

## 마우스에서 *Naegleria fowleri* 감염에 대한 단세포균 항체의 영향

아주대학교 의과대학 의과학교실 및 연세대학교 의과대학 기생충학교실\*

蘇 義 永 · 辛 皓 俊\* · 任 敬 一\*

**요 약 :** 마우스에 *N. fowleri*를 감염시키기 전에 Nf 2 단세포균 항체물 2회 투여했을 때 사망률과 평균 생존기간이 15.8%, 17.7일, 1회 투여했을 때는 16.7%, 17.0일로 대조군의 22.7%, 14.6일에 비해 사망률이 감소하고 생존기간이 연장되었다. Nf 154 단세포균 항체를 2회 투여시 사망률과 생존기간이 10.5%, 16.5일로 대조군에 비하여 차이가 있었다. 그러나 *N. fowleri*를 감염시킨 후 Nf 2 단세포균 항체를 2회 또는 1회 투여했을 때는 대조군과 비교하여 사망률과 생존기간의 차이가 없음이 관찰되었다. 배양중인 *N. fowleri* 영양형에 Nf 2 및 Nf 154 단세포균 항체를 처리했을 때 대조군에 비해 현저한 응집반응이 관찰되었으며, 보체를 처리하여 영양형의 증식정도를 관찰한 결과 단세포균 항체 처리시 영양형의 증식이 현저히 감소하였다. Nf 2 및 Nf 154 단세포균 항체로 처리된 *N. fowleri* 영양형의 미세구조를 관찰하였는데, swelling 된 미토콘드리아의 수가 증가하였으며 cisternae의 손상도 관찰되었다. 또한 lipid droplets가 나타나고 그 수가 증가하였으며, peroxisome은 관찰되지 않았으며, 공포 수의 증가와 더불어 osmiophilic granules 등이 관찰되었다. *N. fowleri*의 세포독성 실험에서 배양된 CHO 세포에 *N. fowleri*만 넣었을 때, 세포독성이 73.0%인데 비해, Nf 2 및 Nf 154 단세포균 항체를 넣었을 때는 각각 9.4%, 10.7%로 CHO 세포에 대한 *N. fowleri*의 세포파괴율이 저하됨이 관찰되었다.

**Key words:** *Naegleria fowleri*, monoclonal antibody, agglutination, cytotoxicity, amoebic meningoencephalitis

### 서 론

자연계에서 흔히 검출되는 자유생활아메바 중 *Naegleria* spp.와 *Acanthamoeba* spp.는 인체에 치명적인 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)을 일으키는 밝혀졌다(Derrick, 1948; Butt et al., 1968; Carter, 1970). 그 후 여러 연구자들에 의해 자연환경 속 및 인체의 뇌조직으로부터 분리, 배양되어 그 병원성이 인정되었다(Culbertson, 1971; Wong et al., 1975; Lawande et al., 1979; Willaert et al., 1980; Moss et al., 1986; Milligan et al., 1988).

Thong et al. (1978 & 1983)과 Haggerty and John (1982)은 *Naegleria fowleri*를 마우스의 혈관 내, 복강 내, 비강 내로 반복 투여할 경우 종특이 응집항체가 생겨 숙주의 방어면역에 기여함을 시사하였고, Bush and John(1988)은 비강 내로 *N. fowleri*를 면역시킨 후, 감염시켰을 때 면역한 수량과 비례하여 생존율이

연장됨을 보고하였다. Lallinger et al.(1987)은 *N. fowleri*를 가토에 감염시킨 후, 항-*Naegleria* 면역혈청과 immunoglobulin G 분획을 뇌실 내로 주사하여 생존율이 연장됨을 관찰하였다.

또한 Köhler and Milstein (1975)의 세포융합기술을 이용하여 여러 연구자들이 다른 여러 원충에 대한 단세포균 항체를 생산하여 진단 및 치료에 적용할 수 있음을 시사하였는데, Perrin et al. (1981), Holder와 Freeman(1982) 그리고 Fine et al. (1987)은 *Plasmodium falciparum*을 재료로, Danforth(1982)는 *Eimeria* 로, Handman and Remington(1980), Kasper et al. (1983)은 *Toxoplasma gondii*에 대하여, Lee et al. (1986)과 Gigliotti et al. (1986)은 *Pneumocystis carinii*, Nash and Aggarwal(1986)은 *Giardia lamblia*, Ortiz-Ortiz et al. (1986)은 이질아메바, Tachibana et al. (1986)은 *Trypanosoma cruzi*에 대한 단세포균 항체를 생산하였다. 국내에서는 임 등(1983)이 *Acanthamoeba royreba*에 대하여, Ryu and Im (1992)은 *Naegleria fowleri*에 대한 단세포균 항체를 생산하여 그 특성을 검토하였다.

Haggerty and John (1982)은 *N. fowleri* 영양형에

\* 이 연구는 1991년 아주대학교 연구비 지원에 의해 수행되었음.

항혈청을 처리했을 때 응집효과가 있다고 보고하였으며, 원충의 세포독성 반응을 관찰한 보고를 보면, Eaton *et al.* (1970)이 *Entamoeba histolytica*가 배양된 HeLa 세포에 세포독성을 나타냄을 보고하였고, Curson and Brown (1976)은 자유생활아메바의 병원성 유무를 Vero 세포를 사용하여 관찰하였으며, Marciano-Cabral *et al.* (1982)은 B-103 rat neuroblastoma 세포가 *Naegleria spp.*에 의해 가장 민감한 영향이 있었다고 하였다. Ravdin *et al.* (1981, 1985 & 1986)은 Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포를 표적 세포로 사용하여 *E. histolytica*의 세포독성을 연구하였으며, Cline *et al.* (1986)은 *N. fowleri*를 rat neuroblastoma(B-103) 세포, Vero 세포, HeLa 세포, HEP2 (human larynx epithelioma) 세포 및 L929 mouse fibroblasts와 작용시켜 그 운동성을 관찰하였다.

본 연구는 마우스를 사용하여 *N. fowleri*를 감염시키기 전과 감염시킨 후에 *N. fowleri*에 대한 단세포균 항체를 마우스에 처리하여 그들의 생존기간 및 사망률의 변동을 관찰하여 단세포균 항체가 마우스의 방어면역에 미치는 효과를 보고자 하였다. 또한 배양 중인 *N. fowleri* 영양형에 단세포균 항체를 처리하여 아메바의 응집 정도, 성장률의 변동 및 영양형의 미세구조 변화를 관찰하였으며, CHO 세포에 대한 *N. fowleri*의 세포독성에 있어 단세포균 항체가 어떠한 영향을 주는가를 관찰하고자 하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. *N. fowleri*의 배양 및 항원의 제조

병원성이 있는 *Naegleria fowleri*, ITMAP 359를 CGVS 배지(Willaert, 1971)를 사용, 37°C 항온기에서 무균적으로 계대배양하여 실험에 사용하였다. 항체가 측정을 위한 항원의 제조는 배양된 아메바를 원심침전하여 초음파분쇄기로 분쇄한 후 10,000 g에서 30분간 원심침전하여 그 상층액을 모아, Lowry(1951)의 방법으로 단백질 함량을 정량하여 사용하였다.

