

肝吸虫에 對한 組織化學的 研究*

특히 Carbonic Anhydrase 의 分布

釜山大學校 醫科大學 寄生蟲學敎室

朱 鼎 均

釜山大學校 醫科大學 內科學敎室

洪 聖 文

I 緒 論

Carbonic anhydrase는 亞鉛을 包含하고 있는 enzyme으로 주로 赤血球內에 存在하고 있다. 이 enzyme은 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ 의 反應을 이르키며 水解와 脫水反應을 주로 觸媒하는 것으로 알려져 있다.

生體內에 있어서 이 enzyme 以外에 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$ 의 反應에 觸媒하는 物質들은 많이 알려져 있으며 특히 Oxy-acid buffer 들이라고 생각된다. 이 Oxy-acid buffer 로써 既知物質들 중에서 Phosphate, Cacodylate, Veronal, Chromate, Borate 와 Selenite 등과 같은 것들을 列擧할 수 있다^{7,8}). 이미 生化學의 部門에서는 上記反應에 있어서 水解反應時에는 pH의 作用領域은 6.5-10.0 이라고 하며 一面 脫水反應時에는 pH의 作用領域이 5.5-7.5로 된다고 하였다⁹).

이 enzyme은 Stadie & Obrien¹⁾(1933)들에 의하여 처음 赤血球로 부터 crude한 enzyme을 抽出하였다.

그러나 많은 生化學者들은 生體內 組織에서 이 enzyme을 生化學的 方法으로 그의 分布를 探索하는 것은 容易한 것이 아니라고 한다. 그 후 組織化學的 研究法 發表로서 이 enzyme이 組織細胞內에 局在하고 있는 것을 探知하는 方法이 普及된 以後 이 方面에 많은 新知見들이 發表되었다^{2,3,4,5,6,7,8,9,10}). 그러나 腸內寄生性蠕虫 특히 肝吸虫에 關한 Carbonic Anhydrase의 分布를 檢索한 業績은 寡聞한 탓인지 거의 없는 것 같다. 著者는 肝吸虫에 대한 Lipase, Phosphatase와 核酸等 各種 物質의 分布를 調查報告한 바 所見과 一聯의 連關性的 有無와 膽管內에 寄生하는 吸虫類가 惡環境에서 生活하는 特殊條件과 新陳代謝에 對한 그의 意義을 究明하려고 本實驗에 着手하여 興味있는 知見을 얻었으므로 報告하고자 한다^{9,10}).

II 研究材料 와 그 方法

本研究에 供한 材料는 著者가 前述한 “肝吸虫에 대한 組織化學的 研究”에 詳述되어 있으므로 略記한다^{9,10}).

그러나 一部 研究는 肝吸虫의 第二中間宿主로 알려져 있는 참봉어(Pseudorasbora parva)를 잡어 人工胃液으로 消化시키어 多數의 metacercariae를 획득하였다. 곧 肝吸虫의 metacercariae 입을 同定한 後 糞檢査所見上陰

性을 呈示한 成熟한 家兎에 經口的으로 感染시키고 綿密히 飼育 觀察하며 4~5日 間隔으로 檢査하여 感染如否를 確認하였다.

感染後 約 45日 經過하여 任意로 撲殺하여 家兎 肝內에서 引은 成虫을 本研究에 使用하기로 하였다^{9,10}).

Carbonic Anhydrase의 組織化學的 檢索法으로 Kurada法을 利用하였다. 그의 染色所見과 方法은 다음 項에서 說明하기로 한다^{11,12,13,14}).

III 研究 所 見

虫體를 冷 acetone으로 固定, 水洗, 基質液에 담어 37°C 孵卵器內에서 30~40分 作用(基質液($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)+8% sod. bicarbonate)水洗, 0.1% Pot. periodate 液中에 담어 37°C 孵卵器內에서 48時間 作用시켰다.

그 후 eosin 液으로 染色하고 脫水 淸淨, resin 封入하여 檢鏡하였다²⁾.

그의 所見은 다음과 같다.

外被의 角質, 角質皮下層에서는 染色되지 않으며 角質皮下層 筋肉 組織內에서도 陽性反應을 確認하지 못하였다.

