

## 아프리카 왕달팽이(*Achatina fulica*) 뇌신경절의 면역조직화학적 연구

장 남 섭, 한 종 민

목원대학교 이공대학 생명과학부

### Immunohistochemical Study on the Cerebral Ganglion of African Giant Snail, *Achatina fulica*

Nam-Sub Chang and Jong-Min Han

Department of Biology, Mokwon University, Taejon 302-729, Korea

#### ABSTRACT

An immunohistochemical study on the cerebral ganglion of the African giant snail, *Achatina fulica*, was conducted by applying the AB/AY staining and the avidin-bovine-peroxidase complex staining methods.

The followings are the results obtained throughout the study.

The cerebral ganglion of *Achatina fulica* is an ellipsoidal body of 2 x 1 mm in size, which is connected by the cerebral commissure of 1 mm in diameter.

The cross-section through the cerebral ganglion, shaped like a butterfly, is divided into the medio-dorsal parts, the latero-dorsal parts, the caudo-dorsal parts, and the lateral lobes.

In the medio-dorsal and latero-dorsal parts, the LG cells and the DG cells are found mixed, although the LG cells are dominant. In lateral lobe, however, the Y cells are quite dominant, while the LG cells and the DG cells are seldom found.

The LG cells are 20-70  $\mu\text{m}$  in sizes and circular or ellipsoidal in shapes. They are stained light

green with the AB/AY. 1 - 3 nucleoli are found in karyolymph, where granular chromatin are evenly distributed. In cytoplasm, it is found that the secretory granules are evenly developed.

**Keywords :** Immunohistochemistry, *Achatina fulica*, Cerebral ganglion

#### 서 론

연체동물의 신경분비작용(neurosecretion)에 관한 연구는 1935년 Scharrer에 의해 시작된 이래 Bargmann(1949)과 Gabe(1953)는 Gomori염색법을 변용 신경분비세포와 이들의 분비작용을 연구하였으며, 1957년에는 Lever가 복족류 기안목(Basommatophora) *Ferrissia shimckii*를, 이어서 Joosse(1964), Boer(1965), Brink and Boer(1967) 그리고 Boer *et al.*(1968)은 병안목(Stylommatophora) *Lymnaea stagnalis*를 포함 기안목에 이어 병안목에서도 신경분비에 관한 여러 현상 등을 심도 있게 연구하게 되었다.

이처럼 1960년 후반까지는 신경분비작용을 전통적인 조직화학적 방법과 미세구조적 방법으로만 이루어져 신경분비세포를 찾아내고 분비기전을 이해하는 데는 많은 어려움이 있었다.

그러나 Wendelaar-Bonga(1970)와 Peute *et al.*(1967)이 개발한 AB/AY 염색법과 Romeis(1968) 염색법을 이용 *Lymnaea stagnalis*의 신경분비세포의 종류를 분류하는데 성공하였으며, 최근에는 면역세포화학법(Immunocytochemical method)인 anti-bovine-insulin antibody를 이용, LG세포와 Canopy세포가 insulin-

Received April 26, 1999; Accepted May 21, 1999

Corresponding author: Chang, Nam-Sub

Tel: (82) 42-829-7582; e-mail: nschang@home.mokwon.ac.kr  
1225-3480/15101

© The Malacological Society of Korea

related peptide를 합성하고, 개체의 성숙과 성장에 관여하고 있음이 확인되었다(Minnen and Schallig, 1990).

그러나 이와 같은 연구는 소수의 복족류(Gastropoda)에만 국한되고 신경분비세포가 분포하고 있는 신경절(뇌신경절, 복막신경절, 체벽신경절 그리고 내장신경절 등) 등의 전반적인 구조와 이에 따른 신경분비세포들의 분포상황을 균형있게 연구한 논문은 매우 드문 실정이다. 이에 본 연구에서는 특히 식용으로 널리 이용되고 있는 아프리카 왕달팽이, *Achatina fulica*를 재료로, AB/AY 염색법(alcian blue-alcian yellow double staining)과 면역조직화학법인 rabbit anti-somatostatin antibody를 이용 신경절 중 가장 중심이 되는 뇌신경절(cerebral ganglion)로부터 신경분비세포의 종류 및 성장호르몬 생성에 관여하는 세포의 분포상태를 연구하고자 본 연구를 시도케 되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

1998년 10월 경기도 근교의 달팽이 사육농원에서 왕달팽이(*Achatina fulica*)를 실험실로 옮겨 사육관찰한 후 실험재료로 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 조직화학적 실험

아프리카 왕달팽이를 30% ethanol로 마취시킨 다음 측각 아래 머리부위를 절개하여 뇌신경절을 적출 하였으며, 실험에 사용할 수 있도록 적당한 크기로 잘라낸 후, 10% buffered neutral formalin으로 1일간 고정하였다. 이어 0.2 M phosphate buffer(pH 7.3)로 3회 세척하고 ethanol 농도 순으로 탈수시킨 후 통상법에 따라 경질 파라핀(58°C)으로 포매하였다. 단 AB/AY 염색을 위해서는 ethanol과 amyl-acetate 농도순으로 탈수 및 치환시켰다. 파라핀 블록은 rotary microtome(Leica Jung histocut 820)을 사용하여 7  $\mu$ m 두께로 얇은 박편을 만들었으며, 신경분비세포의 화학적 성분 확인을 위해서 여러 가지 염색을 수행하였다. 염색된 시료는 카메라가 부착된 BHS Olympus 자동노출 광학 현미경을 사용 촬영하였다. 또한 신경분비세포의 화학적 성분확인을 위해 다음과 같은 염색법을 사용하였다. Harris hematoxylin-eosin double staining(일반적구조와 호산성물질 확인), methylene blue-basic fuchsin double staining(호염기성물질 확인), Peute et al.(1967)과 Romeis(1968)의 alcian blue-alcian yellow double staining(신경분비세포 확인).

#### 2) 면역화학적 실험

파라핀 포매조직을 5  $\mu$ m 두께로 박절하여 gelatin-coated slide에 부착시킨 다음 xylene으로 파라핀을 제거하였다. 100%와 95% ethanol로 탈수시킨 다음 실온에서 0.5 M Tris-HCl buffer(pH 7.2-7.6)에 5분간 처리하였다. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 실온에서 5분간 처리하여 비특이성 반응을 억제시킨 후 항원(somatostatin)에 대한 일차 항체를 조직위에 떨어뜨리고 실온에서 1시간 30분간 반응시켰다. Somatostatin에 대한 일차 항체는 polyclonal antibody인 rabbit anti-rat somatostatin(BioGenex, San Ramon, CA 94583, USA)을 사용하였다. 최적염색을 위한 희석배율을 정하기 위하여 정상대조군을 대상으로, 항원의 항체는 10, 50, 100, 200, 500으로 희석하여 각기 염색하였다. Somatostatin은 50배 희석에서 각기 최적의 염색정도를 보여 이 비율로 희석하여 사용하였다. 면역조직화학 염색은 LSAB2 Kit(DAKO Co., CA K0677, USA)를 사용하여 ABC(avidin-biotin-peroxidase complex) 방법으로 염색하였다. Link antibody 용액을 첨가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 각 단계와 단계 사이에는 0.5M Tris-HCl buffer(pH 7.2-7.6)로 2회씩 세척하여 각 단계에서 여분의 항체를 제거하였다.

