

실험적 뇌막수염에 있어 *Naegleria fowleri* 항원에 대한 세포매개성 면역 반응

연세대학교 의과대학 기생충학교실
朴光敏·柳在淑·任敬一

서론

자유생활아메바인 *Naegleria fowleri*(이하 *N. fowleri*로 약함)는 흙, 토양, 공기 등 자연환경에 널리 존재하며 인체에 감염되었을 때 원발성 아메바성 뇌수막염을 일으키는 원충이다(Carter, 1970). 이 원충의 감염은 주로 비강을 통해 이루어지며 후전막과 사상관을 뚫고 후신경을 따라 중추신경계를 침범하여 후뇌를 비롯한 뇌의 기저부에 괴사성 출혈성 뇌수막염을 일으킨다(Martinez 등, 1983). 호주, 벨지움, 영국, 체코, 뉴질랜드, 미국의 여러 주 등 세계 여러 곳에서 인체 감염이 보고되어 왔고 우리나라에서는 아직 임상적으로 확진된 예는 없으나, 황등(1976)에 의해 서울 시내 하천에서 분리한 *Naegleria* sp.와 *Acanthamoeba* sp.가 병원성이 있음을 밝힌 바 있다.

실험동물 중 마우스 비강내로 *N. fowleri*를 감염시킬 경우 인체에서 관찰되는 원발성 아메바성 뇌수막염과 유사한 치명적인 질환을 유발하는 것으로 보고된 이래(Martinez 등, 1973) 마우스를 사용하여 *N. fowleri* 감염시에 발현되는 숙주의 면역반응에 대한 연구가 많다. Thong 등(1978 a, b)은 살아있는 *N. fowleri*나 면역혈청 또는 면역비장세포를 마우스 복강내 주입한 후 비강내로 *N. fowleri*를 감염시켰더니 살아있는 *N. fowleri*와 면역혈청을 주입시킨 마우스는 저항력이 증가되어 감염된 마우스의 사망율이 현저히 떨어지는 반면, 면역비장세포를 주입한 경우는 저항력이 생기지 않음을 알 수 있었다. Ferrante 및 Thong(1979)은 *N. fowleri*가 숙주의 면역반응에 대처하는 기전을 형광항체법을 이용하여 실험하였는데 *N. fowleri* 표면에 있는 항체를 총체내부로 흡입시켜 숙주의 면역계를 통과한다고 하였다. Holbrook 등(1980)은 *N. fowleri*가 사람의 중추신경계에 기생함에 있어 보체의 중요성을 강조하였다. 즉 중추신경계는 보체가 적으므로 아메바의 조작내 기생이 용이하게 되며 보체가 대행로를 통해 활성화되어 아메바가 다른 기관으로 전파됨을 막는다. 그러나 *N. fowleri*에 감염된 마우스에서의 세포성 면역에 관한 연구보고는 적다. Ferrante 및 Smyth(1984)는 *N. fowleri* lysate가 T 임파구 mitogen임을

보고하였다.

마우스에서 *N. fowleri*가 감염되었을 때 그 경과에 따른 숙주의 면역반응, 특히 T 임파구의 기능변동에 대하여는 연구보고가 없다. 따라서 본 실험에서는 *N. fowleri*를 마우스에 감염시켜 실험적 뇌수막염을 유발시키고 감염 후 경과에 따른 숙주의 T 임파구 기능의 변동을 관찰하고 아울러 혈청내 항체가를 측정하였다.

실험재료 및 방법

1. *Naegleria fowleri*의 배양

본 실험에 사용한 *N. fowleri* 0359주(株)(벨지움, Jardin J.B 교수제공)는 37°C 항온기에서 CGVS배지(bactocastone 10g, folic acid 1mg, biotin 10mg, glucose 0.5gm, penicillin 25×10⁴ unit, streptomycin 2.5×10⁴ mcg, fetal calf serum 25ml, 증류수 500ml)로 무균배양하였다.

2. 실험동물

8주된 20g내외의 백색, 웅성 ICR마우스를 사용하였다.

