抗原接種으로 인한 肝吸蟲感染 白鼠의 脫顆粒 肥滿細胞와 放出된 顆粒의 運命

延世大學校 醫科大學 寄生蟲學敎室 및 熱帶醫學研究所

安 泳 謙 · 蘇 鎮 埈

緒 論

著者等은 肝吸蟲感染 白鼠의 腸間膜과 感作 mice의 皮下結合組織內 肥滿細胞에서 同種의 抗原接種으로 인한 脫顆粒現象을 觀察한 바 있다(安, 1976). 이번에는 이렇게 抗原接種으로 細胞膜周圍의 顆粒을 脫顆粒시키고 난 肥滿細胞의 運命과 細胞 밖으로 放出된 顆粒의 行方을 觀察한 것이다.

材料 및 方法

實驗動物 : 200gm內외의 他寄生蟲이 感染되지 않은 健康한 白鼠 24마리를 使用하였으며 各各 150個의 肝吸蟲 메타센카리아를 經口投與하고 一個月後 糞便檢査에 依한 感染與否와 Ouchterlony(1948) 沈降反應에 依한 抗體形成을 確認後 實驗에 使用하였다.

抗 原 : 酸可溶性 蛋白抗原을 使用하였다. 即 凍結 乾燥 肝吸蟲蟲體를 麻醉「에테르」와 無水「에타놀」로서 脫脂하고 完全 蒸發乾燥시킨 後 4°C의 phosphate buffer 液을 부어가며 glass tissue grinder로서 磨碎하고 다시 超音波振動裝置(Blackstone Ultrasonics Model BP-2)로 處理(volts 120, cycles 60, power 30, 10min.)後 冷藏庫(4°C)內에서 12時間 抽出하였다. 이 抽出液을 1,000G, 20分間 遠心하여 分離한 上清液에 10% trichloroacetic acid를 滴下하여 생기는 白色沈澱物을 다시 遠心分離하여 除去하고 얻어진 上清을 「셀로판」透折膜에 넣어 蒸溜水로서 冷藏庫內에서 一晝夜 以上 透折했다. 이렇게 얻어진 抗原原液을 2倍로 稀釋하여 接種用抗原으로 使用하였으며 Lowry法 (1951)에 依한 蛋白含量은 160

本研究은 1976年度 延世大學校 醫科大學 敎授研究費에 依해 實施되었으며, 本論文의 要旨은 第18回(1976年 11月) 大韓寄生蟲學會 學術大會에서 發表하였음.

7/ml였다.

抗原의 接種 : 感染白鼠를 가볍게 「에테르」麻醉하고 實驗臺에 固定, 麻醉로부터 回復되는 동안 腹部의 털을 除去한다. 그리고 腹部白線을 따라 約 2cm程度 切開하고 腸間膜에 直接 抗原 1 ml를 滴下, 接種시키고 그 部位를 縫絲로 表示하고 다시 縫合하였다.

染色 및 光學顯微鏡의 觀察

一定時間 經過後 腹腔內에 「메타놀」을 注射器로서 多量注入, 生體固定後 作用部位를 切斷하여 後固定하였다. 腸間膜組織은 可及的 30分 以內에 染色過程을 밟았으며 于先 固定된 狀態에서 膜만을 注意깊게 도려내어 載物「스라이드」上에 펴고 室溫에서 乾燥시켰다. 이를 toluidine blue液(氷醋酸 10ml, toluidine blue 0.4gm, ethanol 4ml, 蒸溜水 8ml)으로 1~2分間 染色하고 水洗脫水, 발삼 包埋하여 標本을 만들어 光學顯微鏡 觀察을 하였다.

電子顯微鏡의 觀察

1) 抗原接種後 初期의 脫顆粒現象을 觀察하기 爲하여 腸의 一部를 摘出하여 50ml의 Tyrode液內에서 自律運動하는 腸管에 抗原 1 ml를 滴下, 30秒作用시킨 後 곧 0°C의 前固定液(4% glutaraldehyde磷酸緩衝液)에 넣어 冷溫(4°C)에서 4時間以上 固定하였다.