마지막으로 ABC substrate-chromogen 용액을 첨가하여 실온에서 10분간 처치한 후 증류수로 세척하였다. 염색과정이 끝난 후 hematoxylin시약을 사용하여 핵에 대한 대조염색을 시행하였다. 또한 각 예마다 일차항체 대신 음성대조군 용액(antibody negative control)을 사용하여 염색을 병행하였다. 갈색이나 붉은색으로 염색된 경우를 양성으로 판정하였다.

## 결 과

아프리카 왕달팽이 뇌신경절(cerebral ganglion)은 머리의 전단부에 있는 두 쌍의 측각하단에서 한 쌍의 등근 결절로 이루어져 있고 그 중앙은 대뇌교련부(cerebral commissure)에 의해 연결되어 있었다.

이들의 중단면은 날개를 편 나비 모습과 같았으며, 다양한 형태와 크기의 신경분비세포(neurosecretory cell)들이 신경절의 양측 중배부위(medio-dorsal parts), 미배부위(caudo-dorsal parts), 측배부위(latero-dorsal parts) 그리고 측엽부위(lateral lobes) 등에 집단을 이루면서 분포하였는데, 이들의 중앙에 있는 교련부는 굵은 신경섬유다발로 이루어져, 뇌신경절 양단부위를 연결하고 있었다(Figs. 1, 10).

뇌신경절을 H-E 이중염색(hematoxylin-eosin double staining)을 실시한 결과 hematoxylin에 강한 반응을 나

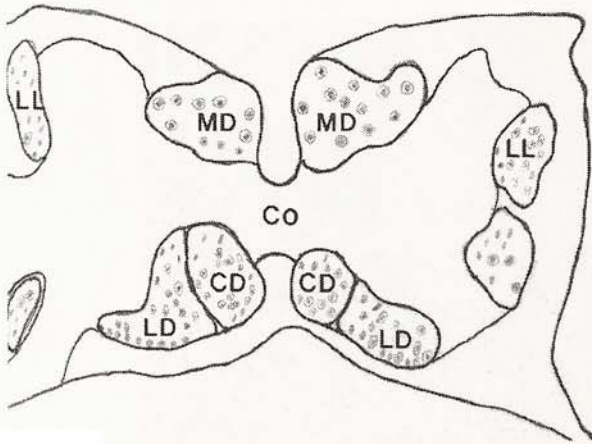


Fig. 1. A diagrammatic representation of the cerebral ganglion of *Achatina fulica* shaped like a butterfly. MD, medio-dorsal parts; LD, latero-dorsal parts; LL, lateral lobe; CD, caudo-dorsal parts; Co, cerebral commissure.

타내는 불규칙한 형태의 많은 작은 세포(3-7  $\mu\text{m}$ )들과 중등도 반응을 나타내는 비교적 둥글고 큰 세포(30-50  $\mu\text{m}$ )들로 이루어져 있으며(Figs. 2, 3, 17), 경우에 따라서는 대형세포(250 x 150  $\mu\text{m}$ )들도 일부 관찰되었다(Fig. 20).

특히 양측 중배부위에 위치한 세포(medio-dorsal cell, 이하 MD 세포; Fig. 11)들은 측배부위에 위치한 세포(latero-dorsal cell, LD 세포)나 미배부위에 위치한 세포(caudo-dorsal cell, CD 세포; Figs. 14, 16)들에 비해 크고 모양도 둥글거나 타원형 또는 불규칙형이 있다. 핵 또한 세포질에 비해 비교적 크고 염색질은 hematoxylin에 중등도로 반응을 나타내었다(Fig. 2).

양측 중배부위 사이와, 측엽부위에서는 중배부위와 측배부위에서 거의 관찰되지 않는 호산성(eosinophilia)의 작고 불규칙한 형태의 세포들이 고르게 분산되어 있거나(Fig. 12), 3-5개씩 군집을 이루면서 관찰되기도 했는데, 이들은 대부분 hematoxylin에 강하게 염색된 둥근핵을 내포하고 있었다(Fig. 3). 특히 측엽부위 세포들은 호산성 세포보다 작은 세포들로 세포전체가 hematoxylin에 강한 반응을 보인 반면(Fig. 13) 간혹 중배부위에서 볼 수 있는 둥글고 큰 세포가 단독으로 관찰되기도 하였다(Fig. 17).

측배부위의 LD 세포들은 양측에 분포한 세포들의 형태가 조금씩 달라서 상동성을 나타내는 중배부위의 MD 세포와는 약간 다른 양상이었다(Figs. 14, 16) 즉 오른쪽 LD 세포들은 대부분 크고 모양이 타원형인데(Figs. 14, 15) 비해, 왼쪽 LD 세포들은 비교적 작고 타원형이거나 불규칙한 모습을 보였다(Fig. 16).

뇌신경절을 alcian blue-alcian yellow 이중염색반응(Peute and van de Kamer, 1967)을 통해 관찰한 결과,

양측 중배부위와 측배부위 그리고 미배부위 등에서 다양한 염색반응을 보이는 4종류의 세포들이 나타났다. 즉, 양측 중배부위와 측배부위에서는 비교적 크고(20-70  $\mu\text{m}$ ) 밝은 녹색 세포(light green cell, 이하 LG 세포; Fig. 6)와 이들보다 약간 작은(직경 20-50  $\mu\text{m}$ ) 진한 녹색세포들(dark green cell, 이하 DG 세포; Fig. 7)만이 관찰된 데 비해, 양측 측엽부위(lateral lobe)에서는 LG 세포나 DG 세포는 거의 관찰되지 않고, H-E 이중염색에서는 eosinophilia를, AB/AY 염색에서는 노란색을 나타내는 비교적 둥글거나 타원형인(직경 25  $\mu\text{m}$ 정도) 작은 세포들만이 3-5개씩 무리지어 나타나는 특징을 보였다(Figs. 7, 17).

중배부위에서 주로 많이 관찰된 LG 세포는 m-b 이중염색(methylene blue-basic fuchsin double staining)에서는 밝게 관찰되는 타원형 또는 원형의 세포였다. 이들은 타원형 또는 원형의 핵을 소지하고 있었는데 염색질은 고른 과립상을 나타냈고 한 개 또는 여러 개의 둥근 인들을 소지하고 있었다. 또한 이들을 감싸고 있는 세포질은 비교적 투명하게 관찰되고, methylenophilia성인 다양한 형태의 과립들만이 무리지어 나타났다(Fig. 19).

