

## *Acanthamoeba culbertsoni*와 *A. royreba*의 가수분해 효소 활성도의 비교 연구

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

金鏞奎 · 金泰宇 · 鄭仁實 · 任敬一

**요약** : 아메바의 cytolytic process가 주로 가수분해 효소 활성과 관계 깊다는 연구들이 70년대 후반부터 병원성 *Entamoeba* sp.와 *Naegleria* sp.에서 보고되었지만 *Acanthamoeba* sp.에서는 가수분해 효소 활성에 관한 연구는 찾아볼 수 없다. 본 연구에서는 병원성이 없는 것으로 알려진 *Acanthamoeba royreba*를 대조로 하여 병원성이 있는 *A. culbertsoni*의 가수분해 효소 활성도를 측정하고 이들을 비교하고자 하였다.

*A. culbertsoni*를 마우스에 감염시켰더니 15일내에 마우스 모두가 사망하였으며, 평균 생존기간은 8.5일이었고, 아메바성 수막뇌염으로 사망했음을 알 수 있었다. 반면에 *A. royreba*를 감염시킨 마우스에서는 수막뇌염이 발생되지 않았다.

CGV배지에서 두 종(種) 아메바를 배양하여 아메바 추출물 및 배양액에서 가수분해 효소의 활성을 측정한 결과 *A. royreba*에 비해 *A. culbertsoni* 세포의 추출물 및 배양액에서 현저히 활성도가 높은 가수분해 효소는 acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase, neutral proteinase, acid proteinase였다.

표적 세포인 CHO 세포에 혼합한 *A. culbertsoni*는 대조군에 비해 강한 세포독성을 나타내었고 CHO 세포와의 혼합후 48시간 후 80%, 72시간후 95% 이상의 CHO 세포가 사멸하는 것을 알 수 있었다. 반면에 *A. royreba*를 혼합하였을 때는 별다른 세포독성을 나타내지 않았다.

CHO 세포에 혼합한 *A. culbertsoni*의 가수분해 효소 활성도를 경과 시간별로 측정하였던 바 CGV 배지에서 배양시간이 지남에 따라 아메바내보다 그 배양액에서 더 높은 효소 활성도를 나타내었던 acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase, acid proteinase는 혼합 120시간 동안 아메바내에서 더 높은 효소 활성도를 나타내었으며, neutral proteinase의 활성도는 경과시간이 지남에 따라 아메바내에서는 일정하였지만 그 배양액인 EBSS 용액내에서는 점점 높아짐을 알 수 있었다.

이상의 정적으로 보아 마우스에서 수막뇌염을 일으키는 *A. culbertsoni*는 비병원성인 *A. royreba*와 비교할 때 여러 종류 가수분해 효소들의 활성도에 현저한 차이를 나타내고 있음을 알 수 있었다. 또한 표적세포인 CHO세포에 대한 *A. culbertsoni*의 세포독성은 강함을 알 수 있었고, 이 때 몇 종류 가수분해 효소들의 활성도도 높게 나타났으며, 이러한 소견이 *A. culbertsoni*의 병원성과 관련이 있을 것으로 추측되었다.

**Key words:** *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba royreba*, hydrolytic enzyme, cytolysis, amoebic meningoencephalitis

### 서 론

자연계에 존재하는 자유생활 아메바의 병원성은 주(株), 배양조건, 숙주의 연령이나 면역상태에 따라 다르며 병원성의 유무는 아메바의 형태(Singh and Das, 1972), 실험동물에 대한 감염력(Culbertson *et al.*, 1966; Kasprzak and Mazur, 1972; Martinez *et al.*, 1973; Wong *et al.*, 1975; Cursons *et al.*, 1977), 면역

반응(Anderson and Jamieson, 1972; Stevens *et al.*, 1977), concanavalin A에 의한 응집반응(Stevens and Kaufman, 1974; Josephson *et al.*, 1977), 전자현미경적 형태(Visvesvara and Callaway, 1974; 鄭 등, 1980) 등을 보아 판별하려는 연구보고가 있다. 이 원충의 감염은 주로 비강을 통해 이루어지며 후점막과 후신경을 따라 중추신경계를 침범하여 괴사성 출혈성 수막뇌염을 일으킨다고 보고되었다(Martinez *et al.*, 1973). 비록 이 아메바의 병원성을 설명할 만한 확실한 기전은

밝혀지지 않았지만 숙주세포를 빠르게 파괴시킬 수 있는 능력이 있음을 볼 때 수막뇌염을 일으키기까지 전 과정에서 cytolytic process가 이루어질 것이라고 하였고 (Lowrey and McLaughlin, 1985), 여러 동물세포에 비특이적 cytolysis현상이 일어난다고 보고하였다 (Marciano-Cabral *et al.*, 1982).

병원성 아메바의 cytolytic process가 주로 가수분해 효소 활성과 관계가 깊다는 연구들은 70년대 후반부터 보고되기 시작하였다. 즉 이질아메바에서 연구된 것을 살펴보면, Lushbaugh *et al.* (1984)은 비병원성에 비해 병원성이 있는 종(種)에서 더 높은 proteinase 활성을 측정하였다고 보고했으며, Werries and Nebinger (1984)는 부분정제한  $\beta$ -amylase 활성이 병원성과 연관 있다고 하였다. Gadasi and Kessler (1983)는 무균배양한 이질아메바에서 collagenase 활성이 병원성과 관계 있다고 하였고, Lundblad *et al.* (1981) 및 Werries *et al.* (1983)은 이질 아메바가 배지로 분비하는 효소로  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase를 분리하였으며 이 효소가 동물세포의 glycoprotein을 분해하는 작용을 한다고 보고하였으며, 또한 여러 당류에 대해서 glycosidase활성을 연구하였다. Long-Krug *et al.* (1985)과 Ravdin *et al.* (1985)은 이질아메바로부터 부분정제한 두 phospholipase A 효소가 cytolytic 활성에 관계한다고 주장하였고  $Ca^{++}$ -dependent phospholipase A는 세포막에 분포되어 있고  $Ca^{++}$ -independent한 것은 세포질과 세포막에 분포된다고 보고하였고, phospholipase A의 억제제인 Rosenthal's inhibitor, quinacrine, phosphatidylcholine, hydrocortisone을 처리하던 동물세포에 대한 cytolysis가 억제된다고 밝혔다. 이러한 이질 아메바에서의 가수분해 효소에 관한 연구에 이어 병원성 *Naegleria fowleri*에서 cytolytic process가 효소 활성과 관계 있다는 보고들이 있다. Lowrey and McLaughlin (1985)에 의하면 *N. fowleri*의 병원성에 있어 lysosomal hydrolase가 역할을 한다고 보고하였는데 그들은 이 아메바의 원형질막에 있는 세포독성 물질이 이 아메바에서 분리한 lysosome에 의해 활성화된다는 점에서 가수분해 효소가 병원성에 기여한다고 제시하였다.