2) 生體內에서 脫顆粒 肥滿細胞 및 放出顆粒의 時間 經過에 따른 動態觀察을 爲한 試料採取는 抗原接種, 一定時間經過後 頭部打擊 屠殺하여 腸管을 迅速히 摘出 前固定하였다. 1), 2)共히 前固定後 腸間膜만을 切斷分離하여 後固定, 脫水, 包埋, 超薄切片을 作成 染色하여 日立 HU-11E型 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

實驗結果

光學顯微鏡의 觀察

肝吸蟲感染 白鼠에 同種의 抗原接種으로 腸間膜 肥滿細胞가 脫顆粒되는 現象을 前實驗(安, 1976)을 通하여 *in vivo*, *in vitro*에서 5分以內에 92.1%, 15分 以內에 99.6%의 脫顆粒을 일으킴을 觀察하였다.

이렇게 脫顆粒된 肥滿細胞는 脫顆粒된 後 1時間內에는 脫顆粒狀態에서 細胞外로 放出된 裸顆粒을 包含한 全般的인 脫顆粒細胞의 形態, 位置上的 變化는 볼 수 있었다. 그러나 3時間 經過後에는 脫顆粒細胞 周圍에 散在되어 있던 顆粒들은 大喰細胞에 依해 抱喰된 樣相을 보여 染色標本으로 볼 때 肥滿細胞에 隣接한 大喰細胞는 질게 集顆粒의 狀態로 觀察된다(Fig. 2a, 2b).

5時間 經過後에는 大部分의 散在顆粒은 喰作用이 完了되고(Fig. 2c), 8~12時間內에 消化吸收가 進行되어 大喰細胞質內에는 染色上 抱喰顆粒의 殘餘分이 觀察된 뿐이다(Fig. 2d, 2e).

한편 脫顆粒시키고 난 肥滿細胞는 多量의 顆粒放出로 染色標本에서 核이 透明하게 觀察된다(Fig. 3a, 3b).

電子顯微鏡의 觀察

脫顆粒過程을 電子顯微鏡으로 觀察하였다. 感染白鼠의 抗原非處理 正常肥滿細胞는 圓型 또는 不規則한 橢圓形의 形態로 二重의 原形質膜으로 되어있다. 細胞表面에서는 多數의 微纖毛(Vi)를 볼 수 있으며 큰 核(N)이 細胞中央에 位置하며 細胞質內 滿在顆粒들에 依해 屈曲있는 變型橢圓形으로 核膜에서는 部分的으로 核膜穴(Np)을 볼 수 있다.

細胞質內에는 圓形 또는 卵圓形의 電子密度가 높은 顆粒(直徑 0.2~0.7 μ)으로 가득히 차있으며 그사이에서 小胞體(Er), 絲粒體(Mi)등도 觀察된다(Fig. 4).

肝吸蟲抗原의 作用을 받으면 30秒內에 脫顆粒을 일으키는데 抗原成分이 細胞膜에 作用되면 그 近邊의 顆粒 膨潤을 招來하고 繼續的으로 細胞質內 隣接顆粒에 作用하여 顆粒周圍膜이 融解되어 顆粒은 서로 融合 吻合腔(Ac)이 形成되고 顆粒의 容積增大로 因하여 細胞外로 膨潤顆粒을 放出, 脫顆粒을 일으킨다(Fig. 5).

細胞外로 放出된 裸顆粒은 細胞周圍의 大喰細胞에 依해 抱喰되는데 白鼠의 腸間膜에서는 脫顆粒을 일으키고 난 1時間後부터 3時間以內에 볼 수 있다(Fig. 6).

24時間 經過後에는 脫顆粒을 일으키고 난 細胞質內의 殘留 膨潤顆粒은 顆粒周圍膜의 融解로 形成된 큰 迷宮腔(Lc)에 모이고 細胞膜에 隣接顆粒이 放出 되고 난 顆粒周圍膜이 새로이 細胞質膜化되는 樣相을 볼 수 있었다(Fig. 7).

