

## 肝吸虫感染 마우스의 膽管系 早期 變化

梨花女子大學校 醫科大學 寄生蟲學教室

閔 弘 基\*

梨花女子大學校 醫科大學 病理學教室

韓 雲 變\*\*

= ABSTRACT =

### Histopathologic Changes of the Bile Duct in Mice Experimentally Infected with *Clonorchis sinensis*

Hong - Ki Min, M.D.\* and Woon - Sup Han, M.D.\*\*

\* Department of Parasitology, College of Medicine, Ewha Womans Univ

\*\* Department of Pathology, College of Medicine, Ewha Womans Univ

The objective of this study was to obtain further information on the relationship between oncogenesis of cholangiocellular carcinoma of the liver and the infection with a liver fluke, *Clonorchis sinensis* in the earlier stage of the infection.

A group of 24 BALB/C male mice were used. Approximately 500 metacercariae were given orally to each mouse. Three mice were killed on the scheduled day, 3rd, 5th, 7th, 10th, 15th, 20th, 25th and 28th day after infection, respectively and histopathologic changes of the bile ducts were examined using hematoxylin and eosin stain method.

The histopathologic findings observed were summarized as follows;

1) Mice killed on the 3rd day showed a mild epithelial hyperplasia with the formation of papillae and adenomatous tissue proliferation. Bile ducts were dilated and the stroma was infiltrated by inflammatory cells, mainly eosinophils and polymorphonuclear leucocytes. Occasionally mitotic figures and atypia of epithelial cells were seen. Worms were found in the distal peripheral smaller branches of the bile duct.

2) Mice killed on the 7th day gave a mild connective tissue proliferation in addition to more striking pictures in the bile ducts. Chronic mononuclear leuco-

cytes appeared in the stroma.

3) Bile duct changes including epithelial hyperplasia, adenomatous tissue formation, connective tissue proliferation and inflammatory cell infiltration were greater in the degrees in mice killed on the 10th day after infection. Mucinous cell metaplasia and collagen fiber proliferation were also observed.

4) From the 15th day throughout the 28th day after infection, mice showed the most striking pictures of epithelial hyperplasia, adenomatous tissue formation and mucinous cell metaplasia. The stroma demonstrated the excessive eosinophil and chronic mononuclear leucocyte infiltrations, while polymorphonuclear leucocytes were decreased.

## 緒 論

人體를 침범하는 寄生虫 가운데 만손住血吸虫은 脾臟의 濾胞性 淋巴腫<sup>1)</sup>, 大腸·直腸癌<sup>2)</sup>, 肝細胞癌<sup>3)</sup> 및 膽管細胞癌<sup>4)</sup>을 유발하며 日本住血吸虫은 肝細胞癌<sup>5)</sup>을, 빌하르쯔住血吸虫은 卵巢奇形腫<sup>4)</sup> 및 膀胱癌<sup>6)</sup>을, 그리고 肝蛭<sup>7)</sup>과 泰國肝吸虫<sup>8)</sup>은 膽管細胞癌의 原因이 된다고 알려져 있다. 特히 韓國을 비롯한 極東 및 東南亞에 濃厚하게 分布하고 있는 肝吸虫 (*Clonorchis sinensis*)은 膽管細胞癌의 發生과 깊이 關聯되고 있다함이 疫學的 調査<sup>9)10)</sup>와 病理組織學的 檢索結果<sup>10)11)</sup>를 根據로 強力하게 主張되어 왔다.

1900年 처음으로 Katsurada<sup>12)</sup>가 肝吸虫感染과 膽管細胞癌과의 關聯을 病理組織學的으로 記述하였으며 Liang 및 Tung<sup>13)</sup>은 中國에서 全 肝癌例의 26.3%와 全 剖檢例의 1.2%가, 그리고 Hou<sup>14)</sup>는 肝吸虫症의 蔓延地인 Hong Kong에서 原發性 肝癌의 15%가 肝吸虫症에 罹患되어 있었다고 報告하였고 Gibson 및 Sun<sup>15)</sup>은 역시 Hong Kong에서 肝細胞癌과 膽管細胞癌의 發見 頻度 對比는 6:1이었다 하였다.