#### 2. 실험동물

생후 4~5주된 음성 BALB/c 마우스를 사용하였다.

#### 3. *N. fowleri*의 감염

마우스 체중 gm당 secobarbital 0.06 mg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후, 생리식염수 5  $\mu$ l에 *N. fowleri* 영양형  $5 \times 10^4$ 을 섞어 비강 내로 떨어뜨려 감염시켰다. 대조군은 실험군과 같은 방법으로 마취시키고 생리식염수를 비강 내로 떨어뜨렸다.

#### 4. *N. fowleri*에 대한 단세포균 항체의 생산

*N. fowleri*에 대한 단세포균 항체를 분리하는 단세포균 Nf 2(IgA)와 Nf 154(IgG<sub>1</sub>) 세포를 10% 우태아 혈청을 포함한 RPMI 1640 배지에서 배양하여 그 상층액을 모아 농축하여 사용하거나, 마우스 복강 내로 pristane(2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane, Sigma)

0.5 ml을 주사한 다음, 5~12일 뒤에 복강 내로 Nf 2 또는 Nf 154 단세포균 세포  $5 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ 개를 접종한 후, 생성된 복수액을 채취하고 원심분리하여 상층액을 취하여 사용하였다. 항체는 Voller *et al.* (1976)의 효소표식 면역결사법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)으로 측정하였는데, 항원의 적정농도는 0.5  $\mu$ g/ml 이었고, 양성 대조군으로 면역혈청을, 음성 대조군은 정상 마우스의 혈청을 1:100으로 희석하여 사용하였다.

#### 5. 단세포균 항체의 투여방법

마우스를 사용하여 꼬리정맥 내로 단세포균 항체를 0.2 ml씩 주사하였으며, 다음과 같이 여러 실험군으로 나누었다. 동시에 대조군으로는 생리식염수만 주사하였다.

##### 가. *N. fowleri* 감염 전 투여군

- 감염전 2회 투여군: 감염시키기 2주 전과 3일 전에 2회 단세포균 항체 주사
- 감염전 1회 투여군: 감염시키기 3일 전에 1회 단세포균 항체 주사

##### 나. *N. fowleri* 감염 후 투여군

- 감염후 2회 투여군: 감염시킨 후 4시간과 3일 후에 2회 단세포균 항체 주사
- 감염후 1회 투여군: 감염시킨 후 4시간 후 1회 단세포균 항체 주사

#### 6. 아메바성 수막뇌염의 발생 확인

감염 후 사망하기까지 마우스의 행동장애, 사망률 및 생존기간을 관찰하였으며, 마우스가 사망하기 직전이나 사망하였을 때 뇌조직으로부터 아메바 영양형의 존재유무 및 뇌조직의 병리학적 변화를 관찰하였다. 또한 생존한 마우스는 감염 후 30일까지 관찰하였다.

#### 7. 단세포균 항체에 의한 *N. fowleri*의 응집반응

단세포균 항체가 *N. fowleri* 영양형을 응집시키는 여부를 Haggerty and John(1982)의 방법으로 관찰하였다. 단세포균 배양상층액을 50% 포화 ammonium sulfate로 농축 투석한 후, 100  $\mu$ l씩 96 well plate의 각 well에 넣고, 동시에 배양중인 아메바 영양형을 Page's amoeba saline(Page, 1967; PAS로 약함)으로 세척하고 30  $\mu$ l PAS에  $5 \times 10^4$ 개의 아메바 영양형을 포함시킨 후 96 well plate의 각 well에 넣고 교반기에서 30분간 교반시킨 뒤 inverted microscope으로 응집 여부를 관찰하였다.

#### 8. 단세포균 항체가 *N. fowleri*의 증식 및 형태에 미치는 영향

Nash and Aggarwal(1986)의 방법에 따라 응집여부를 관찰한 다음, guinea pig complement(CSL)를 각 well에 14  $\mu$ l씩 넣고 30분간 반응시킨 후, 각각을 3 ml CGVS배지가 들어 있는 시험관에 넣고 37°C 항온기에서 배양하면서 *N. fowleri* 영양형의 수의 변동 및 미세구조의 변화여부를 관찰하였다.

*N. fowleri* 영양형의 수는 혈구측정기로 측정하였으

며, 미세구조 변화의 관찰은 투과전자현미경으로 관찰하였다. 배양된 각 실험군의 아메바를 0.1M 인산완충액 (pH 7.4)으로 두번 세척하고 3% glutaraldehyde에 2시간 고정시킨 후 인산완충액으로 다시 세척하고, 2% agar 용액을 부어 굳힌 후 1 mm 두께로 절단하였다. 1% OsO<sub>4</sub>에 고정시킨 다음 통상적인 전자현미경 관찰 방법으로 염색하여 관찰하였다.

9. 단세포균 항체가 조직세포에 대한 *N. fowleri*의 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 관찰할 때 여러 조직세포 중 CHO 세포가 표적세포로 적합함이 알려져 있으므로(李 등, 1986), 이 세포를 Eagle's minimum essential medium(EMEM)에서 monolayer로 될 때까지 배양한 후 배양액을 제거하고 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣어 배양기로부터 세포를 떼어내어 배양액으로 세 번 세척하고, 96 well plate에 각 well 당 4×10<sup>4</sup>개의 CHO세포를 넣어 24시간 지난 다음 monolayer의 형성을 현미경으로 확인하였다. 상층액을 제거한 후 CGVS배지에서 배양 중인 *N. fowleri*를 Earle's balanced salt solution(EBSS)으로 세척하고, 10<sup>4</sup>개의 영양형을 80 μl EBSS에 포함시켜 CHO 세포가 자란 monolayer에 넣고 단세포균 항체 100 μl를 첨가한 후 18시간 CO<sub>2</sub> 함온기에서 반응시켰다. 반응 후 상층액을 제거하고 EBSS 용액으로 2회 세척후, EBSS로 만든 1% glutaraldehyde 용액을 well 당 100 μl씩 넣어 상온에서 15분 고정시켰다. 그뒤에 고정액을 제거하고 0.1% crystal violet 용액을 각 well 당 100 μl씩 넣어 상온에서 10분간 염색하고, 증류수로 3회 세척하여 건조시켰다. 0.2% Triton X-100 용액으로 염색액을 용해시킨 후, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성의 정도는 Alderete and Pearlman(1984)의 방법에 따라 다음 공식으로 산출하였다.

$$\text{세포독성}(\%) = \left(1 - \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

실험 결과

1. 생성된 단세포균 항체의 항체가

생성된 단세포균 항체를 효소표식 면역점사법으로

Table 1. Mortality of the mice injected intravenously with the monoclonal antibody Nf 2 before inoculation of *N. fowleri*

Group	No. of Exam.	Cumulative number of death														Mortality (%)	Mean time to death(day) (mean±S.D.)											
		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			21	22									
Exp. I	19														1	2										15.8	17.7±2.08*	
Exp. II	18															1											16.7	17.0±4.00**
Control	22															1	2	3	4	5							22.7	14.6±2.70

\*, \*\*: Student's t-test, p<0.001 & p<0.05

Exp. I : once treatment

Exp. II : twice treatment

항체가를 측정된 결과, 배양상층액을 모아 농축시킨 Nf 2 단세포균의 항체가는 1 : 2,048이었으며, Nf 154 단세포균 항체가는 1 : 1,024였다. 복수액을 사용한 Nf 2 단세포균의 항체가는 1 : 102,400 이었으며, Nf 154 단세포균 항체가는 1 : 51,200이었다.

