

## Naegleria 수막뇌염에 있어 세포매개성 면역에 관한 실험적 연구\*

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

任 敬 一 · 柳 在 淑 · 李 根 泰

### 서 론

자연계에 널리 존재하는 병원성 자유생활아메바인 *Naegleria fowleri*는 인체에 감염되어 원발성 아메바성 수막뇌염을 일으킨다고 보고되어 왔다(Derrick, 1948; Carter, 1970). *N. fowleri*의 감염에 따른 숙주의 면역반응에 대하여 여러 연구보고가 있는데 Rowan-Kelly *et al.*(1980)과 Holbrook *et al.*(1980)은 아메바가 보체의 대항로를 활성화시켜 아메바의 증추신경계의 파급을 억제한다고 하였고, Thong *et al.*(1978)은 면역항체가 방어면역에 중요한 역할을 한다고 하였다. 또한 Cursons *et al.*(1980)은 *N. fowleri*에 감염된 마우스에서 대식세포 유주 저지 인자(Macrophage migration inhibitory factor; MIF)를 검출할 수 있었다고 하였다. 원발성 아메바성 수막뇌염의 원인 원충인 *N. fowleri*가 숙주 특히 실험동물인 마우스에 감염되었을 때 그 숙주 체내에서 야기되는 체액성 면역에 대하여는 어느 정도 밝혀져 있으나 세포 매개성 면역에 관하여는 알려진 바가 거의 없다.

본 연구는 마우스에 *N. fowleri*를 비강을 통하여 감염시켜서 아메바성 수막뇌염이 발생되었음을 확인하고 수막뇌염이 발생하는 과정에서 생기는 세포 매개성 면역 특히 T세포와 B세포의 기능에 대하여 관찰하고자 한다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 자유생활아메바

병원성이 강한 *Naegleria fowleri*, 0359주를 사용하였으며 CGVS배지(Willaert, 1971)로 37°C CO<sub>2</sub> 항온기에서 무균적으로 배양하였다.

#### 2. 실험 동물

생후 약 6주된 체중 15g 내외의 ICR 웅성 마우스를 실험에 사용하였다.

#### 3. *N. fowleri* 감염

마우스 체중 g당 0.06mg의 secobarbital을 복강내로 주사하여 마취시켰다. 제대배양하고 48시간이 경과된 *N. fowleri* 영양형 1×10<sup>6</sup>개가 함유되게 한 생리식염수 부유액 10 μl를 마취된 마우스 비강내로 떨어뜨린 후 마취에서 깨어날 때까지 방치하였다. 대조군에서는 아메바 부유액 대신 생리식염수를 비강내로 떨어뜨렸다. 매일 마우스의 사망여부를 관찰하였으며 사망한 마우스의 뇌조직 일부를 직접 도말하여 아메바 존재여부를 현미경으로 확인하거나 또는 CGVS 배지에서 배양하여 확인하였다.

#### 4. T세포 및 B세포 기능

마우스의 비장세포를 분리하고 여기에 T세포 및 B세포 mitogen인 concanavalin A (Con. A) 및 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 야기된 blastogenesis(배자발생) 정도를 측정하기 위하여 methyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine을 사용하였다. 감염후 0일, 3일, 7일, 10일에 각각 실험군 5마리, 대조군 4마리에서 시행하였다.

즉 마우스를 희생시켜 복막을 열고 비장을 꺼내어 15% fetal calf serum, L-glutamine, penicillin(100 unit/ml), streptomycin(100 μg/ml)을 함유시킨 RPMI 1640 배지에 담근후 가위로 잘게 부수고 1ml 주사기로 5~10회 pumping하여 세포 부유액을 만들었다. Tris-buffered NH<sub>4</sub>Cl(pH 7.2)을 첨가하여 적혈구를 용혈시키고 RPMI 1640 배지로 3회 세척한 후 1×10<sup>6</sup>개의 세포가 200 μl의 RPMI 배지에 함유되도록 하여 96 well polystyrene plate의 각 well에 200 μl씩 떨어뜨렸다. 이때 배지에는 4μg/ml의 concanavalin A(Cheicon) 및 60 μg/ml의 lipopolysaccharide(Sigma)를 첨가시켰다. 이 plate를 42시간 동안 37°C, 5% 항온기에서 배양하고 각 well에 1 μCi의 methyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine(ICN)을 넣어 6시간 배양한 후 cell harvester(Titertek)에서 glass filter fiber로 세포를 수확한 후 scintillation cocktail(Xylene 1l, POPOP 0.1g, PPO 5g) 5ml를 넣어 liquid scintillation counter(Packard)로 2분동안 방사능을 측정하였다.

