

Acetylcholinesterase 조직화학법으로 관찰한 *Fibricola seoulensis* 신경계의 분포

전은우, 김창환*

경상대학교 자연과학대학 생물학과

국문초록: *Fibricola seoulensis*의 피낭유충을 흰쥐에게 경구 감염시켜 3, 4, 5, 6, 7일 별로 부검 회수하여 생리 식염수로 씻은 후, 10% neutral formalin buffer에 고정 후 세척하였다. Acetylcholinesterase 염색은 기질로 acetylthiocholine iodide를 사용한 효소조직화학적 방법으로 피낭유충과 여러 성장 과정에 있는 총체의 신경계 분포 발달과정을 관찰하고 억제제로는 eserine, iso-OMPA, BW284C51를 사용하였다. 신경계는 피낭유충과 성충의 전반부 부위의 인두와 구흡반과 후반부의 배설 신경총을 연결하는 3쌍의 중주신경간과 그들을 연결하는 횡신경 연합과 환상신경 연합으로 구성되어 있으며, 다수의 환상신경 연합은 총체표면 가까이 위치한 중주신경간과도 연결되어 있다. 총체 발달의 모든 단계에서 구흡반 및 복흡반, 인두, 신경계에 acetylcholinesterase와 nonspecific cholinesterase의 염색반응이 관찰되었다. *F. seoulensis*의 acetylcholinesterase 동위효소 유형은 분자량 69 kDa, 132 kDa의 2개의 분획이 분리되었으며 그 중 69 kDa 분획대가 주분획을 이루었다.

서 론

*Fibricola seoulensis*는 흡충류(Trematoda: Diplostomatidae)의 한종으로 포유동물 중 설치류의 소장에 기생하는 기생충이며, 이것은 한국 서울에서 포획한 집쥐인 *Rattus norvegicus*의 소장에서 발견되어 처음으로 보고되었다(Seo et al., 1964). 그 이후 이 기생충은 전국적으로 분포하고 있다고 보고하였다(Seo et al., 1981).

*F. seoulensis*의 피낭유충을 흰쥐, 생쥐, 개 등에 인공 감염시켜 이들 숙주의 소장에서 성장한 성충을 얻었다고 보고하였으며(Hong, 1992; Hong et al., 1983), 이러한 동물들이 *F. seoulensis* 감염으로 자연계에서 보유숙주(reservoir host)가 되어 총란을 산출함으로써 감염원이 된다고 보고 하였다. 또한 *F. seoulensis*에 감염된 최초의 인체 기생증례는 Seo(1982) 등에 의해 보고되었다.

Schistosoma mansoni 성체의 추출물에서 acetylcholinesterase(AchE)와 choline acetylase의 활성도를 측정하여 이들 물질이 총체에 내포되고

있음이 보고 되었으며(Bueding, 1952), *Fasciola hepatica*에서는 acetylcholinesterase와 nonspecific cholinesterase가 총체내에 존재한다고 보고하였고(Kavavica et al., 1971), 또한 *S. mansoni* 성체에서 조직화학적으로 acetylcholinesterase의 존재를 최초로 보고하였다(Bueding et al., 1967).

Acetylcholine은 신경근 연결(neuromuscular junction)에서 흥분성 전달자로서 작용하는 물질이며 이러한 보고는 신경근 연결에 acetylcholinesterase의 활성이 있으며, acetylcholinesterase는 콜린 분비 신경연접(cholinergic synapses)에서 전달 물질인 acetylcholine의 분해에 가장 중요한 효소라고 보고하였다(Eränkő, 1973).

선충류 *Dipetalonema viteae*의 전자현미경에 의한 연구결과 신경환(nerve ring)의 축색축색연접(axo-axonal synapses)과 측기관구(amphids), 측미선구 유두(phasmids papillae), 두 유두(cephalic papillae)의 부위에서도 acetylcholinesterase의 활성이 존재하고 있음을 보고하였다(Mclaren, 1972).

