

## 비장적출(splenectomy)이 원발성 아메바성 뇌수막염의 발생에 미치는 영향

한양대학교 의과대학 기생충학교실

辛 皓 俊 · 任 敬 一

연세대학교 의과대학 생물학과

崔 林 淳

### 서 론

원발성 아메바성 뇌수막염(primary amoebic meningoencephalitis)의 보고는 1948년 Derrick에 의하여 인체 발병예가 보고되면서 시작되었다. 그후 여러 연구자들에 의하여 *Naegleria sp.*와 *Acanthamoeba sp.*의 limax amoeba가 뇌수막염을 일으키는 원충으로 알려져 토양이나 연못 그리고 수영장, 심지어는 공기 등의 자연환경속과 인체의 뇌로부터 분리, 배양되어 병원성이 확인되었다(Butt *et al.*, 1968; Carter, 1968, 1970; Culbertson *et al.*, 1968, 1971; Wong *et al.*, 1975a, b; Visvesvara *et al.*, 1975; Tayler, 1977; Lawande *et al.*, 1979; Willert *et al.*, 1980). 특히, Martinez등 (1973)은 생쥐를 사용하여 비강내로 아메바를 감염시킨 후, 비강점막을 침투하여 두개강내로 직접 이행하는 *Naegleria fowleri*를 광학 및 전자현미경으로 관찰하여 그 감염경로를 밝혔다. 또한 Lawande등 (1979)은 공기중에서 *N. fowleri*를 분리, 배양하였고 뇌수막염을 일으킨 인체 감염예를 보고하기도 하였다.

비장의 기능에 대하여 Taliaferro(1956)가 방어진역과 연관시켜서 발표한 이래 Shinefield등 (1966)은 *Diplococcus pneumoniae*를 생쥐에 감염시켜서 비장적출(splenectomy)의 영향을 관찰하였고, 그후 많은 연구자들이 *Streptococcus pneumoniae*를 중심으로 비장이 적출된 생쥐와 사람 등에서 여러 면역학적 현상들을 밝혀내었다(Coil *et al.*, 1978; Amsbaugh *et al.*, 1978; Dickerman *et al.*, 1979a, b; Hosea *et al.*, 1981; Hebert *et al.*, 1983).

한편으로 Garnham(1970)은 원생동물의 감염에 있어서 비장적출의 효과에 대하여 보고하였으며, Oster등 (1980)은 *Plasmodium yoelii*를 감염시켰을 때, Ghadirian과 Meerovitch(1981)는 이질 아메바(*Entamoeba histolytica*)의 감염시 비장적출의 영향에 대해 관찰하였다.

본 실험은 자유생활아메바중 병원성이 강한 *N. fowleri*를 무균배양하여 생쥐의 비강내로 감염시켜서 뇌수막염을 발생시키기 전에 비장을 적출하여 그 영향을 관찰하였다. 생쥐의 체중별 그리고 수술 후 회복기간별로 *N. fowleri*를 감염시킨 후 생쥐의 사망율과 생존기간을 조사하였다. 또한 뇌수막염이 발생된 생쥐에서 항체의 형성여부를 관찰하기 위하여 면역확산법을 실시하여 혈청에서 항체를 검출하였고, 대조군과 실험군과의 혈청단백질분획을 전기영동법으로 비교 관찰하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 실험동물

본 실험에서 *N. fowleri*에 감염이 잘되는 생쥐(ICR strain)를 다음과 같이 여러군으로 나누어 각각 20마리씩(숫컷 10, 암컷 10), 총 180마리를 사용하였다(Fig. 1).

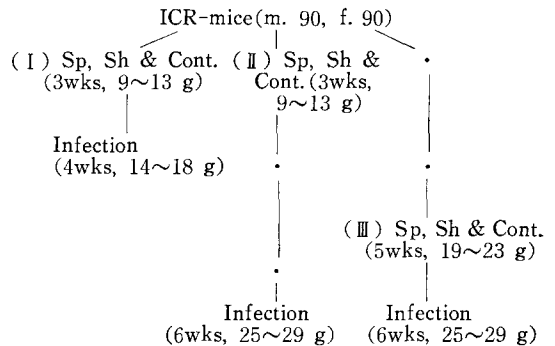


Fig. 1. Scheme of experiment to assess splenectomy effect on *N. fowleri* infection in mice: Sp; splenectomy, Sh; sham-splenectomy, cont; control.

#### 2. 자유생활아메바의 배양

자유생활아메바중 병원성이 강한 *N. fowleri* (0359

strain; Belgium, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine의 J.B. Jardin 교수 제공)를 CGVS배지(Willert와 Le Ray, 1973)에서 3일에 한번씩 무균제대배양하였고, 무균배지를 얻기 위하여 seitz filter로 여과하여 사용하였다.

3. 실험방법

1) 실험설계

① 실험 I : 생후 3주째 된 생쥐(9~13 g)를 비장을 적출한 후 1주일의 회복기간을 두고 아메바를 감염시켰다.

