

면역학적 방법을 이용한 자유생활아메바의 분류학적 접근

충남대학교 생물학과 및 연세대학교 의과대학 기생충학교실*

辛 皓 俊 · 金 鍾 煥 · 任 敬 一*

요 약 : *Acanthamoeba* sp. YM-4의 영양형은 사상의 침상위층을 내어 전형적인 *Acanthamoeba* 속의 특징이 관찰되었으며, 포낭(씨스트)은 외벽이 등근형이었고 내벽이 단순한 구형이거나 다소 불규칙한 2개의 세포벽을 갖고 있었다. SDS-PAGE 결과, *Acanthamoeba* sp. YM-4는 약 16개의 주요 단백질 분획이 관찰되었는데, 2차원 전기영동 결과와 함께 *Acanthamoeba* sp. YM-4의 단백질 분획은 *A. culbertsoni*와 거의 같은 양상이 관찰되었다. *Acanthamoeba* sp. YM-4로 면역시킨 마우스의 비장세포와 myeloma 세포를 융합한 결과, 항체를 분리하는 17개 clone을 얻을 수 있었다. 생성된 단세포군 항체 중 isotyping을 실시하였는데 실험에 사용된 McAY 6, McAY 7, McAY 8, McAY 13, McAY 16 단세포군은 IgG1 항체를, McAY 10, McAY 11 단세포군은 IgM 항체를 분리하였다. 생성된 단세포군 항체는 대부분이 아메바의 세포막에 있는 항원과 반응하였으며, EITB 실험결과, McAY 7 단세포군 항체는 43 kD에서 반응대가 관찰되었고, McAY 10 단세포군 항체는 55 kD과 105 kD에서 반응대가 관찰되었다. ELISA 방법을 이용한 단세포군 항체들과 여러 아메바 간의 교차반응실험 결과, McAY 7 단세포군 항체는 *Acanthamoeba* sp. YM-4에만 반응하였고, McAY 6과 McAY 10은 *A. culbertsoni*와도 반응하였다. 또한 McAY 11은 모든 아메바와 교차반응을 보였다.

Key words: *Acanthamoeba*, PAME, monoclonal antibody, EITB

서 론

자연계의 토양이나 연못, 하수, 수영장이나 공기 중에서도 서식하는 자유생활아메바 중 *Acanthamoeba* spp. 와 *Naegleria* spp.는 인체에서 원발성 아메바성 수막뇌염(髓膜腦炎; primary amoebic meningoencephalitis)을 일으키기 밝혀짐으로써 (Derrick, 1948; Butt *et al.*, 1968; Carter, 1970), 그후 여러 연구자들에 의해 자연 환경속 및 인체의 뇌로부터 분리, 배양되어 병원성이 인정되고 아메바의 종(種: species)이 동정되었다(Culbertson, 1971; Lawande *et al.*, 1979; John and De Jonckheere, 1985).

자유생활아메바의 분리 및 종의 동정에 관하여서는 영양형의 유사분열 양상의 차이와 방추체(spindle)의 유무시기로 판정하거나 (Singh, 1952; Singh and Das, 1970), 포낭(cyst)이나 영양형(trophozoite)의 형태학적 차이로 분류하는 Page(1967a & b)의 분류체계를 일반적으로 따르고 있다. 포낭벽의 구조 즉 내벽과 외벽의 모양으로 종을 분류하거나 영양형 및 포낭의 크기로 분류하는 것은 다양하게 분리된 아메바들에 있어

서 분류 key로서는 한계점에 이르렀다.

최근에는 이러한 형태학적 분류의 단점을 보완하기 위하여 여러 연구가 시작되었다. 병원성 및 호열성 정도(thermophilic)에 따른 분류와(Stevens *et al.*, 1980; De Jonckheere *et al.*, 1984), 아메바의 생화학적 구성 성분 즉, 효소와 단백질의 구성양상을 분석하여 분류하기도 하였다(Costas and Griffiths, 1985; Jacobson *et al.*, 1987). Moss *et al.* (1988)은 농도구배 전기영동법을 이용하여 자유생활아메바 5종류의 isoenzyme 양상을 비교 관찰하였고, Milligan and Band (1988)는 mitochondrial DNA의 분석으로 분류의 key를 연구하기도 하였다. Visvesvara and Balamuth (1975)는 면역전기영동법(immunoelectrophoresis)을 시행하여 *N. fowleri*의 항원성을 다른 아메바의 항원성과 비교하여 차이가 있음을 보고하였다.

한편, 2차원 전기영동법(two-dimensional electrophoresis)으로는 Ahn *et al.* (1983)이 *Amoeba proteus*의 주(株: strain) 감별에 이용한 결과 중요한 방법이 될 수 있다고 보고하였다.

Köhler and Milstein (1975)이 고안한 세포융합기술(cell fusion technique)을 이용하여 기생충에 대한 단세포군 항체(monoclonal antibody)를 만들고 이를 진단 및 분류에 적용하려는 노력이 점차 고조되고 있다. Kovacs *et al.* (1986)은 *Pneumocystis carinii*를, Lopes

* 본 논문은 90년도 한국과학재단 기초 연구비에 의해 수행되었음.

and McMahon-Pratt(1989)는 *Endotrypanum* spp.를 항원으로 이에 대한 단세포균 항체를 만들어 진단 및 분류의 기초를 세우고 있다. 국내에서도 세포융합기술이 발전됨에 따라 여러분야에 적용되고 있는데, Ryu and Im (1992)이 *Naegleria fowleri*에 대한 단세포균 항체의 생산에 성공하여 현재 clone을 보유하고 있어 진단 및 분류에 적용 가능성을 높여주고 있다.

이상의 열거한 방법 외에도 여러 면역학적 방법을 이용한 분류가 시도되면서 자유생활아메바, 특히 *Acanthamoeba* spp.와 *Naegleria* spp.의 분류에 대한 견해가 연구자들에 따라 차이가 있어 논쟁이 되어오고 있는 실정이다.

