기 생 충 학 잡 지 제26권 제1호
The Korean Journal of Parasitology
Vol. 26, No. 1, 39-40, March 1988

비장절제 마우스에서 *Naegleria fowleri* 감염에 대한 면역효과

연세대학교 의과대학 내과학교실 및 한양대학교 의과대학 기생충학교실*

한 광 협 · 안 명 희* · 민 득 영*

요 약 : 비장적출된 BALB/c 마우스에 동종항원으로 면역접종하였을 때 병원성 자유생활 아메바, 즉 *Naegleria fowleri* o 359의 감염에 의한 사망률, 생존기간을 항체생성과 관련하여 관찰함으로써 비장적출이 숙주의 체액성 면역기전에 어떤 영향을 미치는지 관찰하였다. 실험 Ⅰ군은 비장을 적출하고 면역후 감염, Ⅱ군은 비장적출후 감염, Ⅲ군은 면역후 감염, Ⅳ군은 대조군으로서 감염만 시킨 군 등으로 구분하여 $5\sim10\times10^5$ 아메바를 1주 간격으로 2회 복강내에 주입하여 면역접종하였으며 2회 접종 1주 후에 $5\sim10\times10^4$ 아메바를 비강내에 감염시켜 감염 31일까지 관찰하였다.

감염후 사망률은 면역된 Ⅰ 및 Ⅲ군에서 각각 38.1% 및 25%로 Ⅱ군 50%나 Ⅳ군 46.4%에 비해 낮았다. 사망한 마우스의 평균 생존기간은 Ⅰ군 20.1±3.6일, Ⅱ군 17.3±4.5일, Ⅲ군 20.4±7.0일 및 Ⅳ군 19.6±7.6일로 각 실험군간에 차이가 없었다. 감염 31일 후 혈중 IgG 항체가(ELISA치)는 면역군인 Ⅰ군 및 Ⅲ군에서 각각 1.10±0.29 및 1.31±0.28로 대조군의 0.24±0.37보다 훨씬 높았다 ($p<0.05$). 이러한 성적으로 보아 비장적출 마우스에서 면역후 *N. fowleri*를 감염시켰을 때 마우스 생존기간의 차이는 없으나 사망률은 면역시킨 군에서 낮아 비장적출후에도 체액성 면역이 방어기전으로 존재하는 것으로 생각되었다.

Key words: *Naegleria fowleri*, splenectomized mice, immunization effect, serum IgG antibody

서 론

Naegleria fowleri(이하 *N. fowleri*로 약함)는 토양, 하천, 공기 등 자연환경에 널리 존재하는 병원성이 인정되는 자유생활 아메바로 인체에 감염되었을 경우 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)을 일으킨다(Derrick, 1948; Carter, 1970). 이 원충의 감염은 주로 비강을 통해 이루어지며 비점막과 사상판을 뚫고 후신경을 따라 중추신경계를 침범하여 후엽(olfactory lobe)을 비롯한 뇌의 기저부에 괴사성 출혈성 수막뇌염을 일으키는 것으로 알려지고 있다(Martinez *et al.*, 1973). 따라서 이 원충에 대한 생물학적 연구 뿐만 아니라 숙주내에서의 병리현상 및 숙주의 면역반응에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다.

Adams *et al.* (1976)은 마우스에 *N. fowleri*를 복강내 또는 혈관내로 접종시킨 후 *N. fowleri*를 감염시키면 면역시키지 않은 대조군에 비해 저항력이 증가된다고 하였으며, Thong *et al.*(1978)도 살아있는 아메바 영양형, 아메바 lysate 또는 아메바를 배양한 배양액을 복강내에 접종한 후 *N. fowleri*를 감염시키면 감염 마우스의 사망률이 현저히 감소한다고 하였다. 이는 *N. fowleri* 감염에서 항체가 중요한 역할을 하며 면역을 시행함으로써 인위적으로 항체형성을 유발시킬 수 있음을 입증한다.

인체에서 비장은 면역계의 중요한 기능을 담당하며, 비장을 적출할 경우 면역기능의 저하로 세균침입을 받기 쉽고 심한 균혈증으로 사망할 수도 있으며(Francke *et al.*, 1981), 드물게는 malaria나 babesiosis 등에 걸리기도 한다(Rosner *et al.*, 1984). 그러나 비장을 적출한 후에 polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine을 투여할 경우 이 세균의 감염을 예방할 수 있다고 하여(Ruben *et al.*, 1984) 비장 제거후에도 체액성 면역의 인위적 증강 가능성을 제시하고 있다. 그러나 Hosea *et al.*(1981)은 예방접종을 하여도 비장 적출시에는 항체형성이 저하되어 면역효과를 크게 기대할 수 없다고 하여 비장적출후 예방접종의 면역효과에 대해서는 아직까지 논란의 여지가 많다.