② 실험 II : 생후 3주째 된 생쥐(9~13 g)를 비장을 적출한 후 3주일의 회복기간을 두고 아메바를 감염시켰다.

③ 실험 III : 생후 5주째 된 생쥐(19~23 g)를 비장을 적출한 후 1주일의 회복기간을 두고 아메바를 감염시켰다.

모든 실험은 대조군과 실험군으로 나누었으며, 실험군은 다시 sham군(sham-splenectomized group)과 비장적출군(splenectomized group)으로 나누어 실시하였다(Fig. 1).

2) 비장적출(splenectomy)

생쥐의 복강내로 secobarbital용액을 체중 g당 0.05 mg씩 주입하여 마취시킨 후 수술대 위에 고정시키고, 피부와 복막을 가위로 절개하였다. 출혈을 막기 위하여 비장혈관을 전사로 묶어준 후, 비장을 제거하였고, 다시 전사로 복막과 피부의 순으로 봉합해 주었다. sham군의 생쥐는 피부와 복막만을 절개한 후 장기들을 노출시킨 뒤 정상대로 봉합해 주었으며, 대조군의 생쥐는 마취만을 시켜서 사용하였다.

3) 자유생활아메바의 감염

비장을 적출할 때와 같은 방법으로 생쥐를 마취시킨 후, 제대배양한 지 1일째 된 *N. fowleri* 영양형을 생리식염수로 3회 세척하여 5 $\mu$ l에 5 $\times 10^4$ 개가 되도록 부유액을 만들어서 마이크로피펫을 사용하여 생쥐의 왼쪽 비강내로 떨어뜨려 감염시켰다.

4) 감염된 생쥐의 관찰

감염시킨 후 다음 날부터 모두 사망하기까지 사망율과 생존기간에 중점을 두어 관찰하였다. 감염시킨 생쥐가 사망하였을 때, 또 혈청 채취를 위하여 사망하기

직전 가사상태 때 도살하여 뇌조직과 폐조직을 해부하여서 뇌수막염과 폐염의 발생 여부를 육안으로 그리고 광학현미경으로 관찰하였다.

5) 혈청의 채취

실험에 사용된 생쥐의 오른쪽 눈밑, 안와동(orbital sinus)을 피펫으로 찔러 넣어 천천히 혈액을 채취한 후 3,000rpm으로 약 20분간 원심침전하여 혈청을 분리하였다. 혈청의 채취는 자 실험군의 생쥐에서 *N. fowleri*를 감염시키기 전과 감염되어 뇌수막염으로 사망하기 직전의 가사상태 때 두번 실시하였으며, -70°C에서 냉동저장하였다가 사용하였다.

6) 면역확산법(immunodiffusion)의 실시

*N. fowleri*에 감염되어 뇌수막염이 발생된 생쥐의 혈청중 항체의 존재여부를 확인하고자 Nowotny(1979)의 방법을 참조로 하여 double gel diffusion (Ouchterlony method)을 실시하였다. 각 홈의 지름은 3.0mm, 용적은 10 $\mu$ l로 하였고, 중앙의 홈에는 실험혈청을 10 $\mu$ l를 넣고 주위의 6개의 홈에는 항원을 10 $\mu$ l씩 배수 희석하여 넣어 37°C 항온기에서 12시간 확산시켰다. 항원의 제조는 *N. fowleri* 영양형을 생리식염수로 3회 세척한 후, 10 $\mu$ l당 1.0 $\times 10^6$ 개의 부유액을 만들어 조금 파 분쇄기로 깨뜨려 사용하였다. 0.5% cumassie blue 용액으로 20분간 염색을 한 후 탈색과 명화(clearing)를 하여 항원-항체 복합체의 침강대(precipitation line)를 관찰하였다.

7) 전기영동법(electrophoresis)의 실시

자 실험군의 생쥐에서 채취한 혈청중 혈청단백질 분획을 비교하고자 polyacrylamide gel을 만들어 전기영동법을 Laemli(1980)의 방법을 변형하여 실시하였다. 두께 3mm로 5%의 separating gel을 만들었으며 6개의 홈을 만들어 시험혈청 15 $\mu$ l와 sample buffer 15 $\mu$ l를 잘 섞어 넣은 다음 150mA에서 5시간 전기영동을 하였다. 혈청단백질분획의 관찰은 densitometer (Gelman Science, INC)를 이용하여 525nm에서의 흡광도를 상대적인 면적 비율로 나타낸 그래프를 얻었다.

