

세포에 의한 아메바성 수막뇌염에 대한 피동면역의 전달*

延世大學校 醫科大學 寄生蟲學教室 및 熱帶醫學研究所

任 敬 一 · 柳 在 淑

요 약 : *Naegleria fowleri*로 면역된 마우스 비장세포를 이입(移入)함으로써 원발성 아메바성 수막뇌염의 발생을 방어할 수 있는지 즉 방어면역을 피동적으로 전달할 수 있는지를 관찰하였다. 무균 배양한 *N. fowleri*, ITMAP 359 영양형 7×10^4 개를 생후 6주된 ICR 마우스에 감염시켰다. 살아있는 *N. fowleri* 영양형 10^6 개씩을 1주일 간격으로 3회 복강내로 주입시켜 면역시켰다. 면역시킨 마우스의 비장을 적출하여 10^7 개의 비장세포가 함유된 부유액을 마우스 복강내로 주입시키고 3일 후 *N. fowleri*를 감염시켰다. 비장세포에 Con. A와 lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 후 배자발생 정도를 methyl- 3 H-thymidine을 사용하여 측정하였다.

*N. fowleri*를 감염시킨 마우스의 사망률을 보면 정상 비장세포를 주입시킨 실험대조군에서 84%, 면역 비장세포를 주입시킨 실험군에서 72%로서, 정상 대조군에서의 사망률 100%에 비해 낮음을 알 수 있었다. 면역된 비장세포를 주입시킨 실험군에서 LPS를 처리한 비장세포의 배자발생 정도는 감염 7일 후 실험대조군이나 정상대조군에 비해 증가되어 있었고, Con. A치리에 의한 배자발생 정도도 감염 7일 후 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다. 혈청내 항체가는 감염 12일 후 정상 대조군에 비해 실험군과 실험대조군에서 높았다.

Key words: *Naegleria fowleri*, passive immunity, splenocyte transfer, mice

서 론

서울지역 하수 및 물웅덩이에서 *Naegleria* sp.와 *Acanthamoeba* sp.를 분리 동정하였고, 실험동물 마우스에 감염시켜 수막뇌염을 일으킴으로서 병원성이 있음을 입증하였다(黃등, 1976). 이와 같은 병원성 자유생활 아메바의 면역학적 연구는 많지 않다. 실험동물 마우스에 *Naegleria fowleri* 영양형으로 면역시키고 실험적으로 감염시켰더니 원발성 아메바성 수막뇌염의 발생율이 감소되었고, 사망한 마우스의 생존기간도 면역로 인하여 연장됨을 알 수 있었다(李등, 1985). 면역시킨 마우스로부터 태어난 새끼 마우스에 다시 면역시켰더니 방어면역이 나타나지 않음이 보고되었다(任등, 1985).

원충에 의한 감염성 질환에서 면역기전에 관한 연구는 감염된 실험동물로부터 세포성 또는 체액성 인자를 전달시키는 방법이 알려짐에 따라 발전되어 왔다. Greenblatt et al. (1972)은 *Trypanosoma lewisi*에 감염된 rat 면역 비장세포의 transfer를, Patton(1972)은 복강 삼출액 세포의 영향을 연구하였다. Jayawardena et al. (1978)은 *Plasmodium yoelii*로 감염된 마우스에서

세포와 혈청에 의해 면역이 피동전달됨을 보고하였다. 병원성 자유생활 아메바로 면역시킨 실험동물의 세포 특히 비장세포를 transfer함으로써 방어면역이 전달될 수 있는지는 흥미있는 일이다.

본 연구는 병원성 자유생활 아메바 *N. fowleri*로 면역된 마우스의 비장세포를 이입(transfer)함으로써 *N. fowleri* 감염으로 야기되는 원발성 아메바성 수막뇌염의 발생을 방어할 수 있는지, 즉 *N. fowleri*에 대하여 면역된 마우스 비장세포를 이입함으로써 방어면역을 피동적으로 전달시킬 수 있는지 관찰하고자 한 것이다.