DG 세포는 m-b 이중염색에서 강한 methylenophilia를 나타내어 비교적 검게 관찰된 세포로서 둥글거나 타원형을 하고 있었다. 이들은 LG 세포에 비해 작고, 세포질에 비해 핵은 약간 크며, 과립상의 염색질이 발달된 핵질속에는 인이 관찰되기도 하였다(Figs. 18, 19). 이들은 AB/AY 반응에서 진한 녹색으로 반응했으며 LG 세포와 혼재되어 나타났다(Figs. 6, 7). 또한 이들은 somatostatin 항체를 이용한 면역반응에서는 세포질이 붉게 염색되어 양성반응을 나타낸 반면, LG 세포는 별 반응을 나타내지 않았다(Figs. 4, 5).

BG 세포는 AB/AY 반응에서 청녹색을 띤 세포들로서 뇌신경절의 각 부위 주변부에서 드물게 관찰되었다(Fig. 16). 이들은 m-b 이중염색에서 강한 methylenophilia를 나타냈으며 작고 불규칙한 형태를 하고 있었다. 또한 핵의 모습도 불규칙하고 강한 methylenophilia를 나타내어 어둡게 관찰되었으며 인은 한 개 정도가 드물게 나타났다(Figs. 20, 21).

Y 세포는 AB/AY 반응에서 노랗게 관찰된 세포로서 대부분 집단을 이루며 둥글고 작은 모습을 하고 있었다. m-b 이중염색에서 이들은 투명하게 관찰되고 핵속의 이질염색질만이 methylenophilia를 나타내었다(Fig. 21). 이들의 분포는 양측 중배부위와 미배부위사이 그리고 양측 측엽부위 사이에서 많이 관찰되었는데 크기가 다른 두 종류가 확인되었다. 즉, 중배부위와 미배부위 사이에서 관찰된 세포들에 비해(Fig. 12) 측엽부위에서 관찰된 세포가 더 크고, 모양도 둥글었다(Fig. 3). 이 세포는 H-E 이중염색에서 eosinophilia를 나타내어 핑크빛이었으며, AB/AY 반응에서는 노란색을 나타내었다(Fig. 9). 이들은 3-5

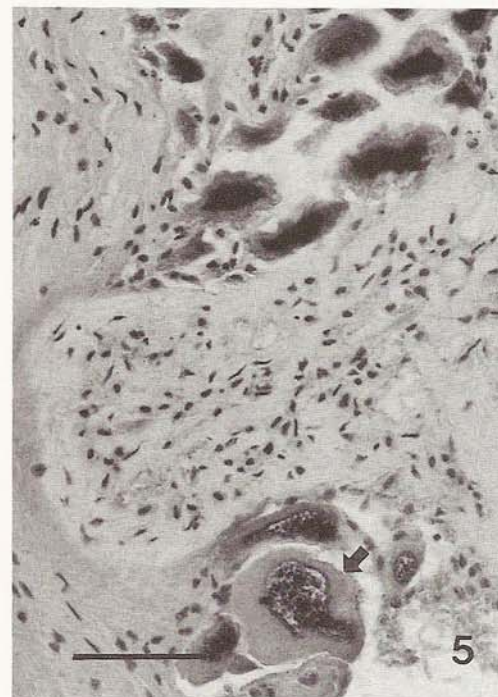
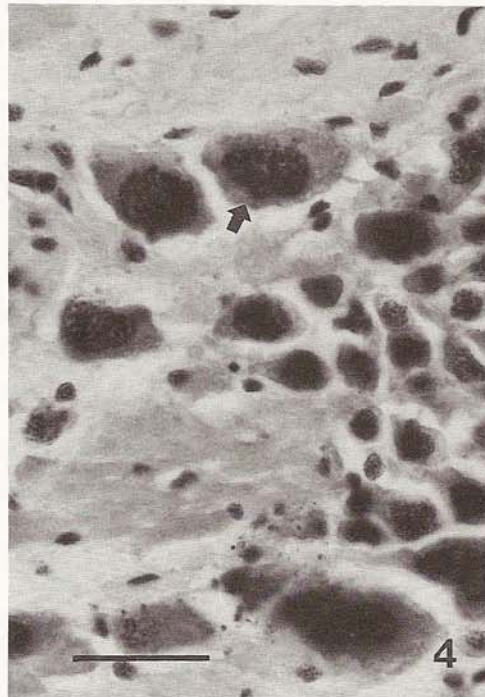
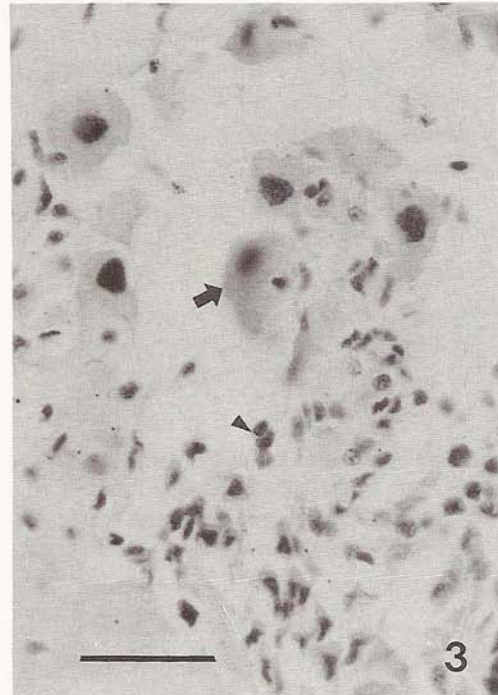
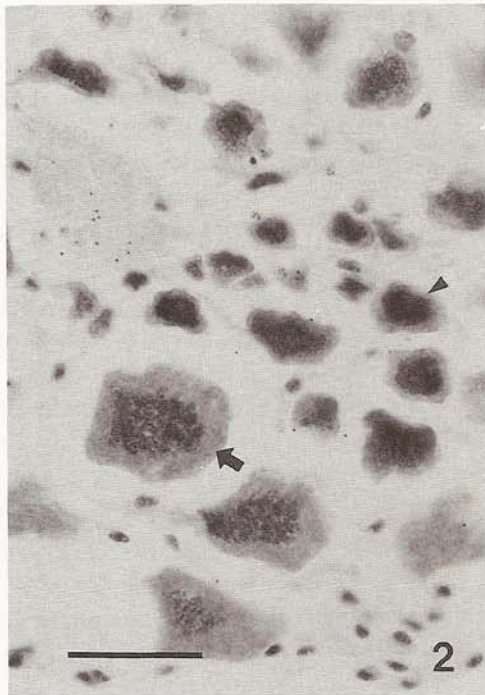
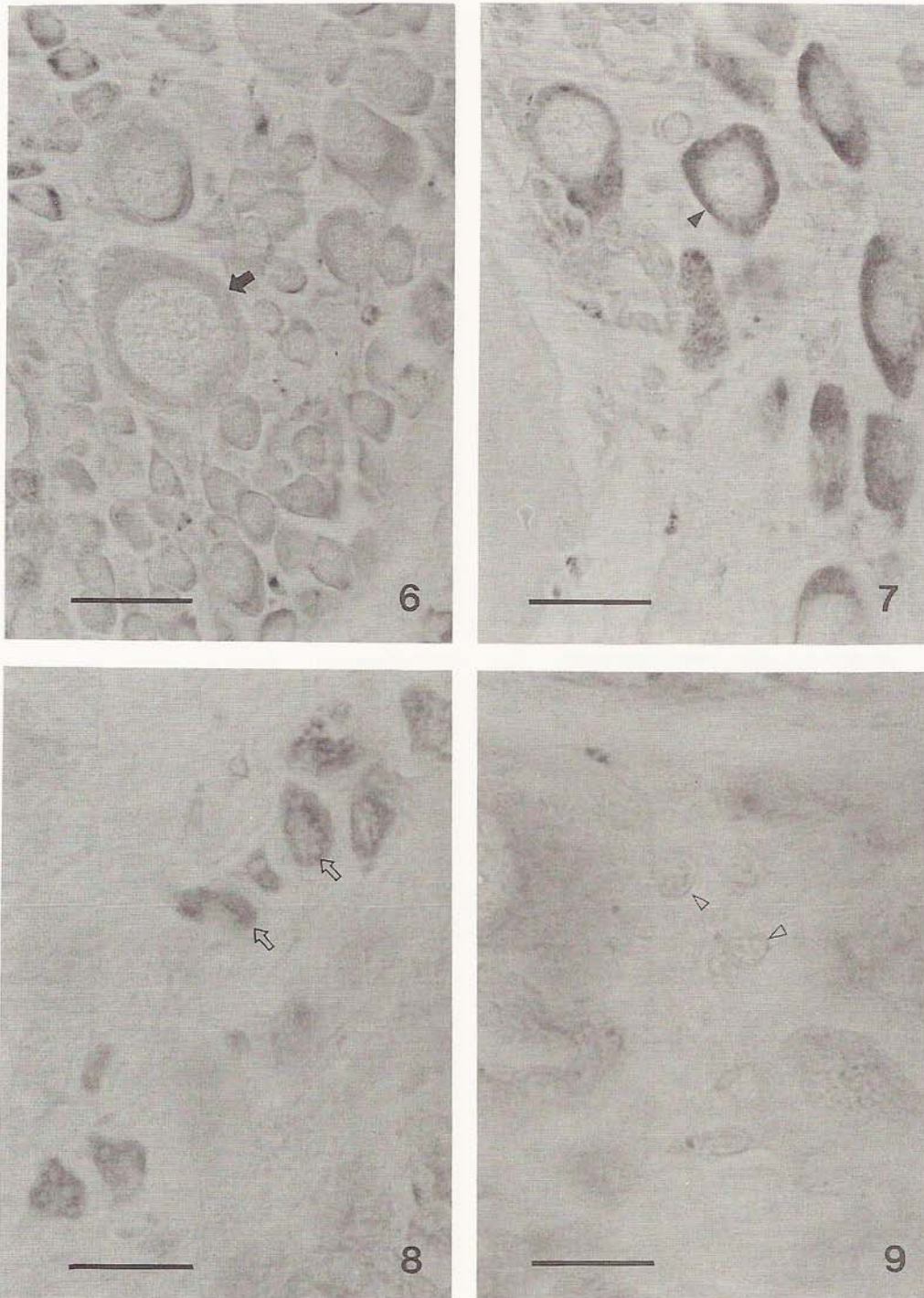


