

실험적 *Naegleria* 감염에 있어서 세포매개성 면역에 관한 연구

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

李順坤·辛皓俊·任敬一

요약: 병원성이 강한 *Naegleria fowleri* ITMAP 359, 병원성이 약한 *Naegleria jadini* 0400, 비병원성인 *Naegleria gruberi* EGB를 ICR 마우스에 각각 감염시켰을 때 세포매개성 면역반응의 차이를 관찰하고 이들 아메바를 감염시킨 후 경과된 감염 시간에 따른 세포매개성 면역반응과 혈청내 항체가의 변동을 관찰하였다.

*N. fowleri*를 감염시킨 마우스의 사망률은 75.7%, *N. jadini*를 감염시킨 실험군에서는 6.2%, *N. gruberi* 감염에 의한 마우스의 사망은 전혀 관찰되지 않았다. 지연형 과민반응은 *N. fowleri* 감염시에 감염 초부터 대조군에 비해 반응이 증가하였으나 7일 후에는 감소하였다. *N. jadini* 감염시에도 감염 후 1일째부터 과민반응이 증가하였으며 감염기간이 지나갈수록 점차 감소하였다. 또 *N. gruberi* 감염시에는 대조군과 비교할 때 변화를 나타내지 않았다. T림프구의 아세포화 정도는 *N. fowleri* 감염시 감염 10일 후 증가하였으나 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. *N. jadini*에 감염된 경우는 대조군과 차이가 없음을 알 수 있었고, *N. gruberi* 감염시에는 감염 후 감소하는 경향이 있었다. B림프구의 아세포화 정도는 *N. fowleri* 감염군, *N. jadini* 감염군 및 *N. gruberi* 감염군에서 대조군과 차이가 없었다. *N. fowleri*에 감염된 마우스의 혈청내 항체가는 감염 7일 후부터 증가하였고, *N. jadini* 감염시에는 14일 후 증가하였으며, *N. gruberi*에 감염된 마우스의 항체가는 대조군과 차이가 없었다.

Key words: *Naegleria fowleri*, cell-mediated immunity, lymphocyte blastogenesis, antibody, ELISA

서론

원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)의 인체 발병예가 Derrick(1948)에 의해 보고되면서, 자유생활 아메바인 *Naegleria* spp.와 *Acanthamoeba* spp.가 수막뇌염의 원인 원충으로 알려졌다(Carter, 1970; Culbertson, 1971). 이들 원충의 감염은 주로 비강을 통해 이루어지며 후점막과 cribriform plate를 뚫고 후신경을 따라 중추신경계를 침범하여 후뇌를 비롯한 뇌의 기저부에 괴사성 출혈성 수막뇌염을 일으킨다(Martinez et al., 1973).

Thong et al. (1978b)은 체액성 면역이 *Naegleria fowleri*에 대한 방어면역에 중요한 역할을 한다고 보고하였으며, 마우스에게 살아있는 영양형 아치사량(sublethal dose)을 혈관내, 복강내 또는 비강내로 반복 투여하는 경우 종특이 응집 항체(species-specific agglutination antibody)가 생긴다고 하였다(Haggerty and John, 1982). 또한 이러한 항체를 면역되지 않은 마우스에 투여할 때 *N. fowleri*에 대한 방어면역이 생긴다고 하였다(Thong et al., 1978a). 항체의 기능적 역할은 *N. fowleri*가 비점막에서 운동이 억제되도록

하여, 중성구가 점막에 축적되는 충분한 시간을 유도하고 중추신경계로 이동하는 것을 막는 작용이 있다는 보고가 있다(Thong et al., 1983). 또한 항체의 증가에 따라 보체도 활성화되어 방어면역의 역할을 한다고 하는데 전형로 뿐만 아니라 비전형로도 활성화시켜서(Holbrook et al., 1980; Rowan-Kelly et al., 1980) 염증반응의 폭을 증가시킴으로써 아메바의 활성화를 저지시킨다고 하였다.

이와 같이 *N. fowleri* 감염시 체액성 면역에 대해서는 많은 연구가 진행되고 있으나 세포매개성 면역에 대해서는 연구가 활발하지 못하다. *In vitro* system에서 기생충 증체 자체 또는 증체의 분비물이 인체 또는 마우스 림프구를 활성화시킴이 여러 종류의 원충 즉 질트리코모나스, 이질아메바, 크루스트리파노조마, 독소플라스마 곤디 등에서 알려졌다(Mason and Patterson, 1985; Diamanstin et al., 1981; Selkirk et al., 1981; Hay et al., 1985). 또한 Strickland et al. (1975)은 독소플라스마 곤디로 감염시킨 마우스에서 비특이성 T림프구 및 B림프구 mitogen인 PHA, Con. A, LPS에 대한 비장세포의 아세포화를 측정하여 감염에 따른 면역반응의 변동을 관찰하였으며 Ferrante and Smyth (1984)는 *N. fowleri* 영양형의 lysate가 마우스 비장

세포 중 T림프구를 활성화시킴을 보고하였다. 또한 Cursons *et al.* (1980)은 기니픽에서 *N. fowleri* 감염시 림프구에서 분리되는 lymphokine의 일종인 거식세포 유주 저지 인자가 검출되는 것으로 보아 세포매개성 면역이 숙주 방어기전에 중요하다고 하였다.