考 察

寄生蟲感染症, 特히 吸蟲類 感染診斷으로 使用되는 皮內反應은 即時型으로 그 抗體는 reagin 抗體로서 皮下結合組織內 肥滿細胞의 表面에 固着되는 性質을 가졌고 特異抗原과 結合하여 生物學的 活性을 出現, 그結果 肥滿細胞의 脫顆粒이 일어난다. 顆粒에 內包된 histamine은 heparin-protein 複合體인 顆粒의 炭酸基과 結合되어있어 裸顆粒狀態로 細胞外로 放出될 때 細胞周圍 組織液內의 Na陽「이온」交換에 依해 遊離된다(Nosal et al. 1970). 遊離 histamine의 量은 感作된 肥滿細胞의 脫顆粒程度에 比例해서 增加되는데 溫度, 遊離因子 및 抗原의 濃度等에 따른 差는 있으나 30秒後부터 脫顆粒이 始作되어 3分後엔 最高値에 達하고 10分間 繼續된다(Röhlich, 1971 및 Uvnäs, 1974).

感作動物에서 histamine 遊離因子(compound 48/80 등)에 依한 肥滿細胞의 脫顆粒現象은 Mann(1969), Röhlich et al. (1971) 및 Kagayama et al. (1974) 등의 電子顯微鏡的 觀察과 Chi et al.(1975)의 freeze-fracture technique에 依한 正常白鼠의 腹膜內 肥滿細胞의 微細構造 觀察報告가 있는데 著者等은 肝吸蟲 感染白鼠의 腸管(腸間膜)을 Tyrode氏液內(*in vitro*)에서 抗原을 直接 30 秒間 作用시키고 初期의 脫顆粒現象을 觀察코자 한 것이다.

抗原作用에 依해 肥滿細胞에서 放出한 裸顆粒에서는 histamine이 遊離된 것이고 한편 細胞外로 放出되지 못하고 細胞質內에 形成된 吻合腔內의 殘留膨潤顆粒에서도 吻合腔을 通해 細胞外 組織液의 流入으로 因한 histamine의 遊離도 可能할 것이다.

著者等은 以上과 같이 肥滿細胞는 抗原에 依해 脫顆粒을 일으켜 많은 顆粒이 細胞外로 放出되고 이 顆粒들은 腸間膜內 肥滿細胞 周圍에 散在해있는 大喰細胞에 依해 抱喰됨을 觀察한 것이다.

Higginbotham et al. (1956)은 mice로서 分離顆粒을 皮下結合組織에 注入했을 때 纖維母細胞의 原形質內에서 吸收顆粒을 觀察했으며 이는 纖維母細胞의 機能面으로 보아 heparin (acidic polysaccharide)이 含有된 顆粒이나 高分子性 多糖類 構造를 갖은 物質을 攝取하는 micelophagosis라 하였으며 이는 局部的인 解毒作用을 意味하는 것이라 하였다.

이번實驗은 白鼠의 腸間膜으로 腸間膜內에는 肥滿細胞外의 大喰細胞, 中皮細胞, 纖維母細胞, 好酸性白血球들中 活潑한 喰作用을 할 수 있는 細胞는 大喰細胞로 脫顆粒 3~5時間內에 大部分의 散在顆粒을 抱喰하여 染色標本에서 同種의 集顆粒 狀態로 大喰細胞質內에서

確認된다.

한편 細胞膜周圍의 部分的인 脫顆粒을 일으키고난 肥滿細胞는 24時間 經過後에는 漸次 回復段階에 들어 새로 細胞質膜이 形成되는 등 細胞質內 小器官이 存在하는 限 顆粒產生의 可能性을 推測케 한다.