본 실험은 자유생활아메바의 형태학적 차이 뿐만 아니라, 2차원 전기영동법을 시행하여 각 아메바의 단백질 구성 양상을 비교하고, 세포융합기술을 이용하여 종-특이(species-specific) 단세포균 항체를 만들어 기존에 분리 동정되어 보유하고 있는 아메바 종간의 분류에 적용하여 보다 객관적인 분류체계를 연구함과 동시에, 우리나라에서 분리 배양되어 현재 아직 동정이 동정되지 않은 *Acanthamoeba* sp. YM-4의 동정에 이용하고자 하였다.

재료 및 실험 방법

1. 자유생활아메바의 배양

사용한 아메바는 *Acanthamoeba culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. royreba* 그리고 기존에 분리한 *Acanthamoeba* sp. YM-4이다. 참고 아메바로는 *Naegleria fowleri*를 사용하였다. *Acanthamoeba* spp.는 CGV 배지(Willaert, 1975)에서, *Naegleria* sp.는 CGVS 배지(Willaert, 1971)를 사용하여 37°C 항온기 내에서 무균적으로 제대 배양하였다.

2. 자유생활아메바의 형태학적 관찰

배양중인 각 아메바 영양형의 형태는 inverted microscope으로 관찰하였고, 각 아메바 포낭의 관찰은 포낭유도 용액(encystment medium; 7g NaCl, 3mg Mg Cl₂, 142mg Na₂HPO₄, 136mg KH₂PO₄, 3mg CaCl₂, 3mg FeSO₄, 1,000ml D.W.)으로 배양액을 교체하여 형성된 포낭의 형태를 inverted microscope으로 관찰하였다.

형태학적 분류위치는 1964년 "Society of Protozoologists"에서 분류 체계를 정리하였으며, 1980년 Levine et al.에 의해 원생동물의 재분류가 시도되었다. 열거한 분류표는 Levine et al.(1980)의 분류를 참고로 하였고, 목(目) 이하의 분류는 Griffin(1976)의 분류를 참조하였으며, 한국어명은 生物學 辭典(山田常雄 et al. 편저, 1976) 및 原生動物 圖鑑(猪木正三 감수, 1981)을 참고로 하여 표기 하였다.

3. 전기영동

Laemmli (1970)의 sodium dodecyl-sulfate poly-

acrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE) 및 O'Farrell (1975)의 2차원 전기영동법으로 isoelectric focusing을 시행하여 계대배양해 오고 있는 아메바의 단백질 구성 양상을 비교 관찰하였다. 전기영동법에 사용된 각 아메바의 시료는 각 아메바의 영양형용 계대배양하여 모은 후 sonicator로 파괴하고 20,000 g로 1시간 원심침전하여 상층액은 취한 후 Lowry et al.(1951) 방법으로 단백질 농도를 측정하였다. 내경이 3mm, 길이 13cm 되게 유리관을 만든 뒤, pH 3.5~10, pH 5~8 ampholyte(LKB)을 이용 pH 구배를 갖는 겔을 만든 후 각 아메바의 영양형 lysate를 넣은 다음, 전체 8,000 Vh가 되게 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 후 겔을 꺼내어 Laemmli(1970)의 방법을 이용하여 두께 1.5mm, 0.1% SDS를 함유한 8~14% 농도 구배를 가진 acrylamide gel에 올려 놓고 2차 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝나면 Coomassie blue로 염색을 한 후 단백질의 분획을 비교 관찰하였다.

4. 세포융합 방법에 의한 단세포균 항체의 분리

세포융합은 Köhler and Milstein(1975)의 방법을 이용하여 *Acanthamoeba* sp. YM-4에 대한 단세포균 항체를 생산하였다. *Acanthamoeba* sp. YM-4의 영양형을 모아 파괴시킨 후 lysate를 분리하여 BALB/c 마우스에 면역시켰다. 면역된 마우스의 비장을 적출하고 RPMI 1640배지에서 잘게 세편하여 비장세포(splenocytes)를 모은 후, 배양된 골수종 세포(myelomacells, V653)와의 비율이 5:1~10:1이 되도록 섞고 50% polyethylene glycol(m.w. 4,000) 1ml을 1분 간에 걸쳐 한방울씩 떨어뜨렸다. RPMI 1,640 배지를 가하고 800 rpm으로 5분간 원심침전하였다. 침사에 15% fetal calf serum을 함유한 RPMI 1640 배지를 넣은 후 부유시켜 96 well plate에 100 μl씩 분주하고 배양하였다. 다음날 HAT(hypoxanthine, aminopterin, thymidine)배지를 well당 100 μl씩 첨가하고 용합 3일과 5일째에 새로운 HAT 배지로 교환한 후 10~12일까지 세포융합 결과를 관찰하였다. 용합된 세포 well 중 ELISA를 시행하여 항체를 분비하는 세포의 well에 HT배지를 넣어 적응시키면서 24 well plate로 옮겨 세포수를 늘렸다.

5. Cell cloning

용합된 세포 중 세포배양 상층액을 가지고 효소표식 면역검사법(Voller et al., 1976)을 시행하여 항체를 분비함이 확인되면 cloning을 시행하였다. Mckearn(1980)의 방법 즉, 한계희석법(limit dilution)을 시행하였는데 96 well plate의 well 당 0.25개의 세포가 들어가도록 희석하여 분주하고, 세포수가 늘어난후 세포 상층액에서 항체를 분비함이 확인되면 다시 24 well plate로 옮겨 세포수를 늘린 후 위와 같은 방법으로 2~3회 반복함으로 cloning하였다. 단세포균 항체를 다량 얻기 위하여 mineral oil인 pristane(2,6,10,14-tetramethyl pentadecane, Sigma) 0.5 ml를 마우스 복강 내에

주사하고, 1~3주일 후에 단세포균 항체를 분비하는 세포 $5 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ 개를 마우스 복강 내로 주사하였다. 접종 후 5~12일 후에 복수액을 채취하고 원심 분리하여 상층액을 취하여 실험에 사용하였다.