많은 총체의 acetylcholinesterase에 대한 연구보고가 있으나 *F. seoulensis*의 acetylcholinesterase에 의한 신경계의 분포에 관한 연구보고는 없었다. 이에 본 연구에서는 *F. seoulensis*의 피낭유충과 성

* 논문접수 1993년 8월 21일, 수정재접수 9월 20일

* 별책 요청 저자

충으로 성장 발달하는 과정 중 acetylcholinesterase에 의한 신경계 분포를 조직화학적 방법으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. *F. seoulensis* 충체의 준비

*F. seoulensis*의 metacercariae를 얻기 위하여 뱀집에서 구입한 유희목이(*Rhabdophis tigrina*)의 장관막과 주위조직에 기생하고 있는 피낭유충을 적출하여 37°C로 12시간 동안 인공소화시켰다. 회수한 피낭유충 중 해부현미경 하에서 후반부의 원기(primordium)를 가지고 있으며 활발히 움직이는 것을 일부 골라 수집하여 흰쥐(*Wister imanichi*)에 인공구강 감염시킨 후 3, 4, 5, 6, 7일 별로 경과된 흰쥐를 부검하여 소장에서 *F. seoulensis* 충체를 회수하여 생리 식염수로 3회 세척 후에 10% neutral formalin buffer에 12시간 압착 고정된 후 세척하여 조직화학적 실험 재료로 사용하였다.

2. 충체의 균질 추출물액 준비

충체의 균질 추출물액의 준비는 회수한 *F. seoulensis* 충체를 생리식염수에 3회 세척한 후 homogenizer로 균질화한 후 0.01 M PBS(pH 7.4) 용액을 넣어 용해시키면서 균질화시킨 다음 다시 ultrasonicate(Braun sonic 1510, B-Braun Melsungen AG)로 100 watt에서 30초간 균질화하고 60초간 냉각시키는 과정을 10회 반복하였다. 이 과정이 끝난 후 0.01 M PBS(pH 7.4) 용액에서 4°C에 12시간 방치한 후 원심분리하여(15,000 rpm/1 hr/4°C) 상층액(supernatant)을 취하여 충체의 균질 추출물액으로 사용하였다. 이 추출물액의 단백질 정량은 Bradford(1976)의 방법을 참고로 Bio Rad Protein Assay Reagent(Richimond, California)를 사용하여 정량하였으며 단백질 함량은 3.1 mg/ml이었다.

3. Acetylcholinesterase의 효소조직화학적 방법

Acetylcholinesterase의 조직화학적 방법은 Karnovsky and Roots(1964)의 방법을 따라 고정된 충체를 4°C의 증류수로 6시간 세척한 후 4°C의

25%, 50% glycerol에 각각 6시간씩 처리 하였다. 처리한 재료를 0.1 M sucrose에 0.1 M sodium cacodylate가 들어있는 용액에 5분간 처리한 후 실온에서 1% CaCl₂에 1시간 30분 동안 처리 하였다. 실온에서 증류수로 5분간 세척한 후 3시간 동안 기질을 처리하여 반응 부위를 발색시켰다. 반응액은 기질인 acetylthiocholine iodide(Sigma) 5 mg을 0.1 M sodium hydrogen maleate buffer(pH 6.0) 6.5 ml에 녹인 다음 0.1 M sodium citrate 0.5 ml, 30 mM CuSO₄ 1 ml, D.W 1 ml, 5 mM potassium ferricyanide 1 ml을 순서대로 혼합하여 사용하였으며, 기질반응이 끝난 재료는 실온에서 20% Na₂SO₄에 5분간 처리함으로써 반응을 중단시켰다. 저해제(Inhibitor)는 eserine(Sigma), BW284C51(Sigma), iso-OMPA(Sigma)을 사용하였으며 이들로 기질 반응 120분 전에 전 처리한 후 기질 반응액과 반응시켜 대조 비교하였다.

4. 전기영동에 의한 AchE의 동위 효소 유형

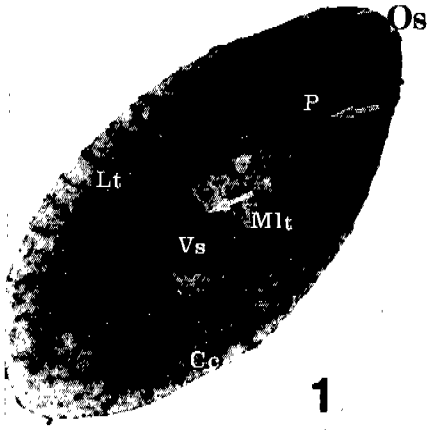
전기영동은 Davis(1964)법을 참고로하여 충체 균질 추출물액을 sample buffer에 1:4로 희석한 후 gel의 각 홈에 30 µl씩 주입하여 Mini Protean II set(Bio Rad)로 Bio Rad instruction manual에 따라 4% stacking gel과 7.5% separating gel을 이용하여 Tris-Glycine buffer(pH 8.3)용액으로 전개하였고 tracking dye는 0.01%(W/V) bromophenol blue 수용액을 사용하였다. 전개 전압은 stacking gel에서는 25 mA, separating gel에서는 50 mA를 통전하여 실온에서 1시간 전개시켰다. 전계가 끝난 gel은 Karnovsky and Roots(1964)의 방법에 따라 반응을 수행하였다.

