

실험적 *Acanthamoeba* 수막뇌염에서 세포성 면역에 관한 연구*

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

任敬一 · 鄭坪林 · 金泰宇

요약 : 병원성이 강한 *Acanthamoeba culbertsoni*를 마우스에 감염시킨 후 경과된 감염기간에 따른 세포매개성 면역반응과 혈청 내 항체가의 변동을 관찰하였다. [³H]-thymidine을 이용한 마우스 비장세포의 아세포화를 관찰하였는데 사용된 mitogen으로는 concanavalin A(Con A)와 lipopolysaccharide(LPS)였으며, 항체의 측정을 위하여 효소표식 면역검사법(ELISA)을 시행하였다. T림프구 및 B림프구의 아세포화 정도는 *A. culbertsoni* 감염 7일 후 증가하는 경향을 보였으며 다른 기간에서는 대조군에 비해 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한 감염된 마우스의 혈청 내 항체가도 감염 7일 후부터 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다.

Key words: *Acanthamoeba culbertsoni*, lymphocyte blastogenesis, antibody, mitogen, ELISA, cell-mediated immunity

서 론

인체 또는 실험동물에서 병원성 자유생활 아메바인 *Naegleria* spp. 또는 *Acanthamoeba* spp.에 의해 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis, PAME)이 발생된다는 것은 널리 알려진 사실이다(Carter, 1970; Culbertson, 1971). 이 종류에 속하는 아메바는 토양, 담수 연체동물, 공기, 해수 등에서 검출, 배양되고 자연 환경에 널리 존재하며(Derrick, 1948), 이 자유생활 아메바의 감염시 체액성 면역에 대해서는 많은 연구가 진행되고 있으나 세포매개성 면역에 대해서는 연구가 활발하지 못한 실정이다.

In vitro system에서 기생충 총체 또는 총체의 분비물은 감염된 숙주의 림프구를 활성화시킨다고 보고되고 있다. 즉 이질아메바, 질트리코모나스, 트리파노조마, 톡소플라스마·곤디와 같은 원충에서 이와 같은 면역반응을 관찰하였다고 한다(Mason and Patterson, 1958; Diamanstein *et al.*, 1981; Selkirk *et al.*, 1981; Hay, 1985). Ghadirian *et al.* (1983)은 실험동물 hamster를 사용하여 간장 아메바증에 대한 면역이 비장세포 등에 의해 피동전달됨을 보고한 바 있다. 일면, 실험동물 마우스에서 *Naegleria fowleri* 영양형으로 면역시키면 PAME 발생률이 감소되고 그 생존기간이 연장된다고 하였다(李 등, 1985). 또한 면역시킨 어미마우스로부터 태어난 새끼 마우스에 면역을 시키면 방어면역이 나타나지 않음을 밝힌바 있다(任 등, 1985). 또 Strickland *et al.* (1975)은 톡소플라스마·곤디로

감염시킨 마우스에서 비특이 T림프구 및 B림프구 mitogen인 PHA, Con A, LPS에 대한 비장세포의 아세포화를 측정하여 감염에 따른 면역 반응의 변동을 관찰하였으며, Ferrante and Smyth(1984)는 *N. fowleri* 영양형의 lysate가 마우스 비장세포 중 T림프구를 활성화시킴을 보고하였다. 또한 Cursons *et al.* (1980)은 기니 픽에서 *N. fowleri* 감염시 림프구에서 분리되는 lymphokine의 일종인 거식세포 유주 저지 인자가 검출되는 것으로 보아 세포매개성 면역이 숙주 방어기전에 중요하다고 하였다.

이에 본 연구에서는 병원성이 강한 *Acanthamoeba culbertsoni*를 감염시킨 마우스에서 세포매개성 면역 반응을 관찰하였다. 즉 감염 후 경과된 시간에 따른 세포매개성 면역 반응과 동시에 혈청 내 항체가의 변동을 관찰하고자 하였다

재료 및 방법

1. *A. culbertsoni*의 배양

실험동물 마우스에서 병원성이 강한 것으로 알려진 *A. culbertsoni* 영양형을 37°C 항온기에서 CGV 배지(Willaert, 1971)를 사용, 무균적으로 계대 배양하여 사용하였다.

2. 실험동물

생후 약 6주 된 15g 내외의 백색 음성 1CR 마우스를 사용하였으며, 실험실 내에서 통상적인 방법으로 사육하였다.

3. *A. culbertsoni*의 감염

마우스 체중 g 당 secobarbital 0.05 mg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후 배양된 *A. culbertsoni* 영양형을

* 이 연구는 연세대학교 의과대학 1987년 및 1988년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음.

