에 대한 구충효능 선발 시험(screen test)은 생체시험보다는 시험관내에서 실시하는 것이 합리적이다. 구충효능의 생체시험은 시험동물 비 및 사육비, 사료비, 시험기간의 장기화 등이 시험관내에서 시험하는 것보다 경제적, 노력, 시험기간 등에서 불합리한 시험방법이다.

기생충 인공배양법이 발달되면서 구충물질에 대한 효능선발시험(screening test)이 연구되기 시작하였다^{3,7}. 시험에 사용한 기생충은 *Cooperia punctata*⁸, *Nippostrongylus brasiliensis*⁷, *Trichostrongylus colubriformis*⁹, *Ascaris suum*¹⁰, *Haemonchus contortus*¹ 등이었으며, 인공배양법은 정치배양법(stationary culture-bottle), 회전배양법(roller-culture system), 조직배양법(tissue culture flask) 등이 연구되었다. 인공배양에 사용한 배지는 API(Animal Parasitology Institute Media)¹¹, Medium 199, D-MEM(Dulbecco's Modified Eagle Media), RPMI medium 1640 등의 조직배양에 사용하는 상업배지로 변천되어 왔었다. 최근에는 RPMI medium 1640에 5% 송아지 혈청을 첨가하는 것이 돼지 회충의 인공배양에 효과적이라고 하였다^{4,5}. 본 시험에서 구충효능 선발시험(anthelmintic screening test)에 사용한 대상 기생충은 돼지 회충(*Ascaris suum*), 배양방법은 stationary multi-well system¹², 배양배지는 RPMI medium 1640⁵를 사용하여 실시하였다.

시험관내에서 사용하는 기생충은 발육단계별로 감염 자충(infective larva), 성충(adult worm)을 사용할 수 있다. 자충을 시험대상 기생충으로 사용하는 장점은 ① 구충효능의 확인에 성충보다 자충이 크기가 작고 활력이 왕성하므로 자충에 대한 효능은 성충의 효능으로 판단할 수 있다. ② 자충은 성충보다 부피가 적어 적은 배양배지와 시험구충제량도 절약할 수 있다. ③ 자충은 인공감염에 의하여 생체나 시험관내에서 회수하는 기간이 성충

보다 빠르므로 시험기간도 단축된다.

본 연구에서는 돼지 합자충란(L₂)을 ① 직접 인공배지에서 배양한 제3기 자충(L₃), ② 감염력 있는 합자충란을 랫트에 감염시킨 후 폐에서 회수한 제3기 자충(L₃), ③ 편충의 성충을 배지에서 배양한 방법으로 나누어 실시하면서 배양결과를 비교 분석하였다. 이러한 시험관내 배양법(*in vitro* culture method)을 연구·발전시키면 실험동물(*in vivo*)에 의한 실험횟수와 실험기간을 단축할 수 있어 실험경비와 연구인력 절약 등의 잇점이 있으며, 구충효능 선발시험을 시험관내에서 배양한 기생충의 자충에 실시함으로써 검사할 많은 수의 약제(chemicals)을 한꺼번에 소량의 구충물질로서 구충력이 있는 물질을 선별할 수 있다¹⁰. 또한 선충류를 인공배지에서 배양하여 배설·분비항원을 분리, 정제하여 미성숙 선충류(immature nematodes)에 의한 기생충성 질병진단⁴ 및 감염력있는 자충을 배양하여 항원생산에 의한 백신개발이 가능하며, 기생충학분야의 면역학적 연구를 수행할 수 있는 기본적인 기술방법도 확립할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

실험동물(laboratory animal) : 돼지 회충의 합자충란을 인공감염시켜 실험동물의 폐에서 제3기 자충을 얻기 위하여 기생충에 감염되지 않은 랫드(250g, 4주령)를 사용하였다.

기생충(target parasite) : 돼지 회충 성충의 자궁에서 회충란을 회수하여 합자충란(L₂)으로 배양하였으며, 돼지 편충의 성충은 인공감염시킨 돼지에서 부검하여 회수하였다.