결 과

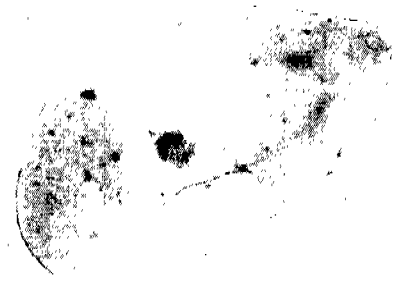
1. 피낭유충에서 AchE의 소재와 신경계의 분포

피낭유충의 신경계는 충체의 전반부 부위의 인두와 그 주위의 신경총(neural mass)에 강하게 염색이 되고 구획반 부위에 신경 분포가 많았으며 1쌍의 주 종주신경간(main longitudinal nerve trunks)과 2쌍의 종주신경간(longitudinal nerve trunks)도 염색이 되어 나타났다.

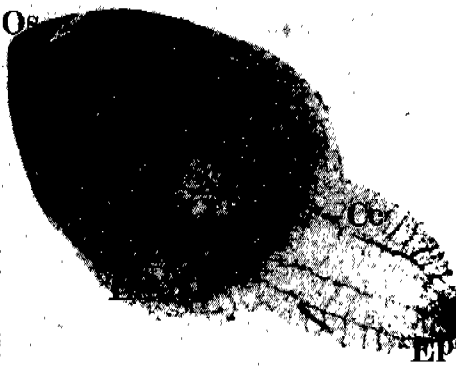
Fig. 1. Histochemical localization of acetylcholinesterase on metacercariae. Localization of AchE in metacercariae treated with substrate (Acetylthiocholine iodide). × 100. **Fig. 2.** Metacercariae treated with inhibitor, 10⁻⁴ M eserine for 1 hour at room temperature. × 100. **Fig. 3.** Histochemical localization of acetylcholinesterase on *F. seoulensis* developed in host for 6 days after infection. Localization of AchE in *F. seoulensis* treated with substrate (Acetylthiocholine iodide). × 40. **Fig. 4.** *F. seoulensis* developed in host for 6 days after infection treated with inhibitor, 10⁻⁴ M eserine for 1 hour at room temperature. × 40. **Fig. 5.** Histochemical localization of acetylcholinesterase on adult (7 days). Localization of AchE in *F. seoulensis* treated with substrate (Acetylthiocholine iodide). × 40. **Fig. 6.** *F. seoulensis* developed in host for 7 days after infection treated with inhibitor, 10⁻⁴ M eserine for 2 hour at room temperature. × 40.



1



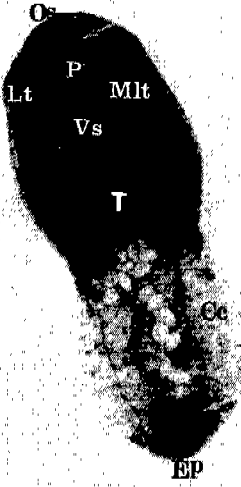
2



3



4



5



6

종주신경간의 3쌍은 횡신경연합(transverse commissure)에 연결되어 있고 다수의 환상신경연합(circular commissure)의 구조도 나타나며 총체 표면 가까이에 위치한 종주신경간과도 연결되어 있다. 또한 복흡반의 영역에서도 염색이 강하게 나타났다(Fig. 1). 10^{-4} M eserine으로 1시간 정온처리 하였을때는 기질반응에 대한 AchE의 반응은 거의 볼 수 없었으며(Fig. 2). 10^{-4} M iso-OMPA(a specific inhibitor of nonspecific cholinesterase)로 2시간 정온처리 하였을 때는 별다른 반응의 차이는 없으나 복흡반 부위에서 반응이 약하게 나타나 AchE의 존재가 적음을 알 수 있었다(Fig. 7). 그러나 10^{-4} M BW284C51(a specific inhibitor of acetylcholinesterase)로 2시간 정온처리 하였을 때는 복흡반, 구흡반, 인두 부위에서 강한 염색반응이 나와 nonspecific cholinesterase가 많이 분포하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 8).

AchE와 nonspecific cholinesterase의 조직적 분포는 구흡반, 인두, 신경계 등에 AchE가 많이 분포하고 있으며, nonspecific cholinesterase도 구흡반, 복흡반, 인두 등에서 많이 분포되어 있었다.