실험재료 및 방법

1. *N. fowleri* 배양

병원성 자유생활 아메바인 *N. fowleri*는 ITMAP 359주를 사용하였으며 그 배양은 CGVS 배지(Willaert, 1971)에서 무균적으로 3일마다 계대 배양하였다.

2. 실험동물

생후 6주된 체중 15g 내외의 백색 웅성 ICR 마우스를 사용하였고, 실험실내에서 통상적인 방법으로 사육하였다.

3. 면 역

실험실에서 배양한 살아 있는 *N. fowleri* 영양형을 생리식염수에 부유시켜 1×10^6 개씩 1주일 간격으로 3회 복강내로 주입시켜 면역시켰다. 대조군에서는 생리

* 이 연구는 연세대학교 의과대학 1985~1986년도 교육연구비에 의해 이루어졌음.

식염수 0.5ml씩을 복강내로 주사하였다.

4. 비장세포 채취 및 접종

N. fowleri 영양형으로 면역시킨 마우스를 희생시키 비장을 적출하여 배지 RPMI 1640에 넣고 가위를 사용하여 비장조직을 잘게 자른 후 1ml 주사기로 pumping하여 비장세포 부유액을 만들었다. 여기에 0.75% NH₄Cl 함유 0.016M tris 완충액 (pH 7.2)을 넣어 적혈구를 용혈시킨 후 RPMI 1640으로 비장세포를 3회 세척하였다. 다시 0.5ml의 RPMI 1640 배지에 10⁷개의 비장세포가 함유되도록 한 후 마우스 복강에 주입시켰다.

실험 대조군에서는 생리식염수를 복강내로 주입시켰던 마우스로부터 비장을 적출하여 위에서 기술한 바와 같은 방법으로 비장세포 부유액을 제조하여 10⁷개의 비장세포를 *N. fowleri*를 감염시킬 마우스 복강내에 주입시켰다.

5. *N. fowleri*의 감염

비장세포를 주입시키고 3일 후 *N. fowleri*를 감염시켰다. 마우스 체중 g당 0.06mg의 secobarbital로 마취시키고, 생리식염수 5μl에 *N. fowleri* 영양형 7×10⁴개가 함유되도록 부유액을 만들어 비장내로 떨어뜨려 감염시켰다. 감염시킨 후 매일 마우스의 병적 상태 여부를 관찰하였으며, 사망한 마우스는 그 뇌조직 일부를 떼어내어 아메바의 존재 여부를 현미경으로 관찰하였다.

6. 면역기능 측정

T림프구 및 B림프구 mitogen인 concanavalin A (Con. A, Chemicon) 및 lipopolysaccharide (LPS, Sigma)를 비장세포와 혼합한 후 배양하였다. 이때 비장세포의 배자 발생 정도를 관찰하기 위하여 methyl-[³H]-thymidine (ICN)을 사용하여 측정하였다.

비장세포를 마우스 복강내로 주입시키고 0일, 3일, 7일, 12일, 21일 후에 비장을 적출하여 위에 기술한 방법대로 비장세포 부유액을 만들어 polystyrene plate의 각 well당 10⁶개씩의 비장세포를 넣고 200μl의 RPMI 1640을 첨가하였다. 이때 배지 ml당 4μg의 Con. A 또는 60μg의 LPS가 함유되도록 하였다. 5% CO₂ 항온기에서 37°C, 42시간 동안 배양하고 각 well에 1μCi씩의 methyl-[³H]-thymidine을 첨가하고 6시간

배양한후 Titertek 세포수확기에서 glass filter fiber로 세포를 수확하였다. 여기에 다시 scintillation cocktail (xylene 1l, POPOP 0.1g, PPO 5g) 3ml를 넣어 liquid scintillation counter를 사용하여 방사능을 측정하였다. 이때 비장 림프구의 배자 발생 정도는 uptake되는 [³H]-thymidine의 방사능 양으로 측정하였으며, 다음 공식에 의해 자극지수를 산출하였다.

$$\text{Con. A 또는 LPS로 처리된 비장세포의 자극지수} = \frac{\text{방사능 (cpm)}}{\text{처리안된 비장세포의 방사능 (cpm)}}$$

생리식염수 주입 마우스의 비장세포를 접종받은 마우스와 정상 비장세포를 접종받지 않은 정상 대조 마우스에서도 위에서 기술한 방법으로 비장세포를 분리하여 mitogen과 [³H]-thymidine을 처리하여 방사능을 측정하였다.