세포매개성 면역은 아메바의 병원성에 따라 그 반응에 차이가 있을 것으로 생각되므로 본 실험에서는 병원성이 강한 *N. fowleri*와 병원성이 약한 *N. jadini*, 그리고 비병원성인 *N. gruberi*를 마우스에 감염시켰을 때, 세포매개성 면역반응의 차이를 관찰하고 경과된 감염시간에 따른 세포매개성 면역반응과 혈청내 항체가의 변동을 관찰하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

1. *Naegleria*의 배양

병원성이 강한 것으로 알려진 *Naegleria fowleri* ITMAP 359, 병원성이 약한 *N. jadini* 0400, 비병원성인 *N. gruberi* EGB를 37°C 항온기 내에서 CGVS 배지(Willaert, 1971)를 사용, 무균적으로 계대 배양하여 사용하였다.

2. 실험 동물

생후 약 6주 된 15g 내외의 백색 웅성 ICR 마우스를 사용하였으며, 실험실 내에서 통상적인 방법으로 사육하였다.

3. *Naegleria*의 감염

마우스 체중 g당 secobarbital 0.05 mg을 복강내로 주사하여 마취시킨 후 배양된 *N. fowleri*, *N. jadini* 및 *N. gruberi* 영양형을 각각 생리식염수 5 μ l에 10 \times 10⁶개가 함유되도록 한 후, 마우스의 오른쪽 비강에 떨어뜨려 감염시켰다.

4. *Naegleria lysate*의 제조

배양된 아메바 영양형을 모아 아세포화 실험에 있어서는 RPMI-1640으로, 지연형 과민반응 실험에서는 생리식염수로 2~3회 세척한 후 초음파분쇄기로 아메바 영양형을 파괴시키고, 4°C, 20,000 g로 2시간 원심침전한 후 상층액을 취하여 0.2 μ m pore size의 여과지로 여과하여 사용하였다. 이들 lysate의 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법에 의해 측정하였다.

5. 세포매개성 면역반응 측정

1) 지연형 과민반응

각 아메바를 마우스에 감염시킨 후 1일, 4일, 7일, 10일, 14일에 각각 마우스의 한쪽 발바닥(footpad)에는 각 *Naegleria lysate*를, 다른 한쪽에는 생리식염수를 0.03 ml씩 피내로 주사한 후 24시간 후에 발바닥 두께를 digital micrometer(Fowler)를 사용하여 측정하였다.

발바닥 두께의 정도는 lysate로 처리한 측정치에서 생리식염수로 처리한 측정치를 제한 값을 실측치로 하였으며, 실험 대조군으로 lysate 대신 bovine serum

albumin(BSA)을 사용하였다.

2) 비장세포(splenoocyte)의 아세포화

각 아메바를 마우스에 감염시킨 후 비장세포의 아세포화 정도를 알아보기 위해 마우스를 희생시켜 그 비장세포에 림프구 mitogen 및 제조된 각각의 *Naegleria lysate*를 넣고 RPMI-1640 배지에서 약 2일간 배양한 후 [³H]-thymidine을 첨가하고 6시간 경과한 후 방사능을 측정하였다.

마우스의 복막을 절개한 후 비장을 적출하여, 10% fetal calf serum, L-glutamine, penicillin(100 unit/ml) 및 streptomycin(100 μ l/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 10⁶개의 세포가 200 μ l의 RPMI-1640 배지에 함유되도록 하였으며, 배지에는 각각 concanavalin A (Con. A), lipopolysaccharide(LPS)와 *Naegleria lysates*를 첨가시켰다. 37°C CO₂ 항온기에서 42시간 배양 후 methyl-[³H]-thymidine(ICN)을 well당 1 μ Ci씩 넣고 다시 6시간 배양한 후, 세포수확기(Titertek)에서 glass filter fiber로 세포를 수확한 후 scintillation cocktail(xylene 1,000 ml, POPOP 0.1 g, PPO 5 g) 3 ml를 넣은 scintillation vial에서 각각을 용해시켜 liquid scintillation counter를 사용, 방사능을 측정하였다.