Hysmith and Franson (1982)에 의하면 이 아메바에서 분비되는 phospholipase들이 괴사성, 출혈성 수막뇌염(hemorrhagic meningoencephalitis)의 발생에 관여한다고 하였다. 즉 아메바를 제거시킨 배양액에서 phospholipase들이 human myelin의 phospholipids를 분해할 수 있다고 하였으며 활성이 비병원성 아메바보다는 병원성 아메바에서 3~250배 더 높다고 보고하였다. Olomu *et al.* (1986)은 *N. fowleri*에서 여러 acid hydrolytic 효소의 활성을 관찰하였고 그중 활성도가 높은 acid phosphatase의 성격을 일부 규명하였다. Das *et al.* (1987)은 lysosomal 효소 중 또 다른 가수분해 효소인  $\beta$ -glucosidase의 특이활성도가 매우 높은 것을

확인했고, 이 효소가 대부분의 동물세포에서 glucoce-rebrosidase로 작용하였으며 또한  $\beta$ -fucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -arabinosidase의 활성을 측정하고 비교하였다. Marciano-Cabral *et al.* (1987)은 peptide 가수분해 효소에 대해서 세포독성 물질과 연관시켜 연구한 바 있다. *Acanthamoeba* sp.에서는 병원성과 연관시켜 효소의 활성을 관찰한 연구보고는 없으며 ATPase (Lynch *et al.*, 1986), adenylate cyclase (Chlapowski and Butcher, 1986), NAD(P)H oxidase (Brooks and Schneider, 1985)의 활성에 대해 보고되었을 뿐이다.

이에 본 연구에서는 병원성이 강한 *Acanthamoeba culbertsoni*의 가수분해 효소들을 연구하고자, 병원성 아메바인 이질아메바와 *Naegleria* sp.에서 주로 연구되었던 13가지 가수분해 효소를 선정하여, 비병원성 대조군인 *A. royreba*와 비교 관찰하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 자유생활 아메바의 배양

자유생활 아메바로는 병원성이 있다고 알려진 *Acanthamoeba culbertsoni* (donated from Jadin, J.B., Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Belgium)와, 비병원성으로 알려진 *Acanthamoeba royreba* (donated from Molot, B., Institute de Parasitologie, Strasbourg, France)를 실험에 사용하였다.

이들 아메바의 배양으로는 무균 액체 배지인 CGV 배지 (Willaert and LeRay, 1973)를 사용했으며 pH 7.0으로 조정한 후 Seitz filter로 여과하였다. 배양은 37°C에서 세포배양 flask (Costar Co. U.S.A.)에 넣어서 매 96시간마다 계대하였다. 아메바 증식에 따른 generation time의 계산은 Visvesvara (1980)의 방법에 의하였으며 다음과 같은 방정식을 이용하였다.

$$\text{Generation time} = \frac{t_2 - t_1}{\log_2 \frac{n_2}{n_1}}$$

[ $n_1$  :  $t_1$ 시간에 있어서 원충의 수,

$n_2$  :  $t_2$ 시간에 있어서 원충의 수]

배양 24시간마다 본 원충의 수를 위 수식에 넣어 generation time을 산정하였다.

### 2. 마우스 감염에 의한 병원성 검증

사용된 ICR마우스는 실험실내에서 통상적인 방법으로 사용하였고, 각 실험군당 체중 20 g내외의 마우스 20마리씩을 사용하였다. *A. culbertsoni*와 *A. royreba*의 영양형  $2 \times 10^5$ 개가 함유된 부유액 5 $\mu$ l를 secobarbital로 마취된 마우스의 비강에 떨어뜨리고 마취에서 깨어날 때까지 방치하였다. 마취에 사용된 secobarbital의 양은 마우스 체중 g당 0.06 g이었고 마우스 복강내로 주입시켜 마취시켰다. 감염시키고 15일후까지 마우스의 사망여부를 매일 관찰하였으며 사망한 마우스는

뇌조직과 폐조직의 일부를 CGV배지에 배양하여 각 조직에서 아메바의 존재 여부를 확인하였다.

### 3. 조직세포에 대한 자유생활 아메바의 세포독성 측정

#### 1) 조직 세포의 배양

자유생활 아메바의 세포독성 측정을 위하여 표적세포로 사용된 조직세포는 *李등*(1986)의 실험에 의해 적당하다고 선정되었던 Chinese hamster ovary cell(이하 CHO 세포로 약기함)이었으며 이 세포의 배양액은 20 mM HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid), 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% fetal calf serum이 포함된 Eagle's minimal essential medium (EMEM)이 사용되었으며 37°C에서 CO<sub>2</sub>함온기(Napco, U.S.A.)에서 세포배양 flask에 넣어 배양하였다.

#### 2) Trypan blue dye-exclusion test

24 well로 된 세포배양 plate내에서 배양된 CHO세포의 단층세포(monolayer, 20만 cells/well)에 *A. culbertsoni* 및 *A. royreba*영양형을 EMEM배지에 잘 부유시켜 아메바 대 조직세포의 수의 비가 1 : 5가 되게 한 후 각 well당 4만개 (50µl)씩을 가해주고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 함온기내에 방치한 후 12시간 간격으로 살아있는 표적세포의 수를 Tennant (1964)의 trypan blue dye-exclusion방법을 이용하여 산정하였다. 즉 살아있는 표적세포의 판정에 있어서는 각 well의 상층액과 0.25% trypsin-EDTA용액(KC Biological, U.S.A.)의 처리로 떼어낸 세포부유액을 혼합한 후 이 세포부유액 0.9 ml와 0.4% trypan blue (Gibco Lab., U.S.A.) 0.1ml를 잘 혼합하여 5분간 방치후 소량을 취하여 hemocytometer로 염색되지 않은 세포의 수를 산정하였다.

### 4. 효소원(酵素原) 제조

#### 1) 자유생활 아메바 및 배양액

*A. culbertsoni*와 *A. royreba*를 10ml의 CGV media가 들어있는 250 ml 조직배양 flask에 2×10<sup>6</sup>개씩 넣고 37°C에서 배양하였다. 3개의 flask를 한 실험군으로 하여 배양한 후 매 24시간마다 각 flask를 4°C에 두어 아메바를 모두 떼어내어 수확한 후 상층액을 모으고, 침전된 세포는 1 ml의 10 mM Tris-HCl(pH 7.4) 완충용액에 부유시켜 hemocytometer를 이용하여 아메바의 수를 센 후 -70°C에 냉동 보관하였다.

모든 아메바는 얼리고 녹이는 것을 반복하여 현미경으로 세포막이 파괴되었음을 확인한 후 20,000×g로 5분간 원심분리하여 그 상층액을 효소원으로 사용하였다. 배양액에서의 효소의 활성도를 측정하고자 각 배양액을 10 mM Tris-HCl(pH 7.4) 완충용액에 24시간 투석하여 사용하였다.

#### 2) CHO 세포에 작용시킨 *A. culbertsoni*

50 ml 세포배양 flask에 배양된 CHO 단층세포(500만 cell/flask)의 상층액을 버린후 Earle's balanced salt solution(EBSS)으로 두번 씻어주고 5 ml의 EBSS만 넣

어준 후 *A. culbertsoni*를 EBSS에 잘 부유시키고 각 flask당 100만개씩 넣어주고, 37°C 5% CO<sub>2</sub>함온기내에 방치한 후 24시간 간격으로 같은 방법으로 아메바내, EBSS에서의 효소원을 각각 준비하였다.

#### 3) 단백질 정량

모든 과정은 0~4°C에서 수행하였고 모든 효소원의 단백질 정량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 하였다.