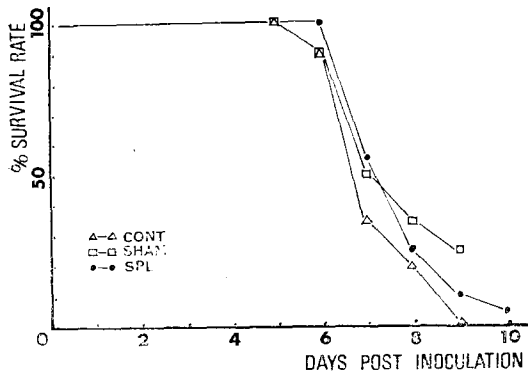
실험 결과

1. 생쥐의 사망율과 생존기간의 비교

Table 1. Cumulative numbers of death in mice inoculated intranasally with *N. fowleri*; splenectomy and infection at the age 3 weeks and 4 weeks, respectively (experiment I)

Group	No. of exam.	Cumulative No. of death in days post-inoculation										Survival time (Mean $\pm$ S.D.)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Control	20	—	—	—	—	—	2	13	16	20	—	7.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
Sham-splenectomized	20	—	—	—	—	—	2	10	13	17	—	7.5 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
Splenectomized	20	—	—	—	—	—	—	9	15	18	19	7.8 $\pm$ 0.9

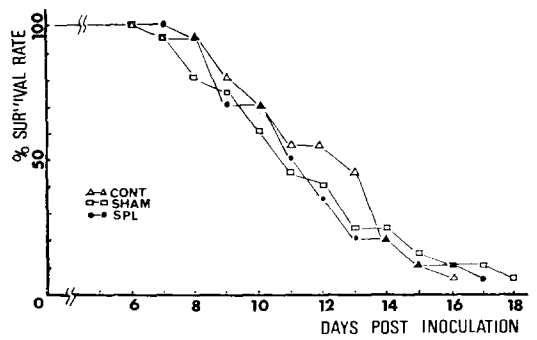
a, b: Student's t-test; p>0.05, p>0.2



**Fig. 2.** Curve of survival rate in mice inoculated intranasally with *N. fowleri*; splenectomy and infection at the age 3 weeks and 4 weeks, respectively (experiment I).

*N. fowleri*의 영양형  $5 \times 10^6$ 개를 생쥐의 비강내로 감염시킨 며칠 후, 생쥐의 뇌조직에서 급성염증반응과 많은 자유생활 아메바의 영양형을 관찰하였다(Fig. 6, 7). 즉 원발성 아메바성 뇌수막염이 발생하였으며, 그 결과 각 실험군에서의 생쥐 사망율과 생존기간이 다음과 같았다.

1) 실험 I : 대조군은 *N. fowleri*를 감염시킨 후 6~9일 사이에 100%(20/20)가 사망하였고 평균생존기간은 7.3일이었다. Sham군의 경우에는 6~9일 사이에 85%(17/20)가 사망하였고 평균생존기간은 7.5일이었다. 비장적출군에서는 7~10일 사이에 95%(19/20)가 사망하였고 평균생존기간은 7.8일로 대조군 및 sham



**Fig. 3.** Curve of survival rate in mice inoculated intranasally with *N. fowleri*; splenectomy and infection at the age 3 weeks and 6 weeks, respectively (experiment II)

군과 비교할 때 통계학적으로 유의성이 없었다( $p > 0.05$ ,  $p > 0.2$ , Table 1, Fig. 2).

2) 실험 II : 대조군은 *N. fowleri*감염 후 7~16일 사이에 95%(19/20)가 사망하였고 평균생존기간은 12.1일이었다. sham군의 경우에는 7~18일 사이에 95%(19/20)가 사망하였으며 평균생존기간은 11.5일이었다. 비장적출군에서는 8~17일 사이에 95%(19/20)의 사망율과 평균생존기간이 11.5일로 나타나 대조군 및 sham군과의 비교에서 통계학적인 유의성은 인정할 수 없었다( $p > 0.5$ ,  $p > 0.2$ , Table 2, Fig. 3).

3) 실험 III : *N. fowleri*감염 후 대조군에서 6~12일 사이에 95%(19/20)가 사망하였고 평균생존기간은 8.1일이었다. sham군에서는 7~10일 사이에 90%(18/20)

**Table 2.** Cumulative numbers of death in mice inoculated intranasally with *N. fowleri*; splenectomy and infection at the age 3 weeks and 6 weeks, respectively (experiment II)

Group	No. of exam.	Cumulative No. of death in days post-inoculation												Survival time (Mean $\pm$ S.D.)
		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Control	20	1	1	4	6	9	9	11	16	18	19	—	—	12.1 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>
Sham-splenectomized	20	1	4	5	8	11	12	15	15	17	18	18	19	11.5 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>
Splenectomized	20	—	1	6	6	10	13	16	16	18	18	19	—	11.5 $\pm$ 2.4

a, b: Student's t-test;  $p > 0.5$ ,  $p > 0.2$

**Table 3.** Cumulative numbers of death in mice inoculated intranasally with *N. fowleri*; splenectomy and infection at the age 5 weeks and 6 weeks, respectively (experiment III)

Group	No. of exam.	Cumulative No. of death in days post-inoculation												Survival time (Mean $\pm$ S.D.)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Control	20	—	—	—	—	—	2	5	14	17	18	18	19	8.1 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
Sham-splenectomized	20	—	—	—	—	—	—	3	11	17	18	—	—	8.3 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
Splenectomized	20	—	—	—	—	—	—	3	7	17	19	—	—	8.6 $\pm$ 0.9

a, b: Student's t-test;  $p > 0.2$ ,  $p > 0.2$

가 사망하였으며 평균생존기간은 8.3일이었다. 비장적출군의 경우에는 7~10일 사이에 95%(19/20)가 사망하였으며 평균생존기간은 8.6일로 대조군 및 sham군과 비교할 때 통계학적인 유의성이 없었다( $p > 0.2$ ,  $p > 0.2$ , Table 3, Fig. 4).