생리식염수 5 μ l에 10만개가 함유되도록 한 후, 마우스의 오른쪽 비강에 떨어뜨려 감염시켰다.

4. 비장세포의 아세포화

아메바를 마우스에 감염시킨 후 비장세포의 아세포화 정도를 알아보기 위해 마우스를 희생시켜 그 비장세포에 mitogen을 넣고 RPMI 1640배지에서 48시간 배양한 후 [³H]-thymidine을 첨가하고 6시간 경과한 후 방사능을 측정하였다. 즉 마우스의 복막을 절개한 후 비장을 적출하여, 10% fetal calf serum, L-glutamine, penicillin(100 unit/ml) 및 streptomycin(100 μ g/ml)을 함유시킨 RPMI 1640배지를 멸균된 50 ml 비이커에 넣고 가위 및 1 ml 주사기로 비장을 잘게 부수어 비장세포 부유액을 만들었다. Tris-NH₄Cl(pH 7.2)을 넣어 적혈구를 용혈시키고 RPMI 1640 배지로 2~3회 세척한 후 96-well polystyrene plate(Costar)에 well당 1×10⁶개의 세포가 200 μ l의 RPMI 1640배지에 함유되도록 하였으며, 배지에는 각각 concanavalin A (Con A)와 lipopolysaccharide(LPS)를 첨가시켰다. 이들을 37°C, CO₂ 항온기에서 42시간 배양후 methyl-(³H)-thymidine(ICN)을 well당 1 μ Ci씩 넣고 다시 6시간 배양한 다음, 세포수확기(Titertek)에서 glass fiber filter로 세포를 수확하였고 scintillation cocktail(Xylen 1,000 ml, popop 0.1 g, ppo 5 g) 3 ml를 넣은 vial에서 각각을 용해시켜 liquid scintillation counter를 사용하여 방사능을 측정하였다.

아세포화 정도를 관찰하는 데는 결합된 [³H]-thymidine의 양으로 측정하였으며 다음 공식에 의해 자극 지수를 산출하였다.

$$\text{자극 지수} = \frac{\text{mitogen으로 처리된 비장세포의 방사능(cpm)}}{\text{처리 안된 비장세포의 방사능(cpm)}}$$

아메바를 감염시키지 않은 대조군에서도 감염시킨 실험군과 같은 방법으로 비장세포를 분리하여 Con A와 LPS를 처리한 후 [³H]-thymidine을 첨가하고 그 방사능을 측정하였다.

5. 혈청 내 항체가 측정

마우스 오른쪽 눈의 후안와 정맥총에서 파이펫을 이용하여 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 -30°C에서 저장하였다가 실험에 사용하였다. 항체가는 효소표식 면역검사법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 측정하되 Voller *et al.* (1976)의 방법을 응용하였다.

효소표식 면역검사법에 사용된 항원은 *A. culbertsoni*의 lysate를 사용하였는데 carbonate-bicarbonate 완충액(Na₂CO₃ 0.159 g, NaHCO₃ 0.293 g, 증류수 100 ml, pH 9.6)으로 polystyrene plate well 당 단백질 함량 5 μ g/ml가 들어가도록 희석한 후 4°C에서 하룻밤 방치하여 항원을 부착시켰다. 세척액(NaCl 9 g, Tween 20 0.5 ml, 증류수 1,000 ml)으로 3분 간격으로 2~3회 세척한 후 3% BSA를 각 well에 넣고 4°C에서 12

시간 방치 후 세척액으로 2~3회 세척한 후 혈청을 희석 완충액(NaH₂PO₄ 0.04 g, Na₂HPO₄ 0.26 g, NaCl 1.76 g, Tween 20 0.1 ml, BSA 1 g, 증류수 200 ml, pH 7.4)으로 마우스 혈청을 1:50으로 희석하여 항원이 부착된 각 well에 100 μ l씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 세척한 후 희석 완충액으로 1:1,000이 되게 희석한 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG(Cappel)를 각 well에 넣고 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. 기질은 0.1M phosphate-citric acid 완충액(pH 5.0) 10 ml에 *o*-phenylene diamine(OPD) 5 mg과 과산화수소 4 μ l를 혼합하여 사용하였다. 모든 과정이 끝난 microwell plate는 효소표식 면역검사법 판독기(Dynatech)로 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실 험 성 적

1. 아메바성 수막뇌염의 발생

*A. culbertsoni*를 감염시키고 6일 후부터 마우스가 사망하기 시작하여 15일 후에는 감염시킨 20마리 중 한마리를 제외하고 모두 사망하였다. 사망률은 95%였고, 죽은 마우스의 평균 생존기간은 감염시키고 난 후 8.57일이었다(Fig. 1). 사망한 마우스 모두에서 아메바성 수막뇌염이 발생하였음을 확인할 수 있었다.