2. 단세포균 항체가 마우스의 방어면역에 미치는 영향

가. *N. fowleri* 감염 전 투여된 단세포균 항체의 효과  
*N. fowleri*를 감염시키기 전에 혈관 내로 Nf 2 단세포균 항체를 주사한 실험군에서, 대조군과 사망률 및 평균생존 기간을 비교할 때 차이가 있음이 관찰되었다 (Table 1, Fig. 1). 대조군의 마우스 사망률은 22.7% 인데 비하여, 감염 2주 전과 3일 전 2회 Nf 2 단세포균 항체를 주사한 실험군과 3일 전 1회 주사한 실험군에서의 사망률은 각각 15.8%, 16.7%로 사망률이 저하되었음을 알 수 있었다. 또한 평균 생존기간도 대조군이 14.6±2.70일인데 비하여, 감염 전 2회 투여군과 감염 전 1회 투여군에서는 각각 17.7±2.08일 및 17.0±4.00일로 통계학적으로 유의성이 관찰되었다(p<0.05). Nf 154 단세포균 항체를 감염 2주 전과 3일 전 2회 투여한 실험군의 경우도 사망률 및 생존기간이 각각 10.5%, 16.5±2.12일(p<0.05)로 대조군과 비교하여 차이가 있음이 관찰되었다(Table 2, Fig. 2).

나. *N. fowleri* 감염 후 투여된 단세포균 항체의 효과  
*N. fowleri*를 감염시킨 후 단세포균 항체를 주사한

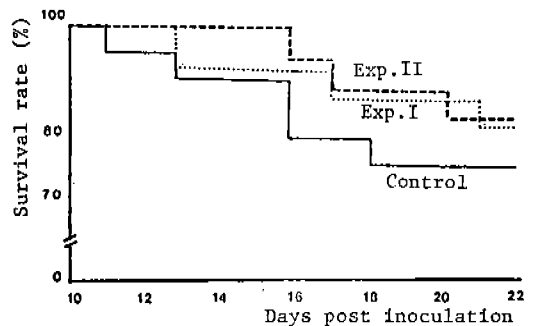


Fig. 1. Survival rate of the mice injected intravenously with the monoclonal antibody Nf 2 before inoculation of *N. fowleri*.

**Table 2.** Mortality of the mice injected intravenously with the monoclonal antibody Nf 154 before inoculation of *N. fowleri*

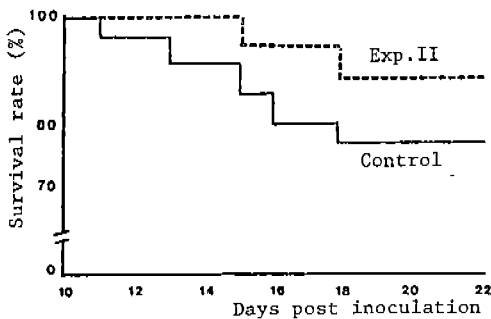
Group	No. of Exam.	Cumulative number of death											Mortality (%)	Mean time to death(day) (mean±S.D.)												
		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			18	19	20	21	22							
Exp. II	19													1					2						10.5	16.5±2.12*
Control	22					1		2		3	4		5												22.7	14.6±2.70

\* : Student's t-test, p<0.02

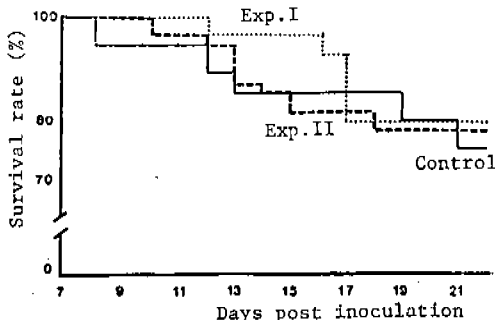
**Table 3.** Mortality of the mice injected intravenously with the monoclonal antibody Nf 2 post inoculation of *N. fowleri*

Group	No. of Exam.	Cumulative number of death											Mortality (%)	Mean time to death(day) (mean±S.D.)												
		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			18	19	20	21	22							
Exp. I	36				1		2	4	5	6							7								19.4	13.6±2.51
Exp. II	28						1							2	5										17.9	15.8±2.17
Control	21		1				2	3												4		5			25.0	14.6±5.32*

\* : Not significant



**Fig. 2.** Survival rate of the mice injected intravenously with the monoclonal antibody Nf 154 before inoculation of *N. fowleri*.



**Fig. 3.** Survival rate of the mice injected intravenously with the monoclonal antibody Nf 2 post inoculation of *N. fowleri*.

실험에서, 마우스의 사망률과 생존기간에 영향을 주지 못함이 관찰되었다(Table 3, Fig. 3). *N. fowleri*를 감염시킨 뒤 4시간 후와 3일 후에 Nf 2 단세포균 항체를 주사한 실험군과 감염 후 4시간 후에만 1회 주사한

실험군에서 마우스의 사망률 및 생존기간을 대조군과 비교할 때, 각각 19.4%, 13.6일, 17.9%, 15.8일 및 25.0%, 14.6일로 통계학적 유의성을 인정할 수 없었다.

**3. 단세포균 항체에 의한 *N. fowleri*의 응집반응**

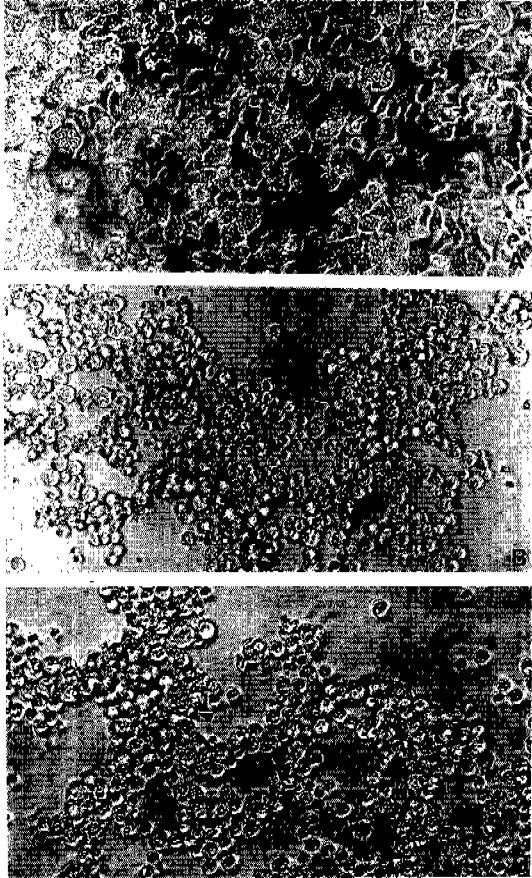
단세포균 배양액을 농축하여 얻은 단세포균 항체를 모아 *N. fowleri*에 대한 응집반응 정도를 관찰하기 위해 처리했을 때, Nf 2 및 Nf 154 단세포균 항체 모두가 대조군에 비해 현저하게 *N. fowleri* 영양형을 응집 시키미 관찰되었다(Fig. 4).