7. 효소면역법 (ELISA)

마우스에 *N. fowleri*를 감염시키고 각 실험군에서 감염후 경과한 기간별로 혈청을 분리하여 항체가 측정하였다. 항체가 측정은 ELISA를 이용하였다. 사용된 항원은 *N. fowleri* lysate였다. 즉 *N. fowleri* 영양형을 ultrasonicator로 파괴시키고 20,000g로 60분간 원심침전하여 그 상층액을 사용하였으며 polystyrene plate의 well당 이 lysate의 단백질 함량 0.5μg이 들어가도록 하였다. ELISA는 Voller *et al.* (1976)의 방법대로 시행하였다. Conjugate는 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Cappel), 기질은 *o*-phenylenediamine과 H₂O₂를 사용하였고, ELISA 측정기 (Dynatech)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. *N. fowleri*에 의한 수막뇌염 발생

*N. fowleri*를 감염시킨 후 마우스의 사망률을 보면 (Table 1) 대조군에서 100%로서, 감염후 7일째부터 사망하기 시작하여 16일에 모두 사망하였다. 정상 마우스 비장세포를 주입시킨 실험 대조군에서는 사망률이 84%, 면역시킨 마우스 비장세포를 주입시킨 실험군에서는 72%로써 정상 대조군에 비해 사망률이 낮음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

Table 1. Cumulative numbers of death of mice infected with *N. fowleri*

Group	No. of exam.	Cumulative No. of death on days post-infection																	Mortality (%)	Survival time* (mean ± S.D.)
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
Control	23	—	—	—	3	11	14	15	18	20	20	21	21	22	23	—	—	100	9.8±2.8	
Normal splenocyte transfer	25	1	2	2	2	2	4	9	12	15	16	18	19	19	20	21	—	84	11.3±3.8	
Immunized splenocyte transfer	25	1	1	1	1	1	4	7	10	12	14	17	18	—	—	—	—	72	11.2±3.0	

*Duration(days) of survival of mice from infection to death

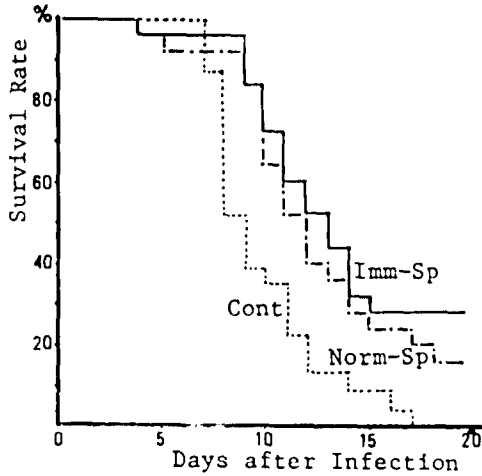


Fig. 1. Survival rates of mice transinoculated with normal splenocytes (---), immune splenocytes (—), or no splenocytes (.....), and challenged with 7×10^4 *N. fowleri* trophozoites.

또한 사망한 마우스의 생존기간을 보면 실험군에서 11.2 ± 3.0 일로써 정상대조군에서의 9.8 ± 2.8 일, 실험대조군에서의 11.3 ± 3.8 일에 비해 별 차이가 없음을 관찰할 수 있었다. 사망한 마우스는 모두 아메바성 수막뇌염이 발생되어 있음을 확인할 수 있었다 (Table 1 & Fig. 1).

