

간흡충에 대한 살충성물질에 관한 연구(VI)

향어 체표면 점액내 살충성물질의 구조 확인

이 재 구 · 김 평 길 · 안 병 준*
전북대학교 수의기생충학교실 · *충남대학교 약학대학
(Received January 22, 1987)

The Wormicidal Substance of Fresh Water Fishes on *Clonorchis sinensis*(VI)

Structure Identification of Purified Clonorchicidal Substance from
Epidermal Mucus of *Cyprinus carpio nudus*

Jae Ku Rhee, Pyung Gil Kim and Byung Zun Ahn*

Dept. of Veterinary Parasitology, Jeonbuk National University, Jeonju 520, Korea

*Dept. of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 300-31, Korea

Abstract—In order to elucidate the defence mechanism of *Cyprinus carpio nudus* to *Clonorchis sinensis*, clonorchicidal substance in the epidermal mucus of this fish was isolated by silica gel column and thin layer chromatography and analyzed for its chemical nature by UV, IR and NMR-spectroscopy. The epidermal mucus of the fish was extracted by ethyl ether and separated into 2 fractions by column chromatography using petroleum ether/chloroform(30/70, v/v) as first solvent and methanol as second solvent. The second fraction with greyish white colour showed clonorchicidal effect. The second was again fractionated into greyish white precipitate and clonorchicidal greenish yellow supernatant fraction, by adding petroleum ether and standing the mixture for 5 days at 5°C. The latter was divided into 7 fractions in column chromatography with acetone/benzene(10/90, v/v) as carrier. The fraction on equivalent to the spot of *Rf.* 0.225 value among them disclosed the strongest clonorchicidal effect. By this purification procedure, clonorchicidal substance was purified 154-fold with 0.9% yield from the mucus of the fish, and 10mg of the final fraction killed the metacercariae in 22 min. Infra red, nuclear magnetic resonance and ultraviolet spectrometric analysis of the purified substance revealed that the substance is linoleic acid. According to the results of the present studies it seemed that this fish could not be proper intermediate host of *Clonorchis sinensis*, and that defence mechanism of this fish to the worm seems to be correlated with clonorchicidal substance in epidermal mucus.

간흡충은 우리나라에서 중요한 흡충류의 일종으로서 남한 각처 하천유역에 큰 유행지를 형성하고 있으며, 간흡충증의 역학적 사실을 이해하는데 필요한 제이중간숙주에 대한 생태학적 지식에는 불충분한 점이 많다.

저자 등^{1~4)}은 향어(*Cyprinus carpio nudus*)에 대한 간흡충의 제이중간숙주로서의 역할 여부를 규명하기 위한 일환으로 우선 간흡충 유미충의 향어에 대한 각종 인공 및 자연감염시험을 수행하여 자연계에서 그 역할을 할 수 없다는

사실을 천명한 다음 그 방어기전을 규명하기 위하여 향어 체표면 점액으로부터 살충성물질을 순수분리하고 아울러 표피의 조직학적 소견을 관찰하여 살충성물질과 관련이 있다고 생각되는 곤봉상세포의 존재를 확인한 바 있다.

이번에 저자 등은 향어 체표면 점액으로부터 순수하게 분리한 간흡충에 대한 살충성물질을 기기분석을 통하여 구조를 확인하였기에 보고하는 바이다.

실험 방법

향어 (*Cyprinus carpio nudus*)—1986년 8월에 호림수산 소양호 양식장으로부터 길이 25cm내외, 체중 500g 정도의 향어 총 40kg을 분양받아, 그 체표면 점액으로부터 살충성 순수물질을 분리하였다.

간흡충의 탈낭유충—1986년 8월에 부산시 북구 강동동 대사리 소제 김해 호수에서 채집한 참붕어 (*Pseudorasbora parva*)로부터 인공소화액 (웍신 6g, 염산 7ml, 증류수 1l)으로 분리시킨 피

낭유충을 인공장액 (NaHCO_3 0.2g, 트립신 0.5g, 생리식염수 50ml)으로 처리하여 얻은 간흡충 탈낭유충을 살충시험에 공하였다.