**4. 단세포균 항체가 *N. fowleri* 영양형의 증식에 미치는 영향**

각 단세포균 항체와 보체로 처리된 *N. fowleri* 영양형  $5 \times 10^4$ 을 48시간과 96시간 배양한 후 영양형의 수를 측정하였는데, 각 단세포균 항체로 처리된 경우 대조군에 비해 증식이 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 5). 보체만 처리된 대조군에서의 영양형의 수는 48시간 배양 후 평균  $130 \times 10^4$ , 96시간 후에는  $277 \times 10^4$  임에 비해, Nf 2 및 Nf 154 단세포균 항체로 처리된 경우 48시간 배양 후 각각  $42 \times 10^4$  및  $94 \times 10^4$  으로 유의하게 영양형의 증식의 감소 되었으며, 96시간 후에는  $158 \times 10^4$  및  $206 \times 10^4$  으로 다소 증식이 회복됨을 보여주었다.

**5. 단세포균 항체로 처리된 *N. fowleri* 영양형의 전자현미경적 관찰**

정상적인 *N. fowleri* 영양형은 3층 구조의 원형질막으로 싸여있으며, 전형적인 위축들의 돌출이 관찰되었다. 또한 핵은 중앙에 전자밀도가 높은 핵인을 갖고 있었고, 핵막은 2중막으로 관찰되었다. 영양형의 내형질에는 형태가 다양하고 cisternae가 뚜렷한 미토콘드리아와, 활면 및 조면소포체(SER, RER), peroxisome, 작은 vesicle을 포함한 Golgi 복합체 등과 다양한 모양



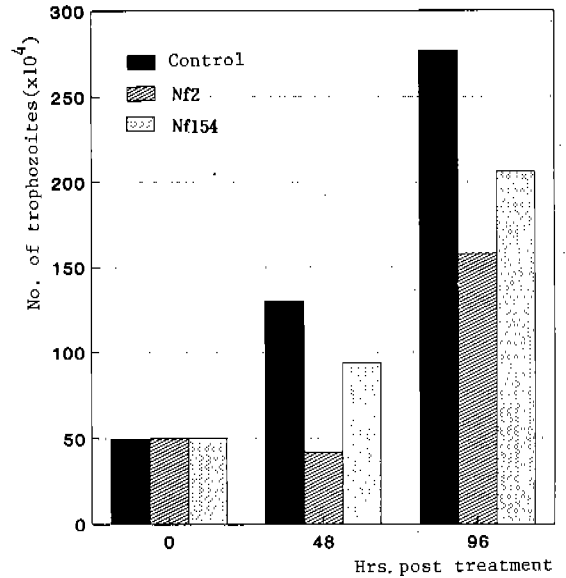
**Fig. 4.** Agglutination of *N. fowleri* trophozoites treated with monoclonal antibodies.  
A: control, B: monoclonal antibody Nf 2, C: monoclonal antibody Nf 154.

의 식포들 및 불규칙한 형태의 수축포들이 관찰되었다(Fig. 6).

Nf 2 단세포균 항체를 처리했을 때 시간이 경과함에 따라 식포 및 수축포들의 수가 줄고 공포의 수가 증가하였다. 또한 24시간 후에는 lipid droplets가 관찰되기 시작하였으며, swelling된 형태의 미토콘드리아들이 많이 관찰되었다(Fig. 7). 48시간 후에는 미토콘드리아의 swelling 정도가 커졌으며 공포의 수가 증가하였고, osmiophilic granules들이 관찰되었다. 더 진행됨에 따라 cisternae가 파괴된 많은 미토콘드리아들과 군집 형태를 이루는 osmiophilic granules의 수가 증가됨이 관찰되었다(Figs. 8 & 9).

**6. 단세포균 항체가 조직세포에 대한 *N. fowleri*의 세포독성에 미치는 영향**

CHO 세포를 이용한 *N. fowleri*의 세포독성실험에서, 아메바의 영양형과 단세포균 항체를 같이 넣었을 때 CHO 세포에 대한 *N. fowleri*의 파괴율을 저하시킴이 관찰되었다(Table 4). CHO 세포 배양에 *N.*



**Fig. 5.** Effect of monoclonal antibodies on the proliferation of *N. fowleri* trophozoites.

**Table 4.** Effects of monoclonal antibodies on the cytotoxicity against Chinese Hamster Ovary Cells(CHO cells) by *N. fowleri*

Monoclonal antibodies from	Cytotoxicity(%)
Nf 2	9.4 ± 3.27*
Nf 154	10.7 ± 5.53**
control	73.0 ± 11.1