Fig. 2. High magnification of the medio-dorsal parts in Fig. 11. arrow, LG cell; arrowhead, DG cell. H-E double stain. Scale bar= 50  $\mu$ m.

Fig. 3. High magnification of the right latero-dorsal part. arrow, eosinophilia cell; arrowhead, nerve cell. H-E double stain. Scale bar= 50  $\mu$ m.

Figs. 4, 5. Light micrographs showing the positive reaction (red color, arrow) to anti-somatostatin serum. Scale bars= 50  $\mu$ m.



Figs. 6-9. Light micrographs showing the LG cells (arrow), DG cells (arrowhead), BG cells (open-arrow) and Y cells (open-arrowhead) in each different part of the cerebral ganglion. AB/AY double stain. Sale bars= 50  $\mu$ m.

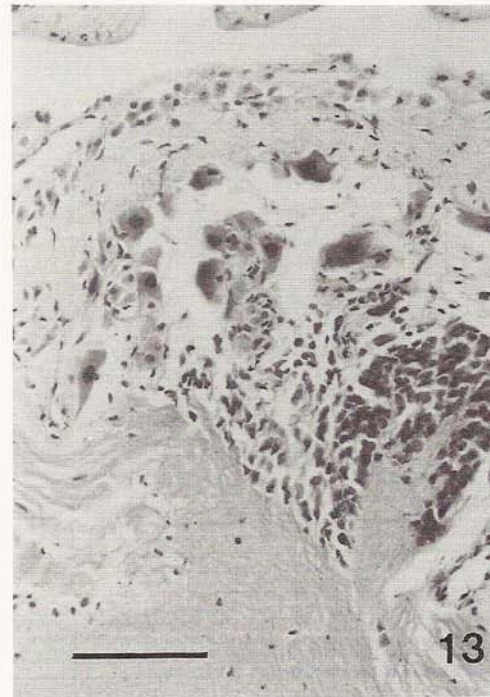
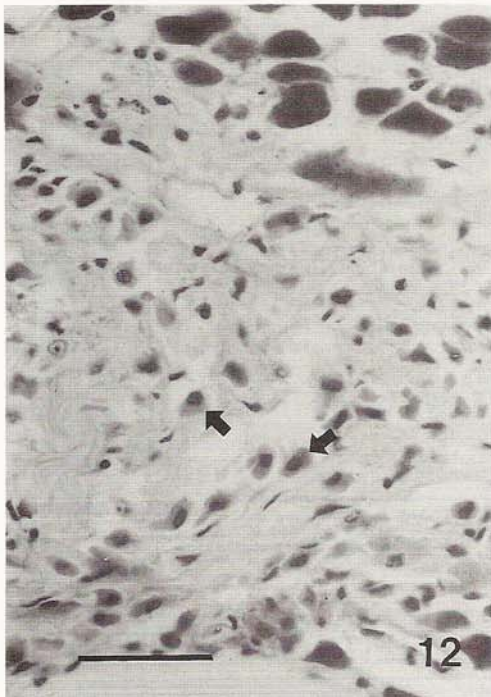
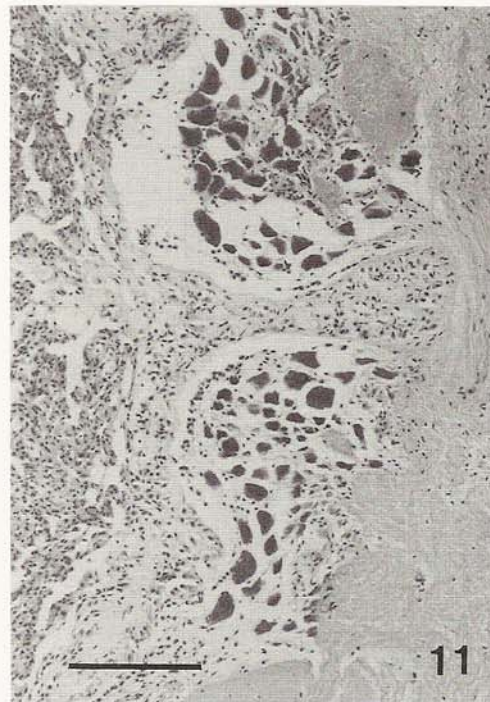
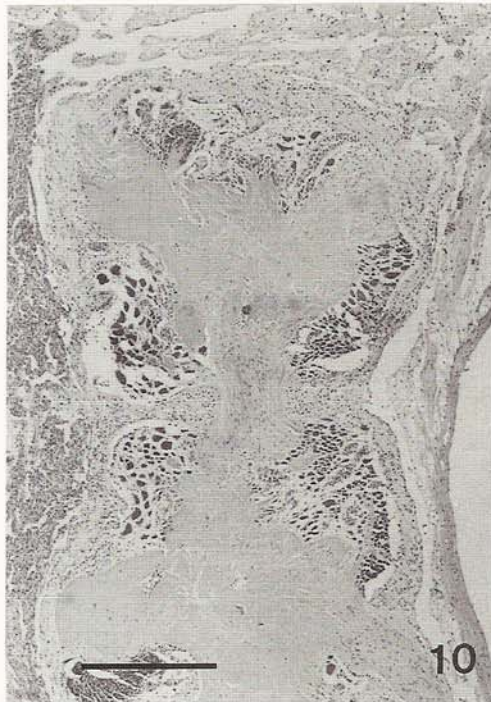