2. 생쥐 혈청내 항체의 검출

*N. fowleri* 감염 후 뇌수막염이 발생한 생쥐에서 사망하기 직전에 혈청을 채취하여 double gel immunodiffusion을 실시하였는데 그 결과 항원-항체 복합체 (antigen-antibody complex)의 2중으로 된 침강대를 확인할 수 있었다.

3. 혈청단백질 분획의 비교

본 실험에 사용한 생쥐에서 *N. fowleri*를 감염시키기 전과 감염시킨 후 혈청을 분리하여 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 실시한 결과 혈청단백질

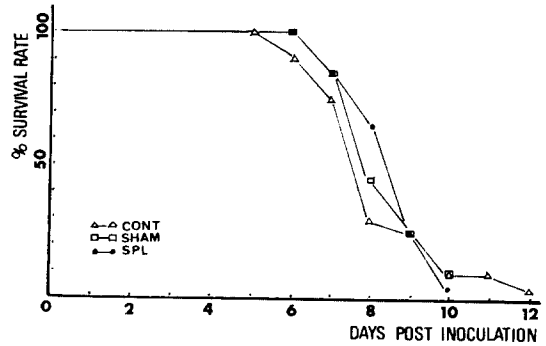


Fig. 4. Curve of survival rate in mice inoculated intranasally with *N. fowleri*; splenectomy and infection at the age 5 weeks and 6 weeks, respectively (experiment III).

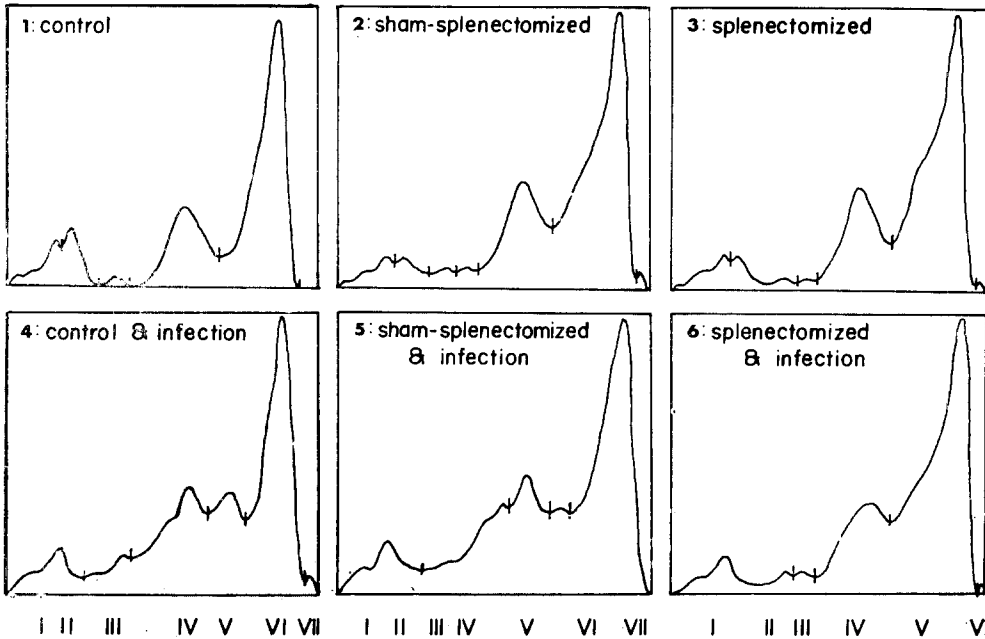


Fig. 5. Serum protein fractions by polyacrylamide gel electrophoresis obtained in each experimental groups and scanning by densitometer at 525nm wave length.

분획은 다음과 같은 차이가 있었다.

1) 비장을 적출한 후 *N. fowleri*를 감염시키기 전 채취한 혈청중, 대조군(1)에서 분획 III, IV가 sham군(2)과 비장적출군(3)에 비하여 다르게 나타났다(Fig. 6).

2) 비장을 적출한 후 *N. fowleri*를 감염시켜서 뇌수막염으로 인하여 사망하기 직전에 채취한 생쥐의 혈청중, 대조군(4)과 sham군(5)에서 분획 II, III, V가 비장적출군(6)의 분획과 달랐다(Fig. 5).

3) 대조군(1)과 sham군(2)에서 *N. fowleri*를 감염시키기 전의 혈청과 감염되어 뇌수막염이 발생한 혈청

(4, 5)과는 각각 분획 I, III, IV, V가 다르게 나타났다(Fig. 6).