우리나라에 있어서도 朴<sup>16)</sup>을 위시하여 金等<sup>10)</sup>, 정<sup>17)</sup>, 정 및 이<sup>9)</sup> 등에 의하여 肝吸虫症과 膽管細胞癌의 相關性을 疫學的 혹은 病理組織學的方法으로 追究한 바 있거니와 最近 민 및 소<sup>18)</sup>는 原發性 肝癌 102例 가운데 肝細胞癌 및 膽管細胞癌의 比對가 16.0:1이었으며 膽管細胞癌 中 非肝吸虫症例 및 肝吸虫合併例의 比對는 4.6:1이었고 肝吸虫症 蔓延地域에 있어 膽管細胞癌의 發生頻도가 越等히 높았다고 報告하였다.

이와 같이 肝吸虫이 膽管細胞癌을 頻繁히 誘發하는 原因 및 機轉을 解明하기 위하여 고양이<sup>19)20)</sup>, 개<sup>21)</sup>, hamster<sup>22)</sup>, 白鼠<sup>23)</sup>, guinea pig<sup>24)</sup>, 마우스<sup>25)</sup> 등을 使用한 實驗이 遂行된 바 있다. 그 結果 이들 兩者間의 相關性을 強하게 뒷받침하는 共通의 病理所見으로서 膽管上皮細

胞의 增殖, 腺腫性 增殖, 粘液細胞化生 및 膽管周圍組織의 纖維化 등이 提示되었으나 癌發生機轉의 올바른 糾明은 아직도 이루어지지 못한 實情에 있다.

이에 著者들은 肝吸虫感染이 原發性 肝癌을 誘發하는 根本性狀을 解明하는데 보다 接近할 수 있는 基礎 知見을 얻을 目的으로 마우스를 使用하여 感染早期에 있어 短時日別 膽管系 變化를 觀察하였다.

## 材料 및 方法

實驗動物: 雄性的의 平均體重 20.5 gm 되는 健康한 BA-LB/C 마우스를 使用하였으며 市販飼料로 飼育하였다.

感染被囊幼虫: 洛東江 下流에 位置한 下端 流域産 참붕어 (*Pseudorasbora parva*)로부터 人工消化法을 利用, 肝吸虫 被囊幼虫을 分離하였으며 各 마우스에게 約 500個씩 經口的으로 投與, 感染시켰다.

檢査方法: 感染後 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 및 28日째에 各 各 3마리씩 ether 麻醉로 犧牲시킨 後 開腹하여 肝·膽管系組織 全部를 摘出하였다. 摘出した 다음 所定の 脫水過程을 거쳐 paraffin으로 包埋, 7μ 두께의 切片을 만들어 hematoxylin-eosin으로 染色하여 光學顯微鏡으로 觀察하였다.

## 成 績

感染後 第3日로부터 第28日 까지에 觀察된 病理組織學的의 所見은 Table 1과 같이 要約되었다.

3日群: 肝內 膽管 및 門脈腔은 輕度の 擴張을 보였고 上皮細胞의 增殖, 乳頭狀 增殖 및 小膽管의 增殖 등이 輕度로 나타났다. 上皮細胞의 分裂 및 非定型化가 一部에서 觀察되었다. 間質組織에서는 輕한 炎症細胞의 浸潤이 보였다.

5日群: 膽管과 門脈腔은 中等度로 擴張되었으나 膽管上皮細胞의 增殖, 乳頭狀 增殖, 小膽管增殖 및 細胞分

Table 1. Histopathologic changes of the bile duct in mice experimentally infected with *Clonorchis sinensis*