Fig. 10. Cross-section of the cerebral ganglion, shaped like a butterfly. hematoxylin-eosin double stain (hence, H-E double stain). Scale bar= 200  $\mu$ m.

Fig. 11. Light micrograph showing the medio-dorsal parts. H-E double stain. Scale bar= 100  $\mu$ m.

Fig. 12. Light micrograph showing the eosinophilic cells between medio-dorsal parts. arrow, eosinophilia cell. H-E double stain. Scale bar= 50  $\mu$ m.

Fig. 13. Light micrograph showing the latero-dorsal part. H-E double stain. Scale bar= 50  $\mu$ m.

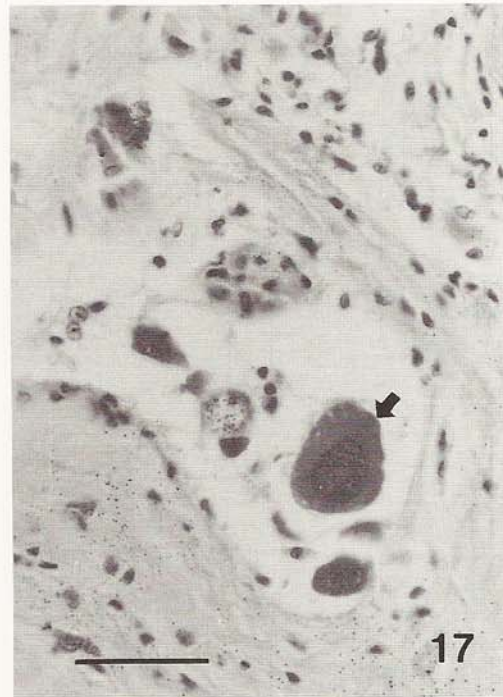
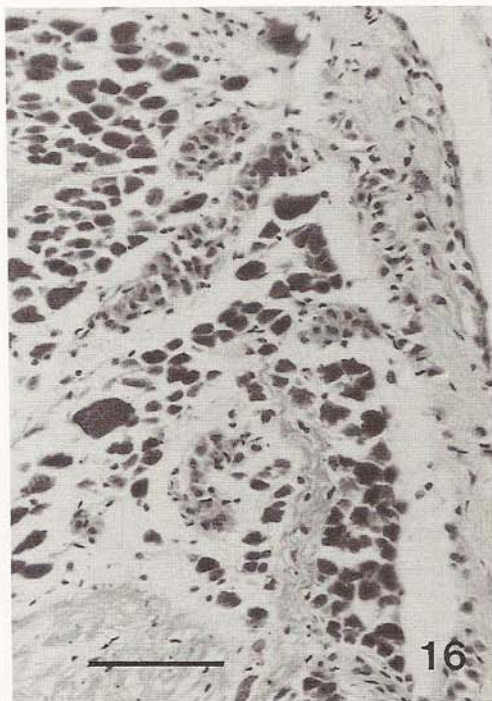
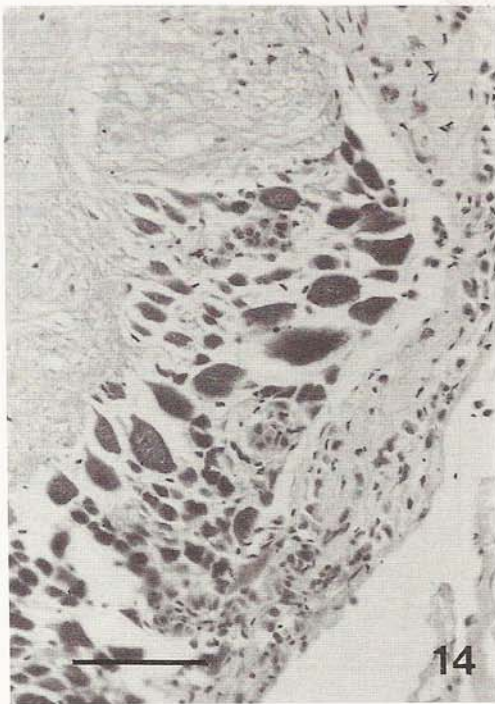


Fig. 14. Light micrograph showing various cells of the caudo-dorsal part. H-E double stain. Scale bar= 100  $\mu$ m.

Fig. 15. High magnification of the DG cells in Fig. 7. H-E double stain. Scale bar= 20  $\mu$ m.

Fig. 16. Light micrograph showing various cells in the left latero-dorsal part. H-E double stain. Scale bar= 100  $\mu$ m.

Fig. 17. Light micrograph showing the Canopy cell (arrow) in the lateral lobe. H-E double stain. Scale bar= 50  $\mu$ m.