3. *N. fowleri*의 감염

마우스를 체중 g당 0.06mg의 secobarbital을 복강내로 주입시켜 마취시킨 후 계대배양하고 48시간 경과된 운동이 활발한 *N. fowleri* 영양형 7×10⁴개를 5μl의 생리식염수에 부유시켜 마우스 비강내로 떨어뜨려 감염시켰다. 실험대조군은 실험군과 같은 방법으로 마취시킨 후 아메바대신 생리식염수를 비강에 떨어뜨렸다.

4. *N. fowleri* lysate의 제조

배양된 *N. fowleri* 영양형을 모아 RPMI1640 배지로 세척한 후 초음파 마쇄기로 아메바를 파괴시키고 4°C에서 20,000g로 60분간 원심침전하여 상층액을 채취하여 0.2μm pore size의 여과지로 여과하였다. Lowry 등(1951)의 방법으로 이 여과액의 단백질 함량을 측정하였다.

5. 혈청내 항체가의 측정

*N. fowleri*를 감염시키고 그 경과에 따른 항체가의 변동을 측정하기 위하여 감염시키고 0, 3, 7, 11, 15일 후에 각각 마우스 심장에서 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하였다. Voller 등(1976)이 시행한 효소표식 면역결

사법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)으로 혈청내 항체가를 측정하였다.

항원은 제조된 *N. fowleri* lysate를 사용하였으며 carbonate-bicarbonate 완충액(pH 9.6)으로 polystyrene plate well당 0.5 μ g이 들어가도록 희석한 후 4°C에서 하루밤 방치하여 항원을 부착시켰다. 세척액(NaCl 9g, Tween 20 0.5ml, 증류수 1,000ml)으로 세척 후 혈청은 인산완충액(pH 7.4)으로 1:500되게 희석하여 항원이 부착된 well에 100 μ l씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 세척한 후 인산완충액으로 1:2,000되게 희석한 peroxidase-conjugated goat antimouse IgG(Cappel, USA)를 well에 넣고 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. 세척한 후 기질을 넣고 실온에서 30분 반응시키고 2N H₂SO₄를 넣어 반응을 정지시켰다. 기질은 0.1M phosphate-citric acid 완충액(pH 5.0)에 O-phenylene diamine과 과산화수소(H₂O₂)를 혼합하여 사용하였다. 이어 ELISA reader(Dynatech, USA)로 흡광도를 측정하였다.

6. T 임파구 기능

*N. fowleri*를 감염시키고 경과에 따른 세포매개성 면역상태를 알기 위하여 감염후 0, 3, 7, 11, 15일째에 각각 마우스를 희생시켜 그 비장세포에 T임파구 mitogen인 concanavalin A(이하 con. A로 약함)와 제조된 *N. fowleri* lysate를 각각 넣고 RPMI 1640 배지에서 배양한 후 배자발생 정도는 [³H]-thymidine을 첨가하고 6시간 경과한 후 방사능을 측정하였다.

마우스의 복막을 열고 비장을 꺼내어 10% fetal calf serum, L-glutamine, penicillin(100unit/ml), streptomycin(100 μ g/ml)을 함유시킨 RPMI 1640 배지에서 가위로 잘게 부수어 비장세포 부유액을 만들었다. Tris-NH₄Cl(pH 7.2)을 넣어 적혈구를 용혈시키고 RPMI 1640 배지로 세척한 후 96 well polystyrene plate(Nunc, Denmark)에 well당 10⁶개의 세포가 200 μ l의 RPMI 1640 배지에 함유되도록 하였다. 배지에는 4 μ g/ml의 con. A 또는 100 μ g/ml의 *N. fowleri* lysate를 포함시켰다. 37°C, CO₂ 항온기에서 42시간 배양 후 methyl-³H-thymidine(ICN, USA)을 well당 1 μ Ci씩 넣고 6시간 방치한 후 세포수확기(Titertek)에서 유리필터 섬유로 세포를 수확한 후 섬광카테일(xylene 1l, POPOP 0.1g, PPO 5g) 3ml를 넣어 액체섬광 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다.