시험한 구충제(anthelmintics for screen test) : 내·외부기생충에 효능이 있는 다음의 구충제(1% 주사제)를 사용하였다.

① abamectin : Abamec LA ethyoleate/Ancare New Zealand Ltd (Lab. No. 6100620 Batch No. 3).

② ivermectin : Ivomec/MSD AGVET Netherland (Batch No. HB 58180).

배양배지(culture medium) : 시험관내 배양에 사용한 배지는 RPMI medium 1640(GibcoBRL : Cat. No. 13200-076, with L-glutamine, without phenol red and sodium bicarbonate)에 5% 송아지 혈청(5% bovine calf serum ; 56℃ 30분간 불활성화), 항생제 및 항곰팡이제(Antibiotic-An-

timycotic, GibcoBRL; Cat. No.15240-062), 첨가 및 처리한 후 최종 pH는 6.8~7.0으로 조정하여 사용하였다¹³.

합자충란의 인공부화후 배양한 돼지 회충 제3기 자충을 이용한 구충효능 선발시험 : 돼지 회충란의 단백막을 0.5N NaOH로 벗기고 25℃, 0.1% formalin 용액에서 28일간 배양하여 감염력있는 합자충란(L2)을 glass beads(diameter 5mm)로 부화(hatching)시킨 후, 제2기 자충을 5% 송아지 혈청을 첨가한 RPMI medium 1640에서 7일간 배양한 제3기 자충, 합자충란을 토끼(랫드)에 감염시킨 7일 후 폐에서 회수한 제3기 자충과 편충의 성충을 시험에 사용하였다¹³. 제3기 자충(약 100마리 정도)을 abamectin 과 ivermectin의 농도별 0, 5, 10, 20ppm의 4군으로 나누어 5일동안 배양하면서 1일 1회 대조군과 처치군의 생존 및 사망한 자충수를 측정하여 다음식에 의하여 구충효능(%)을 산출하였다.

$$\text{Efficacy} (\%) = \frac{(\text{Total no. of cultured larvae} - \text{No. of survival larvae})}{\text{Total no. of cultured larvae}} \times 100$$

실험동물(랫트)의 폐에서 회수한 돼지 회충 제3기 자충을 이용한 구충효능 선발시험 : 폐에서 회수한 제3기 자충을 2일간 배양하여 시험관내에서 적응시킨 후 시험에 사용하였다. 이 제3기 자충을 투약구충제 농도별로 0, 5, 10, 20, 40ppm의 5군으로 나누어 5일간 배양하면서 1일 1회 대조군과 처치군의 생존 및 사망한 자충수를 측정하여 구충효능(%)을 산출하였다.

돼지 편충의 성충을 이용한 구충효능 선발시험 : 인공 감염시킨 돼지를 부검하여 맹·결장에서 회수한 성충을 RPMI 배지에서 ivermectin의 0, 5, 10, 20, 40ppm의 5군으로 나누어 5일간 배양하면서 1일 1회 대조군과 처치군의

생존 및 사망한 자충수를 측정하여 구충효능(%)을 산출하였다.

결 과

합자충란(L2)을 인공부화시킨 제2기 자충을 5% 송아지 혈청을 첨가한 RPMI medium 1640에서 7일간 배양한 제3기 자충, 합자충란을 토끼(랫드)에 감염시킨 7일 후 폐에서 회수한 제3기 자충(*in vitro* L3) 인공배양배지(RPMI medium 1640)에서 5일간 배양하면서 구충제 농도별(0, 5, 10, 20, 40ppm)로 구충효능을 비교한 결과와 시험관내 배양이 어렵고 충체가 작은 돼지 편충에 대한 시험관내 구충효능 선발시험 결과는 다음과 같았다.