이 연구에서는 마우스에서 비장을 절제하고 *N. fowleri*로 면역을 시행하여 항체생성이 잘 이루어지는가를 관찰하고, 또한 면역후 *N. fowleri*를 감염시켰을 때 사망률을 관찰함으로써 비장적출이 숙주의 면역계에 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. *N. fowleri*의 배양

이 실험에 사용된 *N. fowleri* o 359주는 (Belgium, Jardin J.B. 교수 제공) 원발성 아메바성 수막뇌염 환자로부터 분리한 병원성이 강한 자유생활아메바로 37°C 배양기에서 casitone, glucose, vitamin, serum(CGVS; Willaert, 1976)배지에 배양하였다. CGVS 배지 처방

은 다음과 같다.

Bactocasiton 10 g, folic acid 1 mg, biotin 10 mg, glucose 0.5 g, penicillin 25×10^4 unit, streptomycin 25×10^4 mcg, fetal calf serum 25 mg, 증류수 500 ml.

2. 실험동물

실험동물은 생후 3~4주된 건강한 BALB/c 마우스를 사용하였다.

3. 실험군 및 대조군

실험 Ⅰ군 : 생후 3~4주에 비장절제를 시행하고 그 후 각각 두차례의 면역접종을 시행한 후 *N. fowleri*를 감염시킨 군

실험 Ⅱ군 : Ⅰ군과 같은 시기에 비장절제를 시행하고, 면역접종 없이 감염만 시킨 군

실험 Ⅲ군 : 비장절제 없이 생후 4~5주째부터 1주 간격으로 두차례 면역을 시행한 후 감염시킨 군

실험 Ⅳ군 : 대조군으로 비장절제나 면역을 시행하지 않고 생후 6~7주에 감염시킨 군

4. 마우스의 비장절제

생후 3~4주된 BALB/c 마우스를 체중 g당 0.05mg의 secobarbital로 마취시키고 개복하여 비장을 적출한 후 봉합하였다.

5. 마우스의 면역 및 감염

비장적출후 1주 및 2주에 계대배양된 *N. fowleri* 영양형을 생리식염수로 3회 세척하고 아메바 부유액을 만들어 마우스당 $5\sim10\times10^5$개씩 복강내로 주사하였다. 감염은 마우스를 secobarbital로 마취시키고 아메바 부유액을 만든 뒤 5×10^4개의 아메바를 비강에 떨어뜨려 감염시켰다.

6. 혈청내 항체가 측정

마우스의 혈청은 1차 면역후 1주, 2차 면역후 1주, 감염후 1주, 감염후 31일에 안와동내 정맥총에서 채혈한 후 원심침전시켜 얻었으며 사용전까지 −70°C에 보관하였다. 항혈청내 항체는 효소 표식 면역 검사법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA, Voller *et al.*, 1976)으로 측정하였다. 항원은 배양된 아메바를 생리식염수로 세차례 세척하고 sonicator(No. 9100 Labline ultra-tip Labsoni System, U.S.A.)로 분쇄하였다. 그후 10,000 r.p.m.에서 1시간 원심침전하여 상청액을 항원으로 사용하였다. 이 항원의 단백질 농도는 0.63mg/ml 이었다. 항체가 측정은 안등(1986)의 방법을 참고로 하였다. 즉 항원은 carbonate-bicarbonate buffer로 1 : 30으로, 마우스 혈청은 1 : 250으로, peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG(Cooper Biomedical Inc., U.S.A.)는 1 : 2,000으로 각각 희석하였다. 기질은 *o*-phenylenediamine을 사용하였고 ELISA reader (Dynatech Co., U.S.A)로 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 감염 마우스의 관찰

