

Toxoplasma 면역모체로부터 출산된 신생마우스에 있어서 Vaccination 효능 저하

전북대학교 의과대학 미생물학교실

이 정 호 · 하 대 유

- Abstract -

Failure of *Toxoplasma* - Vaccination in Mice Born to Immune Mothers

Jeong-Ho Lee and Tai-You Ha

Department of Microbiology, Chonbuk National University, Medical School, Chonju, Korea

Female ICR mice were vaccinated against *Toxoplasma gondii*(RH strain), infected 2 weeks later and after recovery mated to normal ICR males. Control matings were with normal ICR females. The progeny of the above matings were weaned at 1 week, vaccinated at 1, 2, 3, 4 or 5 weeks of age and infected 2 weeks later with lethal *Toxoplasma* tachyzoites.

As assessed by survival, the effectiveness of vaccination among offspring of vaccinated-recovered mothers was greatly impaired than that of control mice, with respect of age: where mice did survive, recovery was greatly delayed relative to the controls.

The protective effect of vaccination among infants born to control mothers was also blocked by maternal specific antibodies, by administration of high-titered specific antibodies or by transfer of nylon wool adherent immune-spleen cells, but was augmented by transfer of nylon wool passed immune-spleen cells.

These results indicate that this impairment of vaccination may be due to the transmission of maternal specific antibodies to the offspring which acts to suppress both priming by the vaccine and the generation of parasite-specific helper T cells.

서 론

일반적으로 면역모체로부터 태반을 통해 모체 항체(IgG)가 태아에 이행되며, 이 모체이행항체에 의하여 태아는 출산 수개월간 malaria^{8,9,10}, poliomyelitis¹², measles⁴ 등과 같은 특이 병원체에 대한 저항이 유지된다. 그러나 면역모체로부터 출산한 신생아에 있어서, 이들 특이항원체에 대한 저항은 특이 항원으로 vaccination 시키면 오히려 소실된다고 알려져 있다^{4,5}. 그러나 아직까지 *Toxoplasma* 병에 있어서는 이에 대한 연구보고가 없는 듯하다.

따라서 저자는 *Toxoplasma*에 대한 특이항체도 태반을 통하여 태아에 전달되는지, 전달된다면 어느 때까지 체내에 존속하는지, 또한 본 항체가 *Toxoplasma*로 면역시 어떻게 작용하는지를 알아보기 위하여 실험하였던 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

전북대학교 의과대학 미생물학교실에서 번식사육한 체중 18~20 g된 ICR 마우스를 암수 구별없이 사용하였다.

Toxoplasma 항원

농촌진흥청 가축위생연구소에서 분양받아 본 교실에서 3일마다 마우스 복강내에 접종 계대중인 *Toxoplasma gondii*(RH주)를 Krahenbuhl¹¹의 방법에 따라 다음과 같이 처리하여 사용하였다. 간기하면, 계대접종 3일 후의 마우스 복강에 헤파린(100 unit/ml)을 가한 생리식염수 10 ml를 주입, 복강을 세척하여 총채부유액을 얻은 후 glass wool에 통과시켜 혼입된 복강세포를 제거하고 총채를 분리

한 다음 헤파린을 가한 생리식염수로 3 회 원심세척하였다. 그 후 색소시험 및 생존을 검사에는 상기 원심액을 바로 사용하였으며, 마우스에 면역 또는 보강주사하기 위해서는 상기와 같이 세척한 총체를 0.2% 포르마린-생리식염수에 5×10^7 세포/ml되게 부유하여 4°C에 보관 사용하였다.

Toxoplasma 면역

전보^{1,2)}의 성적을 참작하여 총체가 ml당 5×10^6 세포가 되게 조정된 포르마린처리 *Toxoplasma* 항원을 0.2 ml씩 미정맥내로 주입하여 면역하고, 보강주사는 면역 10일에 각 마우스의 복강내에 면역시와 같은 농도의 항원을 주사하였다.