Groups by Mouse day	Mouse No.	Epithelial cell				Inflammatory cell			Fibrosis	
		hyperplasia	mitosis	atypia	mucinous change	PMNL	eosinophil	CMNL	fibrosis	collagen fiber
3rd day	1	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-
	3	+	-	+	-	+	+	-	-	-
5th day	1	++	-	++	-	+	+	-	-	-
	2	+	-	+	-	+	+	-	-	-
	3	+	+	++	-	+	+	-	-	-
7th day	1	++	+	++	-	+	+	-	-	-
	2	++	++	++	-	+	+	-	-	-
	3	++	++	+++	-	+	++	+	+	-
10th day	1	++	+	++	+	++	++	+	+	-
	2	++	++	++	+	++	++	-	++	+
	3	+++	++	++	+	++	++	+	++	+
15th day	1	+++	+	++	++	++	++	+	++	+
	2	+++	+	++	++	++	++	+	++	+
	3	+++	+	++	++	++	++	+	++	+
20th day	1	+++	+	++	++	++	+++	+	++	+
	2	+++	+	++	++	++	+++	+	++	+
	3	+++	-	++	+++	+	+++	++	++	+
25th day	1	+++	-	++	+++	+	+++	++	++	+
	2	+++	+	++	+++	++	+++	++	++	+
	3	+++	+	+++	+++	++	++	++	+++	+
28th day	1	+++	+	+++	+++	++	+	++	++	+
	2	+++	-	+++	+++	+	++	++	++	+
	3	+++	-	++	+++	+	++	+	++	+

PMNL : Polymorphonuclear leucocyte, CMNL : Chronic mononuclear leucocyte

裂의 정도는 3日群의 것들과 大同小異하였으며 上皮細胞의 非定型化는 中等度の 所見을 보였다. 間質組織內 炎症細胞의 侵潤은 큰 變動 없었다.

7日群 : 膽管 및 門脈腔의 擴張程度는 5日群의 것과 類似하였으며 膽管上皮細胞의 增殖, 乳頭狀 增殖 및 腺腫性 增殖은 보다 뚜렷하여져 中等度の 所見을 보였고 細胞分裂 및 非定型化도 그 程度가 보다 增加된 所見을 보였다. 間質內 炎症細胞의 侵潤도 一部에 있어 보다 顯著해졌고 纖維化 所見이 보이기 始作하였다.

10日群 : 膽管 및 門脈腔은 한가지로 高度의 擴張을 보

였으며 上皮細胞의 增殖, 腺腫性 增殖 및 乳頭狀 增殖 등은 7日群의 것들과 類似하였다. 間質組織內 炎症細胞는 主로 多形核白血球 및 好酸球로서 中等度の 侵潤을 보였고 慢性 單核球가 出現되었다. 纖維化는 中等度の 進展을 보였으며 膠原纖維의 出現이 追加되었다. 이 時期에 있어 가장 特徵的인 것은 粘液細胞化生이었다.

15日群 : 上皮細胞의 增殖, 腺腫性 變化, 乳頭狀 增殖 周圍小膽管增殖 등은 高度의 水準을, 그리고 粘液細胞化生은 보다 현저해진 樣相을 各各 보였으나 間質內의 炎症細胞 및 纖維化는 10日群의 것들과 類似하였고 上

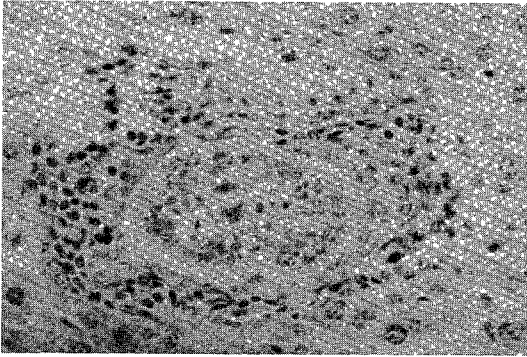


Fig. 1. On the 3rd day of infection, a larva is seen in the dilated lumen of distal branch of the bile duct and periductal stroma is infiltrated by inflammatory cells. H-E stain,  $\times 200$ .

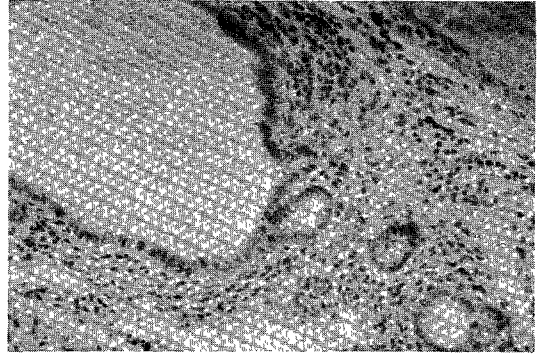


Fig. 2. On the 5th day of infection, a portal tract reveals a mild degree of bile duct proliferation and inflammatory cell infiltration. H-E stain,  $\times 100$ .