T임파구의 기능은 임파구의 배자발생 정도를 관찰하였는데 uptake되는 [³H]-thymidine의 양으로 측정하였으며 다음 공식에 의해 자극지수를 산출하였다.

자극 지수 =

$$\frac{\text{con. A 또는 } N. fowleri \text{ lysate로 처리된 비장세포의 방사능(cpm)}}{\text{처리 안된 비장세포의 방사능(cpm)}}$$

*N. fowleri*를 감염시키지 않은 대조군에서도 감염시킨 실험군과 같은 방법으로 비장세포를 분리하여 con. A 또는 *N. fowleri* lysate로 처리한 후 [³H]-thymidine

을 넣어 방사능을 측정하였다.

실험성적

1. 혈청내 항체가

효소표식 면역검사법으로 측정한 마우스 혈청내 항체가는 감염후 3일에는 감염시키지 않은 대조군 0.15 \pm 0.19(O.D. value)와 비교할때 별차이가 없었으나 감염후 7일에는 0.42 \pm 0.37로 증가하기 시작하여 감염후 11일에는 0.91 \pm 0.17, 감염후 15일에는 1.23 \pm 0.37로 최고치에 달했다(Fig. 1).

2. Concanavalin A 및 *N. fowleri* lysate의 적정농도

마우스 비장세포의 배자발생 정도를 측정하기 위한 *N. fowleri* lysate의 적정농도를 알아보려고 배양액 1ml에 *N. fowleri* lysate의 단백질 10 μ g, 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g이 함유되게 첨가하였다. 100 μ g/ml에서 12152.3

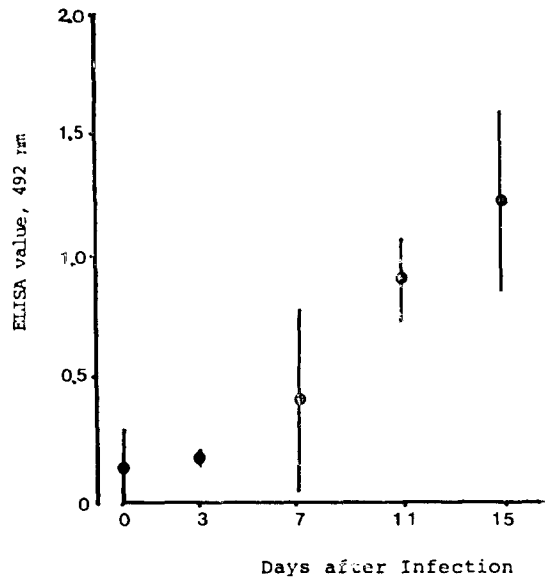


Fig. 1. IgG antibody level of serum in mice infected intranasally with *N. fowleri*.

Table 1. Determination of optimal concentration of *N. fowleri* lysate for spleen lymphocytes blastogenesis

Protein concentration of <i>N. fowleri</i> lysate (μ g/ml)	Methyl- ³ H-thymidine incorporation, cpm Mean \pm S.D.
0	2,779.0 \pm 234.84
10	5,137.7 \pm 464.85
50	8,009.3 \pm 578.08
100	12,152.3 \pm 1,188.13
200	8,922.7 \pm 805.93

±1188.13cpm으로 가장 높은 방사능치를 나타내어 이 값을 적정농도로 택하여 실험하였다(Table 1).

마우스 비장세포의 기능을 측정하기 위한 con. A의 적정농도는 4μg/ml이었다.