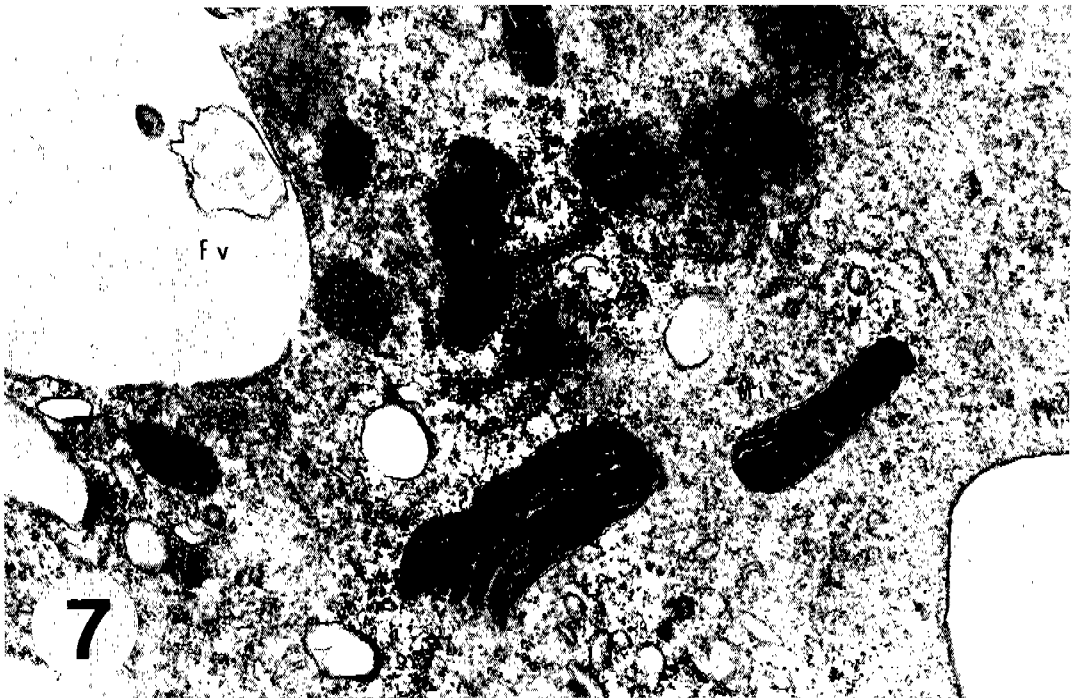
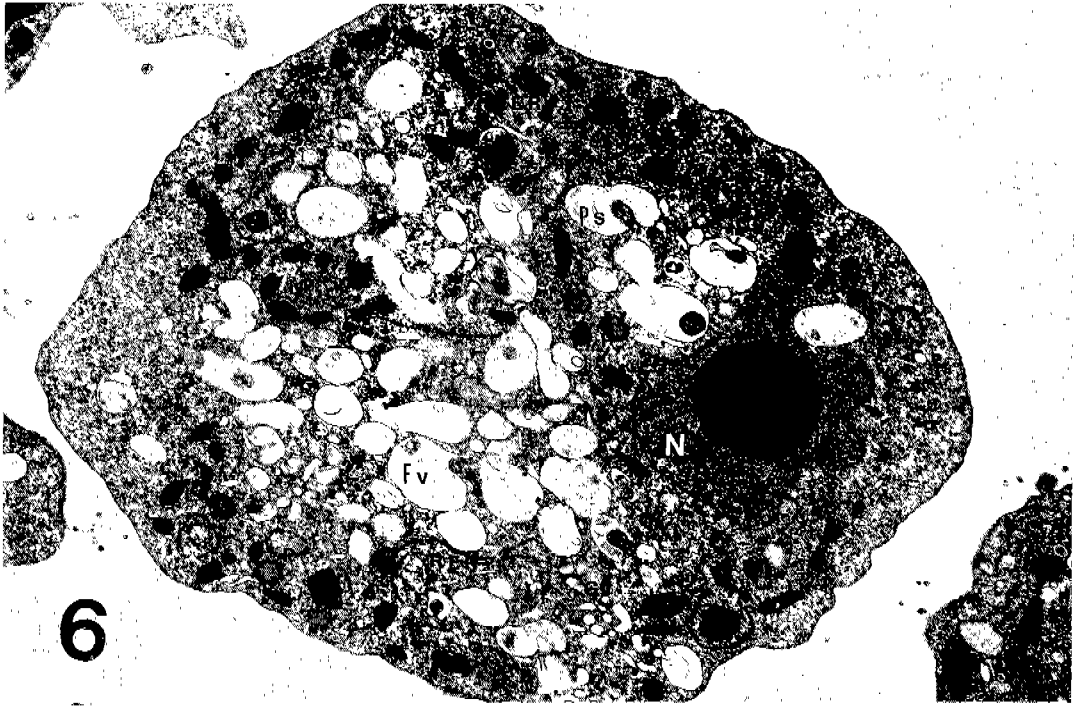
\*, \*\*: Student's t-test, p < 0.001

*fowleri* 영양형만 넣었을 때, 세포독성이 73.0% 인데 비해, Nf 2 및 Nf 154 단세포균 항체를 넣었을 때는 각각 9.5%와 10.7%로 CHO 세포의 파괴율이 저하됨을 알 수 있었다.

**고 찰**

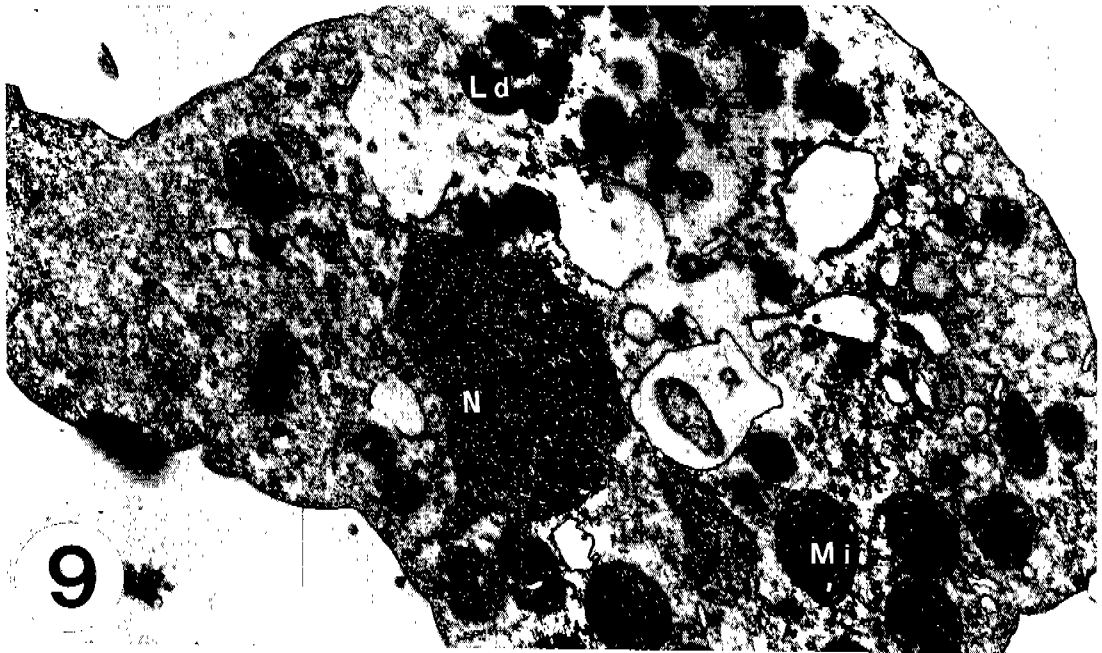
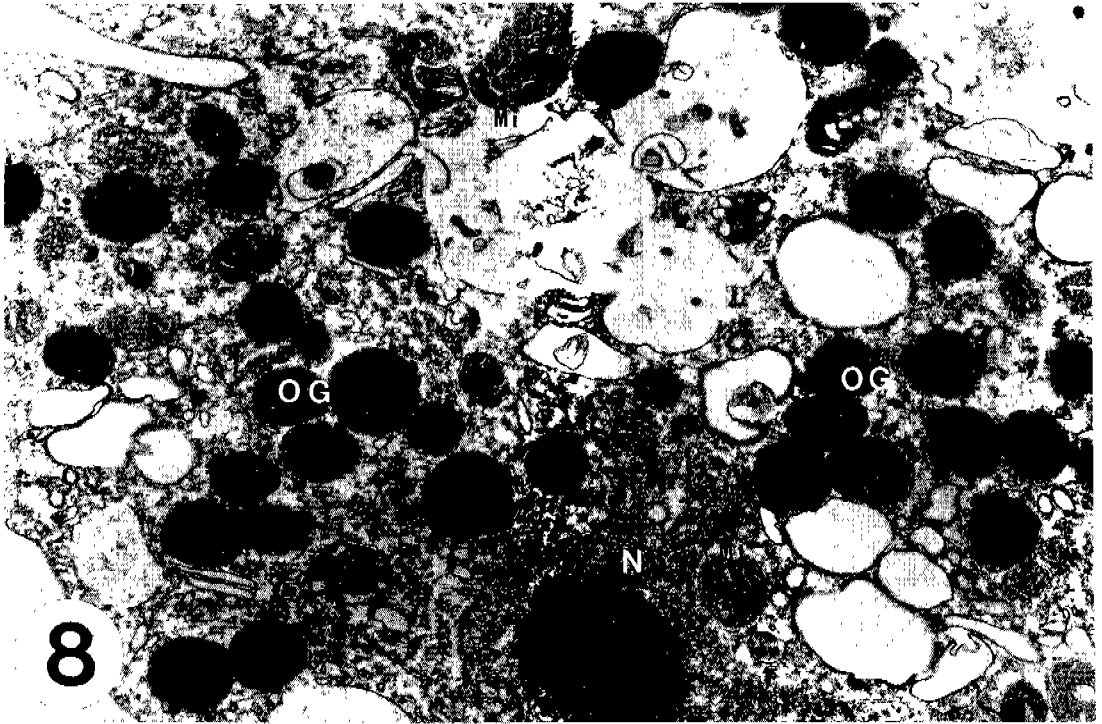
자연환경 속에서 자유생활을 하는 아메바 중 *N. fowleri*는 인체와 실험동물들을 통하여 그 병원성이 인정되어 왔는데, 비강을 통해 실험동물이나 인체에 들어가 비강점막을 뚫고 후신경을 통해 중추신경계를 침범하여 과사성 출혈성 수막염을 일으킨다고 알려졌다(Martinez *et al.*, 1973; Curson & Brown, 1980). 우리나라에서는 황 등(1976)이 서울 주변의 강과 하수에서 자유생활아메바를 분리해냈으며 실험동물에서 병원성이 있음을 입증한 바 있다.