2. 각 발육단계에 있는 총체의 AchE의 소재와 신경계의 분포

인공 감염후 각각 3, 4, 5, 6일이 경과된 총체들은 성장함에 따라 총체의 후반부에 3쌍의 종주신경간과 환상 신경연합도 발달하여 나타났으며 피낭유충에서는 볼 수 없었던 흡착기관(tribocytic organ)과 배설신경총(excretory plexus)도 발달되었다. 특히 구흡반, 복흡반과 배설신경총에는 환상 신경연합이 매우 발달된 신경총을 형성하고 있었으며 전반적으로 피낭유충보다도 발육단계에서는 환상신경연합이 더욱 발달되어 복잡한 신경계 분포를 나타내고 있다(Fig. 3, 9, 13, 15, 16). 그러나 10^{-4} M eserine으로 2시간 정온처리 하였을때는 AchE 반응이 완전히 억제 되었으며(Fig. 10), 10^{-4} M iso-OMPA와 10^{-4} M BW284C51로 2시간 정온처리 하였을때는 정상기질 반응과는 다소의 차이가

있었다(Fig. 11, 12).

3. 성체에서 AchE의 소재와 신경계의 분포

인공 감염후 7일이 경과된 *F. seoulensis*의 성체에서는 매우 복잡하고 잘 발달된 신경계를 관찰할 수 있었다. 3쌍의 종주신경간은 횡신경연합에 연결되어 성체 전반부의 구흡반과 연결되어 있고 후반부는 배설신경총에 연결되어 있다.

성체의 표면 가까이에 위치한 종주신경간은 다수의 환상신경연합과의 연결이 관찰되며 배설신경총은 더욱 분화 발달되었고 인두와 주위의 신경총 또한 매우 발달되어 있다. 그리고 구흡반 및 복흡반에서도 강한 염색반응이 나타났다(Fig. 6).

성체의 신경계는 후반부 보다는 전반부에 더욱 발달되어 있으며 신경계의 주된 구성은 1쌍의 주종주신경간과 2쌍의 종주신경간으로 그들을 연결하는 횡신경연합과 다수의 환상 신경연합으로 구성되어 있다.

10^{-4} M eserine으로 2시간 정온처리 하였을 때는 AchE반응이 완전히 억제되었으며(Fig. 7), 10^{-4} M iso-OMPA로 2시간 정온처리 하였을때는 정상기질반응과는 반응의 차이가 별로 없었으나, 10^{-4} M BW284C51로 2시간 정온처리 하였을때는 종주신경간및 환상신경연합과 더불어 다른 부위에서도 반응의 차이가 다소 있었다.

*F. seoulensis*의 성장 발달에 따른 AchE의 조직적 분포는 Table 1에서와 같이 구흡반및 복흡반, 인두, 흡착기관, 신경계, 배설 신경총에 많이 분포한 반면 충란이나 외피에는 관찰할 수 없었다. 또한 식도에서도 AchE의 조직적 분포를 볼 수 없었다.

4. AchE의 동위효소 유형

*F. seoulensis*의 총체 균질 추출물액을 전기영동하여 Fig. 17에서와 같이 204 kDa에서 20 kDa까지 16개의 분획이 분리되었다. 그 중 acetylthiocholine iodide을 기질로 사용하여 AchE의 활성을 추적한 결과 69 kDa, 132 kDa 분자량을 가진 2개의 분획이 분리되었다.

Fig. 7. Metacercariae treated with inhibitor, 10^{-4} M iso-OMPA for 2 hour at room temperature. $\times 100$. **Fig. 8.** Metacercariae treated with inhibitor, 10^{-4} M BW284C51 for 2 hour at room temperature. $\times 100$. **Fig. 9.** Histochemical localization of acetylcholinesterase on *F. seoulensis* developed in host for 3 days after infection. Localization of AchE in *F. seoulensis* treated with substrate (Acetylthiocholine iodide). $\times 40$. **Fig. 10.** *F. seoulensis* developed in host for 3 days after infection treated with inhibitor, 10^{-4} M eserine for 2 hour at room temperature. $\times 40$. **Fig. 11.** *F. seoulensis* developed in host for 3 days after infection treated with inhibitor, 10^{-4} M iso-OMPA for 2 hour at room temperature. $\times 40$. **Fig. 12.** *F. seoulensis* developed in host for 3 days after infection treated with inhibitor, 10^{-4} M BW284C51 for 2 hour at room temperature. $\times 40$. **Fig. 13.** Histochemical localization of acetylcholinesterase on *F. seoulensis* developed in host for 4 days after infection. Localization of AchE in *F. seoulensis* treated with substrate (Acetylthiocholine iodide). $\times 40$. **Fig. 14.** *F. seoulensis* developed in host for 4 days after infection treated with inhibitor, 10^{-4} M eserine for 2 hour at room temperature. $\times 40$. Os: oral sucker, P: pharynx, Vs: ventral sucker, Nm: neural mass, Lt: Longitudinal nerve trunk, Mlt: main longitudinal nerve trunk, Cc: circular commissure, Ep: excretory plexus, T: tribocytic organ.