3. T림파구의 기능 변동

Con. A를 마우스 비장세포 배양액에 첨가하여 T림파구의 배자발생 정도를 측정하였다. 감염 후 3일째부터 T림파구의 배자발생 정도는 비감염 대조군에 비해

Table 2. Blastogenic responses (stimulation index) of con. A-treated splenocytes from non-infected and *N. fowleri*-infected mice

Days after infection	Stimulation Index*, Mean±S.D.	
	Control	Infection
0	2.3±0.53	2.2±0.61
3	2.2±2.44	0.7±0.31
7	3.2±1.93	1.4±1.20
11	2.5±1.94	0.9±0.59
15	1.6±0.57	1.5±1.14

*Stimulation index

$$= \frac{\text{cpm of stimulated splenocytes}}{\text{cpm of unstimulated splenocytes}}$$

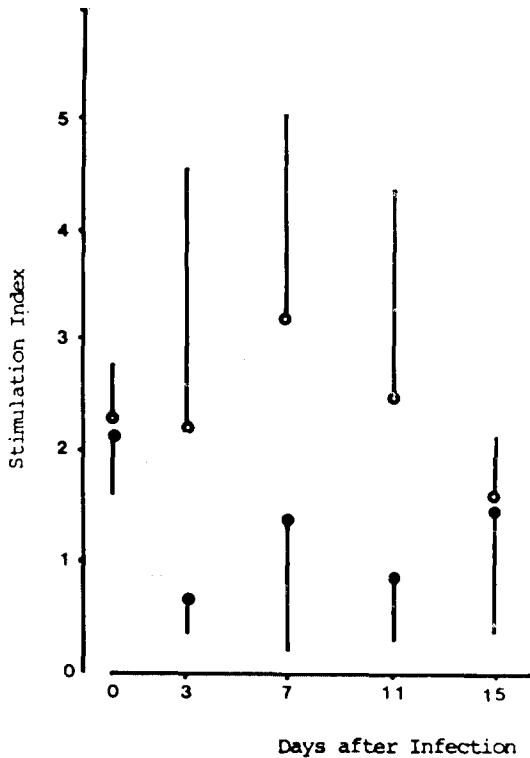


Fig. 2. Blastogenic responses (stimulation index) of con. A-treated splenocytes from non-infected (○) and *N. fowleri*-infected mice (●).

Table 3. Blastogenic responses (stimulation index) of *N. fowleri* lysate-treated splenocytes from non-infected and *N. fowleri*-infected mice

Days after infection	Stimulation Index, Mean±S.D.	
	Control	Infection
0	1.2±0.31	1.7±0.29
3	1.3±1.33	0.6±0.28
7	2.3±0.72	1.4±0.46
11	2.3±0.91	1.4±0.49
15	2.2±0.3	1.6±0.83

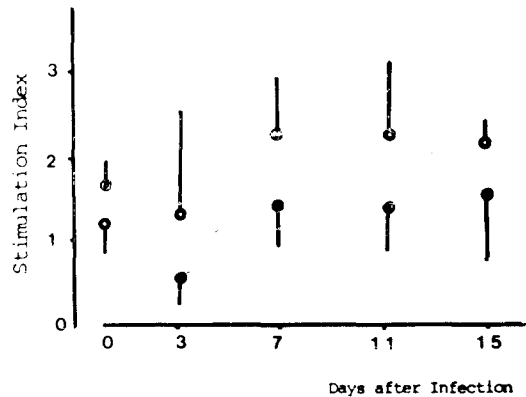


Fig. 3. Blastogenic responses (stimulation index) of *N. fowleri* lysate treated splenocytes from non-infected (○) and *N. fowleri*-infected mice (●).

감소되어 감염 후 11일까지 계속 감소되어 있었고($p < 0.05$), 감염 15일 후에는 대조군과 비슷하게 증가됨을 알 수 있었다(Table 2, Fig. 2).

N. fowleri lysate를 비장세포 배양액에 첨가한 경우에도 con. A를 넣은 경우와 그 성적이 유사하였는데 감염 후 3일부터 T림파구의 배자발생 정도는 대조군에 비교할때 감소되어 감염 후 15일까지 감소되어 있음을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$) (Table 3, Fig. 3).