아세포화 정도를 관찰하는 데는 흡착된 [³H]-thymidine의 양으로 측정하였으며 다음 공식에 의해 자극지수를 산출하였다.

$$\text{자극지수} = \frac{\text{실험물질로 처리된 비장세포의 방사능(cpm)}}{\text{처리 안된 비장세포의 방사능(cpm)}}$$

아메바를 감염시키지 않은 대조군에서도 감염시킨 실험군과 같은 방법으로 비장세포를 분리하여 Con. A, LPS, 각각의 *Naegleria lysate*를 처리한 후 [³H]-thymidine을 넣어 방사능을 측정하였다.

6. 혈청내 항체가 측정

마우스에 아메바를 감염시킨 후 경과된 날짜별로 오른쪽 눈의 후안와 정맥총(retro-orbital venous plexus)에서 파이펫을 이용하여 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 -30°C에서 저장하였다가 사용하였다. Voller *et al.* (1976)이 시행한 효소표식면역검사법(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA)으로 혈청내 항체가를 측정하였다.

효소표식면역검사법에 사용된 항원은 제조된 각각의 *Naegleria lysate*를 사용하였는데 carbonate bicarbonate 완충액(Na₂CO₃ 0.159 g, NaHCO₃ 0.293 g, 증류수 100 ml, pH 9.6)으로 polystyrene plate well당 *N. fowleri lysate*는 5 μ g/ml, *N. jadini*와 *N. gruberi*는 각각 10 μ g/ml이 들어가도록 희석한 후 4°C에서 하루 밤 방치하여 항원을 부착시켰다. 세척액(NaCl 9g,

Table 2. DTH levels obtained in response to subcutaneous injection with each amoeba lysate in the mice infected with *N. fowleri*, *N. jadini*, or *N. gruberi*

Group		Thickness(μm) of hindfoot on each post-infection day				
		1	2	7	10	14
<i>N. fowleri</i>	lysate	81.3 \pm 33.8	81.3 \pm 33.8	106.7 \pm 62.9	25.4 \pm 20.8	38.1 \pm 12.7
	BSA	30.5 \pm 29.7	25.4 \pm 32.0	10.2 \pm 20.3	12.7 \pm 12.7	0.0 \pm 0.0
<i>N. jadini</i>	lysate	66.0 \pm 59.2	50.8 \pm 35.8	45.7 \pm 37.3	31.8 \pm 41.7	30.5 \pm 29.7
	BSA	20.3 \pm 19.1	25.4 \pm 27.7	15.2 \pm 20.3	12.7 \pm 22.1	12.7 \pm 12.7
<i>N. gruberi</i>	lysate	55.9 \pm 43.7	30.5 \pm 10.2	31.8 \pm 27.7	45.7 \pm 33.8	45.7 \pm 29.7
	BSA	25.4 \pm 32.0	25.4 \pm 16.0	15.2 \pm 20.3	20.3 \pm 22.8	10.2 \pm 20.3
Control	BSA	30.5 \pm 19.1	5.1 \pm 10.2	12.7 \pm 22.1	6.4 \pm 10.9	8.4 \pm 11.9

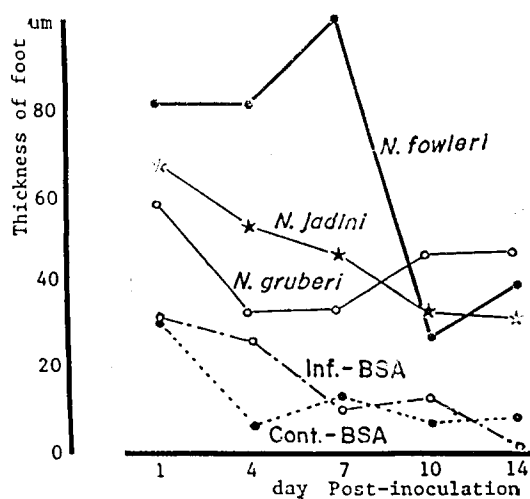


Fig. 2. DTH levels obtained in response to subcutaneous injection with each amoeba lysate in the mice infected with *N. fowleri*, *N. jadini*, or *N. gruberi* (Inf.-BSA; infection-bovine serum albumin, Cont.-BSA; Control-bovine serum albumin).

켰으나($p < 0.01$) 감염 후 경과 기간별로는 별다른 차이가 없었다(Table 2 & Fig. 2).

3. 감염기간별 T 및 B 림프구의 아세포화

마우스 비장세포의 아세포화 정도를 측정하기 위한 *N. fowleri*, *N. jadini* 그리고 *N. gruberi* lysate의 적정 단백질 농도는 각각 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Con. A의 적정 농도는 5 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 LPS는 50 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

*N. fowleri*에 감염된 실험군에서 T림프구 mitogen인 Con. A에 의한 비장세포의 아세포화 정도는 감염 7일 후까지 대조군과 비교할 때 차이가 없었으나 감염 후 10일에 아세포화 정도가 증가하였다. 이러한 아세포화 변동은 Con. A 대신 *N. fowleri* lysate로 처리했을 때에도 비슷하였다. B림프구 mitogen인 LPS에 의한 비장세포의 아세포화 정도는 대조군과 비교할 때 차이가 없었다(Table 3 & Fig. 3).