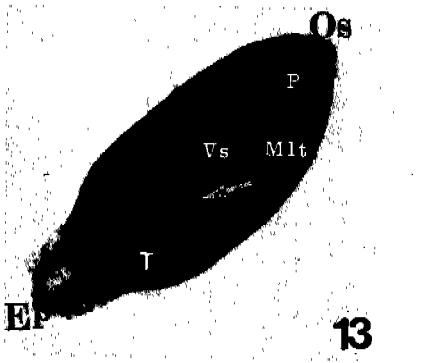
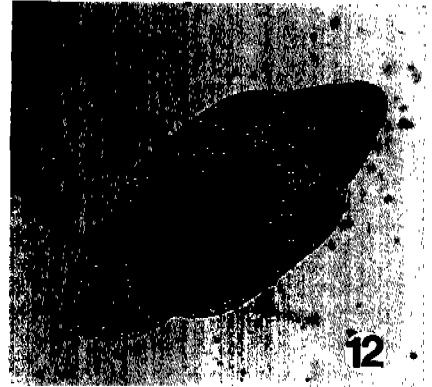
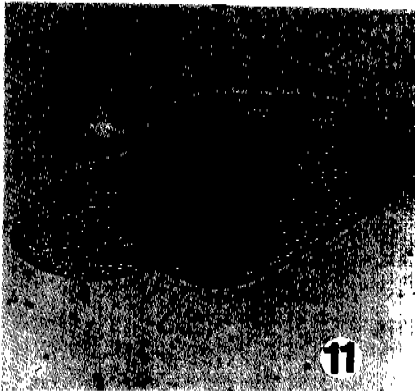
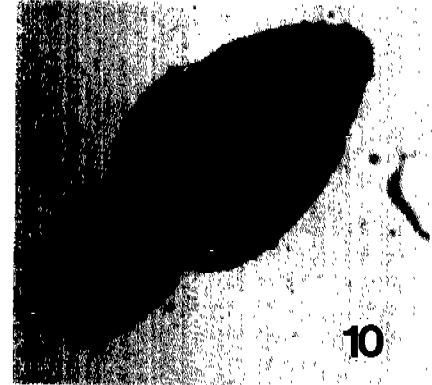
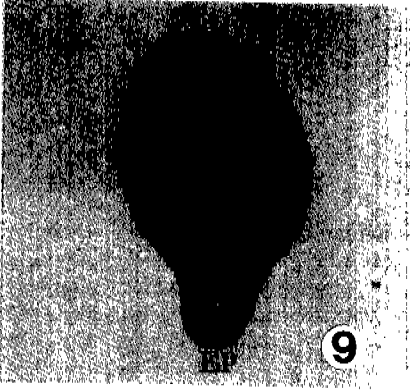
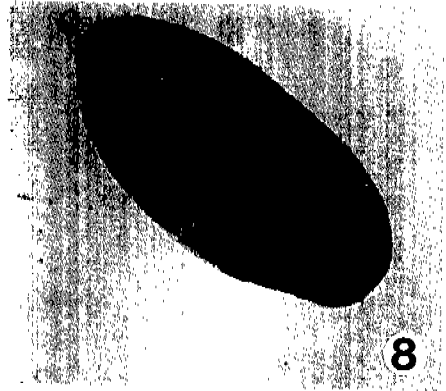
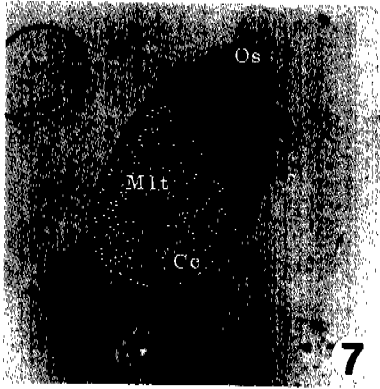




Fig. 15-16. Histochemical localization of acetylcholinesterase on *F. seoulensis* developed in host for 6 days after infection. Localization of AchE in anterior and posterior portion of developmental adult treated with substrate (Acetylthiocholine iodide). $\times 200$. Os: oral sucker, P: pharynx, Vs: ventral sucker, Nm: neural mass, Lt: longitudinal nerve trunk, Mlt: main longitudinal nerve trunk, Cc: circular commissure, Ep: excretory plexus, T: tribocytic organ.