6. 단세포균 항체의 특성에 관한 실험

1) 단세포균 항체의 isotyping : 단세포균 항체의 isotype을 알기 위하여 mouse monoclonal isotyping kit(Hyclone Lab., USA)를 사용하여 효소표식 면역검 사법을 시행하였다. goat anti-mouse immunoglobulin 을 도포한 96 well plate에 단세포균 배양액 또는 복수 액을 떨어뜨려 37°C서 1시간 반응 시켰다. 세척 후 각 각에 rabbit anti-mouse IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM을 넣고 37°C에서 1시간 유지하였다. 여기 에 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immuno globulin을 반응시킨 뒤 기질액을 넣어 10분 후 반응 을 정지시키고 반응 정도를 육안으로 관찰하였다.

2) 간접형광항체법의 시행 : 단세포균 항체가 *Acanthamoeba* sp. YM-4의 어느 부위와 결합하는지 알아보고 자 간접형광항체법을 시행하였다(Ferrante and Thong, 1979). 배양 중인 아메바 영양형을 Page's saline(PAS 로 약칭)으로 세척하고 100 μ l에 10×10^4 개의 아메바 영양형을 함유시킨 후 각각의 단세포균 항체를 100 μ l 씩 넣고 37°C항온기에서 30분간 반응시킨 후 세척하였 다. 여기에 fluorescein conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin을 적정농도로 희석하여 첨가하고 다 시 30분간 반응시킨 후 세척하였다. 4% formalin으로 2시간 고정한 후 0.1% Evans blue로 5분간 counter stain 하고 세척 후 micro-slide glass 위에 포매하여 형광현미경으로 관찰하였다. 음성대조군으로는 변역시 키지 않은 마우스의 혈청을 사용하였다.

3) 면역효소 전기영동 이적법의 시행 : SDS-PAGE 로 전기영동한 gel을 Towbin *et al.* (1979)과 Tsang *et al.* (1983)의 방법에 따라 면역효소 전기영동 이적 법(enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique: EITB, Western blotting)을 시행하였다. Gel과 nitrocellulose paper를 수포가 생기지 않도록 밀착시킨 후 paper를 음극을 향하도록 하고 transfer buffer를 transblotting chamber (Bio-Rad)에 넣고 60 volt로 3시간 동안 blotting 하였다. 표준 단백질이 전이된 lane은 잘라 amido black으로 염색한 후 탈색하였다. 항원이 전이된 paper를 PBS-Tween 20으로 3회 세척 한 후 2% bovine serum albumin을 4°C에서 18시간 작용시켰다. 이 paper를 다시 세척한 후 항체가 함유 된 복수액을 적정 희석하여 37°C, CO₂항온기에서 2시 간 동안 반응시켰다. 세척한 후 peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin을 37°C에서 1시간 반응 시킨 후 다시 세척하였다. 이 paper에 diaminobenzidine(Bio-Rad) 50mg, 30% H₂O₂ 10 μ l를 넣은 PBS 100 ml 기질용액을 반응시켜 10분내에 항원 항체반응을 관 찰하였다.

7. 단세포균 항체를 이용한 아메바의 분류

계대배양 중인 각 아메바의 영양형을 모아 앞의 방법 으로 lysate를 만들고 단백질 농도를 정량하여 각각의 항원으로 사용하였다. 생성된 단세포균 항체를 이용하여 각 아메바와의 반응 정도를 효소표식 면역검 사법으로 관찰하고 각 아메바간의 연관관계 등을 조사하여 아메바 종간의 분류에 적용하였다.

실험 성적

1. 자유생활아메바의 형태학적 관찰

1) 침상위족아메바 속(국명신칭),

Genus *Acanthamoeba*

Genus *Hartmannella* : Page, 1967a & b (pp. 499-21);

Singh & Das, 1970 (pp. 435-476);

Alexeff, 1912

침상위족아메바 속 (genus *Acanthamoeba*, Volkonsky, 1931, emend. Page, 1967b)은 Sawyer and Griffin (1975)에 의해 *Hartmannella* 속의 병원성 아메바를 모아 침상위족속 과 (family *Acanthamoebidae*)에 포함시켰다. 침상위족아메바 속에 속하는 원충들은 운동성이 있는 위쪽 앞에 투명하고 뾰족하며 때때로 사상의 돌기를 내며 (침상위족), 외형질(ectoplasm)과 내형질(endoplasm)이 뚜렷하게 구별되고 포낭(cyst)을 형성하며 편모시기(flagellate stage)가 존재하지 않는다.

2) *Acanthamoeba* sp. YM-4에 대한 기재

(1) 관찰재료 : 1977년 한강변에서 포획한 봉어의 아가미에서 분리하여 형태학적인 특징으로 *Acanthamoeba* sp.로 잠정적으로 동정되어 CGV 배지에서 현재까지 실험실에서 계대배양해온 것으로 이 분리주(株)는 *Acanthamoeba* sp. YM-4라 잠정적으로 명명되었다.

(2) 기재 : 영양형의 형태는 사상의 침상위족(acanthopoda)을 특징적으로 뾰족뾰족하게 내고 있으며, 크기는 11.0~23.0 μ m 정도였고 *A. culbertsoni* 보다는 작게 관찰되었다(Fig. 1; Page, 1967 a & b). 편모시기를 갖지 않았으며 포낭유도 용액에 처리했을 때 쉽게 포낭을 관찰할 수 있었다. 포낭의 형태학적 특징은 외벽이 둥근형이었고, 내벽은 단순한 구형으로 *A. culbertsoni* 또는 *A. royreba*와 비슷한 모양이었으나 크기가 7.0~14.0 μ m로 *A. culbertsoni* 보다는 다소 작게 관찰되었다(Fig. 1).