감염후 사망한 마우스를 부검하고 후구 및 뇌의 전

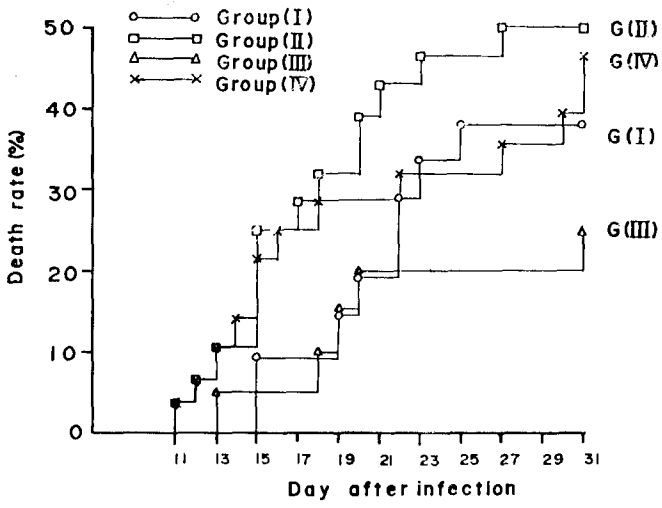

Fig. 1. Death rates of mice infected with *N. fowleri* after splenectomy and/or immunization. (Group Ⅰ : splenectomized and immunized, Group Ⅱ : splenectomized, Group Ⅲ : immunized, Group Ⅳ : not splenectomized nor immunized)

Table 1. Mortality and mean survival time of *N. fowleri* infected mice after splenectomy and/or immunization

Group	Splenectomy	Immunization	No. of mice examined	Day of individual death after infection	Mortality (%)	Mean survival time(day; mean±S.D.)
Ⅰ	done	done	21	15, 15, 19, 20, 22, 22, 23, 25, S*(13)	38.1	20.1±3.6
Ⅱ	done	not done	28	11, 12, 13, 15, 15, 15, 15, 17, 18, 20, 20, 21, 23, 27, S(14)	50	17.3±4.5
Ⅲ	not done	done	20	13, 18, 19, 20, 31, S(15)	25	20.4±7.0
Ⅳ	not done	not done	28	11, 12, 13, 14, 15, 15, 16, 18, 22, 27, 30, 31, 31, S(15)	46.4	19.6±7.6

* S: Number of mice alive on day 31 after infection

Table 2. Serum IgG antibody levels measured by ELISA technique after immunization and/or infection of *N. fowleri* in mice*

Group	Pre-immunization	Post-immunization		Post-infection	
		Primary	Secondary	Day 7	Day 31
Ⅰ	—	0.14±0.05	0.24±0.07	0.92±0.04	1.10±0.29
Ⅲ	—	0.20±0.09	0.50±0.09	—	1.31±0.28
Ⅳ	0.03±0.02	—	—	0.06±0.01	0.24±0.37

* Values are expressed as absorbances at 492nm(mean±S.D.)

두엽부위 조직의 일부를 CGVS 배지에서 배양하여 *N. fowleri*의 영양형을 관찰함으로써 아메바 감염을 확인하였으며, 31일 후에는 생존 마우스를 희생시켜 같은 방법으로 아메바 감염을 확인하고 사망률을 비교하였다.

실험 결과

1. 감염 마우스의 사망률

비강을 통한 *N. fowleri* 감염후 마우스의 사망률은 비장을 절제하고 감염시킨 실험 Ⅰ군은 38.1%, 비장 절제후 면역없이 감염시킨 실험 Ⅱ군에서는 50%, 비장 절제없이 면역만 시행한 후 감염시킨 실험 Ⅲ군은 25%, 아무 처치없이 감염시킨 대조군에서는 46.4%로 대조군에 비해 Ⅰ군 및 Ⅲ군에서 사망률이 감소하였다 (Table 1; Fig. 1).

2. 감염 마우스의 생존기간

사망한 마우스의 생존기간은 실험 Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ군 및 대조군에서 각각 20.1±3.6일, 17.3±4.5일, 20.4±7.0일, 19.6±7.6일로 각 군간의 차이가 없었다(Table 1; Fig. 1).

3. 마우스의 혈중 항체가 변동

면역 또는 감염후 마우스 혈중 IgG 항체를 ELISA법으로 측정하였을 때, 비장절제후 면역시킨 실험 Ⅰ군의 ELISA치는 1차 면역 1주 후에 0.14±0.05, 2차 면역 1주 후에 0.24±0.07, 감염 1주 후에 0.92±0.04, 그리고 감염 31일 후에 1.10±0.29로 차차 증가하였다. 비장 절제없이 면역만 시행한 실험 Ⅲ군의 ELISA치는 1차 면역 1주후에 0.20±0.09, 2차 면역 1주후에 0.47±0.09, 그리고 감염 31일 후에 1.31±0.28로 항체가가 점차 증가하였다. 또 정상대조군의 항체가는 감염전에 0.03±0.02, 감염 1주 후에 0.06±0.02, 그리고 감염 31일 후에 0.24±0.37로 (Table 2), Ⅰ군 및 Ⅲ군에서 면역접종에 의해 항체가가 높아짐을 알 수 있었다.