T세포 또는 B세포 기능을 알아보기 위하여 림프구의 배자발생 정도를 관찰하였으며, 림프구의 배자발생 정도는 림프구에 uptake되는 [<sup>3</sup>H]-thymidine의 양으로 측정하였으며 다음과 같은 공식으로 자극지수를 산출하였다.

\* 이 연구는 연세대학교 의과대학 1986년도 과별 Project 연구비에 의하여 이루어졌음.

**Table 1.** Blastogenic response (stimulation index) represented by uptake of tritiated thymidine by concanavalin A-stimulated mouse splenocyte cultures from non-infected control and *Naegleria fowleri*-infected mice

Day after infection	Stimulation index, mean±S.D.	
	<i>N. fowleri</i> -infected	control
0	17.5±1.75	13.5±10.02
3	8.4±5.54	12.5±8.14
7	6.6±4.03	12.1±10.16
10	28.5±16.80	31.4±16.49
14	7.1±3.46	9.7±3.75

자극지수=

Con. A 또는 LPS로 처리된 비장세포의 방사능(cpm) / 처리안된 비장세포의 방사능(cpm)

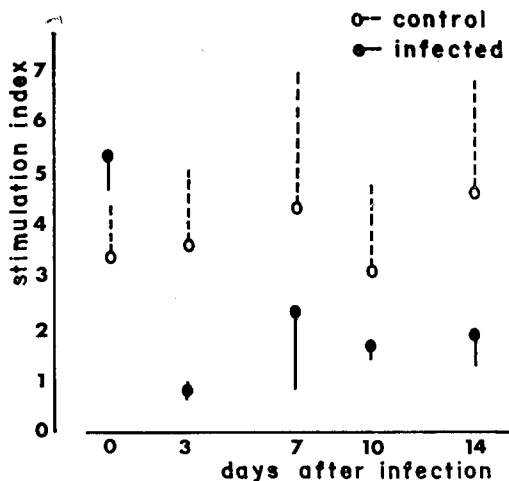
5. 항체 검출

비장을 분리하기 전 심장에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 간접형광항체법으로 항체를 측정하였다. 사용된 fluorescein conjugate는 goat anti-mouse IgG (Cappell)이었다. 사용된 항원은 계대배양하고 3일 후 *N. fowleri* 영양형으로 생리식염수로 희석된 10% formaldehyde로 30분간 고정된 후 1% NH<sub>4</sub>OH를 넣고 5분동안 방치하고, 여기에 다시 3% Tween 80이 함유된 증류수를 넣고 5분 방치한 후 생리식염수로 3회 세척하여 슬라이드 위에 부착시켜 항원으로 사용하였다.

실 험 성 적

1. T세포 기능 변동

*N. fowleri*에 감염된 마우스의 T세포 기능을 알아



**Fig. 1.** The stimulation index in concanavalin A treated splenocyte cultures from noninfected control (○) and *Naegleria fowleri*-infected (●) mice in relation to duration of infection.

**Table 2.** Blastogenic response (stimulation index) represented by uptake of tritiated thymidine by lipopolysaccharide-stimulated mouse splenocyte cultures from non-infected control and *Naegleria fowleri*-infected mice

Day after infection	Stimulation index, mean±S.D.	
	<i>N. fowleri</i> -infected	control
0	5.3±0.86	3.4±1.03
3	0.8±0.23	3.6±1.46
7	2.3±1.57	4.3±2.97
10	1.7±0.14	3.1±1.83
14	1.9±0.66	4.6±2.08

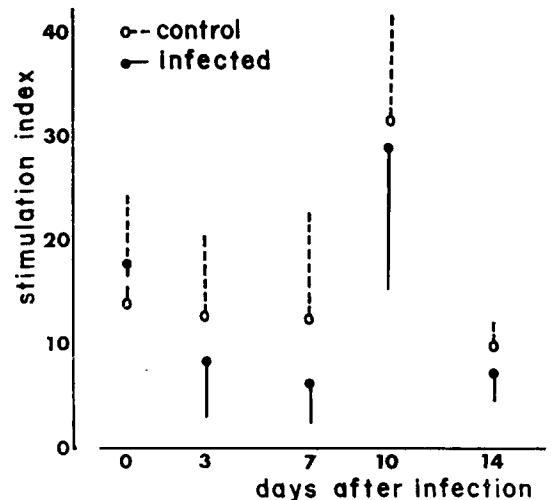
보고자 T세포 mitogen인 Con. A를 비장세포에 처리 후 배양하였다. Con. A에 의한 T세포의 배자 발생 반응 즉 T세포 활성화는 감염후 전 관찰기간인 14일후까지 대조군에 비해 떨어져 있었고, 특히 감염시작 3일후, 7일후에는 유의하게 (p<0.05) 자극지수가 떨어져 있었다 (Table 1, Fig. 1).