*N. jadini*에 감염된 마우스의 비장세포에 *N. jadini* lysate와 Con. A를 처리했을 때의 아세포화 정도는 대조군에서의 비교할 때 차이가 없었다. B림프구 mitogen인 LPS로 비장세포에 처리했을때의 아세포화도 대조군과 별 차이가 없었다(Table 4 & Fig. 4).

*N. gruberi*에 감염된 실험군에서 보면 Con. A와 *N. gruberi* lysate로 처리된 비장세포의 아세포화는 감염

Table 3. Stimulation index* (blastogenic response) of mitogen-treated splenocytes from non-infected (control) and *N. fowleri* infected mice

Post-infection day	Non-infected			Infected		
	lysate	Con. A	LPS	lysate	Con. A	LPS
1	1.43 \pm 0.89	2.70 \pm 2.10	1.41 \pm 0.76	1.87 \pm 0.40	4.14 \pm 2.18	1.10 \pm 0.30
4	1.43 \pm 0.47	4.96 \pm 1.25	1.16 \pm 0.15	0.91 \pm 0.56	2.50 \pm 1.41	0.95 \pm 0.35
7	2.28 \pm 0.89	4.50 \pm 1.33	1.67 \pm 0.55	1.70 \pm 0.79	4.57 \pm 2.04	1.28 \pm 0.66
10	2.48 \pm 0.98	3.67 \pm 0.94	1.52 \pm 0.99	3.65 \pm 1.35	8.49 \pm 4.93	2.25 \pm 1.47
14	3.09 \pm 1.45	6.01 \pm 3.19	3.04 \pm 0.99	1.55 \pm 0.89	3.15 \pm 2.03	1.49 \pm 1.16

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

Table 4. Stimulation index* (blastogenic response) of mitogen-treated splenocytes from non-infected (control) and *N. jadinii* infected mice

Post-infection day	Non-infected			Infected		
	lysate	Con. A	LPS	lysate	Con. A	LPS
1	0.82±0.38	2.70±2.10	1.41±0.76	0.92±0.66	5.20±4.46	1.76±2.17
2	0.47±0.09	4.96±1.25	1.16±0.15	1.02±0.53	2.27±0.83	0.88±0.41
7	1.14±0.54	4.50±1.33	1.67±0.55	0.45±0.27	2.80±1.67	0.85±0.45
10	0.78±0.46	3.67±0.94	1.52±0.99	0.99±0.50	3.39±2.45	1.43±0.37
14	0.95±0.28	6.01±3.19	3.04±0.99	1.11±0.99	3.14±3.69	1.03±0.59

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

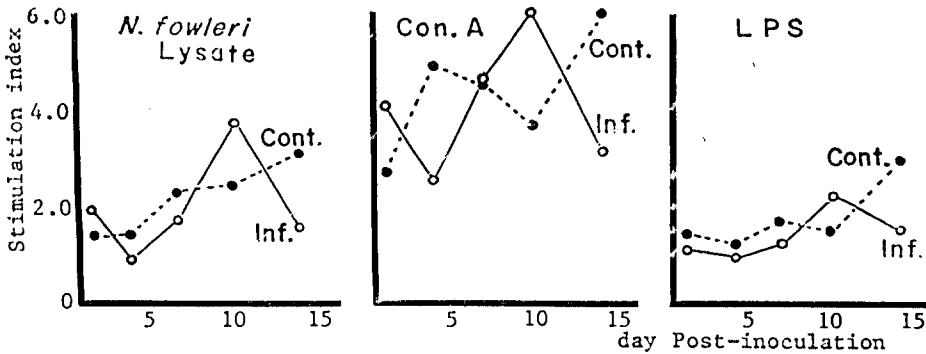


Fig. 3. Stimulation index of mitogen-treated splenocytes from non-infected (control) and *N. fowleri* infected mice

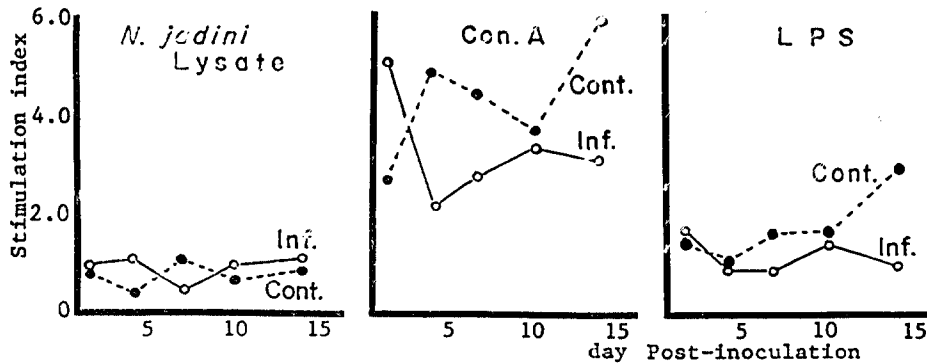


Fig. 4. Stimulation index of mitogen-treated splenocytes from non-infected (control) and *N. jadinii* infected mice.