합자충란을 인공부화후 배양한 돼지 회충의 제3기 자충(*In vitro* L3)을 이용한 구충효능 선발시험 : 인공부화하여 7일간 인공배양한 제3기 자충(L3; 약 100마리 정도)을 구충제별, 농도별(0, 5, 10, 20ppm)로 12 well-plate에서 5일동안 배양하면서 1일 1회 대조군은 생존한 자충수, 처치군에서는 사망한 자충수를 측정하여 평가한 구충효능(%) 결과는 다음과 같았다(Table 1).

Table 1에서 보는 바와 같이 시험관내에서 배양한 돼지 회충의 제3기 자충에 대한 구충효능은 5ppm 농도에서는 5일에 91% 이상의 구충효능이 나타났으며, 10ppm 농도에서 5일만에 100% 구충효능이 있는 것으로 나타났다.

실험동물 폐에서 회수한 돼지 회충의 제3기 자충(*In vivo* L3)을 이용한 구충효능 선발시험 : 인공감염시킨 랫드의 폐에서 회수한 제3기 자충(L3; 약 100마리 정도)을 2일간 RPMI 1640 배지에서 적응시킨 후 구충제별, 농도별(0, 5, 10, 20, 40ppm)로 12 well-plate에서 5일동안 배양

Table 1. *In vitro* screening test of the anthelmintic efficacy(%) against the artificially cultivated *Ascaris suum* (L3) from the artificial hatching of embryonated eggs in RPMI medium 1640*

ppm/day	Abamectin					Ivermectin				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0	0	2	6	7	10	0	0	4	10	10
5	24	42	70	83	100	3	25	64	84	91
10	22	62	85	94	100	16	50	72	93	100
20	43	88	95	100	100	58	90	94	98	100

* HPMI medium 1640 with 5% bovine calf serum(without phenol red and sodium bicarbonate).

Table 2. *In vitro* screening test of the anthelmintic efficacy(%) against the artificially cultivated *A suum* (L₃) from the third-stage larva(L₃) of rat's lung-derived in RPMI medium 1640*

ppm/day	Abamectin					Ivermectin				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0	0	2	4	4	4	0	2	4	6	6
5	25	32	67	69	70	24	44	62	65	67
10	29	54	69	77	79	36	62	75	79	81
20	40	65	70	75	92	44	73	89	90	100
40	75	92	100	100	100	67	85	100	100	100

* RPMI medium 1640 with 5% bovine calf serum(without phenol red and sodium bicarbonate).

하면서 1일 1회 대조군은 생존한 자충수, 처치군에서는 사망한 자충수를 측정하여 평가한 구충효능(%) 결과는 다음과 같았다(Table 2).

랫트의 폐에서 회수한 돼지 회충의 제3기 자충에 대한 구충효능은 인공배양한 제3기 자충에 대한 결과(Table 1)보다는 높은 농도에서 구충효능이 있는 것으로 나타났다. 즉, 20ppm에서 5일 또는 40ppm에서 3일 100%의 구

충효능이 있었다. 이와같은 이유는 *in vivo* L₃가 *in vitro* L₃보다 감염력 및 활력이 왕성하여 구충제의 높은 농도에서 배양시간이 더 경과한 후에 100%의 구충효능으로 나타났다.

Table 1과 Table 2의 결과에서 구충제의 농도 5, 20ppm을 *in vitro* L₃(Fig 1), *in vivo* L₃(Fig 2)을 그래프로 도시하여 비교하여 보면 Fig 1, Fig 2에서 보는 바와 같이 구충

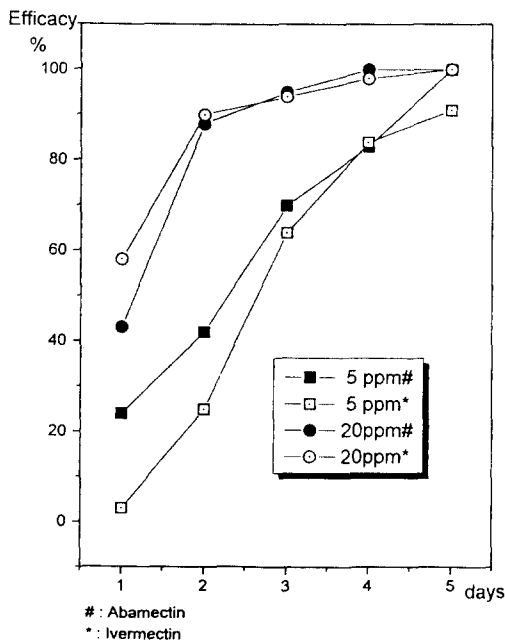


Fig 1. *In vitro* screening test of the efficacy against the artificially cultivated L₃ of *Ascaris suum* at 5 and 20ppm concentration.