2. B세포 기능 변동

*N. fowleri*에 감염된 마우스의 비장세포에 lipopolysaccharide를 처리하였을 때 B세포의 배자 발생 반응은 감염후 관찰 전기간 즉 감염 3일후부터 14일후까지 대조군에 비해 떨어져 있었다. 감염 급성기에 B세포 활성이 유의하게 (p<0.05) 떨어져 있었음을 알 수 있었다 (Table 2, Fig. 2).

3. 혈청내 형광항체가 변동

*N. fowleri* 영양형을 항원으로 사용하여 형광항체가



**Fig. 2.** The stimulation index in lipopolysaccharide treated splenocyte cultures from non-infected control (○) and *Naegleria fowleri*-infected (●) mice in relation to duration of infection.

**Table 3.** Titers of fluorescent anti-*Naegleria* immunoglobulin G antibody following *Naegleria fowleri* infection in mice

Days after infection	Fluorescent antibody titer
0	lower than 1 : 1
3	1 : 4~1 : 8
7	1 : 8
10	1 : 16
14	1 : 8~1 : 32

를 측정하였다. 감염 3일후 마우스 현청내 항체가는 1 : 4였으며, 10일 후에는 1 : 10, 15일후에는 1 : 32까지 증가해 있었음을 알 수 있었다(Table 3).

### 고 찰

일반적으로 원충류에 감염되면 숙주에서의 면역반응이 저하되어 있다고 알려져 있다. Strickland *et al.* (1975)은 *Toxoplasma gondii*에 감염되었을 때 T 및 B mitogen 인 con. A, phytohemagglutinin 및 LPS에 의한 배자 발생 반응이 저하되어 있었음을 보고하였고, Britten and Hudson(1986)은 *Trypanosoma cruzi* 감염에서 그 급성기에 T. cruzi 항원에 대한 입파구 배자발생이 감소되고 지연성 과민반응이 저하되어 있었다고 하였다. *Naegleria fowleri*에 감염되었을 때 세포 매개성 면역 반응에 대하여는 알려진 바가 없으므로 본 실험에서는 T 및 B mitogen인 con. A와 LPS를 비장세포에 처리하여 배자 발생 반응이 일어난 정도를 측정하여 세포매개성 면역상태를 알아 보았다. 대조군에 비하여 *N. fowleri*를 감염시킨 실험군에서 비장세포의 배자발생이 감소되어 있었다.

원충이 감염되었을때 그 급성기에 이러한 배자 발생 반응의 감소 즉 세포 매개성 면역이 저하되는 것으로 생각되는데, *Toxoplasma gondii* 및 *Trypanosoma cruzi* 가 감염되었을때 이를 설명하기 위하여 여러 연구자들의 실험을 통하여 여러가지 기전이 가정되었다. 즉 *T. gondii* 감염시 림프구 배자 발생에 관여하지 않는 세포로 T림프구가 회색되어 mitogen에 대한 반응이 저하된 것 같이 보일 수 있고(Kirchner *et al.*, 1974), T세포의 배자발생을 억제하는 물질이 생기기도 하고(Jacobson and Herzenberg, 1972; Okumura and Tada, 1971), 또는 *T. gondii* 감염시 T세포가 말초 림프조직으로 이동하면서 활성화되어, 남아 있는 비장세포들은 더 이상 mitogen에 대해 반응하지 못한다고 보고하고 있다. *Trypanosoma cruzi* 급성 감염시 관찰되는 면역 반응의 저하에 대하여 Ramos *et al.* (1979)은 suppressor T세포 때문이라고 하였고, Kierszenbaum(1982)은 suppressor macrophage가 관여한다고 하였다. Cunningham and Kuhn(1980)은 suppressor factor 때문이라고 설명하였다. *N. fowleri*에 감염된 마우스는 대부

분 감염 2주후에 원발성 아메바성 수막뇌염이 발생하여 사망하게 되어 감염 14일 이후에는 림프구 배자 발생에 관한 실험을 계속할 수 없었다. 이러한 급성기에 T 및 B mitogen에 의한 비장세포의 배자발생이 감소되었음을 본 실험을 통하여 확인할 수 있었다. 그러나 감염 10일후 con. A에 의한 비장세포의 배자발생 정도가 대조군에 비해 차이가 없으나 다른 감염기간의 성적에 비해 월등히 높음이 관찰되었다. 이 점은 추후 다시 관찰해야 될 것으로 생각된다. 또한 이러한 세포매개성 면역의 저하가 어떠한 기전으로 설명될 수 있는지도 속제로 남아 있다.