그러나 이 2개의 분획은 AchE의 저해제인 10^{-4} M eserine과 10^{-4} M BW284C51로 1시간 동안 전 처리한 추출물액을 주입한 gel에서는 2개의 분획이 나타나지 않았다. 이러한 결과로 보아 AchE의 동위효소 유형은 2개이며 그 중 69 kDa의 분획이 주 분획을 이루었다.

고 찰

Acetylcholinesterase는 acetylcholine을 가수분해 하기 위해 콜린분비 신경연접에서 방출되어 시냅스 간극(synaptic cleft)에 존재하는 효소이다. 이 효소의 성분은 당단백질이며 이미 연구 보고된 대부분의 척추동물의 중추 말초신경계에 존재하며, 소포 체에서 합성되고 신경 세포체의 골지체 속에 저장되며(Rotundo, 1984). 세포외의 공간속으로 최후의 목적지로 향하여 내향축색수송계(the fast axonal transport system)에 의해 이동된다(Hammerschlag and Stone, 1982). 따라서 기생충의 생체내에 분포하고 있는 AchE는 콜린분비 신경연접에서 acetylcholine을 가수분해하는 중요한 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다.

AchE와 nonspecific cholinesterase는 *Fasciola* spp.에서 인두, 구흡반 및 복흡반, 뇌신경절, 신경계에 존재한다고 보고 된 바 있다(Probert and Durrani, 1976). 이는 본 실험의 결과에서도 *F.*

*seoulensis*는 인두와 구흡반 및 복흡반, 신경계에 AchE와 nonspecific cholinesterase가 존재하고 있어 Probert and Durrani(1976)의 보고와 일치 하였다.

AchE는 acetylthiocholine iodide 기질에 강한 염색반응이 나오며 eserine의 첨가시는 완전히 억제되고 iso-OMPA는 별 억제효과가 나타나지 않는다. 이와 같은 현상은 대부분의 효소 활성도가 AchE 때문이라고 설명 하였다(Burston, 1962). 본 연구에서도 AchE반응은 피낭유충에서는 10^{-4} M eserine을 1시간 전에 정온처리 하였을 때는 반응이 억제되었으나 숙주에 감염된 후 3, 4, 5, 6, 7일 경과한 후의 충체와 성체에서는 2시간으로 정온처리 시간을 연장함으로써 반응을 억제시켰다. 이는 충체가 성장함에 따라 표면 투과성이 감소했기 때문으로 생각되며 iso-OMPA의 처리시는 별다른 반응의 억제효과가 나타나지 않아 *F. seoulensis*의 신경계 분포 효소 활성도는 AchE의 효소 때문이라고 볼수 있다.

AchE의 동위효소 유형은 *Fasciola hepatica*에서 5개 분리되었고(Probert and Durrani, 1976). *Nippostrongylus brasiliensis*에서도 동위효소 유형이 5개 분리되었다(Edwards et al., 1971). 반면에 *Oesophagostomum venulosum*에서는 3개의 동위효소 유형이 분리되었고 같은 속이면서도 *O. radiatum*에서는 2개의 동위효소 유형이 분리되었다

(Ogilvie et al., 1973). 이러한 결과를 종합해 보면 동일한 속이라도 AchE의 동위효소 유형이 다양함을 알 수 있으며 *F. seoulensis* 종에서도 2개의 AchE의 동위효소 유형이 분리되었으며 2개의 분획

중 69 kDa의 분획이 주 분획을 형성하였다.

피낭유충과 성체의 신경계는 충체의 전반부 부위의 인두와 그 주위의 신경총에 강하게 염색이 되고 구흡반 부위에도 신경분포가 많았으며 1쌍의 주 종주신경간과 2쌍의 종주신경간도 염색이 되어 나타났다. 종주신경간의 3쌍은 횡신경연합에 연결되어 있고 다수의 환상신경연합의 구조도 종주신경간과도 연결되어 있다. 특히 피낭유충에서는 볼 수 없었던 홑작기관과 배설신경총이 발달하여 각 발육단계에 있는 충체와 성체에서 염색반응이 나왔으며 3쌍의 종주신경간은 횡신경연합에 연결되어 성체 전반부의 구흡반과 연결되어 있고 후반부는 배설신경총에 연결되어 있다. 전반적으로 피낭유충보다는 발육단계에 있는 충체와 성체의 신경계는 후반부보다는 전반부에 더욱 발달되어 있으며 환상신경연합이 더욱 발달되어 복잡한 신경계 분포를 나타내고 있다.