4) 비장적출군에서 *N. fowleri*를 감염시키기 전의 혈청(3)과 감염되어 뇌수막염이 발생한 혈청(6)과는 분획 I에서 차이가 있었다(Fig. 6).

고 찰

자연환경속에서 자유생활을 하는 아메바종 *Naegleria sp.*와 *Acanthamoeba sp.*는 치명적인 원발성 아메바성 뇌수막염을 발생시킨다고 알려져 있으며 세계의 각지

에서 분리되어 그 병원성이 인정되었다(Carter *et al.*, 1968, 1970; Culbertson, 1971; Tayler, 1977; Lawande *et al.*, 1979). 우리나라에서는 황등(1976)이 서울주변의 강과 하수에서 자유생활아메바를 분리해냈으며, 실험동물에 감염시켜서 그 병원성을 인정하였다.

Wong등(1975)은 생쥐, 원숭이, 토끼 그리고 guinea pig등의 실험동물에 따라 *N. fowleri*의 병원성이 다르고, 또 *N. fowleri*의 주(株, strain), 그리고 감염시키는 방법에 따라 병원성이 다르다고 하였다. 본 실험에서는 *N. fowleri*에 감염되었을 때 원발성 아메바성 뇌수막염이 잘 발생된다고 알려진 생쥐를 사용하였다.

*N. fowleri*의 감염방법에 대해서는 실험동물의 비강내, 두개강내, 척수강내, 혈관내 또는 복강내로 직접 주입하면 그 병원성이 나타난다고 보고하였다(Butt *et al.*, 1968; Culbertson *et al.*, 1968; Carter, 1970; Martinez *et al.*, 1973; Wong *et al.*, 1975). 본 실험에서 *N. fowleri*의 감염은 마취된 생쥐의 비강내로 떨어뜨렸으며 이것은 자연환경 속에서 우리가 감염될 수 있는 경우이기도 하다(Carter, 1970; Lawande *et al.*, 1979).

일반적으로 *N. fowleri*에 감염된 지 약 1주일 후 부터 사망하기 시작하는데 주로 뇌수막염에 의한 것이고 때때로 폐염이 발생한다고 하였다(Willert와 Stevens, 1980). 본 실험에서도 원발성 아메바성 뇌수막염과 폐염의 발생을 관찰할 수 있었는데, 폐염의 발생은 실험동물의 불완전한 마취로 호흡이 안정되지 못하여 발생한 흡인성 폐염으로 생각한다.

Oster등(1980)은 *Plasmodium yoelii*를 비장을 적출한 생쥐와 선천적으로 비장이 없는 생쥐에 감염시켜서 그 사망율을 조사하였는데 실험군에서 사망율이 높았다고 하였다. Ghadirian과 Meerovitch(1981)도 *E. histolytica*(이질아메바)를 Hamster의 간장에 주입하여 간농양을 발생시키기 전에 비장을 적출한 후 수술회복 기간별로 그 영향에 대해 실험하였는데, 수술당시와 수술후 1주일 후에 감염시켰을 때 비장이 적출된 실험군에서 간농양의 크기가 더 커져 있었음을 관찰하였다. 본 실험에서 비장을 적출한 후 1주일과 3주일에 *N. fowleri*를 감염시킨 결과 대조군, sham군 그리고 비장적출군 사이에 사망율과 평균 생존기간의 차이가 통계학적으로 유의성이 없었다.

한편으로 비장을 적출한 후 *N. fowleri*를 감염시켜서 뇌수막염이 발생된 생쥐에서 혈청을 분리하여 전기영동법을 실시한 결과, 비장을 적출한 실험군에서 혈청단백질분획 II, III, V가 대조군과 달랐으며 또, 비장을 적출한 후 *N. fowleri*를 감염시키기 전에 채취한 혈청에서는 분획 III, IV가 대조군이 sham군과 비장적출군에 비해 다르게 나타났다. 이것은 아마도 수술자체에 의한 것이라고 생각한다. 본 실험에서 혈청단백질분획이 서로 다르다고 할 지라도 생쥐의 사망율에는 영향을 주지 못한다는 것을 알 수 있었는데 그 이유에

대하여 다음 몇가지로 생각할 수 있다. 우선 위의 많은 실험(Shinefield *et al.*, 1966; Coil *et al.*, 1978; Amsbaugh, 1978; Dickerman *et al.*, 1979a, b; Oster *et al.*, 1980; Ghadirian과 Meerovitch, 1981; Hosea *et al.*, 1981; Hebert *et al.*, 1983)에서 감염시킨 방법들이 병원체를 혈액내로 직접 주입하였기 때문에 직접적으로 비장의 기능과 연관이 있었던 것이 아닌가 생각하며, 본 실험에서의 감염시킨 방법은 비강내로 *N. fowleri*를 주입했으므로 비장의 방어기능의 영향을 덜 받았을 것으로 사료된다. 세포성 면역을 담당하는 흉선을 적출한 후 *N. fowleri*를 감염시킨다면 사망율의 차이를 기대할 수 있을 것이다. 또 혈액, 폐장이나 간장등에서 병변을 일으키는 병원체를 감염시켰을 경우, 비장을 적출하였을 때 그 병변의 발생 정도에 있어서 차이가 있을 것으로 생각하나(Oster *et al.*, 1980; Ghadirian과 Meerovitch, 1981; Hebert *et al.*, 1983) 본 실험실에서는 생쥐의 사망의 직접적인 원인이 뇌수막염으로 병변 부위가 뇌, 즉 중추신경계라는 점이다. 또한 *N. fowleri*를 감염시키려는 약 1주일 후 부터 급성적으로 뇌수막염이 발생되어 사망하게 되는데 이와 같은 병변이 만성적으로 발생하게 된다면 사망율의 차이를 기대할 수 있을 것이다.