2. 감염 기간별 비장 림프구의 아세포화

마우스 비장세포의 아세포화 정도는 감염시킨 후 1일부터 3일 간격으로 측정하여 2주 동안 관찰하였다. Con A의 적정 농도는 5 μ g/ml 그리고 LPS는 50 μ g/ml 이었다.

*A. culbertsoni*에 감염된 실험군에서 T림프구 mitogen인 Con A에 의한 비장세포의 아세포화 정도는 감염 후 7일에 대조군에 비해 현저한 증가를 보였으며 B림프구 mitogen인 LPS에 의한 비장세포의 아세포화 정도도 감염 후 7일에 대조군에 비해 증가를 보인 것을 측정

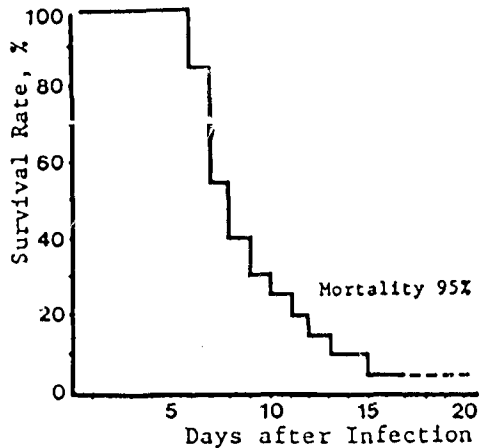


Fig. 1. Survival rate of mice infected intranasally with *A. culbertsoni*.

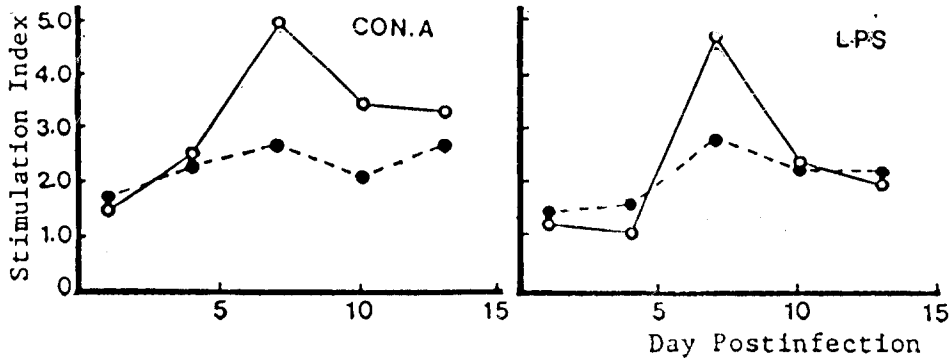


Fig. 2. Stimulation index(blastogenesis) of mitogen-treated splenocytes from non-infected(●●●) and *A. culbertsoni* infected(○●○) mice.

Table 1. Stimulation index* (blastogenic response) of mitogen-treated splenocytes from non-infected and *A. culbertsoni*-infected mice

Post-infection day	Non-infected		Infected	
	Con A	LPS	Con A	LPS
1	1.72±0	1.42±0.51	1.49±0.31	1.23±0.42
4	2.33±0.96	1.61±0.67	2.53±1.12	1.11±0.42
7	2.74±1.21	2.94±1.42	5.15±2.21	4.87±1.68
10	2.22±0.77	2.44±0.88	3.52±0.94	2.55±0.87
13	2.81±1.12	2.43±0.97	3.48±0.03	2.09±0.79

* Stimulation index

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

할 수 있었으며 (Table 1, Fig. 2), 다른 기간에서는 별다른 차이를 보이지 않았다.

3. 혈청 내 항체의 측정

*A. culbertsoni*에 감염된 마우스를 감염 후 경과기간 별로 혈청을 분리한 후 항체가 측정을 위하여 효소표식 면역검사법(ELISA)을 시행하였다. 대조군의 혈청 내 항체가는 전 감염기간에 걸쳐 변동이 없었으나, *A. culbertsoni* 감염시 7일 후부터 계속하여 대조군에 비해 혈청 내 항체가 증가됨을 볼 수 있었다(Fig. 3).

고 찰

인체에서 자유생활 아메바에 의한 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)이 근래에 전 세계적으로 임상례가 계속 늘어남에 따라 (Willaert, 1974), 이 자유생활 아메바의 병원성을 규명하고자 많은 연구가 진행되고 있으며 지금까지 인체에서 이 질병의 원인 원충으로 *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp.가 알려지고 있다.