후 대조군에 비해 감소하였으며, LPS 처리에 의한 비장세포의 아세포화 정도는 대조군과 비교할 때 차이가 없었다(Table 5 & Fig. 5).

4. 혈청내 항체가의 측정

N. fowleri, *N. jadinii* 및 *N. gruberi*에 각각 감염된 마우스를 감염 후 경과 기간별로 혈청을 분리한 후 항체가 측정을 위하여 효소표식면역검사법(ELISA)을

시행하였다. *N. fowleri* 감염시 7일 후부터 계속해서 대조군에 비해 혈청내 항체가가 증가됨을 볼 수 있었고($p < 0.002 \sim 0.01$), *N. jadinii* 감염시는 14일 후 항체가 대조군에 비해 높아 있었으며($p < 0.05$), *N. gruberi* 감염시에는 대조군과 비교하여 항체가에 있어 별다른 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 6).

Table 5. Stimulation index* (blastogenic response) of mitogen-treated splenocytes from non-infected (control) and *N. gruberi* infected mice

Post-infection day	Non-infected			Infected		
	lysate	Con. A	LPS	lysate	Con. A	LPS
1	1.86±1.15	2.70±2.10	1.41±0.76	2.63±3.44	4.05±6.04	1.22±1.53
4	1.38±0.35	4.96±1.25	1.16±0.15	1.33±0.18	2.12±1.16	0.81±0.18
7	2.17±0.44	4.50±1.33	1.67±0.55	1.60±0.38	2.31±1.71	1.24±0.58
10	2.62±1.39	3.67±0.94	1.52±0.99	1.59±0.59	1.72±1.92	0.78±0.64
14	2.71±0.56	6.01±3.19	3.04±0.99	1.44±0.58	3.83±2.41	1.71±0.51

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

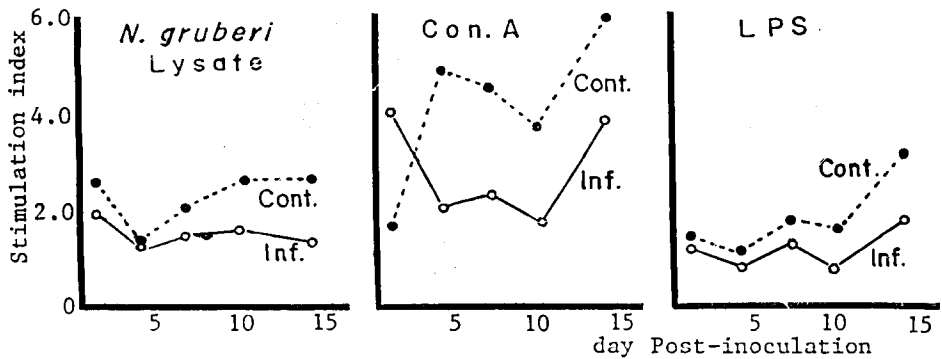


Fig. 5. Stimulation index of mitogen-treated splenocytes from non-infected (control) and *N. gruberi* infected mice.

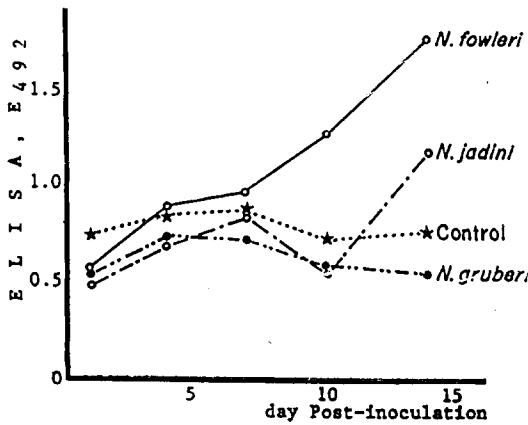


Fig. 6. IgG antibody level of sera in the mice infected intranasally with *N. fowleri*, *N. jadini*, or *N. gruberi*.

고 찰

토양이나 강, 연못 또는 공기 등 자연환경 속에서 자유생활을 하는 아메바 중 *Naegleria* spp.와 *Acan-*

thamoeba spp.는 인체와 실험동물에서 치명적인 원발성 아메바성 수막뇌염을 발생시킨다고 알려져 있으며, 세계 각지에서 검출되어 그 병원성이 인정되어 왔다 (Carter, 1970; Culbertson, 1971; Lawande *et al.*, 1979; John, 1982; Valenzuela *et al.*, 1984; Jacobson and Band, 1987). 우리 나라에서는 황 등(1976)이 서울 주변의 강과 하수에서 자유생활 아메바(*Acanthamoeba* spp.)를 분리해 냈으며, 실험동물에 감염시켜 그 병원성을 확인하였다.