본 실험에서 *N. fowleri*를 생쥐의 비강내로 떨어뜨려 원발성 아메바성 뇌수막염을 발생시킬 수 있었으며 비장을 적출하여도 이와같은 병변으로 인한 생쥐의 사망율과 생존기간에는 영향을 주지 못했음을 알 수 있었다.

## 요 약

자유생활아메바종 병원성이 강한 것으로 알려진 *Naegleria fowleri*영양형  $5 \times 10^4$ 개를 생쥐의 비강내로 감염시켜서 원발성 아메바성 뇌수막염을 발생시켰다. 그런 과정중 비장을 적출하여 그 영향에 대하여 생쥐의 체중과 수술후 회복기간별로 뇌수막염에 의한 사망율과 평균생존기간을 비교하였다. 또 생쥐의 혈청중 면역확산법으로 항체의 형성여부를 관찰하였으며, 각 실험군에서 채취한 혈청을 전기영동법을 실시하여 혈청단백질분획을 비교하였다. 본 실험결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 생후 3주째에 비장을 적출하고 1주일 후에 *N. fowleri*로 감염시킨 실험 I에서 대조군, sham군, 비장적출군 사이의 사망율은 각각 100%, 85%, 95%이었으며, 평균생존기간은 7.3일, 7.5일, 7.8일이었다.
2. 생후 3주째에 비장을 적출하고 3주일 후에 *N. fowleri*를 감염시킨 실험 II에서 대조군, sham군, 비장적출군 사이의 사망율은 각각 95%, 95%, 95%이었으며, 평균생존기간은 12.1일, 11.5일, 11.5일이었다.
3. 생후 5주째에 비장을 적출하고 1주일 후에 *N. fowleri*를 감염시킨 실험 III에서 대조군, sham군, 비

장적출군 사이의 사망율은 각각 95%, 90%, 95%이었으며, 평균생존기간은 8.1일, 8.3일, 8.6일 이었다.

4. 원발성 아메바성 뇌수막염이 발생된 생쥐의 혈청을 면역확산법을 실시한 결과, 항원-항체 복합체의 2중으로 된 침강대를 관찰하였다.

5. 혈청단백질분획의 비교는 다음과 같았다.

1) 비장을 적출한 후 *N. fowleri*를 감염시키기 전에 채취한 혈청중, 대조군에서 분획 Ⅲ, Ⅳ이 sham군과 비장적출군에 비하여 다르게 나타났다.

2) 비장을 적출한 후 *N. fowleri*를 감염시켜서 뇌수막염을 발생시킨 생쥐의 혈청에서는 대조군과 sham군의 분획 Ⅱ, Ⅲ, Ⅴ가 비장적출군과 달랐다.

3) 비장을 적출한 후 *N. fowleri*를 감염시키기 전에 채취한 혈청과 감염시킨 후 뇌수막염에 의하여 사망하기 직전에 채취한 혈청사이에서는 분획 Ⅰ, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ가 다르게 나타났다.

이상의 결과로 보아, 병원성이 강한 *N. fowleri* 영양형을 생쥐의 비강내로 떨어뜨려 원발성 아메바성 뇌수막염을 발생시킬 수 있었고, 비장을 적출하던 혈청단백질분획에는 차이를 나타낼지라도 생쥐의 사망율과 평균생존기간에는 아무런 영향을 주지 않았음을 알 수 있었다.