충체의 신경계 분포에 있어서 *Tetrathyridia* (Cestoda: mesocestoides) 유충에서는 2쌍의 주 종주신경간과 3쌍의 종주신경간으로 구성되어 있으며 (Hart, 1967). *S. mansoni*에서는 1쌍의 주 종주신경간과 2쌍의 종주신경간으로 구성되어 있다 (David and Marietta, 1974).

Hymenolepis diminuta (Cestoda: Cyclophyllidea)에서는 1쌍의 주 종주신경간과 4쌍의 종주신경간으로 구성되어 있으며 (Mckay et al., 1991). *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea)에서는 1쌍의 주 종주신경간과 2쌍의 종주신경간으로 구성되어 있다 (Magee et al., 1989). 본 연구에서 사용된 *F. seoulensis*의 신경계 분포는 1쌍의 주 종주신경간과 2쌍의 종주신경간으로 구성되어 있으며 횡신경연합과 다수의 환상 신경연합으로 연결되어 있다. 이러한 결과를 볼 때 종간의 신경계 구성분포는 종류에 따라 다소의 차이는 있으나 기본적인 신경계 구조는

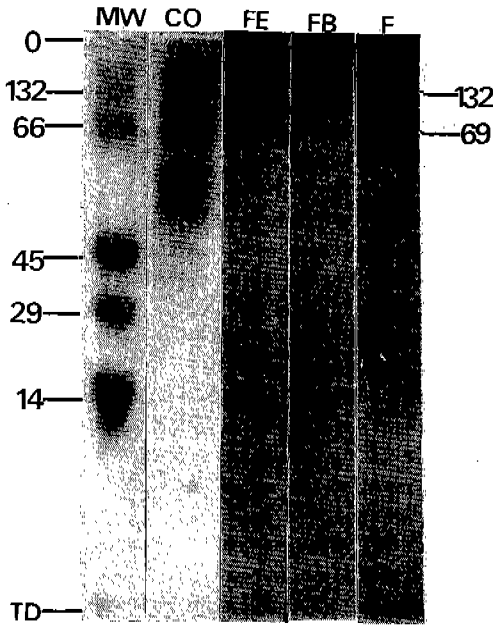


Fig. 17. Isozyme patterns of acetylcholinesterase of extracts of *F. seoulensis* by nondenatured PAGE. FE: Treated inhibitor (eserine 10^{-4} M) in extracts of *F. seoulensis*, FB: Treated inhibitor (BW284C51 10^{-4} M) in extracts of *F. seoulensis*, F: Extracts of *F. seoulensis* treated with substrate (Acetylthiocholine iodide), MW: marker protein, Co: comassie blue staining, TD: tracking dye

Table 1. The histochemical localization and relative intensity of acetylcholinesterase activity on developing *F. seoulensis* in host.

Region	Metacercariae	Age (days) of worms				
		3	4	5	6	7 (Adult)
Oral sucker	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Pharynx	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Ventral sucker	++	+++	+++	+++	+++	++++
Tribocytic organ	—	++++	+++	+++	++	++
Nervous system	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Excretory plexus	—	+	++	++	++	+++
Ovary	—	—	—	—	—	—
Esophagus	—	—	—	—	—	—
Tegument	—	—	—	—	—	—

Note: ++++ the most intensely stained, +++ intensely stained, ++ moderately stained, + slightly stained, — negative reaction.

서로 비슷하며 종마다 신경계 분포의 다양함을 알 수 있었다.

참고문헌

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Bueding E (1952) Acetylcholinesterase activity of *Schistosoma mansoni*. *Brit J Pharmacol* **7**: 563-566.

Bueding EL, Schiller, Bourgeois JG (1967) Some physiological, biochemical and morphologic effect of tris (p-aminophenyl) carbonium salt (TAC) on *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* **16**: 500-515.

Burstone MS (1962) Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. Academic Press New York.

David AB, Marietta V (1974) The nervous system of larval *Schistosoma mansoni* as revealed by acetylcholinesterase staining. *J Parasitol* **60**: 437-446.

Davis BJ (1964) Disc electrophoresis-II. Method and application to hummun serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* **121**: 404-427.

Edwards AJ, Burt JS, Ogilvie BM (1971) The effect of immunity upon some enzymes of the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology* **62**: 339-347.

Eränkö L (1973) Kinetic observation on cholinesterase activities of rat brain and sympathetic ganglion towards biochemical and histochemical substrates. *Acta Physiol* **88**: 71-83.

Hammerschlag R, Stome GC (1982) Membrane delivery by fast axonal transport. *Trends in Neuroscience* **5**: 12-15.