자유생활 아메바 중 *Naegleria* 속에는 병원성이 강한 *N. fowleri*, 병원성이 약한 *N. jadini*, 비병원성인 *N. gruberi* 등이 동정되어 보고되었다(Willaert and Le Ray, 1973). 본 실험에서 *N. fowleri*를 마우스에 감염시켰을 때 75.7% 사망률이, *N. jadini* 감염시 6.2%의 사망률이 관찰되었고, *N. gruberi* 감염시 마우스의 사망은 관찰되지 않았으며 이들 아메바의 병원성에 있어 전자의 보고와 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

기생충 감염에 대한 세포매개성 면역에 관한 연구는 지연형 과민반응, mitogen에 의한 아세포화, 거식세포 유주저지인자 등으로 활발히 진행되고 있는데, 기니피크에 *N. fowleri*를 감염시켰을 때, *N. fowleri* 영양형의 가용성 항원을 피내(皮內)에 주사하면 지연형 과민

반응이 나타난다고 하였다(Diffley *et al.*, 1976). 또한 Cursons *et al.* (1980)은 자유생활 아메바 중 *N. fowleri*, *N. jadini* 그리고 *N. gruberi* 영양형을 모아 여러 번 얼리고 녹이는 것을 반복하여 제조한 항원을 기니픽에 면역시킨 후, 각각 동질의 항원을 주사했을 때 지연형 과민반응의 정도가 컸음을 관찰하였다. 본 실험에서 *N. fowleri*, *N. jadini* 그리고 *N. gruberi* 를 마우스에 감염시켜 각각의 lysate로 지연형 과민반응을 시행한 결과 대조군에 비해 각각 발바다 두께 정도가 증가했음을 알 수 있었다. 감염 후 경과 기간별 변동은 Diffley *et al.* (1976)이 기니픽에서 관찰한 결과 감염 후 36일에 가장 컸으며 점차 감소하는 경향을 보여 주었다. 본 실험에서는 *N. fowleri* 감염시 감염 10일 후부터 감소하였고, *N. jadini*의 경우 감염 후 계속 감소하는 경향을 보였다. 그러나 *N. gruberi*의 경우는 감염 후 경과 기간에 따른 변동이 관찰되지 않았다.

최근 세포매개성 면역에 관한 연구가 활발히 진행되면서 비장 림프구나 말초혈액 림프구에 [^3H]-thymidine 을 처리하여 흡착되는 정도를 T 및 B림프구 mitogen 처리 후 아세포화를 관찰하는 실험이 여러 기생충 감염시에 널리 이용되고 있다(Strickland *et al.*, 1975; Selkirk *et al.*, 1981; Diamanstein *et al.*, 1981; Baral-Netto *et al.*, 1983; Ferrante and Smyth, 1984; Simjee *et al.*, 1985; Mason and Patterson, 1985; Hay *et al.*, 1985; Barbier *et al.*, 1985; Britten and Hudson, 1986; Schurr *et al.*, 1986). 특히 Ferrante and Smyth(1984)는 *N. fowleri*의 lysate가 마우스의 T세포에 아세포화 효과가 있어 mitogen이 될 수 있음을 보고하였다. 또한 그들은 감염 후 기간이 지남에 따라 억제 T세포를 활성화시킬 것으로 예시하였다. Simjee *et al.* (1985)은 이질아메바에 의한 간 아메바증 환자에서 경과 기간에 따라 아세포화 정도가 감소됨을 보여 주었고, Britten and Hudson(1986)도 *Trypanosoma cruzi* 감염에 있어 급성기에는 면역반응 즉 지연형 과민반응과 아세포화가 억제되어 있었는데 이는 감염과 관계가 있으며, 면역시키면 이러한 면역억제가 관찰되지 않는다고 하였고, 만성기가 되면 면역반응이 정상으로 회복된다고 하였다. 본 실험에서 *N. fowleri*, *N. jadini* 감염시 각 lysate로 처리한 마우스의 비장세포의 아세포화 정도는 감염 경과 기간별로 대조군에 비해 전체적으로 차이가 없었으나, *N. fowleri* 감염시 10일째에 약간 증가하였다가 감소하였으며, *N. gruberi* 감염시 감염 기간이 경과함에 따라 계속 감소되는 경향을 보여 주었다.