고 찰

원충에 감염되었을 때 면역반응이 저하되어 있음이 여러 보고에서 밝혀져 있다. 말라리아 원충에 감염되면 내피망상계의 증식이 일어나고 hyperglobulinemia가 관찰되는 등 면역계가 활성화 되어 있음에도 불구하고 양 적혈구를 비롯한 여러 항원으로 면역시킬때 항체형성이 저하되어 있다고 하였으며(Senger 등, 1971; Baker, 1971; Greenwood 등, 1971; Salaman 및 Wedderburn, 1969), 독소플라스마 감염때에도 양 적혈구로 면역시킬때 IgM과 IgG값이 저하됨이 보고되었다(Strickland 등, 1973). 이외에 *Leishmania donovani*

(Clinton 등, 1969), *Trypanosoma gambiense*(Urquhart, 1973) 등에서도 비슷한 연구결과를 관찰하였다고 보고되었다.

원충감염 때 세포매개성 면역상태를 알아보기 위하여 임파구 배양액에 mitogen을 넣고 배자발생 정도를 측정하기 위하여 [³H]-thymidine을 넣어 일정시간 경과 후 방사능을 측정하는 방법이 많이 이용되는데 이 방법으로는 사용된 mitogen의 종류, 임파구의 종류, 감염상태 등 여러 요인에 의해 결과가 달라진다. Britten 및 Hudson(1986)은 *Trypanosoma cruzi*를 감염시킨 마우스 임파구에 mitogen으로 epimastigote, trypomastigote lysate를 넣었을때 급성 감염기에는 세포 증식이 대조군과 비슷하나 만성기로 이행되었을 때는 임파구 증식이 증가되는 것을 관찰하였다. Simjee 등 (1985)은 이질아메바에 의한 간농양 환자의 임파구배양에 amebic lysate를 넣어 주면 임파구 증식이 증가하나 비특이적 T임파구 mitogen인 phytohemagglutinin(PHA)을 넣은 경우 임파구 증식이 일어나지 않았다고 하였다.

본 실험성적에 의하면 *N. fowleri*를 감염시킨 마우스에서 감염 3일후에는 비강을 통해 후뇌로 들어간 아메바가 증식하는 시기로 이때부터 정상대조군보다 T임파구 기능이 감소되며 마우스가 죽는 시기인 7일부터 15일에 걸쳐서 계속 T임파구의 기능이 감소되어 있음을 알 수 있었다. 즉 *N. fowleri*를 마우스에 감염시켰을 때 급성기인 7일후부터 15일까지 T임파구의 기능이 비감염 대조군보다 감소되어 있음을 알 수 있었으나 만성기로 이행되면 세포성면역기능이 회복되는지 여부는 앞으로 연구해야 할 과제로 남아있다.

Strickland 등 (1975)은 *Toxoplasma gondii*를 감염시킨 마우스 비장세포 배양액에 con. A와 lipopolysaccharide를 첨가하여 T임파구의 기능이 저하됨을 관찰하였는데 이에 대해 여러가지 가설을 세웠다. 비장에 있는 T임파구가 mitogen에 반응하지 않는 대식세포 같은 세포로 희석되었거나, T임파구가 이미 말초혈액으로 이동되어 blastoid 세포로 변화되어 더이상 mitogen에 반응하지 못하거나, T임파구 기능을 억제하는 비특이적 억제세포 또는 활성화된 대식세포 때문이라고 하였다. *Trypanosoma cruzi*의 감염시에도 면역반응이 저하되는데 이것에 대해서 Ramos 등 (1979)은 억제 T임파구 때문이라고 하였고, Kierszenbaum(1982)은 억제 대식세포, Cunningham 및 Kuhn(1980)은 suppressor factor 때문이라고 하였다. 본 연구에서 *N. fowleri*를 감염시킨 마우스에서 T임파구의 기능이 저하됨을 알 수 있었는데 앞으로의 실험에서는 임파구중 T임파구를 분리하여 mitogen을 넣는다면 T임파구를 subpopulation으로 분리하는 등 여러 방법으로 시도해 보아야 하겠다.