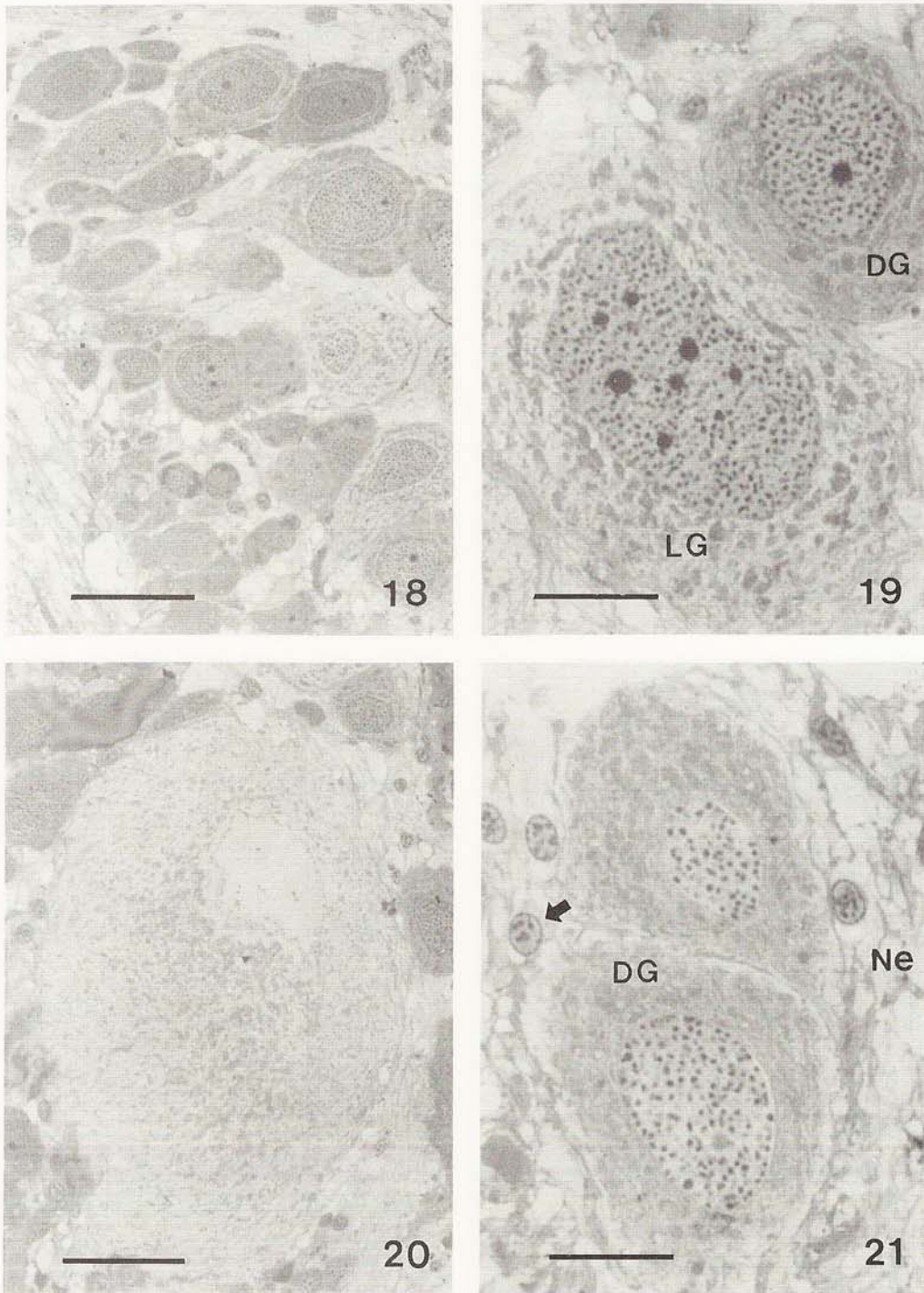


Fig. 18. Light micrograph showing various cells in the medio-dorsal part. methylene blue-basic fuchsin double stain (hence, M-B double stain). Scale bar= 50  $\mu$ m.

Fig. 19. High magnification of Fig. 18. arrow, LG cell; arrowhead, DG cell; M-B double stain. Scale bar= 20  $\mu$ m.

Fig. 20. Light micrograph showing the large cells in the cerebral ganglion. M-B double stain. Scale bar= 50  $\mu$ m.

Fig. 21. Light micrograph showing various cells between the medio-dorsal parts. arrow, Y cells (clear cells); arrowhead, DG cells; Ne, neuropile. M-B double stain. Scale bar= 20  $\mu$ m.

개씩 무리지어 관찰되기도 하였으나 LG 세포 주변에 밀착되어 존재하는 경우도 많이 있어 마치 신경교와 같은 모습을 보이기도 하였다(Fig. 21).

## 고 찰

달팽이류 *Lymnaea stagnalis*의 뇌신경절을 AB/AY 염색법을 통해 관찰한 결과 light green cell(LG 세포)과 caudo-dorsal cell(CD 세포) 그리고 약간의 dark green cell(DG 세포) 등 3종류의 세포들이 관찰된 바 있는데, 이들은 뇌신경절을 중배부위(medio-dorsal part), 측배부위(latero-dorsal part), 미배부위(caudo-dorsal part) 그리고 측엽부위(lateral lobe) 등 4부위로 나눈 곳에서 주로 관찰되었다(Wendelaar-Bonga, 1970). AB/AY 염색에서 밝은 녹색으로 염색된 LG 세포는 성체인 경우 50-75개정도 관찰된 데 비해, 어린 개체에서는 20-40개 정도만이 관찰되었으며, 양측 미배부위에서는 CD 세포가 우측 및 좌측 뇌신경절에서 각각 70개와 30개가 관찰된 바 있다. 또한 진한녹색으로 염색되는 DG 세포는 신경절 중 주로 좌·우측 흉막신경절(pleural ganglion)에서 20개와 15개, 그리고 좌·우측흉막 신경절(pleural ganglion)에서는 4-10 개와 2-5개 정도가 각각 관찰된다고 하였으나(Joosse, 1964; Wendelaar-Bonga, 1970; Roubos, 1973; Swindale and Benjamin, 1976). 왕달팽이(*Achatina fulica*)를 재료로 한 본 실험에서는 뇌신경절의 각 부위에서 LG 세포와 LD 세포 그리고 DG 세포가 각각 100개와 150개 그리고 30개 정도가 관찰되어 *Lymnaea stagnalis*(Wendelaar-Bonga, 1970)와는 다른 양상을 보였다.