### 요 약

원발성 아메바성 수막뇌염을 일으키는 *Naegleria fowleri*를 마우스에 감염시키고 그 급성기에 일어나는 세포 매개성 면역 반응 특히 T림프구 mitogen인 con. A 및 B림프구 mitogen인 lipopolysaccharide에 대한 마우스 비장세포의 배자 발생 정도를 관찰하였다.

*N. fowleri*에 감염된 마우스에서 T림프구의 기능은 관찰기간인 감염 14일후까지 떨어져 있었다. B림프구의 기능도 감염 3일후부터 14일후까지 계속 떨어져 있었음을 알 수 있었다. 또 *N. fowleri*에 감염된 마우스의 현청내 형광항체가는 1 : 4내지 1 : 32였다. *N. fowleri*에 감염된 마우스에서 그 급성기에 세포 매개성 면역이 저하되어 있었음을 관찰할 수 있었다.

### 참 고 문 헌

- Britten, V. and Hudson, L.(1986) Immune suppression to *Trypanosoma cruzi* antigens is associated with infection but not immunisation. *Trop. Med. Parasit.*, **37**:97-100.
- Carter, R.F. (1970) Description of a *Naegleria* isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, **100**:217-244.
- Cunningham, D.S. and Kuhn, R.E. (1980) Lymphoblast transformation as a measure of immune competence during experimental Chagas' disease. *J. Parasitol.*, **66**:390-398.
- 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 humoral antibody. *Infect. Immun.*, **29**:401-407.
- Derrick, E.H. (1948) A fatal case of generalized amoebiasis due to a protozoon closely resembling, if not identical with, *Iodamoeba bütschlii*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **42**:191-198.
- Holbrook, T.W., Boackle, R.J., Parker, B.W. and

- Vesely, J. (1980) Activation of the alternative complement pathway by *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.*, **30**:58:61.
- Jacobson, E.B. and Herzenberg, L.A. (1972) Active suppression of immunoglobulin allotype synthesis. I. Chronic suppression after perinatal exposure to maternal antibody to paternal allotype in (SJL × BALB/c) F mice. *J. Exp. Med.*, **135**:1, 151-1, 162.
- Kierszenbaum, F. (1982) Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi* infection): role of non-adherent, nonspecific, esterase-positive splenic cells. *J. Immunol.*, **129**: 2, 202-2, 205.
- Kirchner, H., Herberman, R.B., Glaser, M. and Lavrin, D.H. (1974) Suppression of *in vitro* lymphocyte stimulation in mice bearing primary Moloney sarcoma virus-induced tumors. *Cell. Immunol.*, **13**:32-38.
- Okumura, K. and Tada, T. (1971) Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. W. Inhibitory effect of thymocytes on the homocytotropic antibody response. *J. Immunol.*, **107**:1, 682-1, 689.
- Ramos, C., Schadtler-Siwon, I. and Ortiz-Ortiz, L. (1979) Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Immunol.*, **122**: 1, 243-1, 247.
- Rowan-Kelly, B., Ferrante, A. and Thong, Y.H. (1980) Activation of complement of *Naegleria*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**:333-336.
- Strickland, G.T., Ahmed, A. and Sell, K.W. (1975) Blastogenic response of *Toxoplasma*-infected mouse spleen cells to T- and B-cell mitogens. *Clin. Exp. Immunol.*, **22**:167-176.
- Thong, Y.H., Ferrante, A., Shepherd, C. and Rowan-Kelly, B. (1978) Resistance of mice to *Naegleria* meningoencephalitis transferred by immune serum. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **72**:650-652.
- Willaert, E. (1971) Isolement et culture *in vitro* des amibes du genre *Naegleria*. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.*, **51**:701-708.

=Abstract=

### Immunodepression during experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice

Kyung-Il Im, Jae-Sook Ryu and Keun-Tae Lee

*Department of Parasitology, College of Medicine, and Institute of Tropical Medicine,  
Yonsei University, Seoul 120, Korea*

In order to test the function of lymphocytes in *Naegleria fowleri*-infected mice, the *in vitro* blastogenic response of splenocyte cultures to non-specific mitogens was studied. Concanavalin A and lipopolysaccharide stimulation were used as tests of T cell and B cell function.

For the first 14 days following *N. fowleri* infection, lymphoblastic transformation induced by T-cell mitogen was markedly reduced in comparison to the uninfected control mice. The blastogenic response to B-cell mitogen remained depressed in the infected mice up to 14 days after infection. The fluorescent antibody titers of sera of *N. fowleri* infected mice were between 1 : 4 and 1 : 32.

The results suggest that there is a suppression of cell mediated immunity during the acute course of experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice.