

## 톡소플라스마 곤디의 세포내 배양에 있어서 세포 주에 따른 감수성 비교

박병규<sup>1)\*</sup>, 문형로<sup>2)</sup>, 유재란<sup>3)</sup>, 국진아<sup>4)</sup>, 채종일<sup>4)</sup>, 이순형<sup>4)</sup>

경상대학교 의과대학 소아과학교실 및 경상대학교 암연구소<sup>1)</sup>, 서울대학교 의과대학 소아과학교실<sup>2)</sup>,  
건국대학교 의과대학 기생충학교실<sup>3)</sup>, 서울대학교 의과대학 기생충학교실 및 풍토병연구소<sup>4)</sup>

요 약: *Toxoplasma gondii*의 세포내 배양에 적합한 숙주 세포 주를 찾기 위하여 정상 세포 2 종류(MDCK-canine kidney cells; Vero-monkey kidney cells) 및 암세포 6종류(A 549, PC 14-human lung cancer cells; SNU 1, SNU 16, MKN 45-human stomach cancer cells; HL-60-human promyelocytic leukemia cells)를 대상으로 하여 각 세포 주의 *T. gondii* 감염에 대한 감수성을 형태학적 관찰 및 <sup>3</sup>H-uracil 흡수 시험을 통하여 비교하였다. *T. gondii*에 대한 감수성은 A 549 및 PC 14 세포가 가장 높았고, Vero, HL-60, MDCK 및 SNU 1 세포가 그 다음, SNU 16 및 MKN 45 세포는 가장 감수성이 낮았다. 또한 각 세포 주에 있어서 *T. gondii* 감염 후 총체 증식 정도를 정량화하여 12시간, 36시간 및 60시간에 각각 측정된 바 총체 수를 적게 ( $2 \times 10^5$ /ml) 투여했을 때는 A 549, PC 14, Vero, MDCK 세포들에서 감염 60시간까지 총체의 분열 증식이 계속 증가하였고, 총체 수를 많이 ( $50 \times 10^5$ /ml) 주입하였을 때는 대부분의 세포들에서 감염 12시간에 최고의 증식을 보이다가 이후 증식이 감소하였다. 이상의 결과로 보아 *T. gondii*의 분리 계대 및 총주(strain) 확립을 위해서는 A 549 및 PC 14 세포가 가장 적합할 것으로 판단되며, 총체 주입 수 및 배양 시간별로 총체의 증식 정도가 다름을 알 수 있었다.

### 서 론

톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*)는 1908년 Nicolle과 Manceaux에 의해 설치류에서 처음 발견된 후, 인체에서는 1923년 체코슬로바키아에서 생후 3개월에 실명하고 16개월에 뇌수종 및 경련으로 사망한 남아로부터 처음 분리된 원충류로서 (Janku, 1959), 남극을 제외한 전 세계에 분포하고 있는 의학적 중요성이 매우 높은 기생충의 하나이다. 톡소플라스마증(toxoplasmosis)은 선천성 감염인 경우 망막막락막염, 뇌수종, 뇌내 석회화 및 정신운동 장애 등, 후천성 감염의 경우에는 뇌척수염, 심근염, 림프절염 및 망막막락막염 등의 증상을 나타낸다(Beaver et al., 1984). 더우기 톡

소플라스마증은 최근 면역기능이 저하된 Hodgkin's disease, 백혈병, 기타 암, 장기 이식자 및 AIDS 환자 등에서 빈번히 발생하고 있어 주목을 끌고 있다(Walzer and Genta, 1989).

그럼에도 불구하고 *T. gondii*에 대해서는 생활사, 역학, 면역학, 진단, 치료 등에 있어서 아직도 추구해야 할 점들이 많다. 특히 우리 나라에서는 최원영 외(1982 & 1983)가 성모병원 일반 환자, 적십자 병원 일반 환자, 그리고 국립서울정신병원의 정신과 환자에 대한 간접 latex 응집반응에서 각각 4.3%, 7.2% 및 1.9%의 양성반응을 보고하여 이 질환이 국내에 만연되어 있음을 시사해 주고 있으나, 아직 환자로부터 총체를 분리하여 명확히 진단한 종례가 없고 *T. gondii*의 국내 총주(strain), 혈청 반응에 필수적인 총체 항원 등도 아직 확립되어 있지 않은 실정이다. 따라서 *T. gondii*에 대해서는 많은 기초적 연구가 필요한 상황이다.

우리 나라에서 *T. gondii*에 대한 연구를 원활히 하기 위해서는 총체, 특히 우리 나라 총주의 *in vivo*, *in vitro* 계대 배양의 성공적 수행 등이 필수적인 요구사항으로서 이를 위해서는 우선 세포 배양

• 논문접수 1993년 6월 24일, 수정재접수 8월 6일  
• 이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.  
\* 별책 요청 저자

system에서 숙주 세포에 *T. gondii*를 감염 계대시키는 일이 선행되어야 할 것이다. *T. gondii*의 계대는 마우스 복강에 주입하여 체내(*in vivo*) 계대하는 방법이 있으나 배양된 숙주 세포에 감염시켜 계대하는 방법이 면역학적 연구는 물론 병태생리학적, 또는 약제 개발 연구 등을 위하여 필수적인 것이다. 세포 배양에 이용되는 숙주 세포로는 여러 종류의 정상 세포(epithelium, fibroblasts, kidney, liver, macrophage, retinoblast cells)들이 있으나 최근에는 각종 암세포(carcinoma of cervix, HeLa), malignant foreskin, retinoblastoma, leukemic monocytes, YAC-1 등)를 이용한 *T. gondii*의 성공적 배양이 보고되고 있어(Doran, 1982; Noriega and Hauser, 1988). 이 원충 연구에 밝은 전망을 주고 있다. 그러나 서로 다른(숙주 종류별, 세포 유형별) 암세포에 대한 *T. gondii*의 배양 및 감수성 비교는 그다지 시도된 바 없어, 많은 연구를 필요로 하고 있다.