2. 면역기능

B 림프구 mitogen인 LPS에 의한 비장세포의 배자 발생 정도를 관찰하였다. *N. fowleri*를 감염시키고 7일 후 정상대조군과 실험대조군에 비해 실험군에서 비장세포의 배자 발생이 증가되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 감염 12일 후와 21일 후에서의 배자 발생 정도는 차이가 없었다(Fig. 2).

T 림프구 mitogen인 Con. A 처리에 의한 비장세포

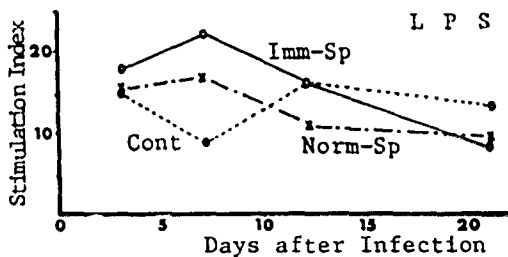


Fig. 2. The stimulation index in LPS treated splenocyte cultures from mice transinoculated with normal splenocytes (---), immune splenocytes (—), or no splenocytes (.....), and challenged with 7×10^4 *N. fowleri* trophozoites.

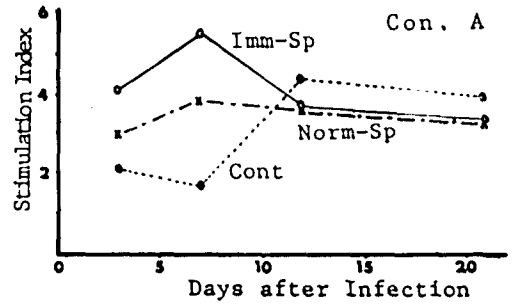


Fig. 3. The stimulation index in Con. A treated splenocyte cultures from mice transinoculated with normal splenocytes (---), immune splenocytes (—), or no splenocytes (.....), and challenged with 7×10^4 *N. fowleri* trophozoites.

의 배자 발생도 감염 7일 후 증가되어 있었음을 관찰할 수 있었다. 또한 감염 12일 후와 21일 후 실험군에서 배자 발생의 정도는 정상대조군이나 실험대조군에서의 성적과 차이가 없었다(Fig. 3).

면역된 마우스의 비장세포를 이입시킨 후 *N. fowleri*를 감염시키고 T 및 B 림프구의 기능을 비장세포 배자 발생 정도로 관찰하였는데 감염 7일 후 T 및 B 림프구 기능은 일시적으로 증가하였으나, 감염 12일 후와 21일 후에는 정상대조군과 비교할 때 차이가 없음을 알 수 있었다(Figs. 2 & 3).

3. 항체 측정

*N. fowleri*를 감염시킨 각 실험군에서 혈청내 항체

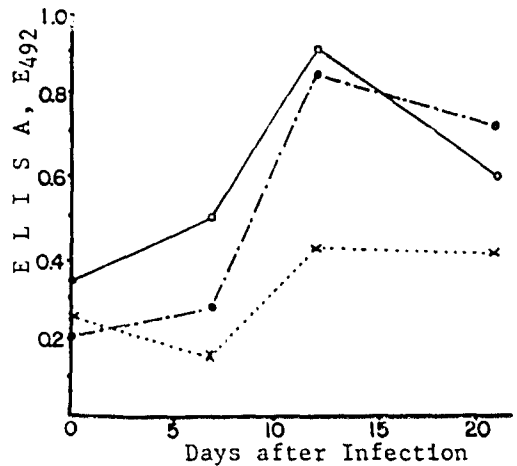


Fig. 4. Changes of circulating antibody (ELISA value) in mice transinoculated with normal splenocytes (---), immune splenocytes (—), or no splenocytes (.....), and challenged with 7×10^4 *N. fowleri* trophozoites.

가를 ELISA에 의해 측정하였다. 정상대조군에서는 감염 후 12일 이후 약간 증가하였다. 정상 비장세포를 이입한 실험대조군과 면역된 마우스의 비장세포를 이입한 실험군에서는 정상대조군보다 혈청가가 높았다. 그러나 실험대조군과 실험군에서의 혈청가의 차이는 없었다(Fig. 4).