### 5. 가수분해 효소 활성도 측정

준비한 각 효소원에서의 가수분해 효소 활성도는 acid phosphatase, β-N-acetyl galactosaminidase, β-N-acetyl glucosaminidase, β-glucuronidase, β-galactosidase, α-fucosidase, phospholipase C의 경우 각 *p*-nitrophenyl derivatives가 효소에 의해 분해되어 생성되는 *p*-nitrophenol을 410 nm 가시광선에서 1 cm quartz cuvet을 사용하여 spectrophotometer (Shimadzu, UV-240)로 측정하여 흡광도를 *p*-nitrophenol 표준 곡선과 비교하여 정량하였다.

*p*-nitrophenol의 표준 곡선은 *p*-nitrophenol을 100µl의 0.2M sodium acetate 완충용액 (pH 5.5, 0.02% Triton X-100)에 녹여 최종 농도가 20 nM부터 100 nM까지 되게 한 후, 2.9 ml의 0.3 M glycine-NaOH 완충용액 (pH 10.5)을 넣어 410 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 작성하였다. 또 α-arabinosidase, β-xylosidase, α-mannosidase, β-glucosidase 및 4-methyl umbelliferyl derivatives가 효소에 의해 분해되어 생성되는 4-methyl umbelliferon을 fluorophotometer(Turner, U.S.A.)를 사용하여 측정하였는데 primary filter로 No. 7-60, secondary filter로 No. 58과 No. 2A를 같이 사용하여 측정하여 4-methyl umbelliferon 표준곡선과 비교하여 정량하였다. 4-methyl umbelliferon의 표준곡선은 4-methyl umbelliferon을 100 µl의 2:1(V/V) chloroform: methanol에 녹여 최종 농도가 0.1 nM부터 10 nM까지 되게 한 후, 2.9 ml의 0.3 M glycine-NaOH 완충용액 (pH 10.5)을 넣은 후 fluorophotometer로 측정하여 작성하였다.

각 효소의 1 unit는 정상적인 반응조건에서 1분동안 1 nM의 *p*-nitrophenol을 생성하거나 1 nM의 4-methyl-umbelliferon을 생성하는데 필요한 효소 단백질의 양이며 특이활성도는 단백질 1 mg당 효소 unit로 나타내었다.

#### 1) Acid phosphatase

이 효소의 활성도 측정은 Robinson and Glew(1980)의 방법으로 0.5 µM의 *p*-nitrophenyl phosphate가 포함된 반응액에 10 µl의 효소액을 넣은 후 최종 부피가 100 µl가 되도록 0.2 M sodium acetate 완충용액 (pH 5.5, 0.02% Triton X-100)을 넣고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응후 반응액에 0.3 M glycine-NaOH(pH 10.5) 2.9 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다,

2)  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase

효소의 활성도는 Steiger *et al.* (1979)의 방법에 의해 0.1  $\mu$ M의 *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-galactosamine이 포함된 반응액에 10  $\mu$ l의 효소액을 넣은 후 10 mM sodium-citrate(pH 4) 완충용액으로 최종부피가 100  $\mu$ l가 되게 한 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 1)의 방법으로 반응을 정지시켜 흡광도를 측정하였다.

3)  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase

0.75  $\mu$ M의 *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine이 포함된 반응액에 10  $\mu$ l의 효소액을 넣은 후 100 mM sodium acetate(pH 5)로 최종부피가 100  $\mu$ l가 되게 하고 37°C에서 60분간 반응시킨 후 1)의 방법으로 측정하였다.

4)  $\beta$ -glucuronidase

0.5  $\mu$ M의 *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide가 포함된 반응액에 100  $\mu$ l의 효소액을 넣은 후 100 mM sodium acetate (pH 5, 0.1% Triton X-100) 완충용액으로 최종부피가 200  $\mu$ l가 되게 한 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 1)의 방법으로 측정하였다.

5)  $\beta$ -galactosidase

0.16  $\mu$ M의 *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside가 포함된 반응액에 20  $\mu$ l의 효소액을 넣은 후 22.2 mM sodium lactate (pH 3.6) 완충용액으로 최종부피가 100  $\mu$ l가 되게 한 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 1)의 방법으로 측정하였다.

6)  $\alpha$ -fucosidase

0.5  $\mu$ M의 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside가 포함된 반응액에 20  $\mu$ l의 효소액을 넣은 후 72 mM의 sodium acetate (pH 5.5) 완충용액으로 최종부피가 100  $\mu$ l가 되게 한 후 37°C에서 120분간 반응시킨 후 1)의 방법으로 측정하였다.

7)  $\alpha$ -arabinosidase

0.07  $\mu$ M의 4-methyl umbelliferyl- $\alpha$ -L-arabinopyranoside가 포함된 반응액에 20  $\mu$ l의 효소액을 넣은 후 50 mM sodium citrate (pH 4.5) 완충용액으로 최종부피가 100  $\mu$ l가 되게 한 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 1)의 방법으로 반응을 정지시키고 fluorometer로 형광도를 측정하였다.

8)  $\beta$ -xylosidase

0.3  $\mu$ M의 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylopyranoside가 포함된 반응액에 10  $\mu$ l의 효소액을 넣은 후 42 mM sodium citrate (pH 4.5) 완충용액으로 최종 부피가 100  $\mu$ l가 되게 하여 37°C에서 60분간 반응시킨 후 1) 방법으로 반응을 정지시키고 fluorometer로 형광도를 측정하였다.

9)  $\alpha$ -mannosidase

0.5  $\mu$ M의 4-methyl umbelliferyl- $\alpha$ -D-mannoside가 포함된 반응액에 효소액을 10  $\mu$ l 넣은 후 72 mM sodium citrate (pH 5) 완충용액으로 최종부피가 100  $\mu$ l가 되게 한 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 1)의 방법으로 반응을 정지시키고 fluorometer로 형광도를 측정하였다.

10)  $\beta$ -glucosidase

0.15  $\mu$ M의 4-methyl umbelliferyl- $\beta$ -D-glucoopyranoside가 포함된 반응액에 효소액을 10  $\mu$ l 넣고 42 mM sodium acetate (pH 5) 완충용액으로 최종부피가 100  $\mu$ l가 되게 한 후 37°C에서 120분간 반응시킨 후 1)의 방법으로 반응을 정지시켜 fluorometer로 형광도를 측정하였다.

11) Phospholipase C

250 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.5), 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 50% (V/V) glycerol과 10 mM의 *p*-nitrophenyl-phosphorylcholine이 포함된 반응액 90  $\mu$ l씩을 96-well mi-

Table 1. Conditions of enzyme assay

Enzyme	Substrate	Buffer
acid phosphatase	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate	0.2 M sodium-acetate (0.02% Triton X-100)
$\beta$ -N-acetyl galactosaminidase	<i>p</i> -nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-galactosamine	0.01 M sodium-citrate
$\beta$ -N-acetylglucosaminidase	<i>p</i> -nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine	0.1 M sodium-acetate
$\beta$ -glucuronidase	<i>p</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide	0.1 M sodium-acetate (0.1% Triton X-100)
$\beta$ -galactosidase	<i>p</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	0.022 M sodium-lactate
$\alpha$ -fucosidase	<i>p</i> -nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside	0.072 M sodium-acetate
$\alpha$ -arabinosidase	4-methyl umbelliferyl- $\alpha$ -L-arabinopyranoside	0.05 M sodium-citrate
$\beta$ -xylosidase	4-methyl umbelliferyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	0.042 M sodium-citrate
$\alpha$ -mannosidase	4-methyl umbelliferyl- $\alpha$ -D-mannoside	0.072 M sodium-acetate
$\beta$ -glucosidase	4-methyl umbelliferyl- $\beta$ -D-glucoopyranoside	0.042 M sodium-acetate
phospholipase C	<i>p</i> -nitrophenylphosphorylcholine	0.25 M Tris-HCl (1 $\mu$ M ZnCl <sub>2</sub> , 50% glycerol)
neutral proteinase	azocasein	0.2 M sodium-phosphate
acid proteinase	hemoglobin	0.25 M sodium-formate

crotiter plate에 넣은 후 효소액을 10  $\mu$ l씩 첨가한 뒤 37°C에서 120분동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

p-nitrophenol 표준용액을 0.5 nM부터 40 nM까지의 농도로 하여 효소액을 펜 반응액을 넣어 ELISA reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