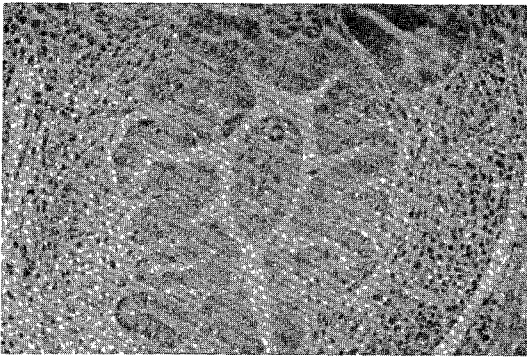


Fig. 3. On the 7th day of infection, a moderate degree of bile duct proliferation with periductal inflammatory cell infiltration and fibrosis is seen. H-E stain,  $\times 200$ .

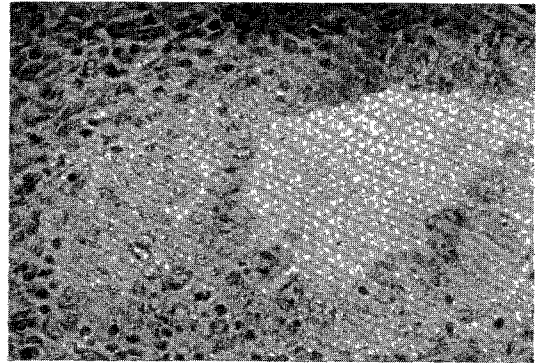


Fig. 4. On the 7th day of infection, the epithelial cells show increased nuclei with micronucleoli, and stratification. H-E stain,  $\times 400$ .

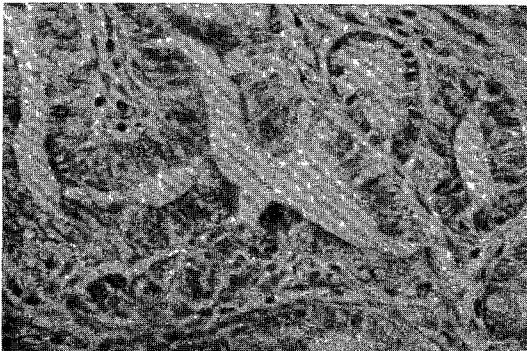


Fig. 5. On the 10th day of infection, a moderate degree of adenomatous tissue proliferation of the bile duct and cellular atypia are observed. Mucinous cells are also seen in some parts of the bile duct epithelium. H-E stain,  $\times 400$ .

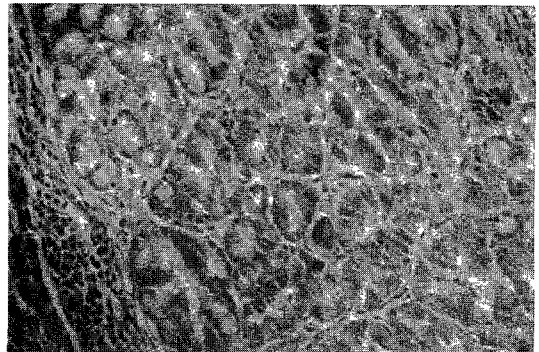


Fig. 6. On the 28th day of infection, epithelial cells show marked adenomatous tissue proliferation and remarkable mucinous cell metaplasia. H-E stain,  $\times 100$ .

皮細胞의 分裂程度와 非定型化는 若干 增加된 狀態로 持續되고 있었다.

20日群: 膽管上皮細胞의 諸般 變化는 보다 현저해졌고 粘液細胞化生은 中等度로 觀察되었으나 細胞分裂 및 非定型化 程度는 큰 變化없었다. 間質組織內의 炎症細胞는 好酸球의 增加가 高度로 觀察되었으나 纖維化는 15日群의 것들과 비슷하였다.

