

## 肝吸虫 感染白鼠 膽管의 病理組織學的 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 燮

= ABSTRACT =

### Bile Duct Changes in Albino-Rat Experimentally Infected with *Clonorchis sinensis*

Hong Ki Min\* and Woon Sup Han\*\*

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

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

The main objective of the present study is to identify the evidences of mucinous cell metaplasia and goblet cell metaplasia of the bile duct epithelial cells in rats. For the purpose, male albino-rats (Wistar strain) were infected with 100 *Clonorchis* metacercariae. On the scheduled day at one month interval from the end of the 1st month after infection up to the 15th month, three rats were sacrificed by general ether anesthesia. The hepatobiliary tissues were extracted, fixed in 10% formalin solution, sectioned serially and stained with haematoxylin and eosin for histopathologic examination. Alcian blue stain was also applied, if necessary.

The results obtained are summarized as follows ;

1) At the end of the 1st month after infection, the bile ducts showed marked epithelial cell hyperplasia, adenomatous tissue proliferation, papillary tissue formation, mitotic figures, atypia and stratification of epithelial cells. The periductal and portal spaces demonstrated a mild fibrosis with inflammatory cells consisted of majority of polymorphonuclear leucocytes and eosinophils.

2) From the 2nd month after infection, adenomatous hyperplastic glands demonstrated some focal mucinous cell metaplasia, with subsequently development of goblet cell metaplasia. Most of fibrosis were replaced by collagen fibers. Chro-

nic mononuclear leucocytes were dominating.

3) From the 4th month to the 6th month, all the pictures reached the zeniths in their degrees, and sustained the peaks up to the 10th month or 11th month, then the figures showed gradual regression.

## 緒 論

肝吸蟲 (*Clonorchis sinensis*)<sup>1)</sup> 또는 타이肝吸蟲 (*Opisthorchis viverrini*)<sup>2)</sup>에 感染된 人體에 있어 膽管上皮의 腺腫性 增殖, 粘液細胞化生 및 杯細胞化生은 必發되는 主要 病理組織學的 共通所見임이 確實하며 惡性化的 先行變化로 看做되고 있다.

動物實驗의 結果에 따르면 개<sup>3)</sup>와 고양이<sup>4,5)</sup>에 있어서는 人體에서와 同一한 病理의 所見과 膽管癌의 發生이 經驗되었으며 햄스터<sup>2)</sup>, 기니퓰<sup>6)</sup> 및 마우스<sup>7-10)</sup>에 있어서는 主要 病理組織學的 共通所見이 認證되었으나 上皮細胞 惡性化的 證據는 發見되지 않았다. 그러나 唯獨 白鼠<sup>11)</sup>에 있어서만은 粘液細胞化生 및 杯細胞化生在 觀察되지 않았다.

肝吸蟲感染의 膽管癌 誘發可能性과 關聯시켜 考慮할 때 白鼠에서 觀察된 이러한 所見이 單純히 實驗動物의 種의 差異에 起因된 것인지 혹은 다른 某種의 要因이 介在된 때문인지를 밝힐 追試의 必要性이 提示<sup>9)</sup>된 가운데 김<sup>12)</sup>은 肝吸蟲感染 白鼠를 使用, PAS 染色法의 適用으로 膽管上皮의 粘液細胞化生과 杯細胞化生 所見을 觀察할 수 있었다고 報告하였다.

이와 같은 白鼠에 있어서의 相反된 異見을 解消하는 한편 上皮細胞 惡性化的 根本性狀을 料明하는데 必要한 知見을 얻은 目的으로 本 實驗을 遂行하였다.

## 材 料 및 方 法

實驗動物: 體重 200 gm內외의 健康한 雄性 白鼠(Wistar strain)를 市販飼料로 飼育하면서 使用하였다.

肝吸蟲 被囊幼蟲: 洛東江 下流에 位置한 下流域産 참붕어로 부터 人工消化液을 利用하여 被囊幼蟲을 分離 하였으며 0.5ml當 約 100個가 包含되도록 生理的 食鹽 水로 調整, 感染에 使用하였다.

感染方法: 小口徑의 鐵製導管을 連結시킨 1.0ml의 투베르쿨린 注射器를 使用하여 被囊幼蟲 含有液 0.5ml를 各 白鼠에게 經口的으로 直接 胃內에 注入, 感染시켰다.