본 연구의 목적은 *in vitro*에서 계대되고 있는 몇 가지 정상 또는 암세포 주(cell lines)의 *T. gondii* 감염에 대한 감수성을 비교, 관찰함으로써 총체의 숙주 세포 선호도와 숙주-기생충 상호관계를 이해하고 궁극적으로는 우리 나라 *T. gondii*의 세포 내 배양(및 충주 확립)을 위한 기초 자료를 제공하고자 하는 데에 있다.

재료 및 방법

1. 숙주 세포의 계대: 정상 세포로는 MDCK (Madin Darby canine kidney cells; ATCC CCL34) 및 Vero(monkey kidney cells; ATCC CCL81)를, 암세포로는 human lung cancer cell line인 A 549(ATCC CCL185) 및 PC 14(일본 국립암센터), human stomach cancer cell line인 SNU 1, SNU 16(서울의대) 및 MKN 45(일본 국립암센터), human promyelocytic leukemia cell line인 HL-60(ATCC CCL240)를 각각 선택하였다. 선택한 세포 주를 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml과 10 mM HEPES(pH 7.4)를 첨가한 RPMI 1640 또는 Earle's MEM(EMEM) 배지에서 계대하였다. 세포 분주 농도는 2-3 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 하였고 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 주 2-3회 계대 배양하였다. 배양 용기는 바닥이 평평한 것을 사용하였고 연구 목적에 따라 50 ml 배양 플라스크나(도립현미경 관찰용) 96-well plate(<sup>3</sup>H-uracil assay용) 및 유리 슬라이드 위에 소형 플라스크를 침착시킨 Lab-tek(Nunc, Inc.) 배양 슬라이드(광학현미경 고배율 관찰용)를 이용하였다. MDCK, Vero 및 A 549 세포는 배양기 바닥에 붙어 자라는 부착세포(adhesive cells)이었고, MKN 45 세포는 부착하

는 것과 부유하는(floating) 것들이 섞여 있었으며 SNU 1, SNU 16, HL-60 및 PC 14 세포는 모두 부유세포의 성질을 가지고 있었다.

2. *Toxoplasma gondii*의 계대: 국내에서 가용한 RH strain(미국 origin)을 마우스 복강 내 계대법을 이용, *in vivo* 배양을 하면서 필요할 때마다 마우스 복강 삼출액을 취해 생리식염수로 씻은 후 1,600 rpm에서 5분간 원침하고 분리시켜 실험에 사용하였다.

3. 숙주 세포에 대한 *Toxoplasma* 감염: 숙주 세포가 96-well plate 또는 Lab-tek 슬라이드 바닥에서 거의 단층(monolayer)을 형성했을 때 숙주 세포를 2 × 10<sup>5</sup>개/ml, 10 × 10<sup>5</sup>개/ml 또는 50 × 10<sup>5</sup>개/ml의 tachyzoites가 들어있는 새로운 배지로 옮겨 12시간, 36시간 또는 60시간 동안 배양하였다.

4. *Toxoplasma*의 발육 증식 정도 측정

1) 형태학적 관찰: 배양기 바닥에 부착하는 부착세포의 경우 감염시킨 플라스크를 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하면서 tachyzoites가 숙주 세포 내로 들어가는지를 도립현미경으로 관찰하였다. 또 감염 12시간부터 36시간까지 12시간 간격으로 배양 중인 Lab-tek 슬라이드 2매를 세포 종류별로 각각 Diff-Q(modified Giemsa) 염색하고 숙주 세포 내의 tachyzoites 수 및 분열 양상, 숙주 세포의 형태 변화 등을 광학현미경 고배율(1,000배)에서 관찰하였다. 배양 플라스크에 부유하는 부유세포의 경우에는 세포 종류별로 각각 12시간, 36시간 및 60시간 배양 후 배양액을 원침(1,500 rpm, 5분)하고 상층액을 버린 다음 침사를 유리 슬라이드 위에 도말한 후 화염으로 잠깐 동안 열고정하였고, 고정 후 역시 Diff-Q 염색한 후 같은 방법으로 관찰하였다.