3) 고찰 : *Acanthamoeba* sp. YM-4의 영양형과 포낭의 형태학적 관찰은 *A. culbertsoni*, *A. royreba*와 거의 같은 특징을 나타냈다. 다소 크기에 있어서 작은 듯 관찰되었으나 개체간의 차이가 있으므로 크기만으로 종을 결정하기란 어렵다고 사려된다.

2. 자유생활아메바의 면역학적 분류 시도

1) 전기영동법을 이용한 단백질 분획 비교

(1) SDS-전기영동법 : 각 아메바의 세포용출액(lysates)을 모아 동량의 단백질을 Laemmli(1970)의 방

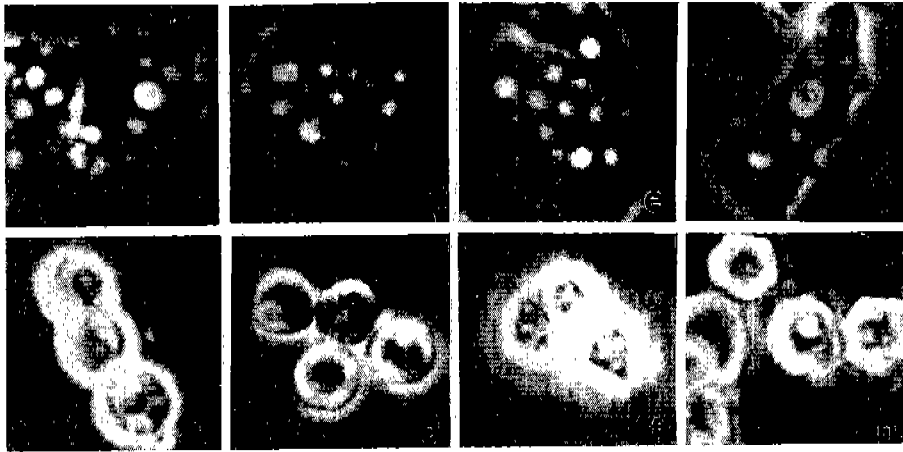


Fig. 1. Inverted microscopic findings of amoeba trophozoites(above) and cysts(below); *Acanthamoeba* sp. YM-4(a,b), *A. culbertsoni*(c,d), *A. royreba*(e,f) and *A. polyphaga*(g,h) ($\times 1,000$).

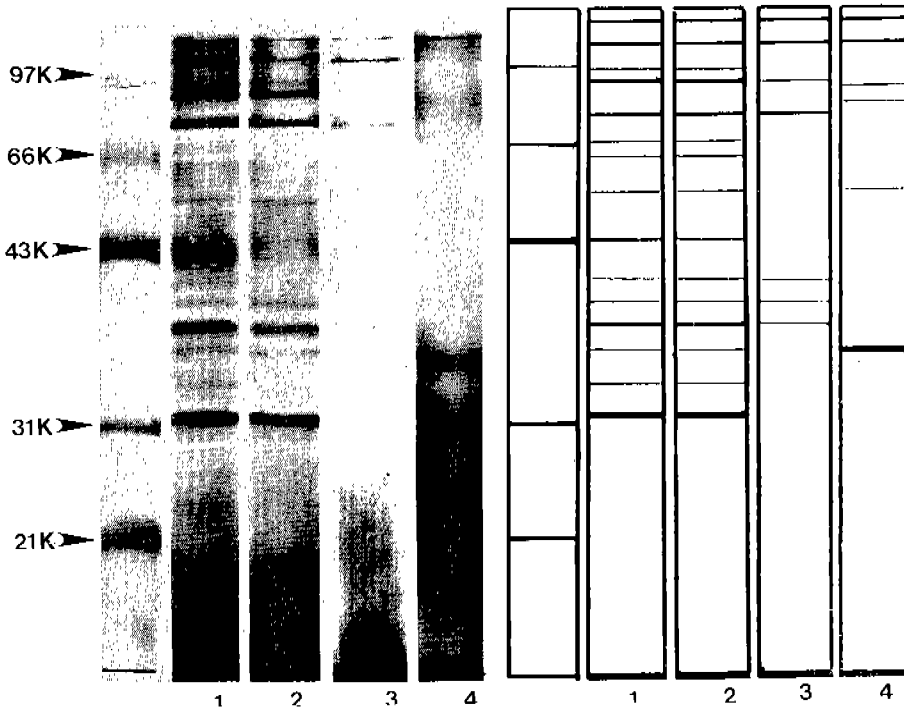


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of *Acanthamoeba* sp. YM-4 (1) and reference species: *A. culbertsoni*(2), *A. royreba*(3) and *A. polyphaga*(4).

법을 약간 수정하여, 0.1% SDS를 함유시켜 전기 영동법을 시행하였다. *Acanthamoeba* sp. YM-4의 주요 단백질 분획은 16개로 분자량 32 kD, 38 kD, 43 kD, 55 kD, 81 kD 90 kD 등이 주요 분획이었으며, *A. culbertsoni*의 단백질 분획과는 거의 같은 양상이 관찰되었다 (Fig. 2). 또한 *A. royreba*와는 분자량 32 kD, 43 kD, 90 kD의 분획에서 차이가 있었으며, *A. polyphaga*와는

대다수 분획에서 차이가 있었음이 관찰되었다 (Fig. 2).