고 찰

원충 감염이 세포매개성 면역 또는 체액성 면역의 피동적 전달에 의해 영향받을 수 있음은 잘 알려져 있다. Thong *et al.* (1978)은 면역시킨 마우스로부터 혈청을 분리하여 부강에 주입시켰더니 *N. fowleri*에 대한 면역이 전달되어 원발성 아메바성 수막뇌염 발생률이 저하되었다고 한다. Jayawardena *et al.* (1978)에 의하면 *P. yoelii*의 한변 감염에서 회복된 혈청은 면역을 전달시키지 못하나 여러번 감염된 후 채취된 혈청에 의해서는 감염을 방어시킬 수 있는 면역이 전달되었다고 하며, T세포 기능에 관계없이 면역 비장세포를 주면 방어면역이 발생되며 이 세포를 항홍선세포 혈청이나 보체로 처치해도 방어면역의 발생을 억제 못한다고 하였다. Ghadirian and Meerovitch(1983)는 이질 아메바 감염에 의해 간농양이 발생한 햄스터의 부강 삼출세포나 비장세포를 이입(移入)시켰더니 간농양에 대해 방어면역을 나타내고 이 비장세포를 항홍선세포 혈청으로 처치하였을 때 방어면역이 사라지므로 이때의 작동세포(effector cell)는 아마 T 세포에 의존된다고 하였으며 말라리아 감염에서도 같은 결과가 보고되었다(Verhave *et al.*, 1978).

한편 Jayawardena *et al.* (1978)은 면역된 비장세포를 이입받은 마우스에서 *P. yoelii* 감염 초기에는 오히려 더 빨리 진행된다고 하였고, Prehn(1972)이 연구 보고한 종양에 대한 두가지 면역반응 양상, 즉 면역반응이 약할 때는 종양세포 발육이 촉진되고, 면역반응이 강할 때 종양세포에 대해 세포독성을 나타낸다는 성격과 비슷한 것으로 보아 면역된 세포, 항체 또는 이 세포에서 생산되는 매개 물질이 기생충의 발육을 촉진시킬 수 있다고 하였다.

면역 비장세포의 피동전달에 의한 방어능력은 제한되어 있다고 생각되며 피동전달되는 면역 비장세포의 양이나 전달시기 및 전달되는 경로에 따라 좌우되는 것으로 생각된다. 본 실험에서는 면역 비장세포를 복강으로 전달시킨 마우스에 3일 후 *N. fowleri*를 감염시켰더니 수막뇌염 발생률을 저하시켰으나 그 효과는 현저하지 못했다. 면역 비장세포를 이입받은 마우스에서 *N. fowleri*에 감염된 후 7일에 T 및 B 세포의 배자발생이 증가한 것으로 보아 면역반응이 생기는 하나 수막뇌염 발생을 저하시킬 만큼의 방어 면역반응은 관찰되지 않았다. 비장세포의 주입시기, 주입경로 등을 달리하였을 때 방어면역 효과에 대해서는 앞으로

더 추구해 보아야 하겠다. 또한 비장세포로 측정된 T 세포나 B 세포의 기능도 일시적으로 증가했는데 *N. fowleri*의 감염시기나 감염량에 따라 면역 비장세포의 피동전달에 의해 야기되는 세포성 면역반응의 효과는 크게 좌우될 수 있다고 생각된다.

Greenblatt *et al.* (1972)은 *Trypanosoma lewisi*에서 회복된 비장세포를 백서에 투여하였을 때 백서의 혈청에 기생충을 응집시키고, 중화시킬 수 있는 항체가 생김을 관찰하였다. 본 실험성적에 의하면 비장세포를 주고 감염시킨 실험군에서는 감염만 시킨 대조군보다 항체가 많이 생성되었음을 알 수 있었는데 이렇게 생성된 항체는 방어면역에 공헌하리라 본다.