2) 동위원소 측정법: *T. gondii*의 tachyzoites가 숙주 세포에 침입하여 얼마나 잘 생존, 발육하는가를 판단하는 방법의 하나로서 <sup>3</sup>H-uracil 흡수시험을 이용할 수 있다는 것이 잘 알려져 있다(Schmatz et al., 1986). 즉 96-well에 숙주 세포를 분주하고 1일간 배양하여 적정 세포 수가 되도록 한 다음 *T. gondii*의 tachyzoites를 감염시키고 12시간, 36시간 또는 60시간 배지에서 자라게 한 다음 <sup>3</sup>H-uracil을 2-2.5시간 동안 첨가하였다. 배양 well로부터 숙주 세포(세포 내의 tachyzoites 포함)를 모두 회수한 후(부착세포의 경우에는 trypsin-EDTA 처리로 박리) 반자동 세포수확기(semiautomatic cell harvester; Skatron Co., Norway)를 통해 직경 5 mm의 작은 원형 여과지에 모으고 60°C 오븐에서 30분간 탈수하였다. 각 여과지 표본을 scintillation vial에 담은 다음

scintillation cocktail을 2 ml씩 첨가하고 liquid scintillation counter를 이용하여  $\beta$ -ray의 방사능을 측정하였다. 각 실험 군마다 3개씩의 well을 사용하였고 실험 결과는 3개 well에서 나온 결과를 평균하여 각 군별로 비교하였다.

### 결 과

1. 형태학적 관찰: 총 8가지 숙주 세포 주에 대한 *T. gondii* tachyzoite 감염 실험을 실시한 결과 모두 감염에 성공하여 모든 세포 주들이 *T. gondii* 감염에 감수성이 있음을 알 수 있었다. 또 감염된 숙주 세포들은 세포질이 부풀고(ballooning) 창백한 염색성을 띠며, 핵은 농축(pyknosis)되는 양상을 보였다. 그러나 *T. gondii*의 증식 정도는 세포 주 종류에 따라 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 즉 A 549 세포의 경우 감염 12시간에 이미 거의 모든 세포의 세포질 내에 *T. gondii*가 침입, 증식하고 있었고(Fig. 1), MDCK 및 Vero 세포(Figs. 3 & 4)에서도 거의 반 이상의 세포에 *T. gondii*가 기생하고 있는 것이 관찰되었다. 부유 세포인 PC 14 (Fig. 5), HL-60 및 SNU 1도 많은 세포들에서 *T. gondii* tachyzoite의 분열 증식을 볼 수 있었다. A 549 및 Vero 세포의 경우 *T. gondii*가 이분법, 특히 endodyogeny 방법으로 분열하는 것을 흔히 관찰할 수 있었고(Figs. 1, 3 & 4), 원형(Fig. 3) 또는 rosette형(Fig. 4)으로 많은 tachyzoite가 배열된 모습도 볼 수 있었다. SNU 16 및 MKN 45 세포는 감염이 가능하다는 것은 확인할 수 있었으나 다른 세포 주에 비해 총체 증식이 매우 낮은 것으로 나타났다. 특히 MKN 45 세포에서는 세포질 내에 tachyzoites가 다수 관찰되었으나 형태로 보아 분열 증식이 왕성한 것으로 보기는 어려웠다(Fig. 6).

이상의 형태학적 관찰로도 각 세포 주별 감수성 차이를 충분히 알 수 있었으나 이 방법으로 총체의 발육 상황을 정량화하기는 어려우므로  $^3\text{H}$ -uracil 흡수시험을 이용하여 세포 주별 감수성의 차이를 관찰하였다.

2.  $^3\text{H}$ -uracil 흡수시험: 각 세포 주에 *T. gondii* tachyzoite를  $2 \times 10^5$ 개/ml,  $10 \times 10^5$ 개/ml 및  $50 \times 10^5$ 개/ml로 총체 수를 다르게 주입하고, 12 시간, 36시간, 60시간에 각각 관찰한 바 세포 주에 따라 또 총체 주입 농도나 배양시간에 따라 uracil 흡수율이 크게 달라지는 것으로 나타났다. 세포 주별로 보면 A 549와 PC 14가 어떤 농도로 tachyzoite를 감염시켰든 다른 6가지 세포 주보다 항상 높은 uracil 흡수율을 보였다(Figs. 7 & 8).