Ferrante 및 Smyth(1984)는 *N. fowleri* lysate를 마우스 T임파구 배양에 넣어 mitogenic effect가 있음을 보고하였다. 본 실험에서는 비특이 T임파구 mitogen

인 con. A와 특이 T임파구 mitogen이라 볼 수 있는 *N. fowleri* lysate를 *N. fowleri*를 감염시킨 마우스 비장세포 배양액에 넣어 관찰하였다. 이 두가지 mitogen의 종류에 관계없이 비슷한 성적을 얻을 수 있었다. 즉 *N. fowleri*를 감염시킨 마우스 비장세포에 비특이 T임파구 mitogen인 con. A를 처리하여 관찰된 세포매개성 면역의 기능저하 정도는 특이 mitogen이라 볼 수 있는 *N. fowleri* lysate를 처리하여 얻은 성적과 비슷하여 서로 상관성이 있는 것으로 생각된다.

지금까지 연구 보고되지 않은 *N. fowleri* 감염때의 세포매개성 면역에 대하여 본 연구에서 그 실험성적을 제시하고 있다. 본 연구성적을 요약하면 *N. fowleri*를 마우스에 감염시켰더니 급성기에 항체가 상당히 높음을 알 수 있었으나 세포매개성 면역는 저하되어 있었음을 알 수 있었다.

요 약

*N. fowleri*를 감염시키고 그 경과에 따른 숙주의 면역기능 변동을 알아보고자 마우스에 *N. fowleri*를 감염시키고 그 경과에 따른 T임파구 기능과 혈청내 항체를 관찰하였다.

T임파구 기능을 알아보기 위하여 비장세포를 배양할 때 mitogen으로 con. A와 *N. fowleri* lysate를 첨가하고 42시간 배양후 methyl-[³H]-thymidine을 넣어 비장세포에 uptake되는 정도를 측정하였으며 혈청내 항체는 효소표식 면역검사법(ELISA)으로 측정하였다. 실험성적을 요약하면 다음과 같다.

T임파구의 기능은 사용된 mitogen con. A와 *N. fowleri* lysate에 관계없이 감염 후 3일부터 감소되어 11일까지 대조군에 비해 유의하게 감소되었다. 감염후 15일에는 *N. fowleri* lysate를 사용하였을 경우 T임파구 기능이 계속 감소되어 있었으나 con. A를 첨가하였을 때 정상대조군과 차이가 없음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

黃瀚琦, 尹德鎮, 任敬一, 蘇鎮璋: 자유생활 아메바의 병원성에 관한 실험적 연구. 연세의대 논문집, 9(2): 86-98, 1976.

Baker, L.R. (1971) Experimental malaria: Effects upon the immune response to different antigens. *J. Inf. Dis.*, 123:99-101.

Britten, V. and Hudson, L. (1986) Immune supression to *Trypanosoma cruzi* antigens is associated with infection but not immunization. *Trop. Med. Parasit.*, 37:97-100.

Carter, R.F. (1970) Description of *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amebic meningoencephalitis and of the experimental pathological