### 12) Neutral proteinase

효소의 활성도는 McLaughlin과 Faubert(1977)의 방법으로 0.2 M sodium phosphate에 녹인 1% azocasein 반응액 100  $\mu$ l에 효소액을 첨가하여 최종부피가 150  $\mu$ l가 되게 하고 37°C에서 60분간 반응시킨 후 250  $\mu$ l의 0.5 M trichloroacetic acid (TCA)를 가하고 각 tube를 10분간 방치한 후 10,000 $\times$ g에서 15분간 원심분리하고 상층액에서 0.5 N NaOH를 1 ml씩 넣고 420 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

### 13) Acid proteinase

8% dialyzed oxyhemoglobin 150  $\mu$ l에 효소액 150  $\mu$ l를 가하고 1.0 M formate (pH 3.0) 150  $\mu$ l에 증류수를 가해 최종부피가 600  $\mu$ l 되게 하여 37°C에서 120분간 반응시킨 후 6% TCA 0.9 ml를 넣은 후 10,000 $\times$ g로 15분간 원심분리하여 상층액을 취해서 280 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

효소의 unit는 정상 반응조건에서 1시간 반응한 후, 기질이 azocasein인 경우는 420 nm에서 흡광도의 변화 0.1을, hemoglobin인 경우는 280 nm에서 흡광도의 변화 0.03을 1 unit로 하였다.

이상의 모든 가수분해 효소들의 반응조건들을 요약하

면 Table 1에서와 같고 특이활성도는 단백질 1 mg당 의 효소 unit로 나타내었다.

## 실 험 성 적

### 1. 자유생활 아메바의 병원성

#### 1) 마우스 감염에 의한 병원성

*A. culbertsoni*와 *A. royreba*를 마우스 비강을 통해 감염시키고 5일 후부터 마우스가 사망하기 시작하였다. 15일만에 *A. culbertsoni*에 의해 감염된 마우스가 모두 죽었고 평균 생존기간은 8.5일이었다. 사망한 마우스에서 염증이 발생된 뇌조직의 일부를 CGV 배지에 배양하였더니 *A. culbertsoni*가 존재함을 관찰할 수 있었으며, 아메바성 수막뇌염이 발생한 것을 확인할 수 있었다. 반면에 *A. royreba*는 15일까지 15%만 사망했으며 (Table 2), 마우스의 폐조직을 배양한 결과 아메바가 검출되었으나 뇌조직에서는 전혀 검출되지 않았다.

#### 2) CHO 세포에 대한 세포독성

배양된 CHO 단층세포에 두 아메바균을 각각 처리하여 12시간 간격으로 살아있는 표적 조직세포의 수를 trypan blue dye-exclusion test로 측정해 본 결과 (Table 3), 병원성이 있는 *A. culbertsoni* 처리군에서는 24시간 후부터 사멸이 일어나기 시작하여 48시간 후에는 80%이상 표적 조직세포가 사멸하는 현상을 보였으며 72시간 후에는 95%이상 사멸되는 것을 관찰할 수 있었다. 반면에 비병원성인 *A. royreba*에서는 표적세포의 증식에 별다른 영향을 주지 못하고 48시간 후에는 아메바를 처리하지 않은 대조군에 비하여 약 85%

Table 2. Mortality and survival time of mice infected with *A. culbertsoni* and *A. royreba*

Group	Cumulative No. of dead mice on each postinfection day										Mortality (%)	Survival time (day) Mean $\pm$ S.D.	
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			15
<i>A. culbertsoni</i>	2	6	9	12	14	15	17		18	19	20	20/20(100)*	8.5 $\pm$ 2.87
<i>A. royreba</i>				1				3				3/20(15)**	—

\* Dead mice due to primary meningoencephalitis

\*\* Dead mice due to pneumonia (trophozoites were not detected in the brain of dead mice)

Table 3. The cytotoxic effect of live *Acanthamoeba* spp. trophozoites on the CHO cells

(Mean $\pm$ S.D.)

Free-living amoebae	No. of viable CHO cells ( $\times 10,000$ /ml) at each incubation time (hr.)					
	12	24	36	48	60	72
<i>A. culbertsoni</i>	19.9 $\pm$ 0.9	16.8 $\pm$ 0.8	8.4 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.2	<1.0
<i>A. royreba</i>	21.8 $\pm$ 1.2	35.2 $\pm$ 1.6	48.4 $\pm$ 2.0	70.4 $\pm$ 2.2	63.3 $\pm$ 1.6	46.2 $\pm$ 1.2
Control*(CHO only)	25.6 $\pm$ 1.1	39.3 $\pm$ 1.6	72.1 $\pm$ 2.1	81.0 $\pm$ 3.3	85.6 $\pm$ 2.8	65.9 $\pm$ 2.9

• Ratio in number of amoeba to target cell (CHO cells), 1 : 5

• The viable target cells were counted by TBDE test.

\* No. of initially inoculated CHO cells were  $2 \times 10^5$ /ml

**Table 4.** Growth of *Acanthamoeba* spp. in CGV medium

Free-living amoebae	No. of trophozoites ( $\times 10^5$ /ml) $\pm$ S.D.						Mean generation time (hrs.)	
	0	24	48	72	96	120		144
<i>A. culbertsoni</i>	2.0	3.0 $\pm 0.4$	10.3 $\pm 1.2$	12.1 $\pm 1.2$	15.6 $\pm 1.7$	13.5 $\pm 1.1$	10.4 $\pm 1.2$	30.0 $\pm 7.1$
<i>A. royreba</i>	2.0	2.4 $\pm 0.6$	4.0 $\pm 0.9$	4.1 $\pm 1.0$	5.0 $\pm 1.1$	4.4 $\pm 0.6$	1.2 $\pm 0.2$	73.4 $\pm 13.3$

경도의 표적세포가 살아 있었으며 72시간 후에도 70% 이상의 CHO 세포가 살아 있음이 측정되었다.

**2. 자유생활 아메바 및 그 배양액내에서의 효소 활성도**

**1) 아메바의 증식률**

CGV 배지에서 배양하여 측정된 각 아메바의 증식률을 보면 generation time이 *A. culbertsoni*의 경우  $30.0 \pm 7.1$ 시간, *A. royreba*의 경우  $73.4 \pm 13.3$ 시간으로 병원성인 *A. culbertsoni*가 *A. royreba*보다 약 2.5 배의 증식률을 나타내는 것을 알 수 있었다. 아메바의 수가 최고에 달하는 시간은 두 경우 모두 배양후 96시간이었다(Table 4).