Thong *et al.*(1978 a & b)은 *N. fowleri*를 마우스에 감염시키기 전에 복강을 통하여 항-*Naegleria* 면역현청을 투여했을 때 생존기간이 연장됨을 관찰하였고,



**Fig. 6.** Transmission electron micrograph of a normal trophozoite of *N. fowleri*. Well developed nucleus(N) with nucleolus, endoplasmic reticulum(ER) and rough endoplasmic reticulum (RER), Golgi-complex(GI), mitochondria(Mi), food vacuole(Fv), phagosomes(Ps) and peroxisomes(P) are seen(10,000 $\times$ ).

**Fig. 7.** 24 hours post culture of a *N. fowleri* trophozoite with monoclonal antibody Nf 2. Mitochondria are slightly swollen. Lipid droplets(Ld) are observed (35,000 $\times$ ).



**Fig. 8.** 48 hours post culture of a *N. fowleri* trophozoite with monoclonal antibody Nf 2. Swelling mitochondria and numerous osmiophilic granules(OG) are observed (20,000 $\times$ ).

**Fig. 9.** 72 hours post culture of a *N. fowleri* trophozoite with monoclonal antibody Nf 2. Lipid droplets and very swollen mitochondria are seen(15,000 $\times$ ).

Lallinger *et al.* (1987)은 *N. fowleri*에 대한 항 면역 혈청을 가토의 뇌실 내로 접종하여 생존기간이 연장됨을 관찰하여 방어면역에 효과가 있음을 보고하였다. 본 실험에서 *N. fowleri*에 대한 항 혈청 대신 단세포균 항체를 얻어, 아메바의 감염 전과 감염 후에 혈관 내로 투여하여 단세포균 항체의 영향을 관찰하였는데, 마우스에 *N. fowleri*를 감염시키기 전 단세포균항체를 투여했을 때, 사망률의 저하 및 생존기간의 연장이 관찰됨으로써 마우스의 방어면역에 단세포균 항체가 효과가 있음을 알 수 있었다. 이는 *Schistosoma mansoni*에 대한 단세포균 항체를 생성하여 방어면역 효과를 본 Bickle *et al.*(1986)의 실험과 같은 결과를 얻을 수 있었다. Thong *et al.*(1978 a & b)에 의하면 *N. fowleri* 항혈청을 복강으로 투여했을 때, 혈관내 주사와 동일하게 흡수되어 *N. fowleri*에 대한 응집효과를 유도하여 방어면역에 기여할 것이라 하였다.

마우스에서 정맥 내로 투여한 단세포균 항체가 blood brain barrier를 어떻게 통과하는지 아직은 밝혀지지 않았으나, Harrison and Parkhouse(1986)의 실험에서 *Taenia saginata*에 대한 단세포균 항체를 소의 혈관내에 투여했을 때 뇌실 내로 이동하여 그곳에서 지속적으로 항체가 존재하여 *T. saginata* 감염시 방어면역에 효과가 있다고 보고하였다.

*N. fowleri* 감염 후 단세포균 항체를 주었을 때는 효과가 없었는데 그 이유는 설명하기 어려우나 *N. fowleri* 자체가 병원성이 강하여 일단 비강 점막을 통과한 후에는 빠른 속도로 후신경을 통해 중추신경계를 침범하는데 Thong *et al.*(1983)에 의하면 *N. fowleri*의 감염시 방어면역은 주로 비강 점막에서 일어나는 것으로 되어있다. 따라서 감염 후에 단세포균 항체를 주면 이것이 비강점막에서 *N. fowleri*와 작용할 수 있는 시간이 부족하여 방어면역의 효과가 없는 것이 아닌가 추측된다.

숙주에 대한 예방효과를 관찰할 때, 이용된 기생충에 대해 생성된 항체가 특이성이 있는지를 보고자, Thong *et al.*(1978)과 Lallinger *et al.*(1987)은 실험 대조군으로 건강한 마우스의 혈청을 사용했는데 효과가 나타나지 않았다고 보고하여 항 면역혈청만이 특이성이 있음을 관찰하였다. 본 실험에서는, 여러 연구 결과들로부터 단세포균 항체가 종특이 항체의 특성을 갖고 있는 것으로 사료되어 비특이성 항체를 이용한 실험을 진행하지 않았다. 앞으로 단세포균 항체들 투여했을 때, 시간 경과별로 혈청 내의 항체가 측정 및 뇌척수액에서의 항체가 측정 등의 실험을 진행한다면 *N. fowleri* 감염시 단세포균 항체의 효과에 대해 좀더 구체적인 결과를 얻을 수 있으리라 사료된다.

본 실험에서는 단세포균 항체가 *N. fowleri*의 감염에 미치는 영향을 간접적으로 관찰하고자 *in vitro* 실험으로 아메바 영양형의 응집반응 및 증식에 미치는 영향 등을 관찰하였다. Haggerty and John(1982)은

*N. fowleri* 영양형에 항혈청을 처리했을 때 응집효과가 있다고 보고하였으며, 본 실험에서는 단세포균 항체를 *N. fowleri* 영양형에 처리하였는데 현저한 응집효과를 관찰할 수 있었다. 또한 보체를 처리한 후 영양형의 증식 정도를 관찰하였는데 *N. fowleri* 영양형의 증식에도 영향을 주어 Nf 2와 Nf 154 단세포균 항체를 처리하였을 때 대조군에 비하여 영양형의 현저한 증식억제를 관찰할 수 있었다.

한편으로, Chung *et al.*(1976)은 이질아메바에 항혈청을 처리한 후 전자현미경으로 미세구조의 변화를 관찰하였는데, 처리 후 비동화원을 관찰하였으며 공포의 수의 증가와 ribonucleoprotein bodies의 helix 구조체들이 관찰되었다고 하였다. *Acanthamoeba* spp.에 항혈청을 처리하여 미세구조를 관찰한 일 등(1988)의 실험에서는 아메바 원형질막의 일부 파괴와 핵막의 불규칙화, 리보솜 배열의 증가, 세포질내 미토콘드리아의 변성, 조면 소포체의 증가 등이 관찰되었고, peroxisome은 관찰되지 않았으며, phagosome 등이 많이 증가되었다고 보고하였다. *N. fowleri* 영양형에 단세포균 항체를 처리한 후 미세구조의 변화를 관찰한 본 실험에서는, 건강 대조군 아메바와 비교하여 볼 때 처리 후 시간이 경과함에 따라 peroxisome을 관찰할 수 없었으며, 미토콘드리아의 swelling 정도가 증가하였고, 공포의 수가 증가하고 커졌으며, lipid droplets와 osmiophilic granules 등의 수가 증가하였다. 이들의 변화가 Fig. 9에서와 같이 거의 가사상태의 아메바에서 흔히 발견되는 것으로 보아 단세포균 항체에 의한 영향으로 사료되며 앞으로 더욱 연구해볼 만한 과제로 사료된다.

또한 여러 원충류에 대한 세포독성 연구에 있어서 여러 동물 조직세포들 즉, HeLa세포, Vero세포, B103 rat neuroblastoma세포 및 CHO세포를 이용, 원충류의 병원성 유무 또는 강약을 알아보기 위하여 세포독성효과를 관찰하는 기술들이 개발되어 이용되고 있는데, Lee 등(1986)의 실험에 의하면 아메바의 세포독성 실험에 있어 여러 조직 세포 중 CHO 세포가 표적세포로 적당하다고 보고하여 본 실험은 CHO 세포를 표적세포로 하여 *N. fowleri*의 세포독성을 관찰하였는데, 단세포균 항체의 처리시 CHO 세포에 대한 *N. fowleri*의 세포 파괴율을 저하시킴이 관찰되었다.

이상의 *in vitro* 실험을 통해 단세포균 항체가 *N. fowleri* 영양형에 어떤 형태로든 영향을 준다는 것을 관찰할 수 있었으나, *in vivo* 실험에서 어떻게 작용하는가를 이해하기에는 많은 어려움이 있다. 추가적으로 생체내 실험에서의 단세포균 항체의 영향에 대하여 앞으로 투여방법과 기간 등을 달리하는 등 다각적인 면으로 연구한다면 *N. fowleri* 감염시 예방 및 치료 효과에 많은 도움을 주리라 사료된다.



참 고 문 헌

- Alderete, J.F. and Pearlman, E. (1984) Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayer. *Br. J. Vener. Dis.*, 60:99-105.
- Bickle, Q.D., Andrews, B.J. and Taylor, M.G. (1986) *Schistosoma mansoni*: Characterization of two protective monoclonal antibodies. *Parasit. Immunol.*, 8:95-107.
- Butt, C.G., Baro C. and Knorr, R.W. (1968) *Naegleria* (sp.) identified in amoebic encephalitis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 50:568-574.
- Carter, R.F. (1970) Description of a *Naegleria* species isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, 100:217-244.
- Chung, P.R., Deung, Y.K., Chang, J.K. and Soh, C.T. (1976) Micromorphological changes on immobilized trophozoites of *Entamoeba histolytica* in the immune serum. *Yonsei R. Trop. Med.*, 7: 51-60.
- Cline, M., Carchman, R. and Marciano-Cabral, F. (1986) Movement of *Naegleria fowleri* stimulated by mammalian cells in *in vitro*. *J. Protozool.*, 33:10-13.
- Culbertson, C.G. (1971) The pathogenicity of soil amoebas. *Ann. Rev. Microbiol.*, 25:231-254.
- Cursons, R.T.M. and Brown, T.J. (1976) Identification and classification of the aetiological agents of primary meningoencephalitis. *N.Z.J. Mar. Freshwater Res.*, 10:245-262.
- 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.
- Eaton, R.D.P., Meerovitch E. and Costerton J.W. (1970) The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 64:299-304.
- Ferrante, A. and Smyth, C. (1984) Mitogenicity of *Naegleria fowleri* extracts for immune T lymphocytes. *Immunology*, 51:461-468.
- Fine, E., Inselburg, J., Obeing, J. and Hanson, A. (1987) *Plasmodium falciparum*-inhibitory monoclonal antibodies produced by human hybridomas. *Parasit. Immunol.*, 9:305-320.
- Gigliotti, F., Stokes, D.C., Cheatham, A.B., Davis, D.S. and Hughes, W.T. (1986) Development of murine monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.*, 154:315-322.
- Haggerty, R.M. and John, D.T. (1982) Serum agglutination and immunoglobulin levels of mice infected with *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.*, 29:117-122.
- Handman, E. and Remington, J.S. (1980) Serological and immunochemical characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Immunology*, 40:579-588.
- Harrison, L.J.S. and Parkhouse, R.M.E. (1986) Passive protection against *Taenia saginata* infection in cattle by a mouse monoclonal antibody reactive with the surface of the invasive oncosphere. *Parasit. Immunol.*, 8:819-332.
- Holder, A.A. and Freeman, R.R. (1982) Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, 156:1528-1538.
- 임병준 · 민득영 · 김경민 (1988) 항혈청으로 처리된 *Acanthamoeba* species, YM-4의 형태학적 변화. 한양대학교학술지, 8:811-822.
- 임경일 · 이근태 · 소진탁 · Chev Kidson (1983) 자유생활 아메바에 대한 monoclonal 항체 분비하는 Hybridoma. 대한의학협회지, 26:157-162.
- 黃瀚琦 · 尹德鎮 · 任敬一 · 蘇鎮璋 (1976) 자유생활 아메바의 병원성에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집, 9:182-194.
- Kasper, L.H., Crabb, J.H. and Pfefferkorn, E.R. (1983) Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.*, 130:2407-2412.
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497.
- Kovacs, J.A., Gill, V., Swan, J.C., Ognibene, F., Shelhamer, J., Parrillo, J.E. and Masur, H. (1986) Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet*, ii:1-3.
- Lallinger, G.J., Reiner, S.L., Cooke, D.W., Toffaletti, D.L., Perfect J.R., Granger D.L. and Durack, D.T. (1987) Efficacy of immune therapy in early experimental *Naegleria fowleri* meningitis. *Infect. Immun.*, 55:1289-1293.
- Lawande, R.V., John, I., Bobbs, R.H. and Egler, L.J. (1979) A case of primary amoebic meningoencephalitis in Zaria, Nigeria. *Am. J. Clin. Pathol.*,

- 71:591-594.
- Lee, C.H., Bolinger, C.D., Bartlett, M.S., Köhler, R.B., Wilde III, C.E. and Smith, J.W. (1986) Production of monoclonal antibody against *Pneumocystis carinii* by using a hybrid of rat spleen and mouse myeloma cells. *J. Clin. Microbiol.*, 23:505-508.
- 李泳愚 · 金泰宇 · 鄭仁實 · 鄭坪林 · 李根泰 (1986) 자유 생활 아메바의 병원성 검정에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집, 19:358-369.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Marciano-Cabral, F.M., Patterson, M., John, D.T. and Bradley, S.G. (1982) Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. *J. Parasitol.*, 68:1110-1116.
- Martinez, A.J., Duma, R.J., Nelson, E.C. and Moretta, F.L. (1973) Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscope study. *Lab. Invest.*, 29:121-133.
- Milligan, S.M. and Band, R.N. (1988) Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA as an aid in the taxonomy of *Naegleria* and *Vahlkampfia*. *J. Protozool.*, 35:198-204.
- Moss, D., Brandt, F.H., Mathews, H.M. and Visvesvara, G.S. (1988) High-resolution polyacrylamide gradient gel electrophoresis (PGGE) of isoenzymes from five *Naegleria* species. *J. Protozool.*, 35:26-31.
- Nash, T.E. and Aggarwal, A. (1986) Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. *J. Immunol.*, 136:2628-2632.
- Ortiz-Ortiz, L., Ximenez, C., Mendoza, F., Michalak, C., Melendro, E.I. and Oliva, A. (1986) *Entamoeba histolytica*: Specific antigen recognized by a monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.*, 61:390-397.
- Page, F.C. (1967) Taxonomic criteria for limax amoeba, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J. Protozool.*, 14:499-521.
- Perrin, L.H., Ramirez, E., Lambert, P.H. and Micscher, P.A. (1981) Inhibition of *P. falciparum* growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies. *Nature*, 289:301-303.
- Ravdin, J.I. (1986) Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.*, 8:247-260.
- Ravdin, J.I. and Guerrant, R.L. (1981) Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.*, 8:1305-1313.
- Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R.L. and Long-Krug, S.A. (1985) Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.*, 152:542-549.
- Ryu, J.S. and Im, K.I. (1992) The production and characterization of anti-*Naegleria fowleri* monoclonal antibodies. *Korean J. Parasit.*, 30(1): 33-41.
- Tachibana, T., Montenegro, L.T., Kurihara, K., Nagakura, K., Kaneda, Y. and Komatsu, N. (1986) Localization of the *Trypanosoma cruzi*-specific Mr 25,000 antigen by immune electron microscopy using monoclonal antibodies. *Z. Parasitenkd.*, 72: 701-707.
- Thong, Y.H., Carter, R.F., Ferrante, A. and Rowan-Kelly, B. (1983) Site of expression of immunity to *Naegleria fowleri* in immunized mice. *Parasit. 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.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1976) Enzyme immunoassay in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 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 Stevens, A.R. (1980) Experimental pneumonitis induced by *Naegleria fowleri* in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74:779-782.
- Wong, M.M., Karr, S.L. and Balamuth, W.B. (1975) Experimental infections with pathogenic free-living amoeba in laboratory primate hosts: 1. (A) A study on susceptibility to *Naegleria fowleri*. *J. Parasitol.*, 61:199-208.

=Abstract=

## The protective effects of monoclonal antibodies in mice from *Naegleria fowleri* infection

Euy-Young Soh, Ho-Joon Shin\* and Kyung-il Im\*

Department of General Surgery, College of Medicine,

Aju University, Suwon 441-749, and

Department of Parasitology\*, College of Medicine,

Yonsei University, Seoul 120-752, Korea

Protective effects of monoclonal antibodies against *N. fowleri* were comparatively studied. BALB/c mice were treated with two types of monoclonal antibodies, Nf 2 and Nf 154, before and after the infection with *N. fowleri*. The mortality and mean survival times were then compared. Also, direct effect of the monoclonal antibodies on the *N. fowleri* trophozoites *in vitro* were observed. *In vitro* protective effects of the monoclonal antibodies were also studied in cells infected with *N. fowleri*.

The observed results are summarized as follows:

1. Among mice pretreated twice before the infection with monoclonal antibody Nf 2 (McAb Nf 2), only 15.8% were killed, and the mean survival time was 17.7 days. This was not much different from the mice pretreated once, as the mortality and mean survival time were 16.7% and 17 days. Those effects were compatible with monoclonal antibody Nf 154 (McAb Nf 154). The above findings contrast with the mortality and mean survival time of the control mice, which were 22.7% and 14.6 days respectively.

2. Mice which received twice the McAb Nf 2 following *N. fowleri* infection incurred a 19.4% mortality rate with 13.6 days survival time; 17.9% and 15.8 days with on time administration, in contrast to the 25% and 14.6 days in the control group.

3. Marked agglutination effect of McAb Nf 2 or McAb Nf 154 were observed on *N. fowleri* trophozoites.

4. When *N. fowleri* trophozoites were treated with McAb Nf 2 or McAb Nf 154 combined with comments, the proliferation rate was more significantly suppressed than in that the control.

5. *N. fowleri* trophozoites treated with McAb Nf 2 or McAb Nf 154 showed an increased number of swollen mitochondria, disfigured cisternae, lipid droplets, and osmiophilic granules in the cytoplasm.

6. A remarkable protective effect of monoclonal antibodies was noticed in CHO cells infected with *N. fowleri*. More than 90.6% of the infected CHO cells survived, contrasted with 27% of untreated cells.

The overall results in this study suggest that *N. fowleri* treated with monoclonal antibodies against *N. fowleri* reduce the mortality and prolong the survival time of the mice when the antibodies are administered before the infection. The protective effect of the monoclonal antibodies is surmised being caused by agglutination of the trophozoites.