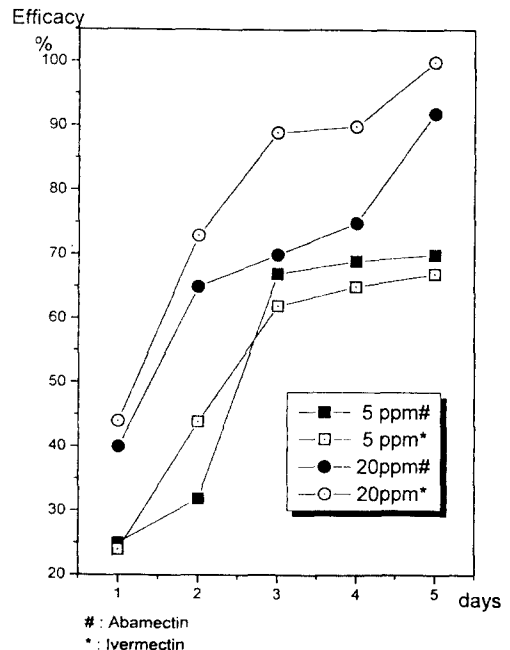


Fig 2. *In vitro* screening test of the efficacy against the rat's lung-derived L₃ of *Ascaris suum* at 5 and 20ppm concentration.

제 농도와 배양시간에 대한 차이는 있지만 그래프 기울기가 비슷하며, 통계학적으로 처리한 결과, *in vitro* L₃와 *in vivo* L₃간의 유의성은 인정되지 않았다($p > 0.05$; 5ppm; A $p = 0.57719$, I $p = 0.95912$; 20ppm; A $p = 0.25439$, I $p = 0.50019$). 그러므로 *in vitro* L₃와 *in vivo* L₃와 같이 시험관내에서 구충효능시험에 사용할 수 있다.

돼지 편충의 성충을 이용한 구충효능 선발시험: 돼지 편충을 인공감염시킨 돼지를 부검하여 맹·결장에서 회수한 편충의 성충을 RPMI 1640배지에서 5일간 배양하면서 1일 1회 대조군은 생존한 자충수, 처치군에서는 사망한 자충수를 측정하여 평가한 ivermectin의 구충효능(%) 결과는 다음과 같았다(Table 3).

Table 3. *In vitro* screening test of the Ivermectin efficacy(%) against adult *Trichuris suis* from the intestine of the artificially infected pigs in RPMI medium 1640*

ppm/day	1	2	3	4	5
0	0	0	0	0	0
5	0	20	30	40	50
10	0	40	40	60	80
20	0	40	70	100	100
40	0	80	100	100	100

* RPMI medium 1640 with 5% bovine calf serum(without phenol red and sodium bicarbonate).

편충의 성충에 대한 시험관내 구충효능은 20ppm에서 4일만에 100%효과가 있었다. 대조군의 편충 성충은 배양 5일동안 한마리도 죽지 않았고, 생체에서 발육된 성충이기에 랫트의 폐에서 회수한 돼지 회충의 제3기 자충에 대한 시험관내 구충효능과 비슷한 결과로 나타났다.

고 찰

개발중인 구충물질에 대한 효능선발시험(screening test)은 많은 물질을 한번에 실시해야 하므로 생체시험을 통하여 실시한다는 것은 불가능하며, 무모한 시도라고 할 수 있다. 이에 시험관내에서 구충효능 선발시험법을 개발하고자 돼지 회충의 제3기 자충을 이용하여 시험관내에서 구충효능 선발시험을 실시하였다.