觀察方法: 感染 1個月 後부터 1個月 間隔으로 15個月에 걸쳐 3마리씩 ether 麻醉로 犧牲시켜 開腹한 後 肝·膽管系 組織을 摘出하여 10% 中性 호르말린 溶液에

固定, 所定の 脫水過程을 거쳐 파라핀에 包埋한 後 切片을 만들어 haematoxylin-eosin 染色과 alcian blue 染色을 並行, 光學顯微鏡으로 觀察하였고 月別로 觀察한 白鼠 膽管의 變化程度를 綜合, 評價하여 陰性(-), 輕微(±), 輕度(+), 中等度(++) 및 高度(+++)로 分類, 表記하였다.

## 成 績

感染 第1個月 從부터 第15個月 까지의 實驗期間 中 每月 觀察된 病理組織學的 變化所見은 Table 1에 表示한 바와 같았다.

第1個月 群: Haematoxylin-eosin 染色 및 alcian blue 染色 標本上 肝內膽管은 一般的으로 中等度 乃至 高度로 擴張되었고 膽管內에서 成蟲의 存在가 認定되었다. 이미 中等度 水準으로 進展된 肝內膽管의 腺腫性 增殖, 乳頭狀 組織形成 및 小膽管의 增殖 등이 觀察되었으며, 上皮細胞의 核分裂 所見 및 非定型性은 中等度로 나타났고 上皮細胞의 部分的인 重層化가 觀察되었다. 膽管周圍 및 門脈腔 間質內에서는 高度의 多形核白血球, 中等度의 好酸球 및 輕度의 慢性 單核白血球 등의 侵潤이 多樣하게 觀察되었으며 中等度의 纖維化와 輕度의 膠原纖維의 出現을 볼 수 있었다. 그러나 粘液細胞化生이나 杯細胞化生 所見은 認證할 수 없었다 (Fig. 1).

第2個月~第3個月 群: Haematoxylin-eosin 染色下에서는 腺腫性 增殖 및 乳頭狀 組織形成은 高度의 進展을 보였으며 餘他 所見의 程度는 第1個月 群의 것들과 大同小異하였다. 그러나 alcian blue 染色 標本에서는 焦點性 粘液細胞化生の 出現을 뚜렷하게 觀察할 수 있었으며 第3個月 群에서는 그 程度가 增加되었을 뿐만 아니라 杯細胞化生 所見도 部分的으로 認證되었다 (Fig. 2). 間質內의 急性 炎症細胞의 侵潤과 纖維化는 中等度 乃至 輕度 水準으로 減少된 反面 慢性 炎症細胞의 侵潤과 膠原纖維는 中等度로 增加되었다.

第4個月~第6個月 群: 兩 染色標本上 腺腫性 增殖 및 乳頭狀 組織形成의 程度는 第3個月 群의 것들과 類似하게 高度의 水準을, 그리고 核分裂 所見 및 非定型性은 中等度의 所見을 그대로 維持하고 있었으나 上皮細胞의 重層化, 粘液細胞化生 및 뒤늦게 出現한 杯細胞化生 등은 中等度의 水準으로 增加되었으며 膠原纖維는 絶頂에 이른 所見을 보였다. 餘他 所見은 以前의 것들과 大差없

Table 1. Histopathologic findings of the bile ducts in rats experimentally infected with 100 *Clonorchis metacercariae* ; based on three rats

Age of infection	Epithelial cell			Inflammatory cell			Fibrosis	Collagen fiber
	glandular hyperplasia	mucinous cell metaplasia	goblet cell metaplasia	PMNL	Eos.	CMNL		
1 month	‡	-	-	‡	‡	+	‡	+
2 months	‡‡	±	-	‡	‡	+	‡	+
3 months	‡‡	+	±	‡	+	‡	+	‡
4 months	‡‡	‡	+	+	+	‡	+	‡
5 months	‡‡	‡‡	‡	+	+	‡	+	‡
6 months	‡‡	‡‡	‡	+	+	‡	+	‡
7 months	‡‡	‡‡	‡‡	+	-	‡‡	+	‡
8 months	‡‡	‡‡	‡‡	+	-	‡‡	+	‡
9 months	‡‡	‡‡	‡‡	+	-	‡‡	+	‡
10 months	‡‡	‡‡	‡	+	-	‡	+	‡
11 months	‡‡	‡	‡	-	-	‡	+	‡
12 months	‡	+	+	-	-	‡	+	‡
13 months	‡	+	+	-	-	+	+	‡
14 months	‡	+	+	-	-	+	+	‡
15 months	‡	+	+	-	-	‡	+	‡