본 실험을 통해 적당량의 면역세포를 적당한 시기에 주입시키면 생성된 항체와 함께 반응하여 원충 감염을 감소시키든지 또는 완전히 방어할 수 있으며 결과적으로 피동적 방어면역을 증강시킬 수 있다는 가능성을 제시하였다고 본다.

참 고 문 헌

Ghadirian, E. and Meerovitch, E. (1983) Passive transfer of immunity against hepatic amoebiasis in the hamster by cells. *Parasite Immunol.*, 5:369-376.

Greenblatt, C.L., Tyroler, E. and Spira, D.T. (1972) *Trypanosoma lewisi* immune spleen cell transfer in rats. *Exp. Parasit.*, 32: 131-139.

黃瀚琦·尹德鎮·任敬一·蘇鎮璋(1976) 자유생활아메바의 병원성에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집, 9:86-98.

任敬一·李根泰(1985) *Naegleria fowleri*로 면역된 어미에서 태어난 마우스의 방어면역 결여. 기생충학잡지, 23(1):151-155.

Jayawardena, A.N., Targett, G.A.T. and Leuchars, E. (1978) The immunological response of CBA mice to *Plasmodium yoelii* II. The passive transfer of immunity with serum and cells. *Immunology*, 34:157-165.

李順坤·任敬一·李根泰(1985) *Naegleria fowleri* 감염에 대한 방어면역에 관한 실험적 연구. 기생충학잡지, 23(2):293-299.

Patton, C.L. (1972) *Trypanosoma lewisi*: influence of sera and peritoneal exudate cells. *Exp. Parasit.*, 32:370-377.

Prehn, R.T. (1972) The immune reaction as a stimulator of tumour growth. *Science*, 176:170-171.

Thong, Y.H., Ferrante, A., Shepherd, C. and Rowan-Kelly, B. (1978) Resistance of mice to *Naegleria meningoencephalitis* transferred by immune serum. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72(6):650-

652.

Verhave, J.P., Strickland, G.T., Jaffe, H.A. and Ahmed, A. (1978) Studies on the transfer of protective immunity with lymphoid cells from mice immune to malaria sporozoites. *J. Immunol.*, 121: 1031-1033.

Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D.E. (1976) Enzyme immunoassays for parasitic disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70:98-106.

Willaert, E. (1971) Isolement et culture *in vitro* des amibes du genre *Naegleria*. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 51:701-708.

=Abstract=

Passive Immunity by Splenocyte Transfer against Amebic Meningoencephalitis in Mice

Kyung-Il Im and Jae-Sook Ryu

*Department of Parasitology and Institute of Tropical Medicine,
College of Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752, Korea*

The role of passive cell-mediated transfer of immunity against primary amoebic meningoencephalitis (PAME) in mice was studied. *Naegleria fowleri*, ITMAP 359, were cultured in CGVS medium. The ICR mice used were six week-old males of average weight of 15 g. Immunization was done by three intraperitoneal injections of 1×10^6 *N. fowleri* trophozoites at the interval of one week. Splenocytes were obtained from normal and immune mice spleens, and 1×10^7 cells were administered intraperitoneally into mice 3 days before challenge infection. Mice were infected intranasally with 7×10^4 *N. fowleri* trophozoites in a 3 μ l suspension under secobarbiturate anesthesia.

Transplants of normal or immune splenocytes seem to alter the pattern of the PAME development. The splenocytes transferred from immune mice reduced the mortality rate in the *N. fowleri* infected mice, as compared with the mice transferred with the same number of normal splenocytes or without splenocyte. The blastogenic response of the splenocytes to both lipopolysaccharide and concanavalin A was elevated on day 7 after infection the mice transinoculated with immune splenocytes. The serum antibody titers in the mice transferred with immune splenocytes were increased gradually from day 7 up to day 20 after infections by mean of ELISA.

It is suggested that the transfer of splenocytes from immunized mice conferred immunity against *N. fowleri* infection.