25日群: 膽管上皮細胞의 增殖, 腺腫性 增殖, 乳頭狀 增殖 및 小膽管增殖 等은 高度로 顯著해졌으며 粘液細胞化生도 最高의 水準으로 나타났다. 間質內 炎症細胞는 큰 變化가 없었으나 慢性 單核球가 보다 增加하였다.

28日群: 諸般所見은 25日群의 것들과 類似하였다.

感染後 3日째부터 虫體가 觀察되었으며 20日째 부터 成熟虫卵을 發見할 수 있었다. 또한 膽管의 擴張 및 上皮細胞의 諸變化는 虫體가 發見되지 않은 部位에 있어서도 同一한 所見을 보였다.

## 考 察

李等<sup>23)</sup>은 肝吸虫感染 3日後의 白鼠 膽管에서 虫體를 發見할 수 없었다 하였으나 家兔<sup>25)</sup>에서는 感染 10時間 後에, 그리고 마우스<sup>27)</sup>에서는 48時間 後에 各各 總輸膽管內에서 虫體가 發見된 바 있고 本 實驗에서도 感染後 3日째에 肝內膽管에서 發見되었다. 이와 같이 感染後 膽管內 幼虫의 出現時間은 動物의 種類와 感受性의 有無 및 높고 낮음에 따라 差異가 認定되나 마우스에서는 48時間 보다 훨씬 以前에 出現될 것으로 생각되며 白鼠에서도 感染後 3日째에 있어서의 膽管 및 門脈腔의 擴張, 間質組織 및 膽管周圍 炎症細胞의 出現等 一連의 變異를 考慮하면 이미 幼虫이 膽管系에 到着했을 것으로 믿어진다. 20日群으로부터 成熟虫卵이 發見된 바 이보다 앞서서 成虫이 되는 듯하며 家兔<sup>26)</sup>에서는 20日頃에 糞便內에서 虫卵이 檢出된다.

마우스에 있어 感染後 3日째에 觀察된 膽管 및 門脈腔의 擴張, 上皮細胞의 脫落 및 增殖, 腺腫性 變化 및 乳頭狀 增殖 等 諸所見은 고양이<sup>19)20)</sup>에서와 類似하게 膽管 및 間質內의 纖維化 出現 및 그 程度의 增加와 步調를 맞추어 顯著하여졌으며 10~15日 사이에 最高에 達하고, 以前 報告<sup>25)</sup>를 함께 考慮하면 膠原纖維가 高度 水準을 보이는 感染 4~5個月 後까지 持續되는 것으로 나타났다. 肝吸虫感染 마우스에 있어서의 이 期間은 肝吸虫이 成熟段階에 이르러 가장 活潑하게 活動하는 時期에 該當된다.

白鼠<sup>23)</sup>에서 7日 以後 觀察된 바 있는 膽管上皮細胞의 假重疊 및 扁平化生 所見은 마우스에서는 全 實驗期間을 통하여 發見할 수 없었다. 그러나 前實驗<sup>25)</sup>에서 感

染 1個月群 마우스로부터 重疊化를 發見한 바 있어 마우스에서도 이러한 變化는 分明히 惹起된다고 생각된다.

膽管上皮細胞의 分裂所見 및 非定型化는 感染後 3日째 부터 部分的으로 觀察되었는데 細胞分裂은 7~15日 사이에 比較的 分明했다가 漸次 減少되었고 非定型化는 5日째 부터 顯著히 增加, 25日째에 最高에 達하였던 바 이러한 所見은 白鼠<sup>23)</sup>에서도 大同小異하였다.

肝吸虫感染時 가장 두드러진 特徵의 變化所見은 膽管上皮細胞의 粘液細胞化生이다. 本 實驗에 있어어도 10日째부터 例外없이 粘液細胞化生이 觀察되었는데 이는 上皮細胞의 增殖, 腺腫性 變化 乃至 乳頭狀 增殖이 高度進行 所見을 보이기 始作하고 纖維化가 觀察되기 始作하는 時期에 나타나 經時的으로 急激히 增加하여 15日 以後 高度 水準에 達하는 樣相을 보였다. 이러한 所見은 長期感染實驗<sup>25)</sup>에 있어 上皮細胞의 增殖 및 腺腫性 增殖이 가장 현저하고 膠原纖維가 高度水準을 보이기 始作하는 感染後 4個月까지 持續되었다가 減少되었다.