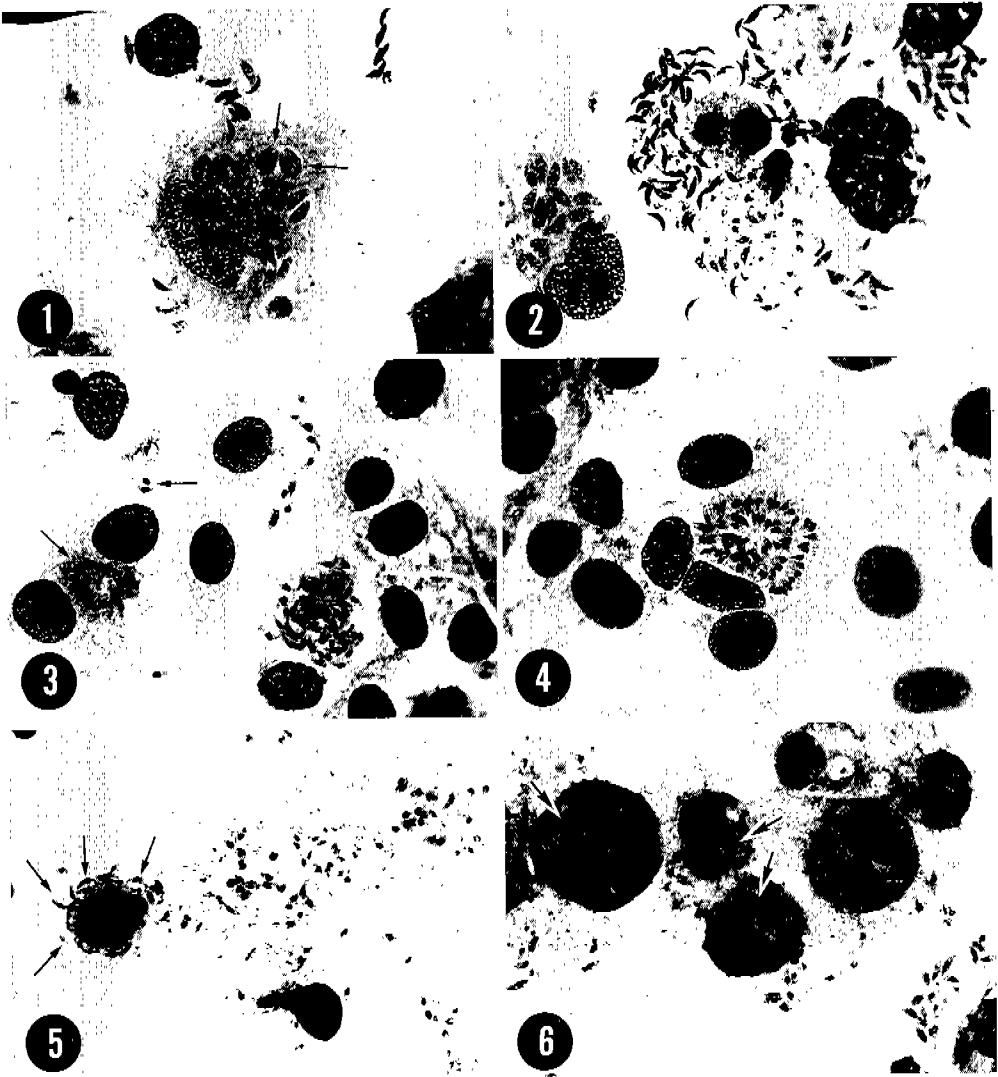
배양시간별로 uracil 흡수율을 보면, 12시간에는 A 549와 PC 14가 총체 주입 농도별로 대조군(세포

만 배양한 군)에 비해 각각 4.2배, 20.8배 및 67.4배(A 549) 및 4.1배, 14.9배 및 59.0배(PC 14)를 나타내었고, 흡수율이 비교적 낮은 세포 주인 SNU 16 및 MKN 45는 각각 2.3배, 1.7배 및 1.6배(SNU 16) 및 1.3배, 1.6배 및 1.6배(MKN 45)를 보였다. 배양 36시간에는 A 549의 경우 각 주입 농도별로 24.7배, 120.4배 및 17.1배, PC 14의 경우 18.5배, 61.2배 및 46.4배를 보인 반면, 감수성이 낮은 SNU 16 및 MKN 45는 2.2배, 3.1배, 1.3배(SNU 16), 및 2.2배, 2.7배, 1.8배(MKN 45)를 나타내었다. 배양 60시간에는 A 549의 경우 82.1배, 21.1배 및 5.5배, PC 14의 경우 27.3배, 29.4배 및 9.4배인 반면 SNU 16 및 MKN 45는 1.0배, 1.3배, 1.3배(SNU 16) 및 1.0배, 1.4배 및 1.0배(MKN 45)로 매우 낮게 나타났다.

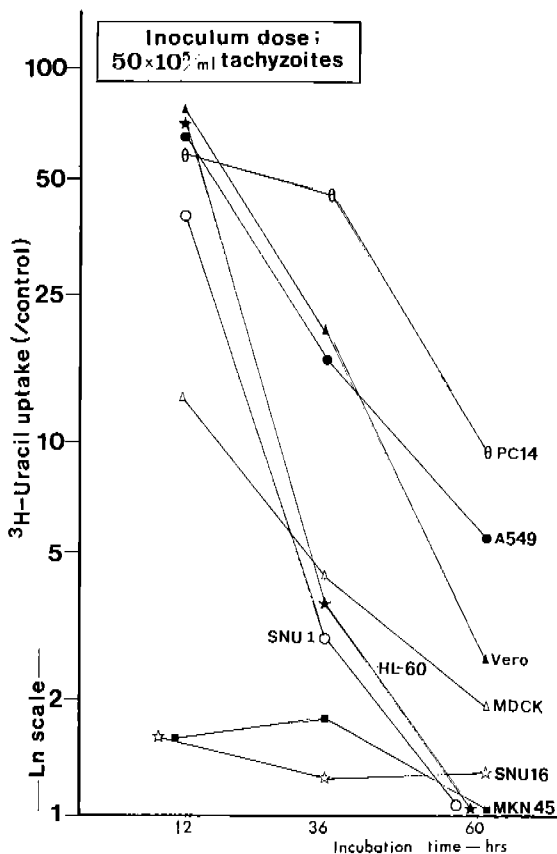
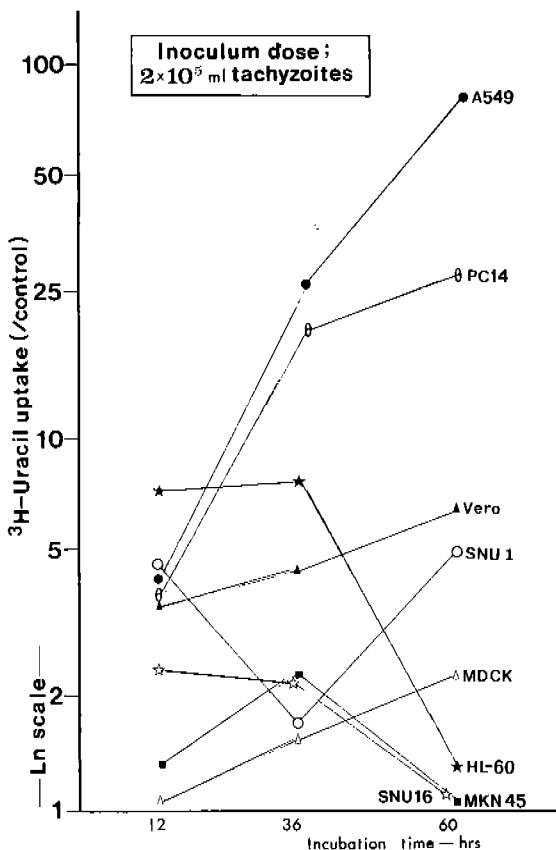
이상의 결과를 각 총체 주입 농도에 따라 배양시간-uracil 흡수 관계로 나타내어 본 바, 총체 수를 적게 투여할수록 감염 60시간까지 계속 총체가 증식하였고(Fig. 7), 총체 수를 많이 투여할수록 감염 12시간 이후 증식 속도가 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 8). 즉 총체 농도를  $2 \times 10^5$ /ml로 낮게 하였을 때는 A 549, PC 14, Vero, MDCK에서 배양시간이 경과함에 따라 증식이 계속 늘어나는 것이 관찰되었고, HL-60, SNU 16, MKN 45는 36시간 이후 증식이 감소하였다(Fig. 7). 한편, 주입 수를  $10 \times 10^5$ /ml로 높였을 때는 A 549, PC 14, Vero 등 대부분의 세포들에서 감염 36시간까지 총체의 증식이 왕성하다가 이후 감소하였다. 또  $50 \times 10^5$ /ml의 고농도 총체 주입군에서는 MKN 45를 제외한 모든 세포들에서 감염 12시간에 이미 총체 증식이 최고도에 달하였고 이후 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 8).

### 고 찰

우리 나라에서 특소플라스마증에 대한 연구는 Soh et al.(1960)이 373명의 혈청검사서서 5.6%의 항체 양성물을 보고함으로써 시작된 것으로 보인다. 그후 문재봉(1965) 및 최원영(1969)에 의해 돼지로부터 *T. gondii*의 tachyzoite가 분리되었음이 보고되었으나 총주(strain)은 확립하지는 못하였다. Nakayama et al.(1970)은 적혈구 응집반응 검사(hemagglutination test)를 이용하여 무작위로 추출한 한국인 251명의 혈청을 검사한 바 8.4%의 양성물을 얻었다고 보고하였고, Rim et al.(1972)은 59명의 산모 및 태아와 60명의 안과 환자의 혈청에서 적혈구 응집반응 검사로 평균 18.6%의 높은 양성물을 보고하였다. 그러나 비교적 최근에 조사된 여러 자료에 의하면 이보다 낮은 양성물을 보고하고 있다. 즉 최원영 외(1982)는 성모병원 환자 412명



**Fig. 1.** An A 549 cell (a highly susceptible cell line) infected with  $10 \times 10^5$ /ml tachyzoites of *T. gondii*, 12 hrs after infection. Note intracellular endodyogeny (arrows) of tachyzoites. Modified Giemsa,  $\times 1,000$ . **Fig. 2.** A 549 cells infected with  $10 \times 10^5$ /ml tachyzoites of *T. gondii*, 24 hrs after infection. Note that the cytoplasm of two cells is being ruptured due to proliferation of tachyzoites. Modified Giemsa,  $\times 1,000$ . **Fig. 3.** Vero cells (a medium susceptible cell line) infected with *T. gondii* 12 hrs previously. Note two just divided tachyzoites (arrow) and circularly arranged ones (arrow) in the host cell cytoplasm. Also note a Vero cell which is about to rupture due to many tachyzoites in the cytoplasm. Modified Giemsa,  $\times 1,000$ . **Fig. 4.** A Vero cell infected with *T. gondii*, 12 hrs previously. Numerous tachyzoites are arranged in a rosette form and occupying the whole cytoplasm of a dividing host cell. Modified Giemsa,  $\times 1,000$ . **Fig. 5.** Smear from culture of PC 14 cells (a highly susceptible cell line) infected with *T. gondii*, 24 hrs previously. Tachyzoites are being liberated from a cell (arrows). Freed tachyzoites are also seen from the culture fluid. Modified Giemsa,  $\times 1,000$ . **Fig. 6.** MKN 45 cells (a less susceptible cell line) infected with *T. gondii*, 24 hrs previously. Note intracellular parasites (arrows) and liberated ones. The intracellular ones, however, look not so good in their condition morphologically. Modified Giemsa,  $\times 1,000$ .



**Fig. 7.**  $^3\text{H}$ -uracil uptake of *T. gondii* cultured in various cell lines according to the cultivation time (12 hrs, 36 hrs and 60 hrs). Cultures were inoculated with  $2 \times 10^5$ /ml tachyzoites. A 549 and PC 14 cells show highest uracil uptake by parasites up to 60 hrs of incubation compared to other cell lines.

**Fig. 8.**  $^3\text{H}$ -uracil uptake of *T. gondii* cultured in various cell lines according to the cultivation time (12 hrs, 30 hrs and 60 hrs). Cultures were inoculated with  $50 \times 10^5$ /ml tachyzoites. Uracil uptake declines after 12 hrs in most of the cell lines. A 549, PC 14 and Vero cells show highest uracil uptake by parasites.

에서 4.3%의 양성률을, 김태진 외(1983)는 서울 적십자병원 외래환자 874명에서 7.2%의 양성률을, 최원영 외(1983)는 서울정신병원 환자 573명에서 1.9%의 양성률을 각각 보고하였다. 또, 유정애 외(1986)는 고려의대 부속병원의 신생아 및 소아 120명의 혈청검사에서 1.7%의 양성률을, Choi et al.(1989)은 강남성모병원 환자에서 1.1-1.9%의 양성률과 제주의료원 환자에서 5.8%의 양성률을 각각 보고하였다. 보고자에 따라 양성률이 이렇게 다른 것은 혈청검사 방법의 차이 및 양성 기준의 차이 등도 한 요인이 될 수 있겠고 도시, 농촌 등 대상 지역 및 집단에 따라서도 다소 차이가 있음을 의미하기도 하며, 한편 이 감염증의 유행이 다소 변동하고 있는 것이 아닌가 추측되기도 한다. 또 혈청역학적 조사 이외에 환자에 대한 보고로는 정관섭 외(1980)가 선천성 독소플라스마증 3례를 보고하던

서 그 중 2례에서 환자 혈액을 마우스에 접종한 후 충체를 검출하였다고 하였으나 충체에 대한 형태학적 기술이 없는 등 의심스러운 점이 많아 인정하기 어려우며, 박지희 외(1991)는 전신 경련으로 입원한 신생아 1례가 임상소견, 혈청검사, 안저검사 등으로 선천성 독소플라스마증을 보고하였다.

이와 같이 우리 나라에서도 독소플라스마증이 중요한 감염성 질환으로 인정되는 만큼 환자로부터 충체를 분리하여 이를 계대 배양함으로써 한국 충주(Korean strain)를 확립하는 것은 한국 충주의 병원성 및 기타 생물학적 특성을 파악하고 혈청검사에 도 이를 항원으로 이용하는 등 앞으로의 다양한 연구를 위하여 시급한 과제라고 하겠다. 이를 위해서는 우선 마우스 복강 내 접종법 이외에 간편한 세포 배양을 이용한 *T. gondii* 계대 배양법의 확립이 요구된다.

*T. gondii*의 세포 배양에는 사실상 매우 다양한 세포 주들이 이용되어 왔으나 많은 세포 주들의 감수성이 만족할 만큼 높지 않은 경우가 많아 (Hughes *et al.*, 1986), 끊임없이 새로운 세포 주의 screening이 계속되고 있는 실정이다 (Noriega and Hauser, 1988; Endoh and Yagita, 1989). 이 연구에서 가장 감수성이 높은 숙주 세포로 A 549 및 PC 14가 추천된 것은 문헌상 처음인 것으로 생각된다. A 549 세포는 한 폐암 환자로부터 1972년에 분리, 계대되어 온 세포 주로서  $5 \times 10^4$  cells/ml을 주입하면 7일에 15배 증식할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이 세포는 배양기 바닥에 부착하는 세포로서 *T. gondii* 감염 후 도립현미경으로 관찰하면 총체가 숙주 세포의 세포질 내에서 분열, 증식하는 것을 쉽게 관찰할 수 있는 이점도 있다. PC 14 세포도 역시 한 폐암 환자로부터 분리, 계대되어 온 것으로서 배양기 내에 떠 있는 부유세포로서의 성질을 가지고 있다. 이 세포는 *T. gondii* 감염 후 배양 도중 도립현미경으로 관찰하면 세포 내 총체를 명확히 인식하기는 어려우나 파괴된 세포로부터 유리된 tachyzoites를 쉽게 볼 수 있고 짧은 배양 시간 동안 거의 대부분의 세포가 감염될 정도로 *T. gondii*에 대한 감수성이 높아 매우 유용한 세포 주로 판단된다.

특히 부착성을 가진 A 549 세포는 배양 도중에도 자세한 형태학적 관찰이 용이하며 의심되는 환자의 림프선 조직, 혈액, 뇌척수액 등을 접종한 후 수시로 총체 증식 여부를 확인할 수 있어 환자로부터의 총체 분리 및 총주 확립을 위하여 유용한 세포로 생각되며, 총주 확립 후 총체의 대량 계대 배양에는 A 549 세포는 물론 부유세포인 PC 14 세포도 매우 유용할 것으로 생각된다.

이상의 두가지 세포 이외에도 부착세포인 MDCK 및 Vero는 정상 신세포의 하나로서 *T. gondii*의 숙주 세포 내 분열, 증식 상황을 잘 관찰할 수 있고 감수성도 비교적 높은 편이므로 *T. gondii*의 계대 배양에 유용한 세포 주로 판단된다. 또 부유세포들 중에서도 HL-60, SNU 1은 총체의 증식이 비교적 양호하였다. SNU 16과 MKN 45는 *T. gondii*에 대한 감수성은 가장 낮았으나 감염에 성공하는 것은 명백하므로 이용 가능성이 있으며, 감수성이 높은 세포들과 비교하여 감수성이 낮은 이유를 연구하는 데에도 좋은 model이 될 수 있으리라 생각된다.

그러나 숙주 세포의 분열 속도 자체가 *T. gondii*의 증식 정도에도 영향을 줄 수 있을 것이라는 점을 고려해 볼 때 본 연구에서 세포 종류별 *T. gondii*에 대한 감수성을 비교함에 있어 숙주 세포의 분열 속도라는 요인을 감안하지 않았던 아쉬움은 있다. 다만 이 연구에서는 숙주 세포의 분열 속도 차이까지도 그대로 인정하면서 어떤 세포가 *T. gondii*의 증식 및 계대 배양에 가장 적합한가를 알아보고자 한

것이다.

본 연구에서 사용된 8가지 세포 주들 중 이번 연구에서 처음 시도한 것은 A 549, PC 14, SNU 1, SNU 16 및 MKN 45이었으며 나머지 3종류의 세포 주는 다른 연구자들이 1회 이상 보고한 것들이었다. 즉 MDCK는 Nam *et al.*(1990)이 처음으로 사용하여 MDCK 세포의 tight junction이 *T. gondii* 총체 침입에 대한 장애물로 작용할 것이라는 결과를 발표한 바 있고, Vero는 Hughes *et al.*(1986)이 HEp2, MRC-5 및 African green monkey primary kidney cell (AGMPK)과 함께 *T. gondii*에 대한 감수성을 볼 목적으로 사용하였는데 AGMPK가 가장 감수성이 높은 세포이며 Vero는 MRC-5와 더불어 중간 정도의 감수성이 있다고 보고한 바 있다. 또 HL-60은 Choi *et al.*(1988)이 처음 시도하여 이 세포 주가 *T. gondii*에 대한 감수성은 높으나 dimethylsulfoxide (DMSO)를 넣어 세포를 분화시키면 오히려 총체를 파괴하는 작용이 있다고 보고한 바 있다.

<sup>3</sup>H-uracil 흡수시험을 이용한 세포 주의 *T. gondii*에 대한 감수성 검사에서 일반적으로 총체 수를 적게 투여했을 때는 감염 후 60시간에 이르기까지 tachyzoites의 증식이 증가하였고, 총체 수를 많이 투여했을 때는 감염 12시간 이후 tachyzoites의 증식이 감소하였다. 이는 tachyzoites가 분열, 증식하면서 숙주 세포가 파괴됨에 따라 tachyzoites의 증식도 줄어드는 현상으로 볼 수 있고, 따라서 *T. gondii*의 계대 배양에 있어서 적절한 총체 수와 계대 배양 간격의 선택이 요구된다고 하겠다.

결론적으로 A 549 및 PC 14가 *T. gondii*의 세포 내 배양에 매우 적합한 세포 주라는 것을 확인할 수 있었고, 총체 주입 수 및 배양 시간별로 총체의 분열, 증식 정도가 다르므로 목적에 따라 적당한 주입 수 및 배양 시간을 결정해야 하겠다는 점을 알게 되었다. 따라서 이들 세포(특히 A 549)를 이용하여 환자의 뇌척수액, 림프선 또는 혈액 내에 적은 수의 총체를 60시간 이상 1차 배양한 다음 A 549 또는 PC 14 세포에 총체 주입 수를  $2-10 \times 10^5$ /ml 정도로 하여 36-60시간 마다 계대함으로써 *T. gondii*의 총체 분리 및 한국 주(Korean strain)의 정립이 가능한 것으로 기대되었다.

### 감사의 글

본 연구를 위해 귀중한 세포주들을 분양하여 주신 서울의대 외과학교실 박재갑 교수님, 생화학교실 정홍근 교수님, 미생물학교실 차창용 교수님, 가톨릭의대 기생충학교실 최원영 교수님과 남호우 교수님, 중앙의대 기생충학교실 강신영 교수님, 그리고 원자력병원면 번역학연구실 여러분에게 심심한 감사

를 드립니다.

### 참고문헌

- 김태진, 최원영 (1983) 서울시내 한국인에서의 간접 Latex 응집반응을 이용한 toxoplasma 항체가. 가톨릭의대논문집 **36**: 133-137.
- 문재봉 (1965) Toxoplasmosis에 관한 연구 제 1보.豚으로부터 *Toxoplasma* 분리. 가축위생연구소보 **11**: 1-18.
- 박지희, 서윤석, 유기환, 정지태, 독고영창 (1991) 선천성 독소플라스마증 1례. 대한의학협회지 **34**: 903-908.
- 유정애, 최평화 (1986) 소아에 있어서의 *Toxoplasma* 항체 보유에 관한 고찰. 최신의학 **29**: 1644-1648.
- 정관섭, 경란남, 정기섭, 김평길, 윤덕진, 서신태 (1980) 선천성 독소플라스마증. 연세의대지 **21**: 62-74.
- 채종일, 이순형, 김응홍, 윤종구 (1989) MDBK 세포 배양에서 *Eimeria tenella* 발육 상황 및 닭 비장세포에 의한 발육 항진 효과. 기생충학잡지 **27**: 87-100.
- 최원영 (1969) 돈육에서의 *Toxoplasma* 분리 및豚혈청의 색소시험. 가톨릭의대논문집 **16**: 229-235.
- 최원영, 유재을, 김운규 (1982) 성모병원 일반환자에 대한 간접 Latex 응집반응에 의한 *Toxoplasma* 항체가. 기생충학잡지 **20**: 33-37.
- 최원영, 유재을, 정창생, 박강규, 조성남 (1983) 정신과 환자에 있어서 *Toxoplasma* 항체가의 의의. 기생충학잡지 **21**: 281-285.
- Beaver PC, Jung RC, Cupp EW (1984) Clinical Parasitology. 9th ed p162-167 Lea & Febiger, Philadelphia.
- Choi WY, Nam HW, Yoo JE (1988) Toxoplasmaicidal effect of HL-60 cells differentiated by dimethylsulfoxide. *Korean J Parasit* **26**: 229-238.
- Choi WY, Nam HW, Youn JH, Kim WS, Kim WK (1989) *Toxoplasma* antibody titers by indirect latex agglutination test in patients of Kangnam St. Mary's Hospital and Cheju Medical Center. *Korean J Parasit* **27**: 171-175.
- Doran DJ (1982) The Biology of the Coccidia. 1st ed p229-285 University Park Press, Baltimore.
- Endoh T, Yagita K (1989) *Toxoplasma gondii*: A simple method for titration of infectivity with monolayer cells. *Jap J Med Sci Biol* **42**: 13-23.
- Hughes HPA, Hudson L, Fleck DG (1986) *In vitro* culture of *Toxoplasma gondii* in primary and established cell lines. *Int J Parasit* **16**: 317-322.
- Janku J (1959) Die Pathogenese und pathologische Anatomie des sogennanten angeborenen Koloboms des gelben Flecks in normal grossen sowie im mikrophthalmischen Auge mit Parasiten befund in der Netzhaut. *Cesk Parasitol* **6**: 9.
- Nakayama I, Aoki T, Rim HJ, Cho SY (1970) The incidence of *Toxoplasma* antibodies among people in Korea, as revealed by hemagglutination test. *Jap J Parasitol* **6**: 583-592.
- Nam HW, Youn JH, Kim DJ, Choi WY (1990) Tight junctional inhibition of entry of *Toxoplasma gondii* into MDCK cells. *Korean J Parasit* **28**: 197-205.
- Noriega FR, Hauser Jr WE (1988) *Toxoplasma gondii* maintenance in tissue culture: A new efficient method for culturing RH tachyzoites. *J Parasitol* **74**: 495-499.
- Rim HJ, Lee SK, Lee JB, Kwak JW (1972) Distribution of *Toxoplasma* antibodies among mothers and her newborns and eye disease patients. *New Med J* **15**: 1331-1336.
- Schmatz DM, Crane MS Jr, Murray PK (1986) *Eimeria tenella*: Parasite-specific incorporation of <sup>3</sup>H-uracil as a quantitative measure of intracellular development. *J Protozool* **33**: 109-114.
- Soh CT, Lee SJ, Ahn YK (1960) Latent infection by *Toxoplasma gondii* in Korea. *Yonsei Med J* **1**: 52-54.
- Walzer PD, Genta RM (1989) Parasitic infections in the compromised host. 1st ed p179-279 Marcel Dekker, Inc., New York and Basel.

=Abstract=

Comparative susceptibility of different cell lines for culture of  
*Toxoplasma gondii* in vitro

Byung-Kiu Park<sup>1)\*</sup>, Hyung Ro Moon<sup>2)</sup>, Jae-Ran Yu<sup>3)</sup>, Jina Kook<sup>4)</sup>,  
Jong-Yil Chai<sup>4)</sup> and Soon-Hyung Lee<sup>4)</sup>

Department of Pediatrics and Gyeongsang Institute of Cancer Research<sup>1)</sup>, Gyeongsang National University,  
Chinju 660-280, Departments of Pediatrics<sup>2)</sup>, Parasitology and Institute of Endemic Diseases<sup>4)</sup>, Seoul  
National University College of Medicine, Seoul 110-799, and Department of Parasitology<sup>3)</sup>, College of  
Medicine, Kon-Kuk University, Chungju 380-701, Korea

In order to establish a useful cell culture system for *T. gondii*, we compared the degree of proliferation of *T. gondii* tachyzoites among 8 different cell lines; 2 kinds of normal animal cells (MDCK-canine kidney cells; Vero-monkey kidney cells) and 6 kinds of human tumor cells (A 549, PC 14-lung cancer cells; SNU 1, SNU 16, MKN 45-stomach cancer cells; HL-60-promyelocytic leukemia cells), through morphological observation and <sup>3</sup>H-uracil uptake assay. The degree of susceptibility to infection with *T. gondii* tachyzoites was highest in A 549 and PC 14 cells, medium in Vero, HL-60, MDCK and SNU 1, and lowest in SNU 16 and MKN 45 cells. The kinetics of *T. gondii* multiplication during the post-infection 60 hours were highly dependent upon the dose of tachyzoites administered and the duration of cultivation. These results show that A 549 and PC 14 are the most suitable cell lines among the 8 tested for the growth and multiplication of *T. gondii* in vitro.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, cell culture, <sup>3</sup>H-uracil uptake assay, susceptibility to infection

[Korean J. Parasit., 31(3): 215-222, September 1993]

---

\*Corresponding author