肥滿細胞內 顆粒의 起源에 對하여 Klug(1961)는 絲粒體說을 主張하고 있으며 Combs(1966)는 Golgi裝置에서 만들어지는 precursor가 progranule이라는 過程을 거쳐 이들이 融合하여 顆粒이 된다고 하였다. 이러한 事實들은 抗原抗體反應으로 脫顆粒된 後의 肥滿細胞의 顆粒의 產生은 細胞質內 小器官의 崩壞與否와 關係가 있을 것으로 믿어진다.

寄生蟲感染症의 診斷으로 實施하는 皮內反應은 抗原이 皮下結合組織內의 肥滿細胞에 作用하여 脫顆粒시켜 顆粒中の histamine을 遊離시키고 이 histamine은 局所的인 細胞膜透過性을 充進시켜 浮腫의 膨疹으로 오는 丘疹의 形成과 末梢血管擴張 및 血液成分의 組織內 滲出로 因한 發赤으로 陽性判定의 基準이 되고있다.

이와같이 抗原抗體가 作用한 皮下組織部位(即 histamine 遊離後)에 再抗原作用으로 어떤 反應이 일어날 것인가 하는 問題가 惹起된다. 故로 앞으로 實驗觀察을 試圖해 究明되어야 할 것으로는 回復段階에 있는 肥滿細胞가 健全한 細胞로 되는 過程과 그 細胞에 抗原再反應에 依한 動態等인 것이다.

結 論

肝吸蟲感染 白鼠의 腸間膜을 利用하여 抗原接種으로 脫顆粒을 일으키고 난 肥滿細胞와 放出된 顆粒의 運命을 觀察한 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 抗原接種으로 肥滿細胞가 脫顆粒된 後 1時間以內에는 脫顆粒狀態에서 細胞外로 放出된 裸顆粒을 包含한 全般的인 脫顆粒細胞의 形態, 位置上的 變化는 볼 수 없었다.

2. 그러나 3時間 經過後에는 脫顆粒細胞周圍에 散在해 있던 顆粒들은 大喰細胞에 依해 抱喰되는 樣相을 보였고 5時間 經過後에는 大部分 喰作用이 完了되나 12時間後에도 部分的인 散在顆粒이 觀察된다.

3. 部分的인 脫顆粒을 일으키고난 肥滿細胞는 많은 數의 顆粒放出로 染色標本上 核을 쉽게 觀察할 수 있었다.

4. 電子顯微鏡觀察로 脫顆粒肥滿細胞는 顆粒放出한 顆粒周圍膜이 새로이 細胞質膜으로 되는 樣相을 보였고 放出되지 못한 細胞內의 殘留 變性膨潤顆粒은 서로 融合되어 細胞質內에 形成된 巨大한 迷宮腔內에서 觀察할 수 있었다.

以上の 結果로 脫顆粒 肥滿細胞는 細胞質의 甚한 崩壞를 일으키지 않은 限 다시 回復될 것으로 推測할 수 있었고, 放出된 顆粒은 大喰細胞에 依해 抱喰됨을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

- 安泳謙(1976). 肝吸蟲感染 란트における マスト細胞의 抗原による反應に關する研究. 名市大醫誌, 27: 42-57.
- Chi, E.Y., Lagunoff, D. and Koehler, J.K. (1975). Electron microscopy of Freeze-fractured rat peritoneal mast cells. J. Ultra. Research, 51:46-54.
- Combs, J.W. (1966). Maturation of rat mast cells. An Electron microscope study. J. Cell Biol., 31:563-575.
- Higginbotham, R.D., Dougherty, T.F. and Jee, S.S. (1956). Fate of shed mast cell granules. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 92:256-261.
- Kagayama, M. and Douglas, W.W. (1974). Electron microscope of Calcium-induced exocytosis in mast cells treated with 48/80 or the inophores A-23187 and X-537 A. J. Cell Biol., 62:519-526.
- Klug, H. (1961). Zur submikroskopischen struktur der mastzellen des thymus. Acta Biol. Med. Germ., 6:545-553(quoted in J. Med. Soc.Toho. Japan, 1973).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275.
- Mann, P.R. (1969). An electron microscope study of the degranulation of rat peritoneal mast cells brought about by four different agents. British J. Derm., 81:926-936.
- Nosal, R., Slorach, S.A. and Uvnäs, B. (1970). Quantitative correlation between degranulation and histamine release following exposure of rat mast cells to compound 48/80 in vitro. Acta Physiol. Scand., 80: 215-221.
- Röhlich, P., Anderson, P., and Uvnäs, B. (1971). Electron microscope observations on compound 48/80 induced degranulation in rat mast cells. J. Cell Biol., 51:465-483.
- Uvnäs, B. (1974). Correlation between morphological and biochemical events on antigen induced histamine release from mast cells. Mechanisms in Allergy, 369-383.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1-3. Light micrographs of the mesenteric mast cells from rats infected with *Clonorchis sinensis*. Stained with toluidine blue.