한편, 비특이 T세포 mitogen인 Con. A 처리시 억제 T세포를 증식시켜 DNA 합성을 억제할 수 있다고 알려졌고(Ferrante and Smyth, 1984), *Toxoplasma gondii*에 감염된 마우스 비장세포에서 감염 초기에 대조군에 비해 아세포화 정도가 감소하였다가 만성기때 점

차 증가함이 알려졌다(Strickland *et al.*, 1975; Hay *et al.*, 1985). 또한 *Leishmania* sp.와 *Trypanosoma* sp.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 실험에서 Con. A 처리시 *N. fowleri*에 감염된 마우스에서 아세포화가 감염 초기에 감소하는 듯 하였다가 감염 후 10일째에 증가한 후 다시 감소하였고, *N. jadini* 감염시 대조군에 비해 다소 감소하였으며 *N. gruberi* 감염시에는 감염 초기부터 아세포화 정도가 억제되어 있음을 알 수 있었다.

B세포 mitogen인 LPS의 처리시 아세포화 정도에 있어서 대조군과 별다른 차이가 없다고 보고되었는데(Selkirk *et al.*, 1981; Ferrante and Smyth 1984; Hay *et al.*, 1985) 본 실험에서도 *N. fowleri*, *N. jadini* 및 *N. gruberi* 감염시 대조군과 별다른 차이가 관찰되지 않았다.

자유생활 아메바인 *Naegleria* 속 아메바에 의한 마우스에 있어서 세포매개성 면역반응은 병원성이 강한 *N. fowleri* 감염시 지연형 과민반응의 경우 감염 초기에 반응이 강하게 나타났으나 감염 후 10일째부터 감소하였으며, 아세포화 정도는 전반적으로 대조군에 비해 차이가 없었으나 10일째 증가하였다가 감소하였고, 두 면역 반응 사이에 그 성격이 일치하지 않았다. 병원성이 약한 *N. jadini* 감염시 *N. fowleri*와 *N. gruberi*의 중간 형태를 보여 주었고, 비병원성인 *N. gruberi* 감염시 전반적으로 대조군에 비해 감소해 있음을 알 수 있었으며, 병원성이 다른 세 종류의 *Naegleria* spp.에서 세포매개성 면역 반응에 서로 차이가 있음이 관찰되었다. *N. fowleri* 감염시 마우스가 일주일 정도 지나면 급격히 사망하게 됨을 볼 수 있었는데 이렇게 짧은 급성 감염기를 지나면서 효과적 면역체계의 활성을 유도하지 못하였다고 생각된다.

Naegleria 감염에 있어서 체액성 면역에 관해서는 Thong *et al.* (1978b)이 방어면역에 체액성 면역이 중요한 역할을 한다고 보고한 이래 Haggerty and John (1982)은 마우스에게 살아있는 *N. fowleri* 영양형 아치사량을 혈관내, 복강내 또는 비강내로 반복 투여하는 경우 종(種) 특이 응집 항체가 생긴다고 하였으며, 감염 기간별로 혈청내 IgG의 수준이 증가함을 보고하였다. 본 실험에서 효소표식 면역검사법을 이용하여 *N. fowleri*에 감염된 마우스의 혈청내 항체가를 측정할 결과, 감염 후 10일째부터 대조군에 비해 현저하게 증가하기 시작하였으며, *N. jadini* 감염시는 14일째 증가하였고, *N. gruberi*에 감염된 마우스에서는 혈청내 항체가가 대조군과 별다른 차이가 없었다.

이상의 성적을 종합하여 보면, 병원성이 강한 *N. fowleri*, 병원성이 약한 *N. jadini*, 비병원성인 *N. gruberi*에 각각 감염된 마우스에서 세포매개성 면역반

응과 혈청내 항체가의 변동에 있어 서로 차이가 있음을 알 수 있었다. 마우스에 *N. fowleri*를 감염시키면 치사율이 매우 높고 짧은 급성 감염기를 취하며 *N. jadini*나 *N. gruberi*와는 그 병원성에 있어서 뚜렷한 차이가 있음을 보여주고 있다. 또한 사용된 세 종류의 *Naegleria* spp에서 각각의 lysate 사이에 항원성이 서로 다르코(John *et al.*, 1977; Ferrante and Smyth, 1984) 따라서 이들 아메바들에 대한 숙주 면역계의 반응에 차이가 있는 것으로 사료된다.