PMNL : Polymorphonuclear leucocyte, Eos. : Eosinophil, CMNL : Chronic mononuclear leucocyte  
 - : Negative, ± : Slight, + : Mild, ‡ : Moderate, ‡‡ : Severe

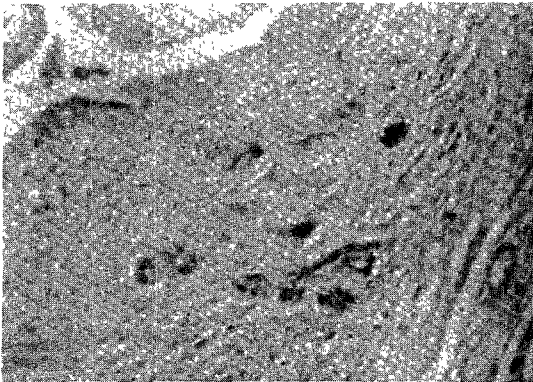


Fig. 1. At the 2nd month after infection, adenomatous hyperplastic glands showed some focal alcian blue positive areas indicating evidence of mucinous cell metaplasia (Alcian blue stain, ×100).

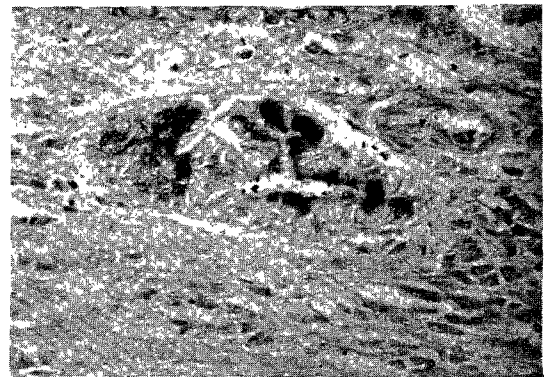


Fig. 2. At the 3rd month, adenomatous hyperplastic glands supported by connective tissue demonstrate a mild mucinous cell metaplasia and some goblet cell metaplasia (Alcian blue stain, ×400).

었다 (Fig. 3).

第7個月以後群 : 中等度 또는 高度水準의 所見을 보였던 모든 變化樣相은 第10 및 第11個月以後 徐徐히 또는 顯著히 減退되었으며 膠原纖維만은 如前하게 高度로 觀察되었다.

### 考 察

人體에 있어서의 肝吸蟲症 또는 타이肝吸蟲症을 同伴한 原發性 肝癌例은 大部分의 境遇 膽管癌이며 主要病

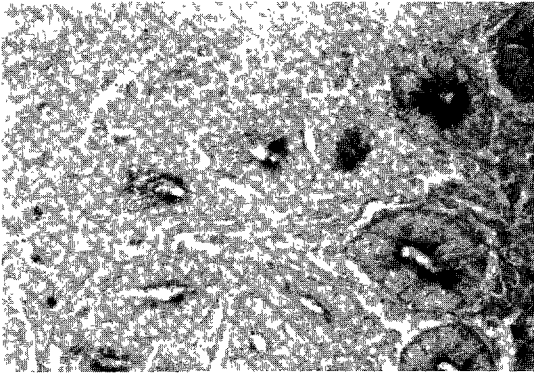


Fig. 3. At the 4th month, the bile ducts revealed definite mucinous cell metaplasia and goblet cell metaplasia in adenomatous hyperplastic glands (Alcian blue stain,  $\times 400$ ).

理組織學的의 所見은 第2次 膽管 上皮細胞의 顯著한 增殖, 腺腫性 增殖, 過量의 粘液分泌를 隨伴하는 粘液細胞化生 및 杯細胞化生, 그리고 膽管周圍 및 門脈腔의 纖維化等<sup>1)9)</sup>이며, 이런 境遇의 膽管癌은 形態學的으로 粘液物質의 旺盛한 分泌가 特徵的이어서 肝吸蟲症을 同伴하지 않은 膽管癌과의 鑑別이 可能한 것으로 理解되고 있다<sup>13)</sup>.