(2) 2차원 전기영동법: *Acanthamoeba* sp. YM-4와 *A. culbertsoni* 영양형을 모아 앞서의 방법으로 세포용출액을 만들어 tube gel을 이용한 O'Farrell (1975)의 2차원 전기영동법을 시행하였다. Coomassie blue 염색을 한 결과 7개 정도의 큰 분획들이 관찰되었는데 (Fig. 3), *Acanthamoeba* sp. YM-4와 *A. culbertsoni*의 단백

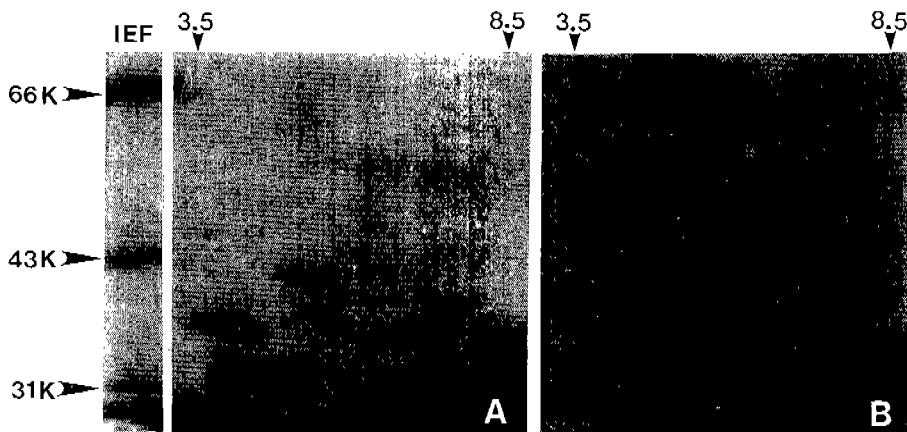


Fig. 3. Two-dimensional electrophoresis patterns of lysates from *Acanthamoeba* sp. YM-4(A) and *A. culbertsoni*(B).

질 분석은 거의 같은 양상을 보여 주었다.

2) 단세포균 항체클oning 이용한 비교

(1) 단세포균 항체의 제조

① 면역된 마우스의 혈청내 항체가 : BALB/c 마우스에 면역시킨 방법의 효율성을 평가하고자 세포융합전에 마우스의 오른쪽 안와동 정맥혈을 채취하여 효소표식 면역검사로 항체를 측정한다. 항체는 1 : 2,560~1 : 5,120이었다.

② 세포융합 성적 : 세포융합 후 5일 전후에는 inverted microscope로 세포접착을 관찰할 수 있었으며, 융합 효율은 96 well 당 70~80 well에서 세포 접착이 관찰되었다. 이 중 항체를 분리하는 것은 5~8개의 well이었다. 항체를 분리하는 세포접착을 한계회색법을 이용하여 2~3회 cloning을 실시함으로써 단세포균 접착을 얻었다. 몇 번의 세포융합의 결과, 항체를 분리하는 17개의 clone(이하 McAY로 약칭)을 얻을 수 있었으며 이 중 항체가 높은 McAY 6, McAY 7, McAY 8, McAY 10, McAY 11, McAY 13, McAY 16 주 등으로 실험을 진행하였다.

(2) 단세포균 항체의 isotype:

생산된 단세포균 항체의 subclass를 알아보기 위하여 isotyping을 시행한 결과, McAY 6, McAY 7, McAY 8, McAY 13, McAY 16 단세포균은 IgG1 항체를, McAY 10, McAY 11 단세포균은 IgM 항체를 분리하였다(Table 1).

(3) *Acanthamoeba* sp. YM-4에 대한 단세포균 항체의 반응부위

생성된 단세포균 항체가 *Acanthamoeba* sp. YM-4 영양형의 어느 부위와 반응하는지를 보코자 간접형광 항체법을 시행하였다. 양성대조군으로 사용된 면역혈청은 아메바의 세포막 전방에서 형광이 관찰되었으며, McAY 7, McAY 8, McAY 10, McAY 11 단세포균

Table 1. Immunoglobulin isotype of monoclonal antibodies against *Acanthamoeba* sp. YM-4

Monoclonal antibodies	Clone	Immunoglobulin subclass
McAY 6	7-8	IgG1
McAY 7	7-30	IgG1
McAY 8	7-40	IgG1
McAY 10	8-16	IgM
McAY 11	8-24	IgM
McAY 13	9-28	IgG1
McAY 16	10-16	IgG1

으로 만든 복수액을 사용했을 때 세포막 전방에서, McAY 6, McAY 10, McAY 13 단세포균의 세포배양액을 사용했을 때는 세포막 일부에서만 형광이 관찰되었다.

(4) 면역효소 전기영동 이적법을 이용한 항원 분석

단세포균 항체와 반응하는 항원성 물질의 분자량을 측정하기 위하여 면역효소 전기영동 이적법 (EITB)를 시행한 결과, McAY 7 단세포균 항체는 43 kD에서 반응대를 보여 주었으며, McAY 10 단세포균 항체는 55 kD와 105 kD에서 반응대가 관찰되었다(Fig. 4).

(5) 단세포균 항체에 의한 각 아메바의 반응

생성된 단세포균 항체가 *Acanthamoeba* sp. YM-4 뿐만 아니라, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. polyphaga* 및 *N. fowleri* 등과도 반응하는지를 보코자 효소표식 면역 검사법으로 종간의 교차 반응 정도를 관찰하였다. 세포배양액을 사용한 McAY 6, McAY 7, McAY 13, McAY 16 단세포균 항체는 *Acanthamoeba* sp. YM-4에만 반응하였으나, McAY 10 단세포균 항체는 *A. culbertsoni*와도 교차반응을 하였다(Table 2). 또한 복

Table 2. Reactivity of anti-*Acanthamoeba* sp. YM-4 monoclonal antibodies with other free-living amoebae, measured by ELISA

Free-living amoebae trophozoites	Monoclonal antibodies from									
	Culture supernatants					Ascites				
	McAY 6	McAY 7	McAY 10	McAY 13	McAY 16	McAY 6	McAY 7	McAY 8	McAY 10	McAY 11
<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-4	0.91	0.86	1.04	0.64	0.43	0.75	1.81	1.16	2.28	1.72
<i>A. culbertsoni</i>	0	0	0.40	0	0	0.40	0.15	0.01	0.33	0.47
<i>A. royreba</i>	0	0	0	0	0	0	0.02	0.04	0	0.37
<i>A. polyphaga</i>	0	0	0	0	0	0	0.23	0.18	0.08	0.64
<i>N. fowleri</i>	0.08	0.15	0.14	0.15	0.14	0.14	0.18	0.16	0.16	0.47