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.*, 79:47-50.
- 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. *Tropenmed. Parasit.*, 37:97-100.
- Carter, R.F. (1970) Description of *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, 100:219-244.
- Culbertson, C.G. (1971) The pathogenicity of soil amoebas. *Ann. Rev. Microbiol.*, 25:231-254.
- 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 a 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.*, 126:2084-2086.
- Diffley, P., Skeels, M.R. and Sogandares-Bernal, F. (1976) Delayed type hypersensitivity in guinea pigs infected subcutaneously with *Naegleria fowleri* Carter. *Z. Parasitenkd.*, 49:133-137.
- Ferrante, A. and Smyth, C. (1984) Mitogenicity of *Naegleria fowleri* extracts for murine T lymphocytes. *Immunology*, 51:461-468.
- 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.
- Holbrook, T.W., Boackle, R.J., Parker, B.W., Vesely, J. (1980) Activation of the alternative complement pathway by *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.*, 30:58-61.
- 黄瀚琦·尹德鎮·任敬一·蘇鎮璋 (1976) 자유생활 아메바의 병원성에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집, 9(2):86-98.
- Jacobson, L.M. and Band, R.N. (1987) Genetic heterogeneity in a natural population of *Acanthamoeba polyphaga* from soil, an isoenzyme analysis. *J. Protozool.*, 34:83-86.
- John, D.T. (1982) Primary amoebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 36:101-123.
- John, D.T., Weik, R.R. and Adams, A.C. (1977) Immunization of mice against *Naegleria fowleri* infection. *Infect. Immun.*, 16:817-820.
- Lawande, R.V., John, I., Bobbs, R.A. and Egler, L.J. (1979) A case of primary amoebic meningoencephalitis in Zaria, Nigeria. *Am. J. Clin. Pathol.*, (May):591-594.
- 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.
- Mason, P.R. and Patterson, B.A. (1985) Proliferative response of human lymphocytes to secretory and cellular antigens of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.*, 71(3):265-268.
- Rowan-Kelly, B., Ferrante, A. and Thong, Y.H. (1980) Activation of complement by *Naegleria*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74:333-336.
- Schurr, E., Kidane, K., Yemaneberhan, T. and Wunderlich, F. (1986) Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. Lymphocyte transformation and antibody titre. *Tropenmed. 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 responses of *Toxoplasma*-infected mouse spleen cells to T- and B-cell mitogens. *Clin. Exp. Immunol.*, **22**:167-176.
- Thong, Y.H., Carter, R.F., Ferrante, A. and Rowan-Kelly, B. (1983) Site of expression of immunity to *Naegleria fowleri* in immunized mice. *Parasite Immunol.*, **5**:67-76.
- 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.
- Valenzuela, G.A., Corella, E.L. and De Jonckheere, J. F. (1984) Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from north-western Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**:558-559.
- 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. and Le Ray, D. (1973) Caracteres morphologiques, biologiques et immunochimiques de *Naegleria jadini* sp. nov. (Amoebida, Vahlkampfiidae). *Protistologica*, **9**:147-426.

=Abstract=

**Studies on the cell-mediated immunity in experimental
Naegleria spp. infections**

Soon-Gone Lee, Ho-Joon Shin and Kyung-Il Im

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

Observations were made on the differences in cell-mediated immune responses in the mice infected with strongly pathogenic *Naegleria fowleri* ITMAP 359, weakly pathogenic *Naegleria jadini* 0400, or non-pathogenic *Naegleria gruberi* EGB, respectively. Variations in cell-mediated responses and changes in antibody titers according to the duration after infection were noted.

Infections were done by dropping 5 μ l saline suspension containing 10×10^4 trophozoites cultured axenically in the CGVS medium into the right nasal cavity of ICR mice aging about 6~7 weeks, under the anesthesia by intraperitoneal injection of secobarbital.

Following infection, delayed type hypersensitivity(DTH) responses in the footpad and blastogenic responses of the mouse spleen cells using [3 H]-thymidine were observed on the day 1, 4, 7, 10 and 14 after infection. For the preparation of amoeba lysates, each of cultured trophozoites were homogenized with an ultrasonicator, and centrifugated at 20,000 g. The supernatants of amoeba lysates were used as the mitogen and antigen for ELISA. Concanavalin A(Con. A) and lipopolysaccharide(LPS) were also used as mitogens in the blastogenic response.

1. The mice infected with *N. fowleri* showed the mortality rate of 75.7%. The rate was 6.2% for the *N. jadini* infected group, while no dead mouse was observed for *N. gruberi* infections.

2. In regard to DTH responses in the *N. fowleri* infected mice, the level increased in comparison to the control group but declined after 7 days. An increase was also noted for the *N. jadini* group after 1 day, but gradual decreases were observed through the infection period. In addition, no difference was noted between the *N. gruberi* infected and control groups.

3. Concerning the blastogenic response of the splenocytes, it increased after 10 days in the experimental group of *N. fowleri* infection, but the differences were not statistically significant compared with control group. It was evident that *N. jadini* group was not different from control group either, while there was a tendency of decrease in *N. gruberi* infected group. In regard to the blastogenic response of the splenocytes by LPS, it was found that the *N. fowleri*, *N. jadini* and *N. gruberi* infected groups had no differences from the control group.

4. The serum antibody titer of *N. fowleri* and *N. jadini* infected mice increased from the day 7 and 14 after infection respectively, while the *N. gruberi* infected mice showed no increase.

In summary of the results, it was observed that there were differences in the cell-mediated immune responses and serum antibody titers in the mice infected with strongly pathogenic *N. fowleri*, weakly pathogenic *N. jadini*, or non-pathogenic *N. gruberi*, respectively.