또한 肝吸蟲의 自然感染 또는 實驗的 感染 고양이와 개의 觀察로 發見된 原發性 肝癌<sup>3)4)5)</sup>도 特徵的인 粘液分泌性 膽管癌이었으며 그 病變의 進行樣相이나 性質 및 形態學的 構造 등이 人體의 것과 同一한 것으로 報告된 바 있으며 肝吸蟲症에 있어서의 膽管上皮의 增殖, 腺腫性 增殖, 粘液細胞化生 및 杯細胞化生 등은 必發되는 主要 病理組織學的 共通所見인 同時 上皮細胞 惡性化의 前段階<sup>1)</sup>로 考慮되고 있다.

그러나 李等<sup>6)</sup>은 기니픽을, 그리고 閔 및 韓<sup>7)8)10)</sup>은 마우스를 使用한 肝吸蟲 感染實驗에서, 그리고 Bhamrapravati等<sup>2)</sup>은 햄스터를 使用한 타이 肝吸蟲 感染 觀察에서 各各 膽管 上皮細胞의 顯著한 增殖, 腺腫性 增殖, 粘液細胞化生, 杯細胞化生, 膽管壁의 纖維化 등을 經驗할 수 있었으나 上皮細胞의 惡性化 證據는 發見할 수 없었다.

더우기 李等<sup>11)</sup>은 12週間에 걸친 肝吸蟲 感染 白鼠의 觀察에서 膽管 上皮細胞의 增殖 및 腺腫性 增殖를 包含하여 細胞核의 非定型의 濃染像, 上皮細胞의 扁平化, 重層化, 角質化, 合胞細胞 및 巢 모양 形成, 膽管周圍의 纖維化, 間質內의 硝子化 結締組織 增殖 등을 볼 수 있었으나 上皮細胞 惡性化는 勿論 上記 動物들에서와는 달리 粘液細胞化生과 杯細胞化生 所見조차 經驗할 수 없었다고 報告함으로써 果然 白鼠에서의 이러한 結果가 單純히 動物의 種의 差異에 起因된 것인지 또는 다른 要因의 介在에

依한 것인지 그 與否가 解明되어야 할 課題로 提示되었다.

이러한 過去의 實驗的 觀察 所見을 根據로 김<sup>12)</sup>은 肝吸蟲 感染 白鼠의 膽管變化를 heamatoxylin-eosin 染色과 PAS 染色을 通하여 觀察하였던 바, 感染後 第1個月째에 이미 膽管은 擴張되었고 間質內의 多形核白血球, 好酸球, 慢性 單核白血球, 纖維化 및 膠原纖維의 增殖 등을 隨伴한 上皮細胞의 增殖, 腺腫性 增殖, 乳頭狀 組織 形成, 細胞의 核分裂 所見, 濃染된 核, 非定型性, 部分的인 重層化 등이 多樣하게 觀察되었으며, 特히 第2個月 째에는 PAS 染色標本上 焦點性 粘液細胞의 出現이 認證되었고 杯細胞化生이 뒤따라 나타났으며, 그 程度가 經時的으로 增加된 樣相을 보임으로써 白鼠에서도 粘液細胞化生 및 杯細胞化生이 惹起된다고 報告하였다.

Alcian blue 染色法을 適用한 本 實驗的 追試에 있어서도 感染 第2個月째 부터 輕微하나마 分明한 焦點性 陽性 反應을 보이기 始作하여 第3個月 以後에 있어서는 haematoxylin-eosin 染色標本에서도 粘液細胞化生 및 杯細胞化生이 觀察 可能하였으며 經時的으로 그 程度가 增加되었다가 第10 및 第11個月 以後에는 減退됨을 보임으로써 김<sup>12)</sup>의 成績과 매우 類似한 所見을 나타내었다. 더우기 alcian blue 染色標本에 있어 陽性 反應은 主된 第2次 膽管의 增殖性 上皮細胞層으로부터 遠隔된 部位의 新生 小膽管 上皮細胞로 부터 始作되어 經時的으로 近位部에 나타나는 傾向을 보이고 있음은 特記할 만한 觀察 所見이라 생각된다. 또한 蟲體와 無關한 遠位部의 膽管에서도 同一한 陽性 反應, 卽 粘液細胞化生 및 杯細胞化生이 發見되었다.