Fig. 1. Mesenteric mast cells and macrophages of rats of nonchallenged ($\times 1,000$).

Fig. 2. Degranulated mast cells and the extruded granules. Many granules are phagocytized by macrophages (arrows). **a.** after challenge with homologous antigen for 3 hrs ($\times 400$). **b.** higher magnification of figure 2a ($\times 1,000$). **c, d** and **e.** after challenge for 5 hrs, 8 hrs and 12 hrs ($\times 400$).

Fig. 3. **a.** The mast cells recovered from degranulation after 24 hrs ($\times 400$). **b.** higher magnification ($\times 1,000$). The large nucleus in the cytoplasm can be observed.

Fig. 4. Electron micrograph of a normal mesenteric mast cell from non-challenged rat. The cytoplasm is tightly packed with granules having a uniformly electron dense, osmiophilic granules ($\times 10,000$). A few mitochondria (Mi) and endoplasmic reticulum (Er) are scattered in the cytoplasm. A small number of nuclear pores (Np) are evident in the section. Several microvilli (Vi) extend from the cell surface.

Fig. 5. A mast cell challenged with homologous antigen for 30 seconds. The extruded granules are seen with swollen appearance and weak electron dense, intact granules in the cell remained unchanged ($\times 10,000$). eG: extruded granule, sG: swollen granule, Ac: anastomosing cavity.

Fig. 6. Macrophage (Mac) is engulfing a freed granule (eG).

Fig. 7. Recovered phase of mast cell after 24 hours of the challenge ($\times 18,000$). The swollen granules remain in the cell combining with each other in a large cavity (Lc, small arrows). Membrane closed to the expelled granule became normal (large arrow).

=Abstract=

Fates of Degranulated Mast Cells and Extruded Granules Responded to Homologous Antigen in Rats Infected with *Clonorchis sinensis*

Yung-Kyum Ahn and Chin-Thack Soh

*Department of Parasitology, Yonsei University Medical College, and
Institute of Tropical Medicine, Yonsei University*

Fates of degranulated mast cells by challenge of the homologous antigen to the *Clonorchis sinensis* infected rats, and the extruded granules were examined by means of light and electron microscopy. The whole experiment was carried out six weeks after the *Clonorchis* infection and an observation was made at 1, 3, 5, 8, 12 hours after the antigen challenges. The abdomen of the infected rat was cut open by 2 centimeters and the antigen was directly inoculated to mesentery, then again sutured. According to the scheduled period, the rat was sacrificed. The challenged portion was cut out and followed by dying procedure.

The results of the observation are summarized as follows:

Degranulation was observed within one hour without noticeable change of the granules. Three hours after the inoculation, the shed granules were phagocytized by macrophages surrounding the mast cells. They were aggregated in the cytoplasm. In 5 hours phagocytosis phenomenon were almost completed but still some granules were scattered in surroundings up to 12 hours.

The nucleus of the degranulated cell appeared clearly in contrast to normal cells which were filled with granules. Membrane became to normal, and the granules which were not expelled out agglomerated in a large cavity.

The above results suggest that the partially degranulated mast cells do not disintegrate, but recover to normal, and expelled granules are phagocytized by macrophages.