최근 세포매개성 면역에 관한 연구가 활발히 진행되면서 비장 림프구나 말초혈액 림프구에 T 및 B림프구

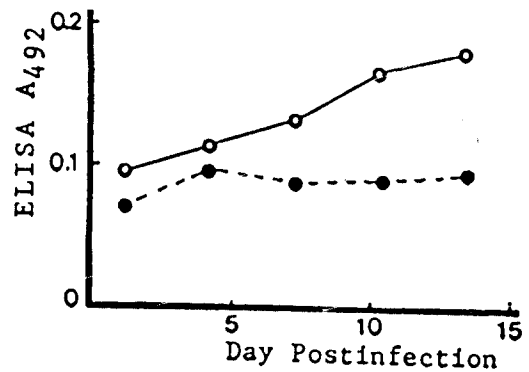


Fig. 3. Changes of circulating antibody titers as measured by ELISA in *A. culbertsoni*-infected(○●○) and control(●●●) mice.

mitogen을 반응시킨 후 [³H]-thymidine을 처리하여 흡착되는 정도 즉 아세포화 정도를 관찰하는 실험이 여러 원충성 감염에 널리 이용되고 있다(Strickland et al., 1975; Diamanstein et al., 1981; Barral-Netto et al., 1983; Ferrante and Smyth, 1984; Simjee et al., 1985; Mason and Patterson, 1985; Barbier et al., 1985; Schurr et al., 1986). 비특이 T세포 mitogen인 Con A 처리시 *Toxoplasma gondii*에 감염된 마우스에서 감염초기에 대조군에 비해 비장세포 아세포화 정도가 감소하였다가 만성기때 점차 증가함이 알려졌다(Strickland et al., 1975; Hay et al., 1985). 또한 *Leishmania* spp.와 *Trypanosoma* spp.에 감염된 마우스나 인체에서 감염 초기 즉, 급성 감염기에 아세포화 정도가 억제됨이 알려졌다(Selkirk et al., 1981; Barbier et al., 1985; Britten and Hudson, 1986; Schurr et al., 1986). 본 실험 성적을 보면 *A. culbertsoni*에 감염된 마우스에서 Con A를 비장세포에 처리했을 때 아세포화가 감염 초기에는 대조군과 비슷하였으나 감염 후 7일째에 증가한 후 다시 감소하여 10일 이후에는 대조군과 비슷한 양상을 보였다.

Trypanosoma spp., *Toxoplasma gondii*, *Naegleria*

spp. 등의 원충이 감염되었을 때 B림프구 mitogen인 LPS의 처리시 림프구 아세포화 정도에 있어서 대조군과 별 차이가 없다고 보고되었는데 (Selkirk *et al.*, 1981; Ferrante and Smyth, 1984; Hay *et al.*, 1985). 본 실험에서는 감염 후 7일째에 증가하였다가 다시 감소하여 대조군과 비슷한 양상을 보여주었다. Con A 처리한 비장세포 아세포화 정도는 감염기간별 LPS 처리한 비장세포 아세포화의 변동과 같음을 알 수 있었다.

Naegleria 감염에 있어 체액성 면역에 관해서는 Thong *et al.* (1978)이 방어면역에 체액성 면역이 중요한 역할을 한다고 보고한 이래 Haggerty and John (1982)은 마우스에게 살아있는 *N. fowleri* 영양형 아치사랑을 혈관 내, 복강 내 또는 비강 내로 반복투여하는 경우 종(種) 특이 응집 항체가 생긴다고 하였으며, 감염 기간별로 혈청 내 IgG의 수준이 증가함을 보고하였다. 본 실험에서 보던 *N. fowleri* 영양형 10⁵을 비강으로 감염시켰더니 15일 후 95%의 사망률을 나타내었는데 이렇게 치명적인 원발성 아메바성 수막 뇌염을 일으키는 마우스에서 효소표식 면역검사법에 의해 측정된 혈청 내 항체는 감염 후 7일째부터 대조군에 비해 증가하기 시작하였음을 알 수 있었다.

본 실험 성적을 요약하면 *A. culbertsoni*는 병원성이 강한 자유생활 아메바의 한 종류로써 감염시킨 마우스에서 B 및 T 림프구 mitogen에 의한 비장세포의 아세포화가 일시적으로 증가했음을 관찰할 수 있었고, 또한 감염기간이 경과됨에 따라 혈청 내 항체가도 점차적으로 증가함을 알 수 있었다.