**2) 배양시간별 가수분해 효소 활성도**

CGV 배지에서 배양한 각 아메바균을 24시간 간격으로 수확하여 144시간까지 효소 활성도를 측정하여 본 결과를 보면 *A. culbertsoni*는 관찰한 13가지의 가수분해 효소중  $\beta$ -glucuronidase와  $\beta$ -galactosidase의 활성도를 세포내에서나 그 배양액에서 거의 검출할 수 없었으며  $\alpha$ -fucosidase,  $\alpha$ -arabinosidase,  $\beta$ -xylosidase의 활성도는 다른 효소들에 비해 훨씬 낮았고 배양액에서의 효소 활성도도 배양 전체시간중 세포내 효소의 활성도보다 작은 것을 알 수 있었다.

반면에 acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, phospholipase C,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -glucosidase, neutral proteinase, acid proteinase의 효소 활성도는 배양후 48-72시간 사이인 아메바 증식의 exponential phase부터 세포내에서보다도 방출된 배양액에서 더 높은 특이 활성도를 나타내어 이러한 종류의 효소들이 세포밖으로 많이 방출되는 것을 알 수 있었다. 비병원성인 *A. royreba*의 경우에는  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -arabinosidase, phospholipase C,  $\beta$ -xylosidase,  $\beta$ -glucosidase의 효소활성도가 *A. culbertsoni*의 경우보다 약간 높거나 비슷할 뿐 다른 효소들의 특이활성도가 *A. culbertsoni*보다 낮은 것을 알 수 있었고 acid phosphatase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -arabinosidase의 경우에는 배양후 120시간 경과시 배양액에서의 효소 활성도가 세포내에서보다 높아진 것을 알 수 있었다.

이러한 결과들과 각 아메바 실험군 간의 효소 활성도를 비교하여 보면 병원성인 *A. culbertsoni*가 비병원성인 *A. royreba*에 비해 세포내 및 배양액에서 현저히

높은 효소 활성도를 나타내는 가수분해 효소로 acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase, neutral proteinase, acid proteinase를 들 수 있었다(Fig. 1).

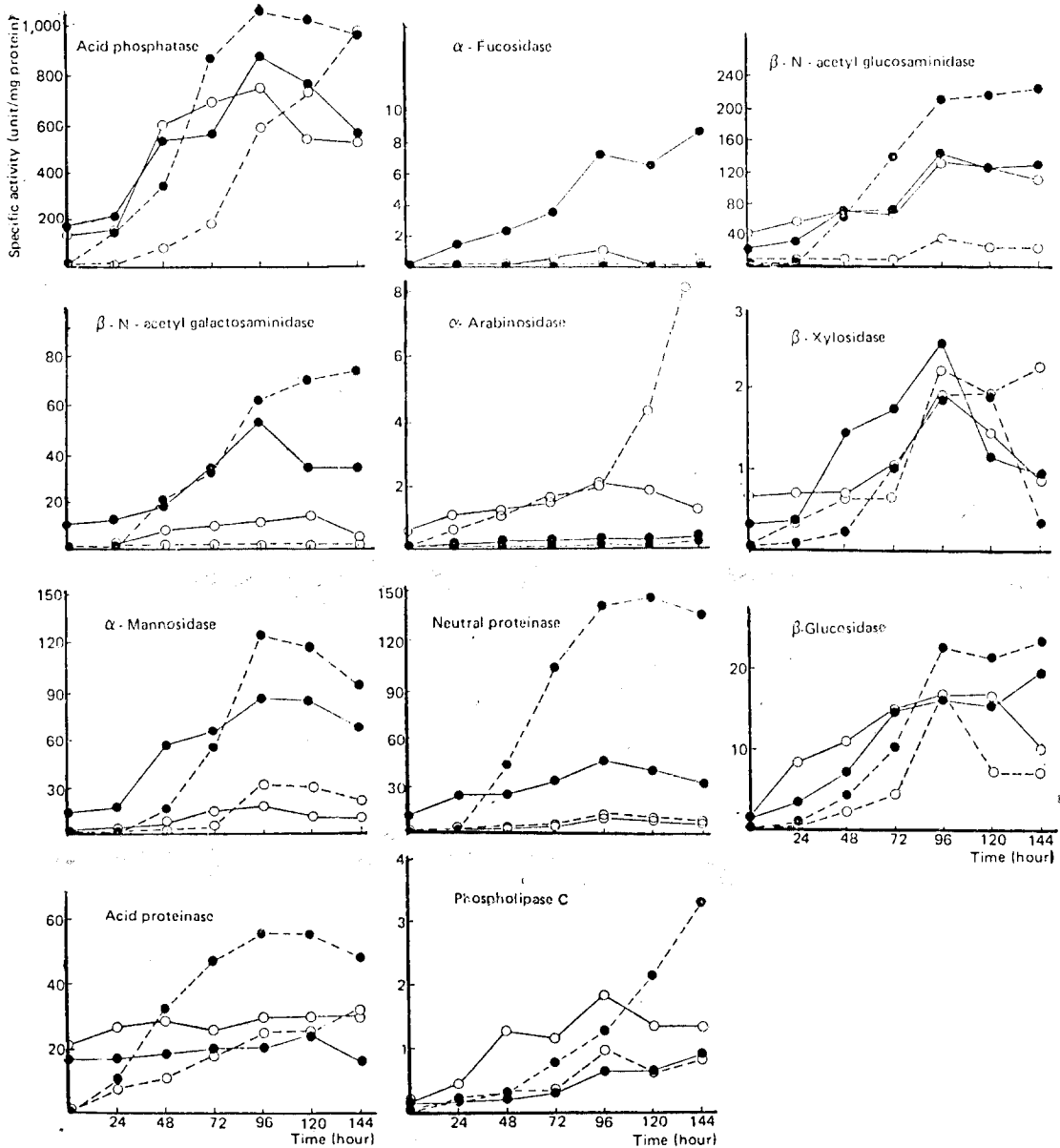
**3. CHO 세포에 혼합된 *A. culbertsoni*의 효소 활성도**

CHO 세포에 *A. culbertsoni*를 혼합하여 세포독성을 관찰한 후 *A. culbertsoni*의 세포추출물 및 그 EBSS용액에서 acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase, neutral proteinase, acid proteinase의 효소 활성도를 측정하였다. 즉 아메바내의 농도와 EBSS 용액내로 분비되어 나온 효소의 시간별 활성도를 측정해 본 결과 acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase, acid proteinase의 경우는 분비된 것보다 아메바 세포내의 활성도가 높았으며 neutral proteinase의 경우는 CHO세포에 혼합한 지 24시간 이후부터 EBSS 용액내로 분비되는 효소량이 현저히 증가되는 경향을 보여주었다(Fig. 2). 반면에 CHO 세포내의 이러한 가수분해 효소들의 활성도는  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase의 경우 전혀 검출할 수 없었으며 acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase, neutral proteinase, acid proteinase의 경우는 아메바에서 측정되는 효소활성도에 비해 10% 이하의 낮은 활성도를 보여 병원성 *A. culbertsoni*의 시간별 효소활성도에는 별다른 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

**고 찰**

인체에서 자유생활 아메바에 의한 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)이 발생되었음을 Fowler and Carter (1965)가 처음 보고한 이래 이 원충성 질병에 대한 병리학적 및 임상적인 관찰이 활발히 이루어지고 있다. 근래에 전세계적으로 임상례가 계속 늘어남에 따라(Willaert, 1974), 이 자유생활 아메바의 병원성을 규명하고자 많은 연구가 진행되고 있으며 지금까지 인체에서 이 질병의 원인 원충으로 *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp.가 알려지고 있다.