살충성물질 분획—향어의 표피 및 진피를 박리하여 Fig. 1과 같은 방법으로 처리하여 간흡충에 대한 살충성물질을 분획하였다. 즉, 3kg의 향어로부터 표피 및 진피를 박리하여 에테르에 침지시킨 후 실온에서 24시간마다 6회에 걸쳐 에테르 추출, 감압증발 농축시켜 101.8g의 물질을 얻은 다음 석유에테르(30%)와 클로로포름(70%)의 최초 혼합용매를 사용, 시리카 겔 컬럼 크로마토그래피하여 살충성 음성의 황색물질을 용

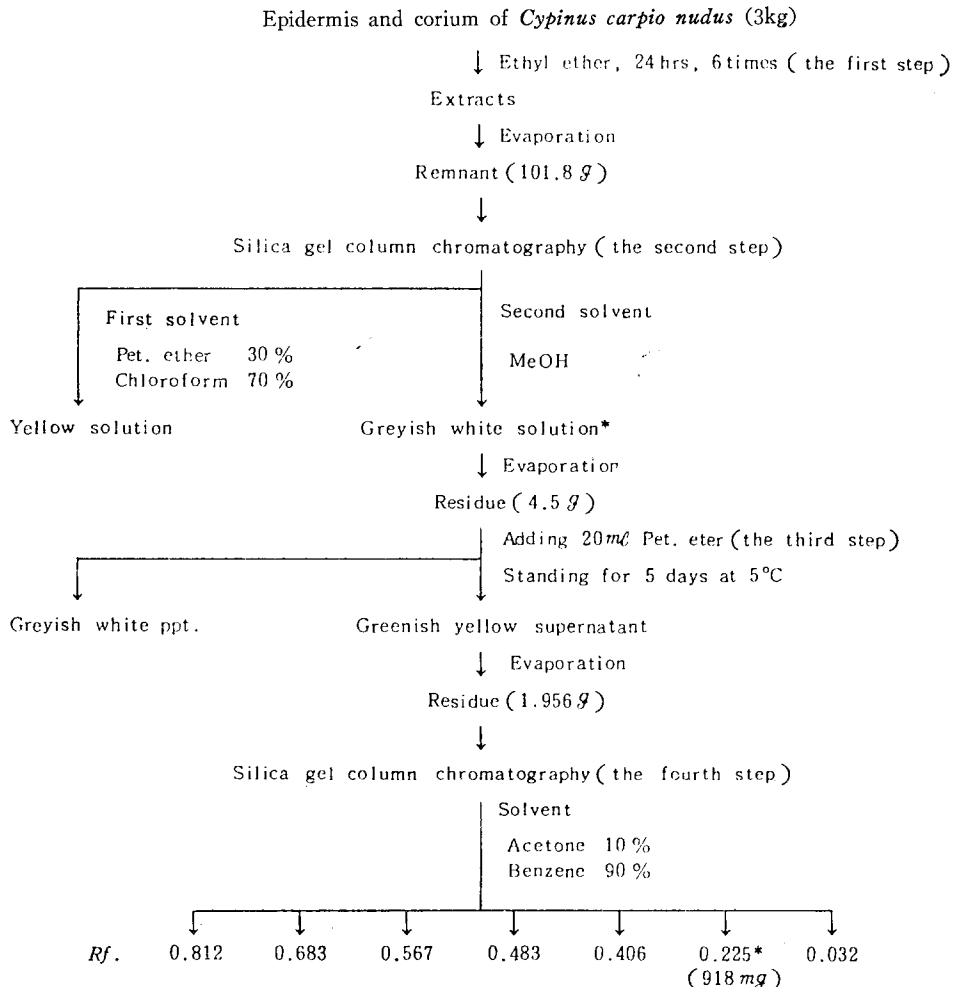


Fig. 1. Fractionation of clonorchicidal substance from *Cyprinus carpio nudus*

* Clonorchicidal activity

리 제거시키고, 두번 제 용매인 메탄올을 이용하여 그 컬럼 상단에 잔류하고 있는 물질을 용리시켜 회백색 용리물을 얻어 감압증발, 4.5g의 살충성 양성물질을 얻었다. 이에 석유에테르 20ml를 추가, 5°C에서 5일간 방치하여 회백색 침전물(살충성 음성)과 대륙황색 상청액(살충성 양성)으로 구분하였다.