세포매개성 면역반응은 감염된 원충의 병원성에 따라 다를 수 있다고 생각된다. 즉 원충의 병원성이 강하여 감염된 숙주에서 치명적인 병변을 일으키는 경우 세포매개성 면역반응은 저하되며(朴 등, 1987), 병원성이 약한 원충에 감염될 때 이러한 급성 감염기를 지나면 효과적인 면역반응의 확성이 일어나게 되리라 생각된다. 또한 숙주에서의 체액성 면역반응도 감염되는 원충의 병원성의 강약에 따라 그 반응이 차이가 있으리라고 생각된다.

참 고 문 헌

Barbier, D., Goyot, P. and Dedet, J.P. (1985) *Leishmania braziliensis guyanensis* dermal leishmaniasis: cell-mediated immunity related to clinical features. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**: 47-50.

Barral-Netto, M., Hofstetter, M., Cheever, A.W. and Ottesen, E.A. (1983) Specificity of antibody and cellular immune response in human schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**:106-113.

Britten, V. and Hudson, L. (1986) Immune suppression to *Trypanosoma cruzi* antigens is associated

with infection but not immunization. *Trop. Med. Parasit.*, **37**:97-100.

Cursons, R.T.M., Brown, T.J., Keys, E.A., Moriarty, K.M. and Till, D. (1980) Immunity to pathogenic free-living amoebae; Role of cell mediated immunity. *Infect. Immun.*, **29**:408-410.

Derrick, E. (1948) A fatal case of generalized amoebiasis due to protozoan closely resembling if not identical with *Iodamoeba bütschlii*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **42**:191-198.

Diamanstein, T., Klos, M., Gold, D. and Hahn, H. (1981) Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. *J. Immunol.*, **126**(6):2084-2986.

Ferrante, A. and Smyth, C. (1984) Mitogenicity of *Naegleria fowleri* extracts for murine T lymphocytes. *Immunology*, **51**:461-468.

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

Haggerty, R.M. and John, D.T. (1982) Serum agglutination and immunoglobulin levels of mice infected with *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.*, **29**:117-122.

Hay, J., Dutton, G.N. and Hair, D.M. (1985) Blastogenic responses of splenic lymphocytes to toxoplasmal and retinal antigens and T and B-cell mitogens in mice with congenital ocular toxoplasmosis. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **79**(1):113-115.

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

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

Mason, P.R. and Patterson, B.A. (1985) Proliferative response of human lymphocytes to secretory and cellular antigens of *T. vaginalis*. *J. Parasitol.*, **71**(3):265-268.

朴光敏·柳在淑·任敬一 (1987) 실험적 수막뇌염에 있어 *Naegleria fowleri* 항원에 대한 세포매개성 면역 반응. 기생충학잡지, **25**(1):1-6.

Schurr, E., Kidane, K., Yemaneberhan, T. and Wunderlich, F. (1986) Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia; I. Lymphocyte transformation and antibody titre. *Trop. Med. Parasit.*, **37**:403-408.

Selkirk, M.E., Ogilvie, B.M. and Plattis-Mills, T. A.E. (1981) Activation of human peripheral blood lymphocytes by a trypanosome-derived mitogen.

- Clin. Exp. Immunol.*, 45:615-620.
- 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., 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., Shepherd, C., Ferrante, A. and Rowan-Kelly, B. (1978) Protective immunity to *Naegleria fowleri* in experimental amoebic meningoencephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27:238-240.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. WHO*, 53:55-65.
- Willaert, E. (1971) Isolement et culture in vitro des amibes de genre *Naegleria*. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 51:701-708.
- Willaert, E. (1974) Primary amoebic meningoencephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.*, 54:429-440.

=Abstract=

Cell-mediated immunity in experimental amoebic meningoencephalitis

Kyung-Il Im, Pyung-Rim Chung and Tae-Ue Kim

Department of Parasitology, College of Medicine and

Institute of Tropical Medicine, Yonsei University,

Seoul 120-752, Korea

Cell-mediated and humoral immune reactions in mice infected with pathogenic *Acanthamoeba culbertsoni* were observed according to the period of time after amoebic infection by intranasal inoculation. The degrees of blastogenesis of spleen cells induced by mitogens, which were measured using radioactive [³H]-thymidine, were compared between infected and non-infected control groups. The mitogens used in this blastogenesis experiment were concanavalin A (Con A) and lipopolysaccharide(LPS). On the other hand, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was employed for the detection of humoral antibodies against *A. culbertsoni*.

The levels of blastogenesis of splenocytes and serum titres in the experimental group showed increasing tendency a week after inoculation of *A. culbertsoni*, although there was no difference between the experimental and control groups in other periods of the experimental time.