* Remark: Healthy BALB/c serum; less than 0.32 in ELISA value

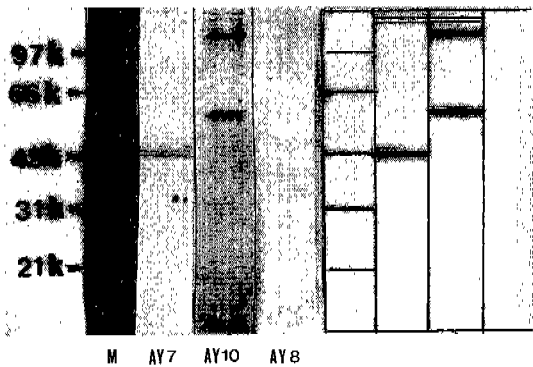


Fig. 4. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blotting patterns of *Acanthamoeba* sp. YM-4 reacted with various monoclonal antibodies from cell lines McAY 7, McAY 8 and McAY 10; M.: protein standard, right: diagram of EITB.

수액을 사용한 McAY 7과 McAY 8 단세포균 항체는 *Acanthamoeba* sp. YM-4에만 반응하였고, McAY 6과 McAY 10 단세포균 항체는 *A. culbertsoni*와 교차반응이 있었으며, McAY 11 단세포균 항체는 실험에 사용한 모든 아메바와 반응을 하였다.

고 찰

원생동물(protozoa)은 1674년 Leeuwenhoek에 의해 처음 발견된 이래 현재 65,000여종에 달하는 것으로 알려져 있다. 이 중 현존하는 종류는 반정도이며, 10,000여종은 기생성 원충류임이 밝혀졌다. *Acanthamoeba* spp.와 *Naegleria* spp.의 분류학적 위치는 최근의 Levine *et al.* (1980)에 의한 분류체계에 따르면, 동물계(kingdom Animalia), 원생동물 아계(subkingdom Protozoa)에 속한 원생동물로서, 육질편모충문(phylum Sarcostigophora), 육질충 아문(subphylum Sarcodina), 근족충 상강(superclass Rhizopoda), 엽상위족

충 강(class Lobosea), 나과아메바 아강(subclass Gymnamoebida)에 속하는 것으로, *Acanthamoeba* 속은 아메바 목(order Amoebida), 침상위족충 아목(suborder Acanthopodina), 침상위족아메바 과(family Acanthamoebidae)에 속하며 *Naegleria* 속은 열각충 목(order Schizopyrenida), 유펜모아메바 과(family Vahlkampfiidae)에 속하는 원충류로서 자유생활을 하는 아메바들이다. 아메바 목 이하의 분류는 연구자마다 논란이 되어오고 있는데 고찰을 통해 아래와 같이 재분류하였으며, 종(species)의 분류는 Page (1967a & b) 및 Singh and Das (1970)의 분류에 기초를 두어 형태학적인 종 검색표를 작성하였다(Table 3).

Table 3. Classical keys of genus *Acanthamoeba* based on the morphology of trophozoites and cysts

1. a. 포낭의 외벽(outer wall)이 불규칙하며, 내벽의 모양이 별모양(stellate)이다. _____ 2
- b. 포낭의 외벽이 둥근형이다. _____ 3
2. a. 둥근 영양형의 크기가 30~40 μm로 크다. _____
 _____ *A. castellanii*
- b. 둥근 영양형의 크기가 15~30 μm이다. _____
 _____ *A. rhyodes*
3. a. 포낭 내벽의 모양이 단순한 구형이거나 조금은 불규칙하다. _____ *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *Acanthamoeba* sp. YM-4
- b. 포낭 내벽이 별모양이다. _____ 4
4. a. 둥근 영양형의 크기가 30~40 μm로 크다. _____
 _____ *A. astronyxis*
- c. 둥근 영양형의 크기가 20~30 μm이다. _____
 _____ *A. polyphaga*

아메바 목, Order Amoebida

엽상위족(lobopodia)이나 사상위족(filopodia)에 의해 운동하거나 영양물을 섭취하며, 자연환경속에서 자유생활을 하는 것과 여러 생물체에 기생하는 것들도 있다. 전형적으로 단일핵(uninucleate)을 갖고 있으며

mitochondria가 존재한다. 생활사 중 편모시기(flagellate stage)가 없다. 5개의 아목(亞目) Tubulina, Flabellina, Conopodina 그리고 Acanthopodina가 여기에 속한다.

관상위족충 아목(국명신칭), Suborder Tubulina

관상위족충류에 속한 원충은 체형이 길쭉한 모양으로 분지골 갖기도 하며, 세포질의 유동은 단일 방향성이며 Amebidae, Hartmannellidae, Entamoebidae 등이 여기에 속한다. Page (1967a)에 따르면 Hartmannella 과(科)는 *Hartmannella* 속 (genus *Hartmannella* Alexieff, 1912, emend. Page, 1967 & 1974)을 포함하고 있으며 여기에는 포유동물에 기생하는 병원성 원충이 속한다. 그후 병원성인 *Hartmannella* 속의 아메바들을 *Acanthamoeba* 속에 포함시켜 침상위족충 아목(suborder Acanthopodina)으로 제칭하였다(Sawyer & Griffin, 1975; Griffin, 1976).

침상위족충 아목(국명신칭),

Suborder Acanthopodina

체형은 다소 끝이 길쭉하거나 때때로 사상(filiform)이다. 넓고 투명한 세포질에서 생긴 위족의 바깥쪽이 뾰족뾰족한 침상위족(acanthopoda) 형태를 갖고 있으며 일반적으로 포낭(cyst)이 형성되는 원충류이다. Griffin (1976)에 의해 아목으로 독립되었으며, 하나의 침상위족충 과(order Acanthamoebidae)와 하나의 침상위족아메바 속(genus *Acanthamoeba*)이 여기에 속한다.