고 찰

자유생활아메바인 *N. fowleri*의 감염때 숙주의 방어기전에 의해 혈중의 항체가 증가되는데(임등, 1978; Reilly *et al.*, 1983), 이는 주로 IgM과 IgG로서, 감염 초기에는 IgM 항체가 증가하고 감염 후기에는 IgG 항체가 증가한다(Haggerty *et al.*, 1982). 또 최근에는 *N. fowleri* 감염시 세포매개성 면역이 관여한다는 보고 (Ferrante *et al.*, 1980; 김등, 1986; 박등, 1987)도 있어 *N. fowleri* 감염때 체액성 면역 뿐만 아니라 세포 매개성 면역도 숙주의 중요한 방어기전으로 작용하고 있다.

비장은 이물질을 여과시키는 기능과 함께 면역기관으로서의 역할을 수행하고 있어 비장이 적출되었을 경우 폐렴균, 수막구균 등의 세균성 감염에 의한 심한 패혈

증으로 사망케 되는 경우가 종종 있다(Ferrante *et al.*, 1980). 특히 5세 미만의 소아나 면역학적 질환이 있는 환자에서 비장을 적출했을 때 세균에 의한 패혈증이나 뇌막염의 위험이 더욱 높으며, 이것은 혈중에서 탐식작용에 의한 미세 병원체의 일차적인 제거기능의 상실, 혈중 항체 특히 IgM의 감소, 다핵세포의 탐식작용을 촉진하는 tufsin의 감소 및 보체활동의 대행로의 주요 요소인 properdin의 감소 등이 원인일 것으로 알려지고 있다(Lockwood, 1983).

비장적출은 체액성 및 세포매개성 면역 모두에 영향을 줄 수 있다. 비장 적출후 면역시행의 효과에 대해서는 아직까지 논란의 여지가 많지만 최근 들어 제한된 범위에서 능동면역을 시행하여 감염에 대한 방어력을 증가시키고 있다. 비장적출후 폐렴균 감염때 혈중 IgM 항체가의 감소가 일시적으로 일어나나(Koren *et al.*, 1984; Chaimoff *et al.*, 1978), polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccination을 시행하면 다시 항체가 증가되어 폐렴균 감염에 대한 면역이 생성되며 혈중 항체가의 상승은 비장을 적출한 환자에서 정상인에 비해 큰 차이가 없었다고 하였다. 한편 Hosea *et al.*(1981)은 ELISA 방법으로 pneumococcal type-specific IgM과 IgG항체를 측정하였을 때 비장 적출 환자에서 항체가가 낮아 면역접종시 비장 적출 상태가 영향을 준다고 보고하였다. 또 토끼나 마우스에서는 비장이 초기의 항체생성에 중요한 부위이며 비장 절제후 pneumococcal polysaccharide로 면역시킬 때 항체형성이 낮아진다고 하였다. 또한 Aaberge *et al.*(1984)은 비장을 적출한 환자군에서 면역전에 혈중 IgM치가 정상 대조군에 비해 낮았고 면역후에 혈중 IgM치가 상승되나 정상 대조군에 비해서 낮았던 점으로 보아 비장 적출로 인해 면역반응이 충분히 일어나지 못했을 것으로 보고하였다. 그러나 Sullivan *et al.*(1978)은 비장을 적출한 경우 피하로 pneumococcal vaccination 하는 경우 정상적인 면역반응을 일으키는 데는 영향을 주지 못한다고 하였다. 마우스에서 비장 적출후 *Plasmodium yoelii*(Oster *et al.*, 1980)나, *E. histolytica* (Ghadirian *et al.*, 1981)를 주입하였을 때 대조군보다 사망률이 증가하거나 심한 증상을 나타내었다고 하였고, 신등(1985)은 마우스에서 비장 적출후 *N. fowleri*를 감염시켰을 때 비장적출에 따른 사망률의 저하나 생존 기간의 차이가 없어 비장적출이 *N. fowleri* 감염에 큰 영향을 주지 못한다고 하였다. 이와 같이 비장 적출이 항체 생성 및 숙주 방어능력에 미치는 영향에 대해서는 아직도 논란이 많다.