본 시험에서는 5% 송아지 혈청이 첨가된 RPMI 1640

배지를 사용하였는데 혈청이 첨가된 배지에서는 구충효능이 감소될 수 있다¹⁰는 사실을 감안한다면 혈청을 첨가하지 않는 것은 구충효능은 증가시킬 수 있지만 인공배지에서 5일간 배양하는데 혈청을 첨가하지 않는 것은 자충의 생존력을 약화시켜 시험을 수행하는데 지장이 있을 수 있다. Table 2에서 나타난 결과와 비교분석하여 보면 *in vitro* L₃에 대한 구충효능이 랫트의 폐에서 회수한 제3기 자충(*in vivo* L₃)에 대한 구충효능보다 높은 이유는 *in vitro* L₃의 활력과 생존력이 *in vivo* L₃ 보다 약하기 때문인 것으로 추측된다. 그러므로 *in vitro*의 활력과 생존력을 높이기 위하여서는 송아지 혈청농도를 10% 이상 첨가하는 것이 바람직하다고 사료되지만 구충효능 선발시험은 결과적인 측면에서는 그 반대이다.

랫트의 폐에서 회수한 돼지 회충의 제3기 자충에 대한 구충효능은 Table 1의 결과보다는 높은 농도에서 구충효능이 있는 것으로 나타났다. 즉, 20ppm에서 5일 또는 40ppm에서 3일 100%의 구충효능이 있었다. 이와같은 이유는 *in vivo* L₃가 *in vitro* L₃보다 감염력 및 활력이 왕성하여 구충제의 높은 농도에서, 오랜 배양시간 후에 100%의 구충효능으로 나타났다. 즉, *in vitro* L₃는 시험관내에서 인공부화, 배양하였기에 생체(실험동물의 간, 폐)보다 영양조건이나 기생조건이 열악하여 생존력이나 활력이 낮아 저농도, 단시간에 사망하는 것으로 추정된다.

편충의 생활환은 회충처럼 자충의 체내이행(hepatotrichal migration)이 없고 결장점막속에서 발육하며², 크기가 작아 장내용물과 분리하기 어렵기 때문에 인공감염 후 자충의 회수가 어렵다⁴. 편충의 성충은 크기가 돼지 회충(20~30cm)보다 적기(3.5~5.0×0.2cm) 때문에 성충으로 시험관내 시험이 가능하므로 본 시험에서는 성충으로 약제시험을 실시하였다. 그러나 시험관내에서 자충을 배양하는 것이 생체에 인공감염시켜 자충을 회수하여 시험하는 것보다 유리하므로 편충의 자충을 인공배지에서 배양하려는 연구를 수행하고 있다. 편충의 자충별 인공배양법 확립은 구충제 선발시험 뿐만 아니라 기존 사용하고 있는 구충제에 대한 내성 기생충(resistant parasite)의 확인¹, 인공배양액에서 배설-분비항원을 분리하여 혈청학적 진단⁴, 면역학적 연구분야에 효용가치가 많으므로 편충의 자충별 인공배양법 확립은 차후라도 실시하기로 하였다.

일반적으로 생체내 구충효능은 편충이 회충보다 낮게 나타나는데 이는 소장에는 회충과 대장에 있는 편충

의 구충물질의 대사과정과 약물흡수기전이 다르므로 즉, 소장에 노출되어 있는 회충은 약물에 노출되고 소장의 흡수기능이 대장보다 높으며, 대장점막에 박혀있는 편충은 약물노출정도나 대장의 흡수기능이 낮지만 점막에 박혀 소장에서 흡수한 약물에 의해 구충되기 때문이다. 본 시험에서 나타난 특징은 회충과 편충의 구충효능이 시험관에서는 비슷하게 나타나는 것이었다.