網狀組織; 組織이 濃黑褐色으로 染色된 圓形 微細 顆粒들이 組織細胞質에 多數 分布되어 있으며 특히 網狀組織中 巨大細胞에 있어서 더욱 顯저하다. 消化器의 口吸盤에서는 두터운 筋層細胞質은 染色所見이 明確하지 않으나 基底膜에서는 黑色微細 顆粒들이 部分的으로 群集되어 있는 것이 或干 보여진다. 其他 咽頭와 食道에서는 特異한 所見을 찾지 못하였다.

그러나 食道下部分岐部以下 盲腸上皮細胞質에서는 黑色顆粒들이 多數 群集 혹은 表面的으로 散在하고 있었다.

生殖器의 卵黃線의 細胞質內에는 黑褐色 微細 顆粒들이 diffuse하게 分布되어 있으며 卵黃管에서는 이와 같은 所見을 보지 못하였다.

卵巢와 子宮內에서는 染色所見上 特異한 것을 發見하지 못하였으나 卵巢內虫卵과 子宮內虫卵의 卵細胞와 卵黃細胞의 細胞質에서는 黑色微細顆粒들이 均等하게 分

*本論文의 要旨은 第2回 (1960)大韓寄生蟲學會席上에서 發表하였음.

布하고 있다.

또한 睪丸에 있어서 Spermatozoa 들은 黑色微細顆粒들이 亦是 均等하게 分布하고 있으나 輸精管과 貯精囊에서는 그리 特異한 所見을 證明할 수 없었다.

V 考 察

$\text{HCO}_3 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 의 反應促進酵素인 Carbonic Anhydrase 를 組織化學的 研究法으로 檢索하게 된 것은 Ca, Mn 과 같은 2 價金屬의 重碳酸鹽을 選擇하여 基質로 할 時 HCO_3 가 酵素作用으로 分解結果로 洗滌하는 不溶解性 碳酸鹽을 細胞化學的으로 證明하는데서 始作되었다.

또한 上記 研究法으로 各種 實驗動物 臟器內에 Carbonic Anhydrase 가 分布하고 있는 것들을 밝히었다⁸⁾.

그의 分布를 보면 一般的으로 赤血球 筋肉組織 Pancreas 와 spermatozoa 에서는 多少 分布하고 胃와 腎에는 많이 分布하고 있다고 한다²⁾. 또한 이 enzyme 이 kidney 內에서 尿의 濾過와 再吸收에 作用하고 있는 機轉도 밝히어 졌다. 그러나 實驗動物以外的 寄生虫에 對한 調查報告는 없으며 거의 없는 것 같다.

肝吸虫에 있어서 enzyme 의 分布가 多少 많은 것은 網狀組織과 消化器系上皮細胞 및 睪丸과 虫卵細胞等に 分布하고 있다는 點은 上述한 實驗動物 所見과 一致되는 것으로 보아 大端히 興味있는 것으로 生覺된다.

이미 動物體內에서 이 enzyme 의 觸媒作用에 關한 機轉이 一部 究明된 것을 土臺로하여 寄生虫의 生理作用을 推想할 때 그 機能上으로는 거의 同等하지 않나 推定된다.

또한 肝吸虫內에 있어서 Lipase, Phosphatase 와 같은 enzyme 의 分布와 이 enzyme 과의 分布像도 같은 것으로 보아 三者間에는 新陳代謝에 緊密한 作用이 있다고 生覺된다. 그외 이 enzyme 이 많은 部位에는 glycogen 의 分布도 相當히 많은 것도 또한 興味있는 所見이라고 본다.

Carbonic Anhydrase 反應時 그의 基質에 使用하는 2 價金屬에 關하여는 先人들이 論議가 많으며 各各 獨有한 主張을 하고 있다. MacCallum⁴⁾(1932) Okamoto^{5,6)}(1942)은 nickel 과 Cobalt 와 calcium bicarbonate 와 混合하여도 反應은 잘 된다고 하였다. Feigl³⁾(1938)은 dimethyl glyoxime 과 ammonia 를 基質로 使用하여 反應을 促進시켰다고 하였다.

Gomori⁷⁾(1958)는 이 反應에 있어서 pH 作用領域에 依하여 加水分解와 脫水反應에 큰 影響을 가져 오게 한다고 하였다. 그러나 Kurada²⁾(1953)는 Mn 을 使用한 時 組織內 Carbonic Anhydrase 의 局在가 명확하게 區分되어 진다고 하며 그의 우수性을 主張하였다.