LG 세포들은 전자력에 의해 서로 밀착되어 있으며(Benjamin and Rose, 1984; Vlieger and Lodder, 1985), 이들은 neuropeptide를 중앙구순 신경(median lip nerve)을 통해 비신경연접(nonsynaptic) 상태로 분비한다고 하였다(Joosse, 1988; Roubos and van der Wal-Divendal, 1980; Buma *et al.*, 1984; Heumen and Roubos, 1990). 그러나 본 실험에서는 LG 세포들이 서로 가깝게 위치하고는 있었으나 밀착된 상태는 아니었으며 뇌신경절내 세포 중 가장 많은 세포밀도를 보였다.

Canopy cell(C 세포)은 매우 크고 드물게 관찰되는 세포(직경 100  $\mu\text{m}$ )로서 양측 측엽부위에 한 개씩 존재하고 있으며 LG 세포계열에 속한다고 하였다(Brink and Boer, 1967; Wendelaar-Bonga, 1970). 또한 이들은 LG 세포와 더불어 4종류의 서로 다른 insulin-like neuropeptides를 생산하며(Smit *et al.*, 1988, 1993a, b; Geraerts *et al.*, 1989), 성장조절에도 관여한다고 하였다(Wijdenes and Runham, 1977). 그러나 척추동물인 경우에는 insulin이나 insulin-related peptide가 성장과 물질대사에 관여하고 있으며(Froesch and Zapf,

1985; Steiner *et al.*, 1985; Joosse, 1988; Minnen and Schallig, 1990), 이들은 신경조직이 아닌 체장이나 간 등에서 합성되는 것으로 알려져 있다(Froesch and Zapf, 1985). 그러나 무척추동물인 경우에는 insulin-related peptide가 신경조직에서 합성되는데, 특히 곤충 중 누에(*Bombyx mori*)인 경우에는 prothoracicotrophic(PTTH)가 insulin-related peptide에 해당이 되며, 이들은 뇌신경절에서 합성된다고 하였다(Nagasawa *et al.*, 1986).

특히 LG 세포 giant neuron은 중배부위와 측배부위에서 약 50개 정도가 관찰되고, Canopy세포와는 거의 같은 형태를 하고 있으며, molluscan insulin-related peptides(MIPs)의 전사가 neuroendocrine cerebral light green cell(LG 세포)에서 활발히 수행된다고 하였다(Geraerts 1976; Smit *et al.*, 1988). 본 실험에서도 Canopy 세포가 측엽부위에서 한 개씩 관찰되었으나 직경이 60  $\mu\text{m}$  정도로서 *Lymnaea stagnalis*(Wendelaar-Bonga, 1970)에서 관찰된 세포보다는 약간 작았다. 이들은 DG 세포와 더불어 somatostatin 항체를 이용한 면역염색에서 양성반응을 보이며 성장조절물질 분비를 억제하는 세포로 확인되어, 분비촉진세포로 알려진 LG 세포와는 그 기능이 서로 다를 것으로 추측되었다.

LD 세포는 아프리카 왕달팽이인 경우 뇌신경절의 하단부에 있는 배측부위에 주로 위치해 있으며, 이들은 주로 LG 세포군과 약간의 BG 세포군으로 구성되어 있었다. 그 중 BG 세포들은 H-E 이중염색에서 hematoxylin에 강하게 염색되고, AB/AY 반응에서는 진한 녹색으로 염색된 바 있다. 이 세포는 크기가 50  $\times$  25  $\mu\text{m}$  정도로 5-6개 정도가 무리지어 나타나서 Wendelaar-Bonga(1970), Roubos(1973) 그리고 Swindale and Benjamin(1976) 등의 실험 결과와 같았다.

Swindale and Benjamin(1976)은 BG 세포의 축삭돌기가 발(足)의 표피와 외투막에까지 뻗어 있으며 전해질 농도가 낮은 용매에서는 활동적이 되며, 반대로 농도가 높을 때는 비활동적인 상태가 되는 것을 광학현미경을 통해 관찰한 바 있다(Wendelaar-Bonga, 1972; Softe *et al.*, 1979).

또한 Y 세포(yellow cell)는 DG 세포나 YG 세포(yellow green cell)와 더불어 주로 체벽신경절(parietal ganglion)이나 내장신경절(visceral ganglion)에서 많이 관찰되고 그 크기는 40-70  $\mu\text{m}$  정도로서 40-50개씩 무리지어 관찰된다고 하였다(Wendelaar-Bonga, 1970).

이들은 전해질이 낮은 용매인 경우 활성화되어 세포의 외포현상(exocytosis)이 증가하고, 삼투압조절에도 중요한 역할을 수행하는 SIS(sodium influx stimulating) 펩티드를 분비하는 신경분비세포(neurosecretory cell)라고 하였으나 본 실험에서 관찰된 Y 세포는 그 크기가 12  $\mu\text{m}$  정도로 매우 작고 뇌신경절의 신경혈관(neurohemal)부위

에서 고르게 관찰되고, H-E 염색에서는 eosinophilia를 나타내 호산성세포로 확인되었다. 이들은 m-b 이중염색에서 반응이 없었고, AB/AY 반응에서는 노란색으로 염색되었으나 Wendelaar-Bonga(1970)가 관찰한 바 있는 Y 세포와는 크기와 모습이 매우 달랐다. 이와 같은 현상은 종의 차이에서 오는 현상인지, 또는 AB/AY염색시 종에 따른 색상의 특이성 때문인지 앞으로 심도 있는 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

아프리카 왕달팽이(*Achatina fulica*)의 뇌신경절을 AB/AY 염색법과 면역조직화학법을 이용, 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

아프리카 왕달팽이의 뇌신경절은 2 x 1 mm 정도 크기의 흰색 타원형체로 중앙은 직경 1 mm 정도의 대뇌교련부(cerebral commissure)에 의해 연결되어 있었다.

뇌신경절(cerebral ganglion)의 종단면은 나비모양으로, 세포의 분포형태에 따라 중배부위(medio-dorsal part), 측배부위(latero-dorsal part), 미배부위(caudo-dorsal part) 그리고 측엽부위(lateral lobe) 등으로 나눌 수 있었다.

중배부위와 측배부위를 구성하는 대부분의 세포는 LG 세포와 약간의 DG 세포로서, 이들은 혼재되어 나타났다. 그러나 측엽부위에서는 LG 세포와 DG 세포는 거의 관찰되지 않고, 주로 Y 세포만이 관찰되었다.

LG 세포는 크기가 20-70  $\mu$ m 정도의 원형 또는 타원형의 세포로서 AB/AY 염색시 밝은 녹색으로 염색되고 핵질속에는 과립상의 염색질이 고르게 분산되어 있으며, 1-3개의 인이 관찰되었다. 세포질 속에는 분비성과립들이 고르게 발달해 있었다.

DG 세포는 대부분 장타원형의 세포로서 LG 세포에 비해 약간 작았다. 이들은 m-b 이중염색에서 강한 methylenophilia를 보였고, AB/AY 염색에서는 진한 녹색으로 염색되었다. 이 세포는 rabbit anti-somatostatin antibody를 이용한 면역염색에서 양성으로 반응하였다.