Hart JL (1967) Studies on the nervous system of *Tetrathyridia* (Cestoda: *mesocestoides*). *J Parasitol* **53**(5): 1032-1039.

Hong SJ, Lee SH, Seo BS, Hong ST, Chai JY (1983) Studies on intestinal trematodes in Korea IX. Recovery rate and development of *Fibricola seoulensis* in experimental animals. *Korean J Parasit* **21**(2): 224-233.

Hong ST (1982) Studies on intestinal trematodes in Korea VII. Growth, development and recovery of *Fibricola seoulensis* from experimentally infected rats and mice. *Korean J Parasit* **20**(2): 112-121.

Karnovsky MJ, Roots L (1964) A "direct-coloring"

thiocholine method for choline esterase. *J Histochem Cytochem* **12**: 219-221.

Kavavica S, Thommen H, Becejac S (1971) Localization and properties of cholinesterase in the liver fluke. 2nd *International liver fluke colloquium Wageningen* 73-74.

Magée RM, Fairweather I, Johnston CF, Halton DW, Shaw C (1989) Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the merre system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Parasitology* **98**: 227-238.

Mckay DM, Fairweather I, Johnston CF, Shaw C, Halton D (1991) Immunocytochemical and radioimmunometrical demonstration of serotonin-and neuropeptide-immunoreactivities in the adult rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidae). *Parasitology* **103**: 275-289.

Mclaren DJ (1972) Ultrastructural and cytochemical studies on the sensory organelles and nervous system of *Dipetalonema viteae* (Nematoda: Filarioidea). *Parasitology* **65**: 507-524.

Ogilvie BM, Rothwell TLW, Bremner KC, Schnitzerling HJ, Nolan J, Keith AK (1973) Acetylcholinesterase secretion by parasitic nematodes. I. Evidence for secretion of the enzyme by a number of species. *Intern J Parasitology* **3**: 589-597.

Probert AJ, Durrani (1976) *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Total cholinesterase, characteristics, and effect of specific inhibitors. *Exp Parasit* **42**: 203-210.

Rotundo RL (1984) Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Pro Natl Acad Sci USA* **81**: 479-483.

Seo BS, Lee SH, Hong ST, Hong SJ, Chi JG (1982) Pathologic findings of small itestinal mucosa of albino rat in *Fibricola seoulensis* infection. *Korean J Parasit* **20**(2): 231-232.

Seo BS, Cho SY, Hong ST, Hong SJ, Lee SH (1981) Studies on the parasitic helminths of Korea V. Survey on intestinal trematodes of house rats. *Korean J Parasit* **19**(2): 131-136.

Seo BS, Lee SH, Hong ST, Kim CY, Lee HY (1982) Studies on intestinal trematodes in Korea. V. A human case infected by *Fibricola seoulensis* (Trematoda: Diplostmatidae). *Korean J Parasit* **20**(2): 93-99.

Seo BS, Rim HJ, Lee CW (1964) Studies on the parasitic helminths of Korea. I. Trematodes of rodents. *Korean J Parasit* **2**(1): 20-26.

=Abstract=The nervous system of *Fibricola seoulensis* by acetylcholinesterase histochemistry

Eun-Woo Cheon and Chang-Hwan Kim*

Department of Biology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

F. seoulensis were obtained from artificially infected albino rats at 3, 4, 5, 6, 7 days after infection. The worms and metacercariae were washed in physiological saline solution, and fixed with 10% neutral formalin. The acetylcholinesterase (AChE) stained by enzyme histochemistry using acetylthiocholine iodide as substrate. Eserine, iso-OMPA and BW284C51 were used as inhibitors of AChE. The nervous system consists of three pairs longitudinal nerve trunks interconnected with excretory plexus in posterior half, and pharynx and oral sucker in anterior half of metacercariae and adults. The longitudinal nerve trunks are interconnected with transverse commissures and numerous circular commissures. Considerable numbers of circular commissures are interconnected with longitudinal nerve trunks lying on the surface of the worms. At each stage of juvenile worms, AChE and nonspecific cholinesterase activities were observed in the oral sucker, ventral sucker, pharynx and nerve system. Isozymes of AChE in *F. seoulensis* were separated into the two bands, 69 kDa and 132 kDa. The major band was 69 kDa.

Key words: *Fibricola seoulensis*, acetylcholinesterase (AChE), nonspecific cholinesterase, longitudinal nerve trunks, circular commissure, transverse commissure, isozyme

[Korean J. Parasit., 31(4): 321-329, December 1993]

*Corresponding author