本 實驗成績과 김<sup>12)</sup>의 成績에 따르면 白鼠에 있어서도 出現 및 消長 時期에 差異가 있을지언정 上皮細胞의 粘液細胞化生 및 杯細胞化生은 分明히 惹起되며 또한 以前의 實驗結果와 함께 考慮하면 肝吸蟲 感染은 動物 種의 差異에 關係없이 膽管의 腺腫性 增殖, 粘液細胞化生 및 杯細胞化生 등의 變化가 必發된다고 믿는다.

## 結 論

肝吸蟲症에 있어서의 膽管의 腺腫性 增殖, 粘液細胞化生 및 杯細胞化生 등은 必發되는 主要 病理組織學的 共通所見이며 上皮細胞 惡性化의 先行變化라 알려져 있으나, 唯獨 白鼠에서는 粘液細胞化生 및 杯細胞化生이 觀察되지 않았다는 報告를 接함으로써 이를 再確認하기 爲하여 alcian blue 染色法을 適用하여 觀察한 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 感染 第1個月째에 이미 中等度로 進行된 肝內 膽管의 腺腫性 增殖, 乳頭狀 組織 形成, 上皮細胞의 核分裂

非定型性 및 細胞의 重層化, 多様な 炎症細胞의 侵潤, 纖維化 등이 觀察되었다.

2) 感染 第2個月 째에 焦點性 陽性反應이, 그리고 第3個月 째에 輕度の 粘液細胞化生 및 輕微한 杯細胞化生이 觀察되었으며 經時的으로 그 程度가 增加되었다가 第11個月 以後 부터 減退되는 傾向이 뚜렷하였다.

3) 感染 第1個月 째에 高度 所見을 보였던 多形核 白血球 및 好酸球의 侵潤은 第3個月 째 以後 減退되는 反面 慢性 單核白血球로 代置되었으며, 膽管周圍 및 門脈腔의 纖維化는 第4個月 째 부터 大部分 膠原纖維로 代置되었다.

4) 全 實驗期間을 통하여 蟲體가 膽管內에서 發見되는데도 不拘하고 膠原纖維를 除外한 餘他 所見의 程度는 後期에 이르면서 原狀으로 回復하는 傾向을 볼 수 있었다.

## REFERENCES

- 1) Chou ST and Gibson JB: The histochemistry of biliary mucins and the changes caused by infestation with *Clonorchis sinensis*. J Path, 1970; 101:185-197.
- 2) Bhamarapravati N, Thamavit W and Vajrasthira S: Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. Am J Trop Med Hyg, 1978, 27:787-794.
- 3) Hou PC: Hepatic clonorchiasis and carcinoma of the bile duct in dog. J Path Bact, 1965 ; 89 : 365-367.
- 4) Hou PC: Primary carcinoma of bile duct of the liver of cat infested with *Clonorchis sinensis*. J Path Bact, 1964:87:239-244.
- 5) Hou PC: Pathological changes in the intrahepatic bile ducts of cats (*Felis catus*) infested with *Clonorchis sinensis*. J Path Bact, 1965 ; 89:357-364.
- 6) 李容善 · 李純炯 · 池堤根: 肝吸蟲感染 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.
- 7) 閔弘基 · 韓雲燮: 肝吸蟲症의 肝癌誘發 可能性에 關한 研究. 梨花醫大誌, 1983; 6(3): 139-148.
- 8) 閔弘基 · 韓雲燮: 肝吸蟲感染 마우스의 膽管系 早期 變化. 梨花醫大誌, 1984; 7(2): 63-68.
- 9) Min HK: The relationship between *Clonorchis sinensis* infection and cholangiocarcinoma. Yonsei Rept Trop Med, 1984; 15(1): 17-37.
- 10) 閔弘基 · 韓雲燮: 長期 肝吸蟲感染 마우스의 膽管系 變化. 梨花醫大誌, 1985; 8(1): 21-27.
- 11) 李純炯 · 沈台燮 · 李相文 · 池堤根: 肝吸蟲感染 白鼠 肝의 病理組織學的 變化. 기생충학잡지, 1978; 16(2) : 148-155.
- 12) 김희진: 백서에 있어 간흡충 감염의 담관암 유발 가능성에 관한 실험적 연구. 이화여자대학교 대학원 석사논문, 1984;
- 13) 金勇一 · 梁德鎬 · 張起昌: 韓國에 있어 肝吸蟲症과 原發性 肝癌과의 相關關係. 서울의대잡지, 1974; 5 (3): 247-255.