일반적으로 *A. culbertsoni*는 인체나 실험동물에 병원성을 나타낸다고 인정되고 있으며 (Culbertson, 1971), *A. royreba*는 비병원성으로 보고되고 있다(Griffin, 1976). Park *et al.* (1989)의 실험에 의하면 *Acanthamoeba* sp. YM-4의 영양형 10×10^4 또는 20×10^4 개를 마우스의 비강 내로 떨어뜨렸을 경우에는 14~22%의 사망률을 보여 주었으며, 2×10^4 개를 두개강 내로 집중하였을 때 100% 치사율을 나타내었다. *Acanthamoeba* sp. YM-4는 *A. culbertsoni*와 비교하여 병원성에 있어서 강약의 차이는 있지만 *A. culbertsoni*와의 상관관계를 형태학적인 특징과 병원성의 정도만으로 구별하기란 어려움이 있었다. 본 연구는 이런 형태학적인 관찰의 한계점을 면역학적인 분류방법으로 보완함으로써 *Acanthamoeba* sp. YM-4의 동정에 적용하고자 하였다.

Ahn *et al.* (1983)에 의하면, *Amoeba proteus* 중 공생 박테리아(endosymbiotic bacteria)를 갖고 있는 Dx 주(株)는 박테리아를 갖고 있지 않은 아메바와 2차원 전기영동법상 단백질분획의 차이를 보여줘, 같은 종에서도 공생 박테리아의 유무에 따라 주를 분류하기도 하였다. 또한 일반적으로 silver 염색을 할 경우 더 작은 많은 분획이 관찰된다고 알려져 있으나 본 실험은 아메바 종간 또는 아종간의 분획 비교에 목적이 있고 실제적으로 작은 많은 분획은 비교가 용이치 않아 Coomassie 염색만으로 비교 관찰하였다. 본 실험결과 두 아메바간에 2차원 전기영동법상 단백질 분획이 거의 같은 양

상을 보여줘 역시 두 종간에는 상당한 관계가 있을 것으로 사료되었다. 따라서 좀더 구체적인 접근방법으로 세포융합법에 의한 단세포군 합체를 만들어 비교하고자 하였다.

Ryu and Im (1992)의 단세포군 합체를 생산하여 여러 실험을 진행한 결과에서 보면, IgA를 분비하는 단세포군이 많았으나, 본 실험에서는 isotyping을 시행한 7개의 단세포군 중 하나도 생성되지 않았다. 이는 면역원 또는 면역방법에 따라 차이가 있을 것으로 사료된다. Western blotting을 시행한 Ryu and Im(1992)의 실험에서 여러 단세포군 합체 중 하나 내지는 두개의 반응대를 보여 주었으며, Torian *et al.*(1984)의 실험에 의하면 분리한 단세포군 합체 대부분이 면역효소 전기영동 이적법만으로는 분자량을 측정하기 어렵다고 하였다. 본 실험에서도 McAY 8, McAY 13 단세포군 합체 등에서는 반응대를 관찰할 수 없었다. Ryu and Im(1992)에 의하면 gel의 농도를 높여 주거나 immunoprecipitation test 등의 실험으로 보다 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 추측하여 후후에 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Salazar *et al.* (1986)은 *Naegleria* sp.를 Brazil의 호수에서 분리한 후, Visvesvara 교수 등에게서 얻은 *N. fowleri*에 대한 단세포군 합체를 사용하여 간접형 광합체법으로 반응정도를 관찰 하였던 바, *N. fowleri*로 동정하였다고 하였다. 한편 Lopes and McMahon-Pratt (1989)는 *Endotrypanum* 속의 여러 편모류군 계료로 26개의 단세포군 합체를 생성하여 다른 종들과의 교차반응 정도를 dot-blot radioimmune assay 방법으로 측정하여 새로운 종의 동정에 이용하였고, Mimori *et al.* (1989)은 *Leishmania* sp.에 대한 단세포군 합체를 생성하여 radioimmune binding assay방법으로 측정하였는데 *L. braziliensis*, *L. amazonensis* 또는 *L. panamensis*에만 반응하는 종 특이성 단세포군 합체를 찾아내어 새로 분리한 종의 동정에 이용하였다. 본 실험에서 단세포군 합체를 함유한 세포배양액 뿐만 아니라 복수액을 사용하여 면역효소검사법을 시행한 결과, McAY 7 단세포군 합체는 *Acanthamoeba* sp. YM-4에 단 반응하여, 종-특이 단세포군 합체라 할 수 있으며 McAY 6, McAY 10 단세포군 합체는 *A. culbertsoni*와도 반응하였고, McAY 11 단세포군 합체는 실험에 사용된 모든 아메바와 반응하여 공통 항원에 대한 항체로 사료된다. 사용된 7개의 단세포군 합체 중 3개에 시 *A. culbertsoni*와만 교차반응이 관찰되어, *Acanthamoeba* sp. YM-4는 *Acanthamoeba* 속의 여러 아메바 중 *A. culbertsoni*와 유연관계가 있을 것으로 생각되며, 덧붙여 형태학적인 관찰 뿐만 아니라, 아메바의 단백질 분획비교 및 단세포군 합체의 교차반응 등을 분류 key에 적용한다면 보다 객관적인 결과를 얻을 수 있으리라 사료된다.