<이 실험의 처음부터 끝까지 많은 도움을 준 한양대학교 의과대학 기생충학교실 尹松老 선생을 비롯한 교직원들께 감사합니다.>

### 참 고 문 헌

- Amsbaugh, D.F., Prescott, B. and Baker, P.J. (1978) Effect of splenectomy on the expression of regulatory T-cell activity. *J. Immunol.*, **121**(4):1, 483-1, 485.
- Butt, C.G., Baro, C. and Krorr, R.W. (1968) Pathologic progress in amoebic encephalitis. *Am. J. Clin. Path.*, **50**:568-574.
- Carter, R.F. (1968) Primary amoebic meningoencephalitis; Clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J. Path. Bact.*, **96**:1-25.
- Carter, R.F. (1970) Description of a *Neogleria species* isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Path.*, **100**:217-244.
- Coil, J.A., Dickerman, J.D. and Boulton, E. (1978) Increased susceptibility of splenectomized mice to infection after exposure to an aerosolized suspension of type Ⅲ *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **21**(2):412-416.
- 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.
- Culbertson, C.G. (1971) The pathogenicity of soil amoebas. *Annu. Rev. Microbiol.*, **25**:231-254.
- Derrick, E. (1948) A fatal case of generalized amoebiasis due to a protozoan closely resembling if not identical with *Iodamoeba butschlii*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **42**:191-198.
- Dickerman, J.D., Bolton, E., Coil, J.A., Chalmer, B.J. and Jakab, G.J. (1979) Protective effect of prophylactic penicillin on splenectomized mice exposed to an aerosolized suspension of type Ⅲ *Streptococcus pneumoniae*. *Blood*, **53**(3):498-503(a).
- Dickerman, J.D., Horner, S.R., Coil, J.A. and Gump, D.W. (1979) The protective effect of intraperitoneal splenic autotransplants in mice exposed to an aerosolized suspension of type Ⅲ *Streptococcus pneumoniae*. *Blood*, **54**(2):354-358(b).
- Garnham, P.C.C. (1970) The role of the spleen in protozoal infections with special reference to splenectomy. *Acta Trop.*, **27**:1-13.
- Ghadirian, E. and Meerovitch, E. (1981) Effect of splenectomy on the size of amoebic liver abscesses and metastatic foci in hamsters. *Infect. Immun.*, **31**(2):571-573.
- Hebert, J.C., Ganell, R.L., Dickerman, J.D., Chalmer, J.B., Gump, D.W. and Foster, R.S. (1983) Lack of protection by pneumococcal vaccine after splenectomy in mice challenged with aerosolized Pneumococci. *J. Trauma*, **23**(1):1-6.
- Hosea, S.W., Brown, E.J., Burch, C.G., Berg, R.A. and Frank, M.M. (1981) Impaired immune response of splenectomized patients to polyvalent pneumococcal vaccine. *Lancet*, **11**:804-807.
- Lawande, R.V., Abraham, S.N., John, I. and Egler, L.J. (1979) Amoebas from the nasal passages of children during the dusty harmattan period in Zaria. *A.J.C.P.* (Feb.), :201-203.
- Lawande, R.V., John, I., Bobbs, R.H. and Egler, L.J. (1979) A case of primary amoebic meningoencephalitis in Zaria, Nigeria. *A.J.C.P.* (May), :591-594.
- Martinez, J.A., Duma, R.J., Nelson, E.C. and Moretta, F.L. (1973) Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: A light and electron microscope study. *Lab. Invest.*, **29**:121-133.
- Nowotny, A. (1979) Basic exercises in immunochemistry. 2nd, 232-234.
- Oster, C.N., Koontz, L.C. and Wyler, D.J. (1980) Malaria in asplenic mice—effects of splenectomy,

- congenital asplenia, and splenic reconstitution on the course of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**(6):1138-1142.
- Shinefield, H.R., Steinberg, C.R. and Kaye, D. (1966) Effect of splenectomy on the susceptibility of mice inoculated with *Diplococcus pneumoniae*. *J. Exp. Med.*, **123**:777-794.
- Taliaferro, W.H. (1956) Functions of the spleen in immunity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **3**:391-410.
- Taylor, P.W. (1977) Isolation and experimental infection of free-living amoebae in freshwater fishes. *J. Parasitol.*, **63**:232-237.
- Visvesvara, G.S. and Balamuth, W. (1975) Comparative studies on related free-living and pathogenic amoebae with special reference to *Acanthamoeba*. *J. Protozool.*, **22**(2):245-256.
- 黃瀚琦, 尹德鎮, 任敬一, 蘇鎮璋 (1976) 자유생활 아메바의 병원성에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집, **9**(2):182-194.
- Willert, E. and Stevens, A.R. (1980) Experimental pneumonitis induced by *Naegleria fowleri* in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**(6):779-782.
- 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. Parasitol.*, **61**(2):109-208.
- Wong, M.M., Karr, S.L. and Balamuth, W.B. (1975) Experimental infections with pathogenic free-living amoebae in laboratory primate hosts: I. (B) A study on susceptibility to *Acanthamoeba culbertsoni*. *J. Parasitol.*, **61**(4):682-690.

= Abstract =

## Effect of Splenectomy on Development of Primary Amoebic Meningoencephalitis

Ho-Joon Shin, Kyung-Il Im

*Department of Parasitology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133, Korea*

and Rim-Soon Choe

*Department of Biology, College of Science, Yonsei University*

To elucidate the effect of splenectomy on the development of experimental primary amoebic meningoencephalitis in mice, the death rate and survival time of mice infected intranasally with *Naegleria fowleri* trophozoites  $5 \times 10^4$  cultivated in CGVS medium were compared according to the mouse age when splenectomy was done, and post-operation until experimental infection.