면역마우스의 감염에 대한 방어력 측정

Toxoplasma 면역마우스 또는 이들로 부터 출산된 신생마우스를 출산 후 주령별로 *Toxoplasma* 로 면역한 다음, 보강주사하고 그 10일에 생충(2×10^3 cells/mouse)를 복강내로 접종 감염시켰다. 그 후 이들 마우스의 생존율을 경시적으로 관찰하여 감염에 대한 방어력을 평가하였다.

색소시험

혈청내 색소시험항체가의 측정은 Ivey 가 기술한 방법⁶⁾에 준하여 실시하였다. 간기하면 생리식염수로 4 배 계열 희석한 가검혈청 0.1 ml에 *Toroplasma*-heparin-accessory factor 혼합액 0.1 ml를 가하여 37°C에 1 시간 방치한 다음 alkaline-methylene blue 액 0.1 ml를 가하여 혼합하고 그 1 적을 초자판에 놓아 검사하였다. 이때 50% 이상의 총체가 비염색된 최고혈청희석도를 색소시험역가로 판독하였다.

면역비장세포와 그의 투여

Vaccine의 효능에 미치는 전가비장세포의 성상을 구명하기 위하여 면역 10일에 보강주사한 다음 2 일된 마우스로 부터 비장을 적출, Dulbecco phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에서 초자판으로 조심스럽게 압착하여 비장세포부유액을 만든 다음, nylon mesh로 여과하여 세포피를 제거하고 PBS로 2회 원심세척하여 비장세포가 1×10^7 세포/ml의 농도가 되도록 조정하였다. 그 후 Julius등⁷⁾의 방법에 준하여 비장세포를 nylon wool 부착능에 따라 nylon wool 부착 및 비부착성 세포로 분리하여 사용하였는데 그 분리방법을 간기하면 다음과 같다. 즉 1 g의 nylon wool (Frenwal Laboratories,

Table 1. Protection by vaccination against *Toxoplasma* infection in offspring of immune-mothers and normal-mothers

Offsprings from	Age (wks)	Vaccination	No. of mice	Survivors				
				on day 5	10	after 15	initial 20	infection 25
Vaccinated-recovered-mothers	1	-	4	4	3	0	0	0
		+	5	2	1	0	0	0
	2	-	6	5	4	2	1	1
		+	8	3	2	1	0	0
	3	-	4	4	3	3	1	1
		+	5	4	4	3	2	0
	4	-	7	4	3	0	0	0
		+	8	5	5	4	4	4
	4	-	6	3	2	0	0	0
		+	7	6	6	6	5	5
Dye test-negative-mothers	1	-	5	4	0	0	0	0
		+	5	4	3	0	0	0
	2	-	5	3	0	0	0	0
		+	4	3	3	3	2	2
	3	-	5	4	0	0	0	0
		+	5	4	4	3	3	3
	4	-	5	2	0	0	0	0
		+	5	5	5	4	4	4
	5	-	5	3	0	0	0	0
		+	5	5	5	5	5	5

Mice born to immune- or control-mothers were vaccinated at indicated age and infected two weeks later with 2×10^3 toxoplasma tachyzoites by ip injection.

Table 2. Effect of passive transfer of antisera and immune spleen lymphocytes on the protection against *toxoplasma* infection in offspring of dye-test negative mothers

Transfer with	Vaccination	No. of mice	Survivors on days after initial infection		
			5	10	15
None	-	4	3	0	0
	+	4	3	3	3
Antisera	-	8	5	2	0
	+	8	4	0	0
Nylon-adherent cells	-	8	5	1	0
	+	8	5	0	0
Nylon-nonadherent cells	-	8	6	4	2
	+	8	8	7	7

Four-weeks aged mice born from normal mothers were transferred iv 0.5 ml of antisera (dye-test titer : 1:2560) or 0.5 ml of immune spleen cell populations (2×10^6 cells/mouse) at 6 hrs before vaccination (1×10^6 formalized-toxoplasma, iv), and infected 2 weeks later with 2×10^3 toxoplasma by ip injection.

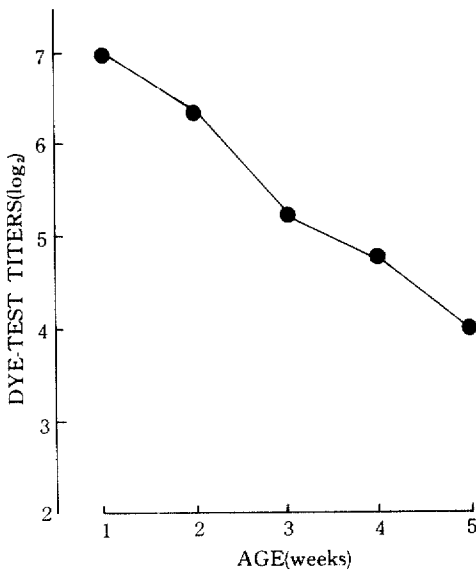


Fig. 1. Specific antibody titers in offspring of immune mothers. At each point, five mice were randomly selected from 1 litters and their sera pooled. The lowest titers considered to be parasite-specific was four.

Morton Grove)이 5 ml 눈금의 수준으로 들어 있는 12 ml들이 plastic 주사기를 RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island)에 streptomycin(100 µg/ml), penicillin(100 unit/ml) 및 우태아혈청(FCS, 10% v/v) 을 가한 배지 (이하 FCS-RPMI라 약) 50 ml로 세척하고 전술한 바와 같이 준비한 비장세포부유액 5 ml (5×10^6 세포/ml)를 넣어 37°C, 5% CO₂F 하에서 45분간 방치한 다음 30 ml의 30°C FCS-RPMI로 1 ml/min의 속도로 유리(elution)시켜 nylon wool 비부착

성 세포를 얻었다. 이때 유리된 세포는 원 부유액의 20~25% 가량이었다. Nylon wool 부착성 세포의 수확은 비장세포가 부착된 nylon wool을 FCS-RPMI에서 세척계 5분간 흔들어 부착세포를 탈락시켜 얻었는데 이때 세포의 회수율은 원부유액의 50~60%이었다.

비장세포의 투여는 상기와 같이 작조한 nylon wool 부착성 및 비부착성 세포를 각각 4×10^6 세포/ml의 농도로 PBS에 부유하여 그 0.5 ml를 마우스에 *Toxoplasma*로 면역하기 6시간 전에 미정맥 내로 주사하여 실시하였다.

성 적

면역모체로 부터 출산된 신생마우스에 있어서 *Toxoplasma* vaccination의 효과

모체이행항체가 마우스를 *Toxoplasma*로 면역시 감염에 대한 저항력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 색소시험 음성모체로부터 출산된 신생마우스 및 면역모체로부터 출산된 신생마우스를 출산주령 별로 구분하여 면역을 실시하고 면역 2주에 생충을 감염시켜 경시적으로 생존율을 관찰하였던 바, 그 결과는 제 1표와 같다. 즉 색소시험 음성모체로부터 출산된 신생마우스는 면역하지 않을 경우 감염마우스 모두가 감염 10일 이내에 폐사하였으나, *Toxoplasma*로 면역을 실시하면 출산주령이 지난 마우스일수록 생존율이 증가되어 출생 5주령의 마우스는 대부분이 전관찰기간동안 생존하였다. 그러나 면역모체로 부터 출산된 신생마우스는 면역을 실시하지 않을 경우, 항체음성모체로 부터 출산된 동주령의 마우스에 비하여 생존기간이 길었으나, 면역을 실시한 경우는 항체음성모체로 부터 출산된 동

주령의 마우스에 비하여 오히려 생존기간이 단축되어, 면역항체로부터 출산된 신생마우스는 대조마우스에 비하여 감염에 대한 방어력은 다소 증가되거나 vaccine의 효과는 오히려 저하된 결과를 보였다.

면역모체로부터 출산된 신생마우스의 혈청중 항체가

면역모체로부터 출산된 신생마우스에 있어서 vaccine의 효과가 저하된 원인을 구명하기 위하여 이들 마우스의 주령별 혈청항체가를 측정하였던 바, 그 결과는 그림 1에서와 같이 출생직후엔 높은 항체가를 보이다가 주령이 지남에 따라 점차 소실되어 출생 5주령에는 거의 항체가 검출되지 않았다.

고역가항체 및 면역임파구의 전가가 vaccine의 효과에 미치는 경향

면역모체로부터 출산된 신생마우스에 있어서 vaccine의 효과저하와 혈청중 항체가가 밀접한 관계를 보인 위의 실험성적을 확인하고 그 기전을 구명하기 위하여 색소시험항체음성 모체로부터 출산한 4주령의 마우스에 고역가의 항 *Toxoplasma* 혈청(역가 1:2560)을 투여하거나 면역임파구를 nylon wool을 이용하여 nylon wool부착성 및 비부착성 임파구로 분획하여 이를 각각 전가시켰던 결과, 제 2표에서와 같이 항혈청 또는 nylon wool부착임파구를 투여한 후 면역한 마우스에서는, 면역하지 않은 마우스에 비하여 오히려 생존율이 저하되었으나, nylon 비부착성 임파구를 전가한 경우는 현저히 생존율이 증가되었는데, 그 증가는 비면역군에서 보다 면역군에서 더욱 높았다.

고 찰

본 실험에서 면역마우스 또는 비면역 마우스로부터 출산된 신생마우스에 출산후 주령별로 *Toxoplasma*로 면역을 실시한 다음, 생충을 감염시켰던 결과(제1표) 면역모체로부터 출산된 마우스의 경우, 비면역모체로부터 출산된 마우스에 비하여, 면역을 실시하지 않은 상태에서 생충을 감염시키면 출산후 5주령까지는 어느 정도 감염에 대한 저항을 보였다. 그러나 이들에 주령별로 면역을 실시하면 비면역모체로부터 출산된 마우스에서 보다 면역모체로부터 출산된 마우스에서 폐사율이 높았다. 이와 같은 결과는 Harte^등의 malaria를 모델로 실험한 경우에서와 같은 기전으로 일어날 수도 있으리라 생각되어 면역모체로부터 출산된 마우스를 대상으로 주령별로 혈청내 색소시험항체를 측정하였던 바(그림 1), 생후 1주에는 높은 항

체가를 유지하다가 주령이 지남에 따라 서서히 혈청내의 항체가가 감소되어 제 5주령의 경우에는 색소시험양성 기준치의 최저치(<1:16)로 감소되었다. 이와 같은 실험결과로 미루어 면역모체로부터 출산된 5주령미만의 마우스에서 vaccination이 실패한 것은 모체이행항체와 밀접한 관계가 있었음을 제시한다. 따라서 이를 더욱 체계적으로 확인하기 위하여 색소시험음성모체로부터 출산된 4주령마우스에 고역가의 특이항체(1:2560)을 투여하거나, 면역비장임파구를 nylon wool column에 통과시켜, nylon 비부착성 임파구 또는 부착성 임파구를 전가시킨 다음 *Toxoplasma*로 면역을 실시한 결과(제 2표) nylon 비부착성 임파구를 전가하면 방어력이 항진되었으나, nylon부착성 세포 또는 고역가혈청을 투여하면 오히려 방어력이 소실되어 높은 폐사율을 보였다.

이상의 결과로 *Toxoplasma*에 대한 면역시 항체 또는 nylon wool부착성 세포는 감각항원의 효능을 오히려 blocking시킴을 알수 있었다. 그러나 이와 같이 혈청항체가가 감각항원의 효능을 저하시키는 기전에 대해서는 본 실험만으로는 알 수 없었으나 아마도 체내항체가 감각항원의 자극으로 급속히 생산이 촉진되어 면역항원의 항원성을 억제하거나 제거시킨 결과¹²⁾라고 볼 수도 있으며, 한편 feedback mechanism에 의하여 항체생산세포의 증식을 억제시킨 결과¹³⁾라고도 생각할 수 있으며, 고역가의 모체이행항체에 의하여 특이 suppressor cell이 generation되므로서 야기될 수도 있으리라 생각할 수 있다. 따라서 이에 대한 추사가 있어야 되리라고 사료된다.

결 론

*Toxoplasma gondii*에 대한 면역시 모체이행항체가 vaccine의 방어효능에 미치는 영향을 구명하기 위하여 면역모체로부터 출산된 신생마우스와 대조신생마우스에 주령별로 본 층으로 면역을 실시한 후 생충을 감염시켜 생존율을 측정 비교하고, 면역모체로부터 출산된 신생마우스의 주령별 색소시험항체가를 측정함과 아울러 고역가 특이항체를 투여하거나 면역임파구를 전가하여 이들이 vaccine의 효능에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 신생마우스를 면역시 모체이행항체가 존재하거나 고역가항혈청 또는 nylon부착성 면역임파구를 투여하면 감염에 대한 방어력이 저하되나 nylon 비부착성 면역임파구를 전가하면 방어력이 증가되었다. 따라서 면역시 모체이행항체는 vaccine의 효능손상과 밀접한

관계가 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 이정호 · 하대유 : *Taxoplasma gondii* 로 면역한 마우스에 있어서 대식세포유주저지시험에 의한 지연성과민반응 측정. 전북의대논문집 4 : 23, 1980.
- 2) 이정호 · 하대유 : 색소시험 양성인의 *Taxoplasma-rosette* 형성능. 전북의대논문집 5 : 53, 1981.
- 3) Cohen S, McGregor LA and Carrington S: Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 192 : 733, 1961.
- 4) Greenwood BM and Whittle HC : In immunology of medicine in the tropics(ed. by B.M. Greenwood, and H.C. Whittle)p. 257 : Edward Arnold, London, 1981.
- 5) Harte PG, De Souza JB and Playfair JHL: Failure of malaria vaccination in mice born to immune mothers. *Clin. Exp. Immunol.* 49 : 509, 1982.
- 6) Ivey MH : Laboratory procedures in parasitology. In Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. Ed. by Frankel, S, Reitman S and Sonnenwirth, AC, 7th ed., The C.V. Mosby co., Saint Louis pp. 176 - 1787, 1976.
- 7) Julius MH, Simpson E and Herzenberg LA : A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 3 : 645, 1973.
- 8) Krahenbuhl JL, Ruskin J and Remington JS: The use of killed vaccine in immunized against an intracellular parasites : *Taxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 108 : 425, 1972.
- 9) McGregor LA, Williams K, Voller K and Bill-ewics, WZ : Immunofluorescence and the measurement of immune response to hyperendemic malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 59 : 395, 1965.
- 10) Molineaux L, Cornille-Brogger R, Mathous H M and Storey J : Longitudinal serological study of malaria in infants in the West African savanna. Comparisons of infants exposed to or protected from transmission from birth. *Bull. WHO* 56 : 573, 1978.
- 11) Moller G and Wigzell H : Antibody synthesis at the cellular level. Antibody induced suppression of the 19s and the 7s antibody response. *J. Exp. Med.* 121 : 696, 1965.
- 12) Perkins FT, Yetts R and Gaisford W: Response of infants given a third dose of poliomyelitis vaccine ten to twelve months after primary immunization. *Br. Med. J.* 1 : 197, 1959.
- 13) Solomon JB : Foetal and neonatal immunology. In *Frontiers of Biology*(ed. by E.L. Tatum. and A. Neuberger) Vol. 20. North Holland, Amsterdam 1971.