Y세포는 AB/AY 염색에서 노란색으로 염색되고, H-E 염색에서는 eosinophilia를 보여 호산성세포로 확인되었다.

그러나 BG 세포는 위의 세포들과는 달리 뇌신경절의 주변 부위 결합조직에서 관찰된 매우 드문 세포였다. 이들은 AB/AY 염색시 청녹색으로 염색되고, H-E 염색에서는 hematoxylin 에 강한 반응을 보였다.

## 감사의 말씀

본 논문은 1999년도 목원대학교 학술연구비 지원에 대

하여 수행되었음.

본 연구를 위하여 식용왕달팽이를 지원해 주신 화성농산의 이천형 집사님께 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 논문이 나오기까지 도와준 김상원군과 이영희 양에게도 고마움을 전합니다.

## REFERENCES

- Bargmann, W. (1949) Ueber die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. *Z. Zellforsch.*, **34**: 610-634.
- Benjamin, P.R., and Rose, R.M. (1984) Electrotonic coupling and after discharges in the light green cells: A comparison with two other cerebral ganglia neurosecretory cell types in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **77B**: 67-74.
- Boer, H.H. (1965) A cytological and cytochemical study of neurosecretory cells in Basommatophora, with particular reference to *Lymnaea stagnalis* L. *Arch. Neerl. Zool.*, **16**: 313-386.
- Boer, H.H., Douma, E. and Kokksma, J.M.A. (1968) Electron microscope study of neurosecretory cells and neurohaemal organs in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, **22**: 237-256.
- Brink, M. and Boer, H.H. (1967) An electron microscopical investigation of the follicle gland (cerebral gland) and of some neurosecretory cells in the lateral lobe of the cerebral ganglion of the pulmonate gastropod *Lymnaea stagnalis* L. *Z. Zellforsch.*, **79**: 230-243.
- Buma, P., Roubos, E.W. and Buijs, R.M. (1984) Ultrastructural demonstration of exocytosis of neural, neuroendocrine and endocrine secretions with an in vitro tannic acid (TARI-) method. *Histochemistry*, **80**: 247-256.
- Froesch, E.R. and Zapf, J. (1985) Insulin-like growth factors and insulin: comparative aspects. *Diabetologia*, **28**: 485-493.
- Gabe, M. (1953) Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde. *Bull. Microsc. Ser.*, **3**: 153-162.
- Geraerts, W.P.M. (1976) Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **29**: 61-71.
- Geraerts, W.P.M., Smit, A.B. and Joosse, J. (1989) Peptide messenger evolution: The invertebrate

- contribution. In: Recent Advances in Basic and Clinical Neuroendocrinology. (ed. by Casanueva, F.F. and Dieguez, C.). pp. 3-37. Amsterdam: Excerpta Medica.
- Heumen, W.R.A. van, and Roubos, E.W. (1990) Ultrastructural evidence for synthesis, storage and release of insulin-related peptides in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, **39**: 493-500.
- Joosse, J. (1964) Dorsal bodies and dorsal neurosecretory cells of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis* L. *Arch. Neerl. Zool.*, **16**: 1-103.
- Joosse, J. (1988) The hormones of molluscs. In: Invertebrate Endocrinology Vol. 3. Endocrinology of Selected Invertebrate Types. (ed. by Laufer, H. and Downer, G.H.). pp. 89-140. Alan R. Liss, New York.
- Lever, J. (1957) Some remarks on neurosecretory phenomena in *Ferrissia* spec. (Gastropoda Pulmonata): *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.*, **C60**: 510-522.
- Minnen, J. van, and Schallig, H.D.F.H. (1990) Demonstration of insulin-related substances in the central nervous systems of pulmonates and *Aplysia californica*. *Cell Tissue Res.*, **260**: 381-386.
- Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Muzoguchi, A., Fujiwara Y., Suzuki, A., Takahashi, S.Y. and Ishizaki, H. (1986) Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**: 5840-5843.
- Peute, J. and Kamer, J.C. van de (1967) On the histochemical differences of aldehyd-fuchsin positive material in the fibres of the hypothalamo-hypophyseal tract of *Rana temporaria*. *Z. Zellforsch.*, **83**: 441-448.
- Romeis, B. (1968) *Mikroskopische Technik*. 16nd ed. Muenchen-Wien: Oldenbourg Verlag.
- Roubos, E.W. (1973) Regulation of neurosecretory activity in the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (L.). A quantitative electron microscopical study. *Z. Zellforsch.*, **146**: 177-205.
- Roubos, E.W. and van der Wal-Divendal, R.M. (1980) Ultrastructural analysis of peptide-hormone release by exocytosis. *Cell Tissue Res.*, **207**: 267-274.
- Scharrer, B. (1935) Ueber sekretorisch taetige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. *Naturwiss.* **9**: 131-138.
- Smit, A.B., Vreugdenhil, E., Ebberink, R.H.M., Geraerts, W.P.M., Klootwijk, J. and Sokolove, P.G. (1988) Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*, **331**: 535-538.
- Smit, A.B., van Marle, A., van Elk, R, Bogerd, J., van Heerikhuizen, H. and Geraerts, W.P.M. (1993) Evolutionary conservation of the insulin gene structure in invertebrates: cloning of the gene encoding molluscan insulin-related peptide III from *Lymnaea stagnalis*. *J. Mol. Endocrinol.*, **11**: 103-113.
- Smit, A.B., Thijsen, S.F.T. and Geraerts, W.P.M. (1993) cDNA cloning of the sodium influx-stimulating peptide in the mollusc, *Lymnaea stagnalis*. *Eur. J. Biochem.*, **215**: 397-400.
- Soffe, S.R., Slade, C.T. and Benjamin, P.R. (1979) Environmental osmolarity and neurosecretory neurones in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Malacologia*, **18**: 585-586.
- Steiner, D.F., Chan, S.J., Welsh, J.M. and Kwok, S.C.M. (1985) Structure and evolution of the insulin gene. *Annu. Rev. Genet.*, **19**: 463-484.
- Swindale, N.V. and Benjamin, P.R. (1976) The anatomy of neurosecretory neurones in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, **274**: 169-202.
- Vlieger, T.A. de, and Lodder, J.C. (1985) Electrophysiology and morphology of growth hormone-producing cells in *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Kon. Akad. Wet.*, **C88**: 129-141.
- Wendelaar-Bonga, S.E. (1970) Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Z. Zellforsch.*, **108**: 190-224.
- Wendelaar-Bonga, S.E. (1972) Neuroendocrine involvement in osmoregulation in a freshwater mollusc, *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, (suppl.), **3**: 308-306.
- Wijdenes, J. and Runham, N.W. (1977) Studies on the control of growth in *Agriolimax reticulatus* (Mollusca, Pulmonata). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **31**: 154-156.