Immunodiffusion was undergone to detect the presence of serum antibody due to *N. fowleri* infection in mice. Polyacrylamide gel electrophoresis was done to compare the protein fractions of mouse serum in each experimental groups.

In experiment I, splenectomy was done 3 weeks and infection 4 weeks after birth, the death rate of control, sham operated and splenectomized group were 100%, 85% and 95%, and the mean survival time after infection 7.3 days, 7.5 days and 7.8 days, respectively.

In experiment II, splenectomy was undergone 3 weeks and infection 6 weeks after birth, the death rate of control, sham operated and splenectomized group were 95%, 95% and 95%, and the mean survival time after infection 12.1 days, 11.5 days and 11.5 days, respectively.

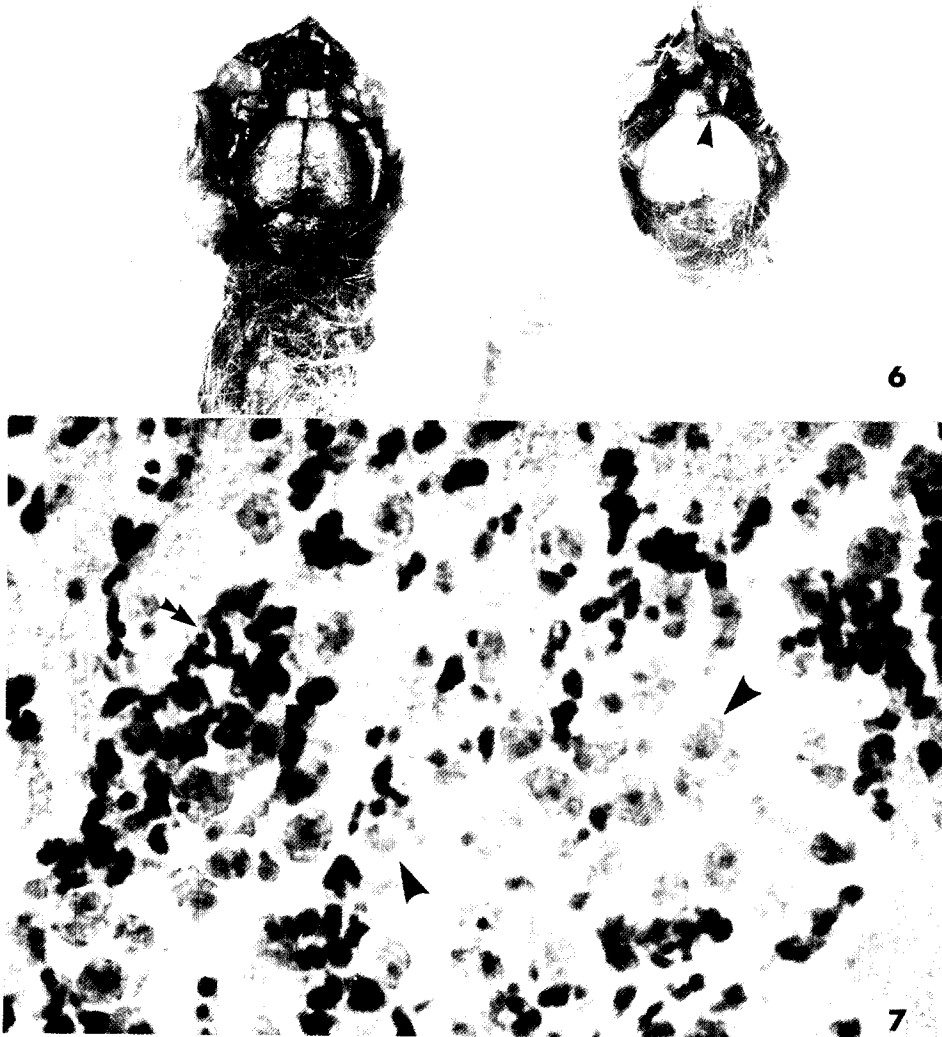
In experiment III, splenectomy was done 5 weeks and infection 6 weeks after birth, the death rate of control, sham operated and splenectomized group were 95%, 90% and 95%, and the mean survival time after infection 8.1 days, 8.3 days and 8.5 days, respectively.

By Ouchterlony immunodiffusion, anti-*N. fowleri* antibody in the serum of mouse with primary amoebic meningoencephalitis was detected against a *N. fowleri* antigen, which was prepared by ultrasonication of *N. fowleri* trophozoites, each reacting two lines of precipitation.

The patterns of serum fractions by polyacrylamide gel electrophoresis were different between control and sham operated groups from splenectomized group in fraction II, III and V, the sera of which were collected after *N. fowleri* infection.

This results may be summarized as that splenectomy has no effect on the development of primary amoebic meningoencephalitis in mice.





**Fig. 6.** Mouse brain infected with *N. fowleri* (right) showing edema, haemorrhage and necrosis, and left is normal.

**Fig. 7.** Mouse brain tissue showing numerous *N. fowleri* trophozoites (arrow heads) with the inflammatory cells infiltration (arrow).  $\times 400$