이상의 성적을 종합해 보면, *Acanthamoeba* sp. YM-4

의 영양형과 포낭의 형태학적 특징은 *A. culbertsoni*나 *A. royreba*와 유사하였으며, SDS-PAGE 및 2차원 전기영동법을 시행한 단백질 분획 양상에서는 *A. culbertsoni*와 거의 같은 양상을 보여주었다. 또한 단세포 균양체를 이용한 아메바 종간의 교차반응 실험에서는 *Acanthamoeba* sp. YM-4와 *A. culbertsoni*에 같이 반응하는 단세포균 합체도 있었던 반면, *Acanthamoeba* sp. YM-4에만 반응하는 단세포균 합체가 있어, *Acanthamoeba* sp. YM-4는 또 다른 하나의 종(種) 또는 *A. culbertsoni*의 아종(亞種: subspecies)으로 분류할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Ahn, T.I. and Jeon, K.W. (1983) Strain-specific proteins of symbiont containing *Amoeba proteus* detected by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Protozool.*, 30:713-715.
- Butt C., G., Baro, C. and Krorr, R.W. (1968) Pathogenic progress 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.
- Costas, M. and Griffiths, A.J. (1985) Enzyme composition and the taxonomy of *Acanthamoeba*. *J. Protozool.*, 32:604-607.
- Culbertson, C.G. (1971) The pathogenicity of soil amoebas. *Ann. Rev. Microbiol.*, 25:231-254.
- De Jonckheere, J.F., Pernin, P., Scaglia, M. and Michel, R. (1984) A comparative study of strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis* n. spp. *J. Protozool.*, 31:324-331.
- Derrick, E. (1948) A fetal 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.
- Ferrante, A. and Thong, Y.H. (1979) Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Int. J. Parasit.*, 9:599-601.
- Griffin, J.L. (1976) Pathogenic free-living amoebae. Parasitic Protozoa. Academic Press Inc., pp.508-549.
- 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. and De Jonckheere, J.F. (1985) Isolation of *Naegleria australiensis* from an Oklahoma Lake. *J. Protozool.*, 32:571-575.
- 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.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*, 227:68-685.
- 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.*, (May):591-594.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.G., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. and Wallace, F.G. (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, 27:37-58.
- Lopes, A.H.C.S. and McMahon-Pratt, D. (1989) Monoclonal antibodies specific for members of genus *Endotrypanum*. *J. Protozool.*, 36:354-361.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.R. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Mckearn, T.J. (1980) Cloning of hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase 374, In Kennet RH, Mckearn TJ, Bechtol KB (eds). Monoclonal antibodies, hybridoma: A new dimension in biological analysis. Plenum Press, New York
- 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.
- Mimori, T., Grimaldi, G., Kreutzer, R.D., Gomez, E.A., McMahon-Pratt, D., Tesh, R.B. and Hashiguchi, Y. (1989) Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40:154-158.
- Moss, D., Brandt, F.H., Mathews, H.M. and Visvesvara, G.S. (1988) High-resolution of polyacryl-

- amide gradient gel electrophoresis(PGGE) of isoenzymes from five *Naegleria* species. *J. Protozool.*, 35:26-31.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250:4007-4021.
- Page, F.C. (1967a) Taxonomic criteria for limax amoeba, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J. Protozool.*, 14:499-521.
- Page, F.C. (1967b) Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J. Protozool.*, 14:709-724.
- Park, E.S., Kim, K.M., Ahn, M.H. and Min, D.Y. (1989) Study on the pathogenicity of an *Acanthamoeba* species isolated from freshwater fish. *J. Hanyang Med. Coll.*, 8:225-239.
- 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.
- Salazar, H.C., Moura, H., Fernandes, O. and Reralta, J.M. (1986) Isolation of *Naegleria fowleri* from a lake in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80:348-349.
- Sawyer, I.K. and Griffin, J.R. (1975) A proposed new family, Acanthamoebidae n. fam. (order Amoebida), for certain cyst-forming filose amoebae. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 94:93-98.
- Singh, B.N. (1952) Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, 236:405-461.
- Singh, B.N. and Das, S.R. (1970) Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order Amoebida. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, 259:435-476.
- Stevens, A.R., De Jonckheere, J. and Willaert, E. (1980) *Naegleria lovaniensis* new species: Isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *Int. J. Parasit.*, 10:51-64.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Ordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:4350-4354.
- Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. and Simons, A.R. (1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*, 92:377-391.
- Visvesvara, G.S. and Balamuth, W. (1975) Comparative studies on related free-living and pathogenic amoebae with special reference to *Acanthamoeba*. *J. Protozool.*, 22:245-256.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1976) Enzyme immunoassay 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. Belg. Med. Trop.*, 51:701-708.
- Willaert, E. (1975) Recherches immuno-taxonomiques comparees sur les amibes du groupe "Limax". *Acad. R. Sc. Outer-Mer, Mem. class Sc. Nat. sous presse*

=Abstract=

Immunological approach for classification of free-living amoeba in Korea

Ho-Joon Shin, Chong-Hwan Kim and Kyung-il Im*

Department of Biology, College of Natural Science, Chungnam National University, Taejon 302-764, and Department of Parasitology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752, Korea*

Acanthamoeba spp., free-living amoebae inhabited in moist soil, pond, freshwater, sewage, atmosphere and swimming pool, may be causative protozoa of the fatal primary amoebic meningoencephalitis in experimental animals and humans. In this study, *Acanthamoeba* spp., including *Acanthamoeba* sp. YM-4 (isolated strain from Korea) had been compared by the two-dimensional electrophoresis and hybridoma technique as well as the difference of morphological characteristics. Trophozoite of *Acanthamoeba* sp. YM-4 is usually uninucleate and show the hyaline filamentous projections (acanthopoda). No flagellate stage observed. Cysts have two walls, the outer wall is nearly circular, but inner wall is oval or some irregular. As results of SDS-PAGE for lysate of *Acanthamoeba* sp. YM-4, 16 major protein fractions are similar to those of *A. culbertsoni*, but different to *A. royreba* and *A. polyphaga*. Findings of two-dimensional electrophoretic patterns of *Acanthamoeba* sp. YM-4 are almost same to those of *A. culbertsoni*. The isotype of monoclonal antibodies produced from McAY 6, McAY 7, McAY 8, McAY 13 and McAY 16 clones were IgG1, and McAY 10 and McAY 11 clones were IgM. As results of the cross-reactivity among various amoebae using ELISA with monoclonal antibodies, McAY 7 monoclonal antibody (molecular weight 43 kDa by EITB) was only reacted with *Acanthamoeba* sp. YM-4, but McAY 6 and McAY 10 monoclonal antibodies were reacted to *A. culbertsoni* as well as *Acanthamoeba* sp. YM-4.

[*Korean J. Parasit.* 30(4):289-298, December 1992]