以上 要約하여 보면 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$

에 使用하는 促進物質들은 enzyme 以外에 Oxy-acid buffer 들이 있다고 한다. Carbonic Anhydrase 의 寄生虫體內 分布調查 業績은 거의 없으며, 肝吸虫 體內에서는 網狀組織 消化器上皮細胞 睪丸 虫卵 卵黃腺 等에 量的 差異는 있으나 多少 分布하고 있음을 알았다.

V 結 論

1) 著者は 肝吸虫에 對한 Carbonic Anhydrase 의 分布를 Kurada 法으로 檢索하여 다음과 같은 所見들을 얻었다.

2) 이 enzyme 의 分布는 網狀組織, 吸盤과 腸上皮細胞 睪丸 등에서 diffuse 하게 分布되어 있고 其他 虫卵과 卵黃腺 細胞에서도 多少 많은 分布를 呈示하고 있다.

文 獻

- 1) Stadie, W.C. and Obrien, H.(1933) : The catalysis of the hydration of carbon dioxide and dehydration of carboinic acid by an enzyme isolated from blood cells. J. Biol. Chem., 103; 521-9.
- 2) Kurada, Y. (1953) : Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. Stain Tech., 28; 5.
- 3) Feigl, F. (1938) : Qual. Anal. Tupfelreaktionen. Akad. Verlage gesell. Leipzig. pp. 345-6.
- 4) MacCallum, A.B. (1932) : Romeise Taschen mikrosk. Technik. Aufl. Munchen & Berlin. pp. 345-6.
- 5) Okamoto, K. (1942) : Biologische untersuchungen der metalle(VI. Mittlung.) Histochemischer nachweis einiger metalle in den gewebe, besonders in den Niere, und deren veränderungen. Trans. Jap. path. Soc. 32, 99-105.
- 6) Okamoto, K. (1946) Morphological studies on the metabolism(first report) On the Ca, Mg' fat and bile pigment. Trans. Jap. Path. Soc. 35, 12-21.
- 7) Gomori, G. (1958) : Microscopic Histochemistry; Univ. of Chicago Press.
- 8) 朱鼎均：肝吸虫에 對한 組織化學的 研究 (특히 Vitamin A, B₂, C 의 分布에 대하여) 中央醫學 2 (1), 105-10, 1962.
- 9) 朱鼎均, 金應南：肝吸虫에 對한 組織化學的 研究 (특히 Lipase 의 分布에 대하여) 서울의대 잡지 3, (2) 55-58, 1962.
- 10) 朱鼎均：肝吸虫에 對한 組織化學的 研究 서울의대 잡지 (3), 31-44, 1961.
- 11) 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英(1958) : 顯微鏡的 組織化學 醫學書院, 東京.
- 12) 市川收(1957) : 細胞化學 本田書店, 東京.

- 13) Lison, L. (1962): (今泉正譯) 組織化學 及び 細胞化學 理論と 方法(增訂) 白水社,
14) Lillie, A.B. (1954): Histopathologic technic and practical histochemistry. Philadelphia and Tronto,
15) 徐丙嘉 (1961): 臨床寄生蟲學 一潮閣 서울.
16) Faust and Russel (1957): Clinical parasitology Lea and Figbier. Philadelphia

朱 鼎 均 · 洪 聖 文 論 文 寫 真 附 圖



第1圖 角質皮下層 中腸壁, 辜丸 網狀組織細胞內
carbonic anhydrase 의 分布



第2圖 網狀組織細胞, 中腸, 辜丸 細胞內
carbonic anhydrase 의 分布

Abstact

HISTOCHEMICAL STUDIES ON CLONORCHIS SINENSIS

(The Distribution of Carbonic Anhydrase)

Jung-Kyun Chu, M.D.

Department of Parasitology, College of Medicine, Pusan Univ.

Sung-Moon Hong, M.D.

Department of Medicine, College of Medicine, Pusan Univ.

1. The authors carried out histochemical studies on Clonorchis sinensis, especially, histochemical demonstration of Carbonic Anhydrase activity.
2. Kurada's method was applied for the histochemical staining in this study.
3. The results obtained were summarized as follows: Carbonic Anhydrase activity was intensely positive in oral sucker cells, reticular tissue cells, epithelium of the intestine and testes, more or less intensely positive in vitelline gland cells and yolk of eggs as well.