결 론

시험관내에서 배양한 선충류의 자충을 시험관내에서 구충효능 선발시험에 사용할 수 있는지를 확인하기 위하여 시험관내에서 인공부화하여 배양한 돼지 회충의 제3기 자충, 돼지 회충의 합자충란을 인공감염시킨 7일 후에 실험동물(랫트)의 폐에서 회수한 제3기 자충과 돼지편충의 성충을 이용하여 시험관내에서 구충효능 선발 시험을 실시한 결과는 다음과 같았다.

1. 합자충란을 인공부화, 배양한 돼지회충의 제3기 자충(*in vitro* L₃)에 대한 abamectin과 ivermectin의 시험관내 배지 10ppm 농도에서 5일만에 모두 100% 구충효능이 있는 것으로 나타났다.

2. 랫트 폐에서 회수한 돼지 회충의 제3기 자충(*in vivo* L₃)에 대한 abamectin과 ivermectin의 구충효능은 20ppm에서 5일 또는 40ppm에서 3일만에 모두 100%의 구충효능이 있었다.

3. 돼지 편충의 성충에 대한 abamectin과 ivermectin의 구충효능도 20ppm에서 4일만에 모두 100% 이었다.

이상의 결과로 시험관내에서 배양한 돼지 회충의 제3기 자충도 생체의 폐에서 회수한 제3기 자충과 같이 시험관내에서 구충효능 선발시험을 수행할 수 있다고 사료되며, 자충의 배양이 어렵거나 성충의 크기가 작은 선충류(편충, 사상충 등)는 성충을 이용하여 구충효능 선발시험을 수행할 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Assonville JA, Janovsky, E, Verster A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance, *Vet Parasitol*, 61:73-80, 1996.
2. Beer, RJS. Studies on the biology of life-cycle of *Trichuris suis* Schrank, 1788. *Parasitol*, 67:253-262, 1973.
3. Cleeland R. The effects of different atmospheres and various supplements on the *in vitro* survival and growth of *Ascaris suum* larvae. *J Parasitol*, 49:64-68, 1963.
4. Dolores EH, Robert DR, Joseph F, Urban Jr. A *Trichuris* specific diagnostic antigen from culture fluids of *Trichuris suis* adult worms, *Vet Parasitol*, 68:91-102, 1997.
5. Fetterer RH. Growth and Cuticular synthesis in *Ascaris suum* larva during development from third to fourth stage *in vitro*. *Vet Parasitol*, 65:2775-282, 1996.
6. Jenkins DC, Armitage R, Carrington TS. A new primary screening test for anthelmintics utilizing the parasitic stages of *Nippostrongylus brasiliensis*, *in vitro*. *Z Parasitenkd*, 63:261-269, 1980.
7. Jenkins DC, Carrington TS. An *in vitro* screen for anthelmintics employing *Nippostrongylus brasiliensis* in a defined medium. *Vet Parasitol*, 11:223-230, 1982.
8. Leland SE Jr, Ridley RK, Dick JW, et al. Anthelmintic activity of trichlorfon, coumaphos and naphthalophos against the *in vitro* grown parasitic stages of *Cooperia punctata*. *J Parasitol*; 57:1190-1197, 1971.
9. Rapson EB, Jenkins DC, Topley P. *Trichostrongylus colubriformis*: *in vitro* culture of parasitic stages and their use for the evaluation of anthelmintics, *Res Vet Sci*, 39:90-94, 1985.
10. Rew RS, Urban JF Jr, Douvres FW. An *in vitro* screen for anthelmintics using larvae of *Ascaris suum*. *Am J Vet Res*, 47:869-873, 1986.
11. Taylor AEL, Baker JR. *In vitro* methods for parasite cultivation. Academic Press, London, p321, 1987.
12. Urban JF, Douvres FW, Xu S. Culture requirements of *Ascaris suum* larvae using a stationary multi-well system: increased survival, development and growth with cholestrol. *Vet Parasitol*, 14:33-42, 1984
13. 지차호, 박승준. 시험관내에서 돼지 회충(*Ascaris suum*) 합자충란(L₂)의 인공배양. 대한수의학회지, 38:107-117, 1998.