아메바의 병원성 여부를 규명하는 동물실험으로



**Fig. 1.** Specific activity of hydrolases from *Acanthamoeba* sp. cultured axenically in CGV medium. (●—●; trophozoite of *A. culbertsoni*, ●—●; culture medium of *A. culbertsoni*, ○—○; trophozoite of *A. royreba*, ○—○; culture medium of *A. royreba*)

Culbertson *et al.* (1966)과 Martinez *et al.* (1973)은 *Naegleria* spp.를 마우스 비강 점막에 떨어뜨려 원발성 아메바성 수막뇌염이 생겼음을 관찰하였고, Butt *et al.* (1968)과 Carter (1970)는 마우스 두개강내에 직접 *N. fowleri*를 주입하여 급성뇌염, 원발성 아메바성 수막뇌염을 발생시켰고, Culbertson *et al.* (1968)은 마우스 복강에, Wong *et al.* (1975)은 월숭이의 두개강, 척수강 또는 혈관내에 직접 *N. fowleri* 또는 *A. culber-*

*toni*를 주입하면 수막뇌염이 발생함을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 *A. culbertsoni*를 마우스 비강에 감염시켜 병원성 여부를 확인하였는데, 감염 후 사망한 마우스의 뇌조직 일부를 각각 CGV 배지가 들어있는 tissue culture flask에 무균상태로 옮겨놓은 후 37°C 항온기에서 48시간 동안 배양하였던 바 *A. culbertsoni*를 감염시킨 후 사망한 마우스의 뇌조직에서 아메바 영양형을 전부 관찰할 수 있었으며, 따라서 아메바성 수

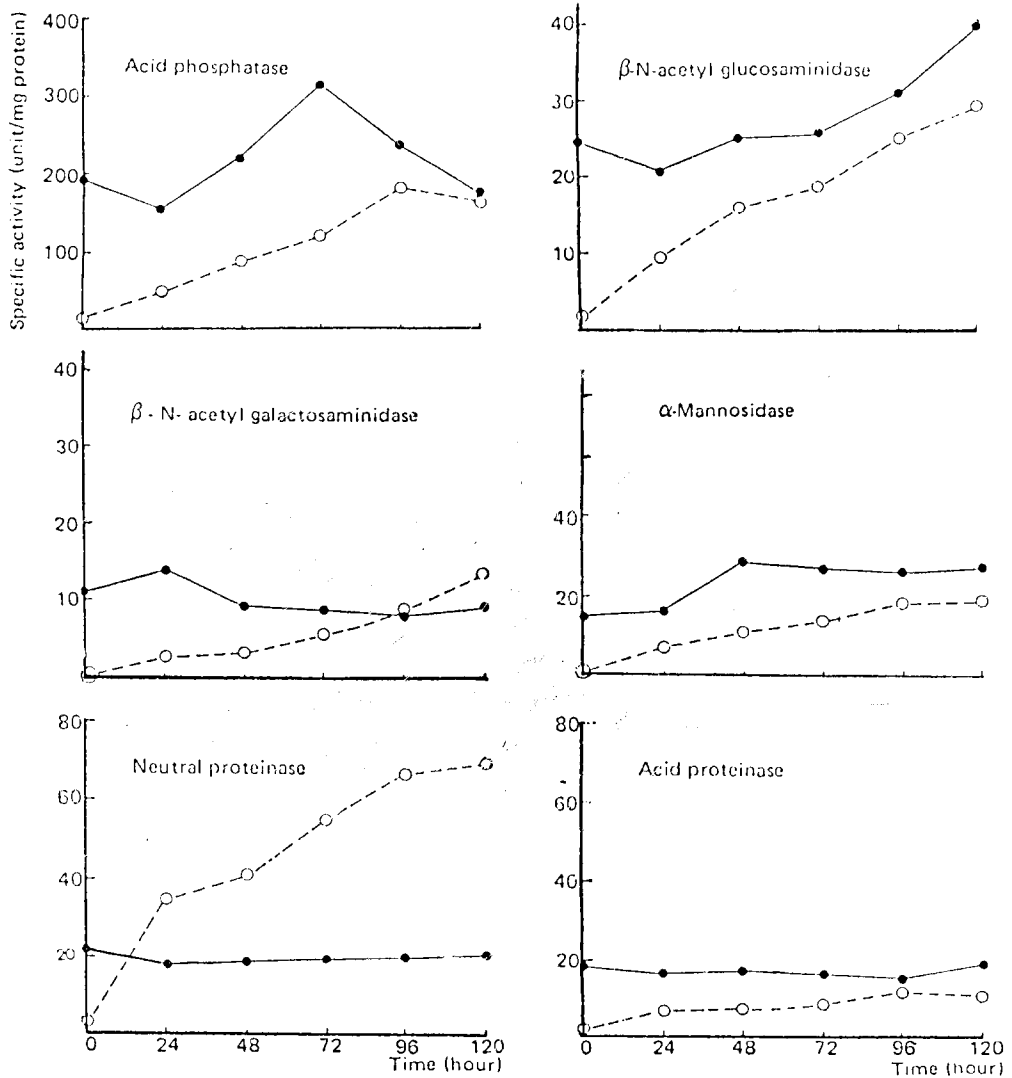


Fig. 2. Specific activity of hydrolases in the lysates of *A. culbertsoni* trophozoites exposed to target cell monolayer and in the culture medium (EBSS). (●—●; trophozoites of *A. culbertsoni*, ○—○; culture medium)

막내염에 의한 사망임을 확인할 수 있었다.

*A. royreba*를 감염시킨 마우스는 소수가 사망하였고 사망한 마우스의 뇌조직에서는 전혀 아메바를 관찰할 수 없었고, 폐조직에서 *A. royreba* 영양형이 검출되어 단순한 aspiration pneumonia에 의한 사망으로 생각된다. 또한 이 아메바들은 수년간 실험실에서 계대 배양으로 유지시켜 온 것으로 마우스에 *A. culbertsoni*를 감염시켰을 경우 100% 사망률을 나타내는 것으로 보아 병원성이 비교적 잘 유지되는 것으로 사료되며, *A. royreba*는 마우스에 감염시켰을 때 병원성이 없는 것으로 관찰되었다.

동물세포의 조직배양이 가능해짐에 따라 조직세포에

대한 자유생활아메바의 세포독성을 관찰함으로써 병원성 여부를 판별할 수 있게 되었다. *N. fowleri*를 Vero 단층세포에 첨가하여 광학 및 전자현미경적 관찰이 이루어졌으며 (Visvesvara and Callaway, 1974), 李 등 (1986)의 보고에 의하면 *Acanthamoeba* spp.의 실험에서 Vero세포나 HeLa세포에 비해 CHO세포가 표적 조직세포로 적합하다고 하였고 세포독성을 관찰함에 있어 아메바대 CHO세포수의 비가 1:5였을 때 관찰이 가장 용이하였으며 Marciano-Cabral *et al.* (1982)이 선정한 B-103 rat neuroblastoma세포에 비해 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 그러나 광학현미경적 관찰로는 파괴된 세포를 볼 수 있지만, 표적세포의 정확한



생사판정이 불가능할 때가 있기 때문에 본 연구에서는 Tennant(1964)의 방법에 따라 trypan blue dye-exclusion test에 의해 살아있는 표적세포의 수를 시간별로 측정하기에 이르렀다. 즉 병원성 *A. culbertsoni*는 표적 조직세포에 노출시켰을 때 *A. royreba*에 비해 월등한 세포독성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서 *A. culbertsoni*를 마우스 비강을 통해 감염시켜 수막 뇌염이 발생했고, 또한 아메바는 CHO세포에 강한 세포독성이 있음을 확인하였으나, *A. royreba*의 경우 이와 같은 두가지 실험에서 병원성이 없음을 확인하였다.