李等<sup>23)</sup>은 白鼠를 使用한 12週間の 觀察期間을 통하여 上皮細胞의 粘液細胞化生 乃至 杯細胞의 出現을 볼 수 없었던 相異한 結果를 經驗하였다 하나 Chou 및 Gibson<sup>28)</sup>의 報告에 따르면 肝吸虫症에 있어 膽管上皮의 增殖, 腺腫性 增殖과 아울러 粘液細胞化生은 必發되는 主要 共通所見이며 이런 變化는 上皮細胞 惡性化의 한 段階로 考慮된다 하였다. 따라서 白鼠에서의 이들 所見에 關한 追試가 要望된다.

肝吸虫感染 마우스에 있어 感染後 28日째 까지의 早期에 觀察된 膽管系의 病理組織學的 所見과 以前에 報告한 関 및 韓<sup>25)</sup>의 觀察結果를 腫瘍 誘發可能性과 關聯시켜 함께 考慮할 때 以上과 같은 第3期 所見이 가장 顯著한 感染後 15日로부터 始作하여 4個月 까지의 期間이 매우 有意性있는 時期라고 推定된다.

## 結 論

肝吸虫症이 原發性 肝癌 特히 膽管細胞癌의 誘發要因이라는 意見에 同意를 表하면서 그 變化機轉을 解明하는데 必要한 資料를 얻기 爲하여 肝吸虫感染 마우스를 使用하여 感染後 28日까지의 早期 變化를 觀察하였던 바 그 結果는 다음과 같이 要約되었다.

1) 膽管 및 門脈腔은 感染後 3日째에 이미 擴張되었고 膽管上皮細胞의 增殖, 腺腫性 變化, 乳頭狀 增殖, 小膽管의 增殖 等을 觀察할 수 있었다.

2) 膽管上皮細胞의 諸所見은 感染後 7日째에 中等度 水準으로 뚜렷하게 進展되었으며 纖維化가 觀察되었다.

3) 感染後 10日째에는 早期부터 觀察된 多形核白血球

및 好酸球가 中等度로 增加하였고 慢性 單核球가 出現하였으며 纖維化도 中等度 所見을 보이면서 膠原纖維가 觀察되었다. 이와 同時的으로 膽管上皮細胞의 粘液細胞化生이 觀察되었다.

4) 感染後 15日째에는 膽管上皮細胞의 諸變化 및 粘液細胞化生이 보다 顯著해졌으며 이러한 所見은 25日째에 最高水準으로 觀察되었으며 28日째에도 繼續 維持되었다.

5) 感染後 15日째 以後 부터 原發性 肝癌의 誘發과 關聯하여 매우 有意性 있는 變化를 보였다고 생각되었다.

## REFERENCES

- 1) Andrade, Z.A. and Abreu, W.N.: Follicular lymphoma of the spleen in patients with hepatosplenic *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1971; 20: 237-242.
- 2) Earnshaw, F., Busuttill, A. and Ferguson, A.: Colorectal cancer; Relevance of colonic mucosal inflammation to aetiology. Recent Results in Cancer Res., 1982; 83: 31-35.
- 3) Cheever, A.W.: Schistosomiasis and neoplasia. J. Nat. Ca. Inst., 1978; 61: 13-18.
- 4) Greenwald, E.D., Greenwald, E.S. and Brenner, S.M.: Extrahepatic bile duct cancer. N.Y. State. J. Med., 1981; 81: 324-329.
- 5) Pesigan, T.P. and Beltran, A.M.: Studies on liver function in *Schistosoma japonica*. J. Parkistan Med. Ass., 1951; 27: 220-228.
- 6) Skrabanek, P. and Walsh: Bladder cancer. U.I.C.C. Tech. Rept. Ser. No. 60, 1981, p. 118.
- 7) Robbins, S.L.: Textbook of Pathology with Clinical application. Ed. 2, p. 335, W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1962.
- 8) Harinasuta, C. and Vajrasthira, S.: Opisthorchiasis in Thailand. Ann. Trop. Med., Parasit., 1960; 54: 100-105.
- 9) 정창수 · 이선경: 부산지방의 원발성 간암에 대한 역학적 연구. 대한병리학회지, 1976; 10(1): 33-46.
- 10) 金勇一 · 梁德鎬 · 張起呂: 韓國에 있어 肝吸虫症과 原發性 肝癌과의 相關關係. 서울의대잡지, 1974; 5(3): 247-255.
- 11) Hou, P.C.: The pathology of *Clonorchis sinensis* infestation of the liver. J. Path. Bact., 1955; 70: 53-63.
- 12) Katsurada, F.: Beitrag zur Kenntnis des *Distomum spathulatum*. Beitrage zur Pathologische Anat. u. zur Allege. Path., 1900; 28: 479-505.
- 13) Liang, P.C. and Tung, C.: Morphologic study and etiology of primary liver carcinoma and its incidence in China. Chinese Med. J., 1959; 79: 336-374.
- 14) Hou, P.C.: The relationship between primary carcinoma of the liver and infestation with *Clonorchis sinensis*. J. Path. Bact., 1956; 72: 239-246.
- 15) Gibson, J.B. and Sun, T.: Clonorchiasis in pathology of protozoal and helminthic diseases. Marcial-Roias Ed., pp. 546-566, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1971.
- 16) 朴斗福: 원발성 간장암의 통계적 고찰. 부산대학교 10주년 기념논문집, 1956; 399-405.
- 17) 정갑년: 부산지방에서 관찰된 원발성 간암에 대한 병리학적 연구—특히 간디스토마 감염을 고려하여. 부산의대잡지, 1975; 15(1): 217-227.
- 18) 민흥기 · 소진탁: 원발성 간암환자에 있어서의 肝吸虫感染의 疫學的 調査. 梨花醫大誌, 1980; 3(4): 163-167.
- 19) Hou, P.C.: Primary carcinoma of bile duct of the liver of cat infested with *Clonorchis sinensis*. J. Path. Bact., 1964; 87: 239-244.
- 20) Hou, P.C.: Pathological changes in the intrahepatic bile ducts of cats (*Felis catus*) infested with *Clonorchis sinensis*. J. Path. Bact., 1965; 89: 357-364.
- 21) Hou, P.C.: Hepatic clonorchiasis and carcinoma of the bile duct in a dog. J. Path. Bact., 1965; 89: 365-367.
- 22) Thamavit, W., Bhamarapavati, N., Sahaphong, S., Vajrasthira, S. and Angsubhakorn, S.: Effect of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini* infected Syrian golden hamsters. Cancer Res., 1978; 38: 4634-4639.
- 23) 李純炯 · 沈台燮 · 李相文 · 池堤根: 肝吸虫感染 白鼠 肝의 病理組織學的 變化. 기생충학잡지, 1978; 16(2): 148-155.
- 24) 李善容 · 李純炯 · 池堤根: 肝吸虫感染 guinea pig 에서의 肝細胞 및 膽管上皮細胞 微細構造의 變化. 기생충학잡지, 1978; 16(2): 88-102.
- 25) 閔弘基 · 韓雲燮: 肝吸虫症의 肝癌誘發 可能性에 關

- 한 研究. 梨花醫大誌, 1983; 6(3):139-148.
- 26) Komiya, Y. and Suzuki, N.: Biology of *Clonorchis sinensis*. In Progress of Medical Parasit. in Japan, 1964; 1:551-600.
- 27) 李中煥·徐丙高: 마우스 體內에 있어서의 肝吸虫 (*Clonorchis sinensis*)의 發育, 産卵能力 및 感受

- 性에 關한 研究. 寄生蟲學잡지, 1968; 6(3):101-109.
- 28) Chou, S.T. and Gibson, J.B.: The histochemistry of biliary mucins and changes caused by infection with *Clonorchis sinensis*. J.Path., 1970; 101:185-197.
-