- changes induced by it. *J. Path.*, **100**:219-244.
- Clinton, B.A., Stauber, L.A. and Palczuk, N.C. (1969) *Leishmania donovani*: Antibody response to chicken ovalbumin by infected golden hamsters. *Exp. Parasit.*, **25**:171-180.
- Cunningham, D.S. and Kuhn, R.E. (1980) *Trypanosoma cruzi* induced suppressor substance. 1. Cellular involvement and partial characterization. *J. Immunol.*, **124**:2122-2129.
- Ferrante, A. and Thong, Y.H. (1979) Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Intern. J. Parasit.*, **9**:599-601.
- Ferrante, A. and Smyth, C. (1984) Mitogenicity of *Naegleria fowleri* extracts for murine T lymphocytes. *Immunology*, **51**:461-468.
- Greenwood, B.M. and Playfair, J.H.L., Torrigiani, G. (1971) Immunosuppression in murine malaria. I. General characteristics. *Clin. Exp. Immunol.*, **8**:467-478.
- Holbrook, T.W., Boackle, R.J., Parker, B.W. and Vesely, J. (1980) Activation of the alternative complement pathway by *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.*, **30**:58-61.
- Kierszenbaum, F. (1982) Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi* infection): Role of non-adherent, non-specific, esterase-positive splenic cells. *J. Immunol.*, **129**:2202-2205.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.
- Martinez, A.J., Duma, R.J., Nelson, E.C. and Morreta, F.L. (1973) Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Preparation of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: A light and electron microscope study. *Lab. Invest.*, **29**:121-133.
- Ramos, C., Schadtler-Siwon, I. and Ortiz-Ortiz, L. (1979) Suppressor cells present in the spleen of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Immunol.*, **122**:1243-1247.
- Salaman, M.H. and Wedderburn, N. (1969) The immunodepressive effect of a murine oncogenic viruses. *J. Gen. Microbiol.*, **59**:383-391.
- Sengers, R.C.A., Jerusalem, C.R. and Doesburg, W. H. (1971) Murine malaria IV. Disturbed immunological responsiveness during *Plasmodium berghei* infection. *Exp. Parasit.*, **30**:41-53.
- Simjee, A.E., Gathiram, V., Coovadia, H.M., Jackson, T.F.H.G., Kiepiela, P., Pudifin, D.J. and Stretton, M. (1985) Cell-mediated immunity in hepatic amoebiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**:165-168.
- Strickland, G.T., Pettitt, L.E. and Voller, A. (1973) Immunodepression in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **22**:452-455.
- Strickland, G.T., Ahmed, A. and Sell, K.W. (1975) Blastogenic response of *Toxoplasma*-infected mouse spleen cells to T- and B-cell mitogens. *Clin. Exp. Immunol.*, **22**:167-176.
- Thong, Y.H., Ferrante, A., Shepherd, C. and Rowan-Kelly, B. (1978a) Resistance of mice to *Naegleria* meningoencephalitis transferred by immune serum. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **72**:650-652.
- Thong, Y.H., Shepherd, C., Ferrante, A. and Rowan-Kelly, B. (1978b) Protective immunity to *Naegleria fowleri* in experimental amoebic meningoencephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **27**:238-240.
- Urquhart, G.M., Murray, M., Murray, P.K. and Jennings, F.W. (1973) Immunodepression in *Trypanosoma brucei* infections in rats and mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **67**:528-535.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. World H. Org.*, **53**:55-65.

=Abstract=

Blastogenic responses of splenic lymphocytes to *Naegleria fowleri* lysates and T-cell mitogen in mice with primary amoebic meningoencephalitis.

Kwang-Min Park, Jae-Sook Ryu and Kyung-Il Im

Department of Parasitology, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

This study was to observe the changes of blastogenic responses of splenic lymphocytes to T-cell mitogens, *N. fowleri* lysate and concanavalin A, and serum antibody titer during the course of experimental PAM in mice.

Naegleria fowleri, strain 0359, was cultured in the CGVS medium axenically and inoculated intranasally with 7×10^4 trophozoites for the development of experimental PAM in mice.

The amoebae were subjected to ultrasonication and centrifuged at 20,000g for 60 minutes, and filtered through 0.2 μ m filter membrane. The supernatant, *N. fowleri* lysate, was used as T-cell mitogen, and antigen for ELISA. The serum antibody was examined by ELISA using peroxidase conjugate.

Two hundred μ l of 10^6 splenocytes in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum were added to each well of a microtiter plate. To each well was added T-cell mitogens, 100 μ g/ml of *N. fowleri* lysate or 4 μ g/ml of con. A, and the plates were incubated for 42 hours at 37°C in 5% CO₂ incubator. Cultures were pulsed with 1 μ Ci of methyl-(³H)-thymidine 6 hour before harvesting.

The mean blastogenic response of the splenocytes to *N. fowleri* lysate was reduced, whereas that to con. A was also reduced up to on day 11 after infection. Both of these results were statistically significant compared with those of uninfected control group. The serum antibody titers were increased gradually up to day 15.

The results indicated that there was an impairment of the blastogenic response of splenocytes to *N. fowleri* lysate during the acute course of experimental PAM in mice.