비강을 통해 감염된 병원성 자유생활 아메바가 후점막, 전두엽, 소뇌엽 조직에서 아메바성 수막뇌염을 일으키는 전과정에서 cytolitic process가 이루어질 것이라 생각된다(Martinez *et al.*, 1973, Lowrey and McLaughlin, 1985). 병원성 아메바가 동물의 조직 세포를 파괴시키는 기전에 대해서는 거의 알려진 바가 없으나 조직세포에 손상을 주는 cytolitic substance가 주로 세포막의 구성 성분을 가수분해 시키는 효소일 것이라는 추측에서 이 효소들에 대한 연구가 진행되어 왔다. 즉 병원성 아메바의 추출물 및 부분 정제된 cytolitic substance는 collagenase (Gadasi and Kessler, 1983),  $\beta$ -amylase (Werries and Nebinger, 1984),  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase (Lundblad *et al.* 1981; Lowrey and McLaughlin, 1985), proteinase (Scholze and Werries, 1984), glucose phosphate isomerase와 phosphoglucomutase (DeJonckheere, 1982), phospholipases (Hymith and Franson, 1982; Ravdin *et al.*, 1985), acid phosphatase (Olomu *et al.*, 1986),  $\beta$ -glucosidase 및 여러 glycosidase (Das *et al.*, 1987)의 활성이 있다고 보고되었다. 본 연구에서도 이들 가수분해 효소들의 활성 유무를 알아보고자 하였다.

비 병원성 *A. royreba*를 대조로 하여 병원성 *A. culbertsoni*를 CGV 배지내에서 배양할 때 증식 시간별로 가수분해 효소의 활성도를 측정 한 결과, acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase, neutral proteinase, acid proteinase의 활성도가 병원성 *A. culbertsoni*의 아메바 추출물 및 배양액에서 현저히 높은 것으로 보아 비병원성 아메바에 비해 병원성 아메바가 이러한 종류의 가수분해 효소들을 많이 생성하거나 분비하는 경향이 있음을 추측할 수 있었다. 본 실험에서의 아메바 추출물은, 아메바 영양형을 얼림과 녹임을 반복하여 세포막이 파괴된 것을 확인한 후 20,000×g에서 5분간 원심분리하여 상청액을 사용한 것이므로 세포질, 세포막 분획, lysosome 분획들이 상청액에 많이 포함되어 있으므로 이러한 효소들이 아메바 세포내의 어느 부분에 분포하는가는 알 수 없었다.

*A. culbertsoni*를 조건이 좋은 배지에서 배양할 때와는 달리 조직세포에 접촉시켰을 때 이같은 가수분해 효소들의 활성도는 다를 것으로 생각되어 표적 조직세

포 CHO세포에 접촉시킨 후 이 효소들의 활성도를 측정하였다. 즉 nutrient source로 조직세포만 주고 아메바 배지는 전혀 첨가시키지 않은 표적 조직세포에 병원성 *A. culbertsoni*를 혼합하여 준 후 24시간 간격으로 아메바 세포내 및 EBSS 용액내로 분비된 효소활성도를 관찰하였다. 이때 표적 조직세포인 CHO 세포의 효소 활성도를 측정하여 보았는데 거의 검출이 안되거나 10%이하의 낮은 활성도를 보여 아메바 효소 활성도 측정에는 별다른 영향을 주지 않은 것으로 사료되었다. Neutral proteinase 활성도를 보면 혼합후 시간이 경과함에 따라 아메바내의 효소 활성도는 일정한데 비해 24시간 후부터 분비되는 효소가 급격히 증가함을 측정할 수가 있었다. 반면에 acid phosphatase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase 등 다른 효소들의 경우는 조직세포가 완전히 파괴되는 120시간까지 아메바 밖으로 분비되는 것보다는 아메바 내에서 더 높은 활성도를 갖고 있었다. 이러한 성적으로 보아 이러한 여러가지 가수분해 효소들도 세포독성에 관계한다고 생각되지만 그중 neutral proteinase가 표적 조직세포의 파괴에 주로 관여할 것이라고 사료된다. 그러나 이러한 효소들이 *A. culbertsoni* 영양형 어느 부위에 분포하며 어떠한 기전으로 조직세포를 파괴하는지는 앞으로 더 연구되어야 할 과제로 남아 있다.

## 참 고 문 헌

- Anderson, K. and Jamieson, A. (1972) Agglutination test for the investigation of the genus *Naegleria*. *Pathol.*, 4:273-278.
- Brooks, S.E. and Schneider, D.L. (1985) Oxidative metabolism associated with phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Protozool.*, 32:330-333.
- 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* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, 100:217-244.
- Chlapowski, F.J. and Butcher, R.W. (1986) Activation of adenylate cyclase in *Acanthamoeba palestinensis*. *Life Sci.*, 38: 849-859.
- 鄭騏燮·尹德鎭·任敬一·蘇鎮璋 (1980) 자유생활아메바의 병원성 감별을 위한 세포화학적 연구. 연세의대논문집, 13(1):72-81.
- Culbertson, C.G., Ensminger, P.W. and Overton, W.M. (1966) *Hartmanella (Acanthamoeba)*: Experimental chronic granulomatous brain infections produced by new isolates of low virulence. *Am. J.*