이 상청액을 감압증발시켜 얻은 1.956g의 분획물질을 아세톤과 벤젠 10:90의 혼합용매를 사용, 시리카 겔 컬럼크로마토그래피하여 작은 시험관에 120단계의 각 용리물을 3ml씩 채취하였다. 이들을 시리카 겔 박막크로마토그래피하여 확인한 7개의 반점중에서 살충성이 가장 강력한 것은 *Rf*. 0.225값에 상당한 분획이었으며, 무색의 유상물질 918mg을 집량하였다.

간흡충에 대한 살충성시험—향어 표피 점액으로부터 추출한 각 단계 분획물질을 적당한 양의 에테르를 추가하여 10mg 상당의 물질이 함유된 에테르 용액을 시계접시에 취하여 용매를 완전히 증발시키고, 10마리의 간흡충 탈낭유충이 들어 있는 생리식염수 1ml를 넣고 직접 접촉시켜 탈낭유충의 변성 사멸과정을 관찰하였다.

한편, 대조로서 시계접시에 에테르 1ml를 취하여 완전히 증발시켜 생리식염수와 간흡충 탈낭유충을 가하여 그 변성 사멸과정을 관찰하였다. 실험 및 대조군 모두 이러한 실험을 3반복으로 실시하였다.

탈낭유충의 사멸 판정은 그 운동의 완전 정지 및 충체의 이완을 기점으로 하였다.

살충성물질의 화학분석—적외선 분광분석은 Beckmann spectrophotometer를, 핵자기공명 분광분석은 Varian 80 FT-NMR spectrophotometer

를, 자외선 분광분석은 Pye Unicam사의 ultra-violet spectrophotometer를 사용하였다.

실험 결과

간흡충 탈낭유충에 대한 살충시험—향어 표피 점액 에테르 추출물의 최종단계 각 분획물질의 탈낭유충에 대한 살충성은 Table 1에 표시한 바와 같이 각 분획물질을 *in vitro*에서 탈낭유충에 각각 직접 접촉시켜 경시적으로 관찰한 소견은 *Rf*. 0.812~0.032값의 7개의 분획물질 중에서 제 6 반점인 *Rf*. 0.225값 상당의 물질이 다른 분획물질에 비교하여 살충성이 강력하였다. 즉, 탈낭유충에 이 물질을 직접 접촉시킨 다음 4분까지는 정상적인 모든 운동을 관찰할 수 있으나 그 후부터는 시계접시 바닥에 구름반을 밀착시킨 채 격련을 일으키며 미약한 수축운동을 하다가 8분에는 충체가 이완하기 시작하였다. 그리고, 12분에는 거의 운동성이 소실된 채 충체는 고도로 수축되어 22분에는 모든 충체가 변성 사멸하기 시작하였다.

한편, 대조에 있어서 탈낭유충은 24시간 이상 생존하였으며, 충체의 제운동은 저자 등⁹⁾이 관찰한 소견과 유사하였다.

각 분획단계별 살충성물질의 정제도 및 수율—각 분획단계별 살충성물질의 정제도 및 수율은 Table 2에 표시한 바와 같이 향어 체표면 점액 에테르 추출물 101.8g으로부터 최종 분획단계에서 918mg가 회수되었으며 그 수율은 0.9%, 그 정제도는 154배이다.

살충성물질의 화학분석—최종분획 순수살충성 물질의 자외선 분광분석 결과는 228.7nm이었다.

Table I—Clonorchicidal effects of the final fractions from epidermal mucus on excysted metacercariae

Status of metacercariae	Thin layer chromatography (<i>Rf</i> .)						
	0.812	0.683	0.567	0.483	0.406	0.225	0.032
Duration of normal movement	65'	70'	55'	50'	30'	4'	25'
First appearance of body relaxation	140'	110'	90'	80'	60'	8'	40'
Death of all the worm	186'	176'	160'	154'	110'	22'	75'

Remark; ' ; Minutes

Table II—Purification of clonorchicidal substance from *Cyprinus carpio nudus*

Steps	Total amount* (mg)	Specific activity** (Min./10mg dry weight)	Purity (-fold)	Yield (%)
1	101,800	3,390	1	100
2	4,500	415	8	4.42
3	1,956	255	13	1.9
4	918	22	154	0.9

* Clonorchicidal activity

** Time (Min.) required to kill excysted metacercariae

적외선 분광분석 결과는 파수 2,800~3,000 cm^{-1} 와 1,400~1,460 cm^{-1} 에 강한 피이크, 그리고 720 cm^{-1} 에 피이크가 있다. 또, 1,710 cm^{-1} 에 강한 피이크와 이와 동시에 3,400 cm^{-1} 부위와 930 cm^{-1} 부위에도 피이크가 있다. 그리고, 1,650 cm^{-1} 및 3,020 cm^{-1} 에 피이크가 있다.

핵자기공명 분광분석 결과는 5.3ppm, 0.88 ppm, 1.12ppm, 1.52ppm, 1.98ppm, 2.25ppm, 2.75ppm 부위에 피이크가 있다.

고 찰

1910년 Kobayashi에 의하여 담수어류가 간흡충의 제이중간숙주 역할을 한다는 사실이 판명된 이래 지금까지 109종의 담수어류와 3종의 담수산 새우가 제이중간숙주로서 극동지역에서 많은 기생충 학자에 의하여 보고된 바 있다¹⁰⁾.

그러나, 간흡충 제이중간숙주로서 보고된 담수어류에 대한 그 역할 여부와 그 적, 부적의 정도를 규정짓기 위해서는 이들 담수어류가 필연적으로 제검토되어야 할 것으로 생각되는 데 아직까지 몇 가지 어류에 한해서만 검토되었을 뿐이다.

즉, 동일수계에 서식하고 있는 담수어류라 할지라도 그 종류에 따라 간흡충 유미유충이 용이하게 침입할 수 있는 것과 그렇지 않는 것으로 대별할 수 있을 뿐더러 담수어 체내에 있어서 그 피낭유충의 수명이 현저하게 다르다는 것은 주지의 사실이며¹¹⁻¹³⁾ 간흡충의 제이중간숙주로서 알려진 잉어(*Cyprinus carpio*), 붕어(*Carassius carassius*) 등은 중간숙주의 역할을 거의 할 수

없다는 사실이 밝혀졌다.^{9,14-18)}

그러므로, 이의 기전을 구명하기 위한 끊임없는 노력이 지속되고 있다. 일찌기 Chun¹⁶⁾은 잉어와 붕어의 체표면 점액내에 간흡충 유미유충에 대한 살충성물질이 있다고 하였으며, 최근에 이르러 Rhee 등^{3,9,17)}은 붕어, 잉어, 금붕어, 가물치(*Ophicephalus argus*), 메기(*Parasilurus asotus*) 및 향어 등의 체표면 점액으로부터 간흡충에 대한 살충성물질을 분획한 바 있으며, Rhee 등¹⁸⁾은 잉어 체표면 점액내의 간흡충에 대한 살충성물질을 순수 분리하여 화학적 성상을 밝힌 바 있다. 그리고, Rhee¹⁹⁾는 담수어류 표피의 곤봉상세포와 간흡충 피낭유충의 감염도는 상관관계가 있다고 하였다.

저자 등은 전보^{2,3)}에서 각종 인공 및 자연감염시험을 통하여 향어는 간흡충의 제이중간숙주의 역할을 할 수 없다는 것을 천명한 다음 향어의 간흡충에 대한 방어기전을 규명하기 위한 일환으로 제이단계 시험으로서 향어 체표 점액을 에테르로 추출하여 여러 가지 용매를 혼합하거나 또는 단일 용매를 사용하여 시리카 겔 박막 및 컬럼크로마토그래피하여 순수 살충성물질을 얻었는데 이번에는 제삼단계 실험으로서 적외선, 자외선 및 핵자기공명 분광분석을 통하여 살충성물질의 구조를 확인하였다.

우선 향어 표피 점액을 에테르로 추출한 다음 석유에테르(30%)와 클로로포름(70%)의 최초 혼합용매를 사용, 시리카 겔 컬럼크로마토그래피하여 살충성 음성물질을 용리 제거시키고 두번째 용매인 메탄올을 이용하여 회백색 용리물을 얻었다. 이에 석유에테르를 추가하여 살충성 음

성 회백색 침전물을 제거시키고 살충성 양성 대륙황색 상청액을 얻어 아세톤 10%와 벤젠 90%의 혼합용매를 사용, 시리카 겔 컬럼크로마토그래피하여 향어 표피 점액 에테르 추출물 101.8g 으로부터 살충성이 가장 강한 *Rf*. 0.225 값의 물질 918mg(수율 0.9%, 정제도 154배)을 집량하여 기기분석을 시도하였다.

즉, 적외선 스펙트럼에서 $2,800\sim 3,000\text{cm}^{-1}$ 와 $1,400\sim 1,460\text{cm}^{-1}$ 에 강한 alkyl group의 피이크가 있고, 또, 720cm^{-1} 의 피이크는 4개의 methylene기가 연속적으로 결합되어 있는 구조의 존재를 시사한다. $1,710\text{cm}^{-1}$ 에는 carbonyl기에 해당하는 강한 피이크가 있으며 이와 동시에 $3,400\text{cm}^{-1}$ 에 퍼져 있는 산의 hydroxyl기, 그리고 산의 분자간 수소교결합으로 나타나는 930cm^{-1} 부위의 피이크의 존재로 보아 이 물질은 유기산에 해당한다는 것을 알 수 있다. 또한, $1,650\text{cm}^{-1}$ 및 $3,020\text{cm}^{-1}$ 부위의 피이크는 C=C의 존재를 암시한다. 위의 carbonyl기의 위치로 보아 이는 이중결합과 공액되어 있지 않고 수소교결합만 하고 있다고 볼 수 있다. 만일, 이중결합과 공액으로 되어 있다면 이 피이크는 $1,700\text{cm}^{-1}$ 이하에 나타났어야 할 것이다. 적외선 스펙트럼의 데이터를 종합, 검토하면 이 물질은 4개 이상의 methylene기로 연결되는 alkyl기와 C=C와 그리고 이 이중결합에 직접 연결되지 않은 산기를 지니고 있다⁶⁾. 한편, 자외선 스펙트럼의 228.7nm에서 나타난 피이크는 C=C와 C=O의 존재를 시사한다⁸⁾.

핵자기공명 스펙트럼에 있어서 5.3ppm에 이중결합상의 4개의 수소가 있다는 것을 알 수 있으며, 피이크의 모양으로 미루어 보아 이들 수소의 성질은 유사하며, 또한 trans 상태보다 cis형일 가능성이 높다. 적외선 스펙트럼에 있어서 725cm^{-1} 위치에 이중결합상의 cis형 수소의 out of plane bend가 존재하므로 이와 같은 수소의 존재를 더욱 가능케 하고 있다. 0.88ppm에 나타나는 피이크는 그 이웃에 methylene기를 동반한 말단 methyl기에 해당하고 1.12ppm에는 methylene기의 수소가 나타나 있다. Methyl기들 기준으로 환산한다면 이 위치의 methylene기

의 수는 8개이다. 1.52ppm, 1.98ppm, 2.25ppm 및 2.75ppm의 피이크들은 4개의 paramagnetic shift를 한 methylene기에 해당된다. 그중에서 2.75ppm의 methylene기는 두 개의 이중결합 사이에 있을 때의 chemical shift를 가지고 있다. 그 밖의 것은 이중결합 하나에 결합되어 있는 methylene기 들이다. 적외선 스펙트럼의 해석을 상기한다면 이중결합중에서 하나는 C=O 즉 산기이다. 핵자기공명 스펙트럼에서도 두개의 C=O에 이웃한 수소를 확인하였다. 그러므로, paramagnetic shift를 한 4개의 methylene기는 이들 3개의 이중결합의 이웃에 있다⁷⁾.

또한, 산기의 화학적 확인을 위하여 도포길이 10cm의 시리카 겔 박막크로마토그래피 판의 1cm 부위에 이 물질을 점적하고 4cm 부위에 메탄올성 NaOH를 흡입시켜 하나의 band를 만들어 건조시킨 다음 벤젠으로 전개시킨 바 이 물질이 NaOH band에 머물러 있으므로 산이라고 생각한다.

위의 데이터들을 종합적으로 분석할 것 같으면 이 물질은 유기산이며 탄소수가 18~19개이다. 또한, 그 중에서 4개의 탄소가 C=C에 참여하고 있으며, 이들 사이에 하나의 methylene기가 결합되어 있다. 그리고, 이중결합은 모두 cis형이다. 이와 같은 구조적 특징은 linoleic acid의 것과 상위없으므로 이 물질은 linoleic acid (Aldrich Library of NMR, 2nd Ed. 437C)이다.

Rhee 등¹⁰⁾은 잉어 체포 점액으로부터 간흡층에 대한 살충성물질을 순수분리하여 적외선 및 핵자기공명 분광분석을 통하여 살충성물질이 2개의 이중결합, 15개의 methylene group 그리고 1개의 methyl group으로 구성된 불포화지방산의 에틸 에스테르라고 보고한 바 있는 데 본 실험에서 수행한 향어의 적외선 및 핵자기공명 스펙트럼의 해석을 비교 및 참고로 하여 잉어의 살충성물질을 다음과 같이 재검토할 수 있다. 즉, 잉어의 적외선 스펙트럼에 있어서 $3,500\text{cm}^{-1}$ 부위에서 산의 OH를 볼 수 없으며, 향어의 경우 $1,710\text{cm}^{-1}$ 에서 나타난 carbonyl기가 잉어에서는 $1,750\text{cm}^{-1}$ 로서 높은 에너지쪽으로 이동하였다.

두 핵자기공명 스펙트럼을 비교하면 잉어의 경우 4.23ppm에 나타나는 quartet이 향어에서는 없다. 이 피이크의 모양과 수소의 수로 보아 ethoxy기의 methylene기에 해당하며, ethoxy기의 methyl triplet는 1.0~1.5ppm 사이에 묻혀 있다. 이와 같은 향어와 잉어의 간흡충에 대한 살충성물질의 데이터를 비교 검토한 결과 잉어의 살충성물질은 ethyl linoleate(Aldrich Library of IR, 3rd Ed. 380B 및 NMR, 2nd Ed. 542A)임을 알 수 있다.

결론적으로, 간흡충에 대한 향어의 방어물질은 linoleic acid, 잉어의 것은 ethyl linoleate이며, 잉어가 향어로 변이됨으로써 향어의 방어물질이 에스테르가 아닌 유리산으로 되어 있다는 사실은 생태화학적 측면에서 매우 흥미있으리라 생각된다. 그리고, 최종 살충성 분획물질 10mg의 탈랑 유충에 대한 살충시간은 잉어 115분¹⁸⁾, 향어 22분으로서 linoleic acid가 ethyl linoleate보다 살충력이 강력하다. 이것은 진자가 극성이크기 때문이라고 추측된다.

결 론

향어의 간흡충에 대한 방어기전을 규명하기 위하여 그 체포면 점액으로부터 순수하게 분리한 살충성물질을 기기분석하여 그 구조를 결정하였다.

향어 체포면 점액의 에테르 추출물을 여러 단계의 화학적 처리를 거쳐 7개의 반점으로 분획하여 이들 물질을 간흡충의 탈랑유충에 *in vitro*에서 직접 접촉시켜 살충성시험을 수행한 바 제 6반점인 Rf. 0.225값의 물질이 다른 것들에 비교하여 살충성이 월등하게 강력하였다.

향어의 체포면 점액의 에테르 추출물 101.8g으로부터 918mg의 살충성 순수물질을 회수하였으며 그 수율은 0.9%, 그 정제도는 154배이다. 그리고, 순수하게 분리한 살충성물질에 대하여 적외선, 자외선 및 핵자기공명 분광분석을 이용하여 구조결정을 하였던 바 이 물질은 linoleic acid로 판명되었다.

이상의 실험결과로 미루어 보아 향어의 체포

면 점액내의 살충성물질인 linoleic acid가 간흡충의 방어기전에 관여하고 있다고 생각된다.

문 헌

- 1) Rhee, J.K., Kim, P.G., Baek, B.K., Lee, S.B. and Ahn, B.Z.: Clvate cells of epidermis in *Cyprinus carpio nudus* with reference to its defence activity to *Clonorchis sinensis*. *Korean J. Parasit.*, **20**, 201 (1982).
- 2) Rhee, J.K., Kim, P.G., Baek, B.K. and Lee, S.B.: Experimental infection of *Clonorchis sinensis* to *Cyprinus carpio nudus*. *Korean J. Parasit.*, **21**, 11(1983).
- 3) Rhee, J.K., Kim, P.G., Baek, B.K., Lee, S.B. and Ahn, B.Z.: The wormicidal substances of fresh water fishes on *Clonorchis sinensis* W. Preliminary research on the wormicidal substance from mucus of *Cyprinus carpio nudus*. *Korean J. Parasit.*, **21**, 21(1983).
- 4) Ahn, B.Z. and Rhee, J.K.: Anthelmintic natural products against *Clonorchis sinensis* and the analogues. *Yakhak Hoeji*, **30**, 253(1986).
- 5) Rao, C.N.R.: *Chemical Application of Infrared Spectroscopy*. Academic Press, New York, 204pp. (1963).
- 6) Colthup, N.B., Daly, L.H. and Wiberly, S.E.: *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy* 2nd ed., Academic Press, New York, 220pp. (1975).
- 7) Gunther, H.: *NMR Spectroscopy*. Wiley & Sons, New York, 46pp. (1980).
- 8) Jaffe, H.H. and Orchin, M.: *Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 204pp. (1970).
- 9) Rhee, J.K., Baek, B.K., Ahn, B.Z. and Park, Y.J.: The wormicidal substances of fresh water fishes on *Clonorchis sinensis* I. Preliminary research on the wormicidal substance from mucous substance of *Carassius carassius*. *Korean J. Parasit.*, **17**, 121(1979).
- 10) Rhee, J.K.: Supplemental knowledge on the second intermediate hosts of *Clonorchis sinensis* reported in Korea. *Theses Collection, Natural*

- Science, Jeonbug National University*, **26**, 344 (1984).
- 11) Suzuki, N. and Komiya, Y.: Studies on the second intermediate host of *Clonorchis sinensis* I. Experimental infection of *Zacco platypus* with *Clonorchis* cercaria. *Jpn. J. Parasitol.*, **15**, 215 (1966).
 - 12) Rhee, J.K.: Experimental studies on the second intermediate hosts of *Clonorchis sinensis* II. Observations on the fate of encysted cercariae of *Clonorchis sinensis* in the fish hosts, *Pseudorasbora parva*, *Acheilognathus signifer* and *Acanthorhodeus asmussi*. *Korean J. Vet. Res.*, **13**, 147 (1973).
 - 13) Rhee, J.K., Baek, B.K. and Lee, H.I.: Experimental studies of the second intermediate hosts of *Clonorchis sinensis* IV. Observations on the fate of metacercariae of *Clonorchis sinensis* in the fish host, *Cultricolus eigenmanni*. *Korean J. Parasit.*, **23**, 79(1985).
 - 14) Chun, S.K.: Studies on the experiment of mode of infection of *Clonorchis sinensis* I. Studies on the metacercaria of some trematodes parasitic in fresh water fishes and experimental infection of the cercaria of *Clonorchis sinensis* to fresh water fishes. *Bulletin Pusan Fisheries College*, **6**, 1 (1964).
 - 15) Chun, S.K.: Studies on the experimental mode of infection of *Clonorchis sinensis* II. Experimental infection of *Clonorchis sinensis* cercaria to fry of fresh water fishes. *Korean J. Parasit.*, **2**, 1(1964).
 - 16) Chun, S.K.: Studies on the experimental mode of infection of *Clonorchis sinensis* III. Studies on the wormicidal effect of external mucous substance of some fresh water fish on the larva of *Clonorchis sinensis*. *Korean J. Parasit.*, **2**, 12(1964).
 - 17) Rhee, J.K., Baek, B.K., Ahn, B.Z. and Park, Y.J.: The wormicidal substances of fresh water fishes on *Clonorchis sinensis* II. Preliminary research on the wormicidal substances from mucous substances of various fresh water fishes. *Korean J. Parasit.*, **18**, 98(1980).
 - 18) Rhee, J.K., Lee, S.B. and Ahn, B.Z.: The wormicidal substances of fresh water fishes on *Clonorchis sinensis* V. Purification and chemical characterization of clonorchicidal substance from epidermal mucus of *Cyprinus carpio*. *Korean J. Parasit.*, **22**, 127(1984).
 - 19) Rhee, J.K.: Experimental studies on the second intermediate hosts of *Clonorchis sinensis* III. Observations on the relationship between clavate cells of epidermis and infectivity of metacercariae of *Clonorchis sinensis* in fresh water fish. *Korean J. Parasit.*, **12**, 101(1974).