- Clin. Path.*, 46:305-314.
- Culbertson, C.G., Ensminger, P.W. and Overton, W.M. (1968) Pathogenic *Naegleria* sp.: study of a strain isolated from human cerebrospinal fluid. *J. Protozool.*, 15:353-363.
- Cursons, R.T.M., Brown, T.J. and Keys, E.A. (1977) Immunity to pathogenic free-living amoebae. *Lancet*, 2:875-876.
- Cursons, R.T.M. and Brown, T.J. (1978) Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *J. Clin. Pathol.*, 31:1-11.
- Das, S., Saha, A.K., Nerad, T.A., Martinez, A.J., Lamarco, K.L., Basu, A., Legler, G. and Glew, R.H. (1987) Partial purification and characterization of *Naegleria fowleri*  $\beta$ -glucosidase. *J. Protozool.*, 34:68-74.
- DeJonckheere, J.F. (1982) Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Ann. Microbiol.*, 133A:319-342.
- Fowler, M. and Carter, R.F. (1965) Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* species: a preliminary report. *Brit. Med. J.*, 2:740-742.
- Gadasi, H. and Kessler, E. (1983) Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.*, 39:528-531.
- Hysmith, R.M. and Francon, R.C. (1982) Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta*, 711:26-32.
- Josephson, S.L., Weik, R.R. and John, D.T. (1977) Cancanavalin A induced agglutination of *Naegleria*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26:856-858.
- Kasprzak, W. and Mazur, T. (1972) Free-living amoebae isolated from waters frequented by people in the vicinity of Poznan, Poland. Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates. *Z. Tropenmed. Parasit.*, 23:391-398.
- 李泳愚·金泰宇·鄭仁實·鄭坪林·李根泰(1986) 자유생활 아메바의 병원성검정에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집, 19:358-369.
- Long-Krug, S.A., Fischer, K.G. Hysmith, R.M. and Ravdin, J.I. (1985) Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*; description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.*, 152:536-541.
- Lowrey, D.M. and McLaughlin, J. (1985) Subcellular distribution of hydrolases in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.*, 32:616-621.
- Lowry, O.H., Resebrough, N.L. Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Lundblad, G., Huldt, G., Elander, M., Lind, J. and Slettengren, K. (1981)  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Entamoeba histolytica*, Stockholm. *Biochem. Physiol.*, 68B:71-76.
- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F., Kairalla, A.A., Cantey, J.R. and Pittman, F.E. (1984) Relationship of cytotoxins of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* to virulence. *Gastroenterology*, 86:1488-1495.
- Lynch, T.J., Albanesi, J.P., Korn, E.D., Robinson, E.A., Bowers, B. and Fujisaki, H. (1986) ATPase activities and actin-binding properties of subfragments of *Acanthamoeba myosinia*. *J. Biol. Chem.*, 261:17156-17162.
- Marciano-Cabral, F., Patterson, M., John, D.T. and Bradley, S.G. (1982) Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. *J. Parasit.*, 68:1110-1116.
- Marciano-Cabral, F., Stanitski, S., Radhakrishna, V. and Bradley, S.G. (1987) Characterization of a neutral aminoacylpeptide hydrolase from *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.*, 34:146-149.
- Martinez, A.J., Duma, R.J., Nelson, E.C. and Morietta, F.I. (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.*, 29:121-134.
- McLaughlin, J. and Faubert, G. (1977) Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Can. J. Microbiol.*, 23:420-425.
- Olomu, N., Martinez, A.J., Lamarco, K.L., Nerad, T.A., Saha, A.K., Das, S. and Glew, R.H. (1986) Demonstration of various acid hydrolases and preliminary characterization of acid phosphatase in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.*, 33:317-321.
- Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R.L. and Long-Krug, S.A. (1985) Effect of calcium and phospholipase A antagonists in the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.*, 152:542-549.
- Robinson, D.B. and Glew, R.H. (1980) Isolation and characterization of a tartrate-sensitive splenic acid phosphatase in Gaucher's disease. *Arch. Biochem. Biophys.*, 205:156-168.
- Scholze, H. and Werries, E. (1984) A weakly acidic

- protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **11**:293-300.
- Singh, B.N. and Das, S.R. (1972) Occurrence of pathogenic *Naegleria aerobia*, *H. culbertsoni* and *H. rhyzodes* in sewage sludge samples of Lucknow. *Curr. Sci.*, **41**:277-281.
- Steiger, R.F., Van Hoof, F., Bontemps, J., Nyssens-Jadin, M. and Druetz, J.E. (1979) Acid hydrolases of trypanosomatid flagellates. *Acta Tropica*, **36**: 335-341.
- Stevens, A.R. and Kaufman, A.E. (1974) Concavalin A-induced agglutination of *Acanthamoeba*. *Nature*, **252**:43-45.
- Stevens, A.R., Kilpatrick, T., Willaert, E. and Capron, A. (1977) Serologic analysis of cell-surface antigens of *Acanthamoeba* spp. with plasma membrane antisera. *J. Protozool.*, **24**:316-324.
- Tennant, J.R. (1964) Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*, **2**:685-694.
- Visvesvara, G.S. (1980) Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TPS-1 medium. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**:213-215.
- Visvesvara, G.S. and Callaway, C.S. (1974) Light and electron microscopic observation on the pathogenesis of *Naegleria fowleri* in mouse brain and tissue culture. *J. Protozool.*, **21**:239-250.
- Werries, E., Nebinger, P. and Franz, A. (1983) Degradation of biogene oligosaccharides by  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase secreted by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **7**:127-140.
- Werries, E. and Nebinger, P. (1984) The occurrence of  $\beta$ -amylase in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **11**:329-336.
- Willaert, E. and LeRay, D. (1973) Caractres morphologiques, biologiques et immunolochemiques de *Naegleria jadini* sp. nov. (Amoebida, Vohlkampfiidae). *Protistologica*, **9**:417-426.
- Willaert, E. (1974) Primary amoebic meningoencephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.*, **54**: 429-440.
- Wong, M.M., Karr, S.L. and Balamuth, W.B. (1975) Experimental infections with pathogenic free-living amoebae in laboratory primate hosts: I. (A) A study on susceptibility to *Naegleria fowleri*. *J. Parasit.*, **61**:199-208.

=Abstract=

**A Comparative Study on Hydrolase Activities in *Acanthamoeba culbertsoni* and *A. royreba***

Yong-Kyu Kim, Tae-Ue Kim, In-Sil Joung and Kyung-Il Im

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

Specific or non-specific cytolytic processes of free-living amoebae causing meningoencephalitis have been emphasized and the cytolytic ability related to hydrolases in *Entamoeba* sp. and *Naegleria* sp. has also been reported since the latter half of 1970's. However, no information on hydrolase activities in *Acanthamoeba* sp. is available.

Hydrolases in *Acanthamoeba culbertsoni*, a pathogenic species of free-living amoebae, were assayed and compared with those in a non-pathogenic species, *A. royreba*. Pathogenicity of these two species was confirmed through experimental infection to BALB/c mice. Hydrolase activities and cytotoxic effects between pathogenic and non-pathogenic species were compared in the trophozoites cultured in CGV media and in CHO cell line, respectively. The results are summarized as follows:

1. The mice infected with *A. culbertsoni* were all dead 15 days after nasal inoculation, and the mean survival time was 8.5 days. Also the mice infected with this pathogenic species manifested typical meningoencephalitis, whereas the mice infected with *A. royreba* did not.

2. Hydrolases detected both in the cell extracts and culture media were acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase, neutral proteinase and acid proteinase, all of which were detected with remarkably higher rate in *A. culbertsoni* than in *A. royreba*.

3. *A. culbertsoni* revealed strong cytotoxicity for the target CHO cells, whereas *A. royreba* did not show any specific cytotoxicity. About 80 % of the target cells mixed with *A. culbertsoni* were dead 48 hours after cultivation, and more than 95% of the target cells were dead 72 hours after cultivation.

4. Hydrolase activities in *A. culbertsoni* cultured with the target cell line were assayed according to the culture time. The activities of acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetyl galactosaminidase,  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase and acid proteinase in this pathogenic amoeba were detected higher in amoeba extracts than in culture media up to 120 hours after cultivation, but after 120 hours of cultivation those activities were detected higher in culture media than in the amoeba lysates. Neutral proteinase activity in *A. culbertsoni* increased more in EBSS medium than in the lysate specimens although the activity in the extracts was generally steady according to the cultivation time.

Summarizing the above results, it is concluded that there were differences in hydrolase activities between pathogenic *A. culbertsoni* and non-pathogenic *A. royreba*, and that some hydrolase activities were detected remarkably higher in *A. culbertsoni* which revealed strong cytotoxicity to the target CHO cell line.