이 실험에서 비장 적출후 면역시키지 않은 실험 Ⅱ군과 대조군을 비교하면 신등(1985)의 결과와 유사한 소견을 보였다. 그러나 비장 적출후 면역을 시행한 실험 Ⅰ군과 정상 마우스에 면역을 시행하였던 실험 Ⅲ군이 면역을 시행하지 않았던 실험 Ⅱ군 및 대조군에 비해 감염후 사망률이 낮았다.

또한 비장 적출후 면역을 시행한 실험 Ⅰ군과 정상 마우스에 면역을 시행한 실험 Ⅲ군을 비교할 때 2차 면역후 비장을 적출한 군에서 항체가가 낮았지만 면역을 시키지 않았던 대조군에 비해 혈중 IgG항체가가 유의하게 높았고 ($p<0.05$), 감염 1개월 후까지 생존한 마우스의 혈중 항체가는 비장 적출에 관계없이 실험 Ⅰ, Ⅲ군 모두에서 대조군에 비해 월등히 높아 비장 적출 후 면역 접종하였을 때 항체가가 서서히 증가하여 방어효과를 나타내는 것으로 생각된다. 이러한 방어효과는 절대수의 B 세포를 함유한 비장이 제거되고 난 후에도 상당한 양의 항아메바 항체가 다른 조혈기관에서 새로이 생성되어 숙주의 방어기전으로써 역할을 하였기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 비장 적출후 충분한 양의 항체가 어떻게 생성되는지는 앞으로도 연구되어야 할 과제이다.

참 고 문 헌

Aaberge, I.S., Heier, H.E., Hem, E., Giercksky, K.E. and Groeng, E.C.(1984) IgM and IgG response to pneumococcal polysaccharide vaccine in normal individuals and individuals splenectomized due to trauma. *Acta. Path. Microbiol. Immunol.* (Scand. Sect.), **92**:11-16.

Adams, A.C., John, D.T. and Bradley, S.G. (1976) Modification of resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infect. Immun.*, **13**:1387-1391.

安明姬·閔得映·任敬一·李根泰(1986) 마우스에서 모체를 통해 얻은 *Naegleria fowleri* 면역에 관한 연구. 연세의대 논문집, **19**(1):102-110.

Carter, R.F.(1970) Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amebic meningoencephalitis and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, **100**: 217-224.

Chaimoff, C. Douer, D., Pick, I.A. and Pinkhas, J. (1978) Serum immunoglobulin changes after accidental splenectomy in adults. *Am. J. Surg.*, **136**: 332-333.

Derrick, E.H.(1948) A fatal case of generalized amebiasis due to a protozoon closely resembling, if not identical with, *Iodamoeba bütschlii. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **42**:191-198.

Ferrante, A. and Thong, Y.H.(1980) Unique phagocytic process in neutrophil-mediated killing of *Naegleria fowleri. Immunology*, **2**:37-41.

Francke, E.L. and Neu, H.C.(1981) Postsplenectomy infection. *Surg. Clin. North Am.*, **61**:135-155.

Ghadiricar, E. and Meerovitch, E.(1981) Effect of

splenectomy on the size of amoebic liver abscesses and metabolic foci in hamsters. *Infect. Immun.*, **31**(2):571-573.

Haggerty, R.M. and John, D.T.(1982) Serum agglutination and immunoglobulin levels of mice infected with *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.*, **29**:117-122.

Hosea, S.W., Burch, C.G., Brown, E.J., Berg, R.A. and Frank, M.M.(1981) Impaired immune response of splenectomised patients to polyvalent pneumococcal vaccine. *Lancet*, **1**:804.

任敬一·吳惠淑(1978) 자유생활아메바 항원청에 의한 면역반응 1. 자유생활아메바 가토 항원청에 의한 제동반응. 기생충학잡지, **16**:41-46.

金東洙·龍泰淳·柳在淑·任敬一·李根泰(1986) 마우스에서 흉선이 *Naegleria* 뇌수막염에 미치는 영향. 연세의대논문집, **19**(1):1-12.

Koren, A., Haasz, R., Tiatler, A. and Katzuni, E. (1984) Serum immunoglobulin levels in children after splenectomy. A prospective study. *Am. J. Dis. Child.*, **138**:53-55.

Lockwood, C.M.(1983) Immunological functions of the spleen. *Clinics in Haematol.*, **12**(2):449-465.

Martinez, A.J., Duma, R.J., Nelson, E.C. and Morreta, F.L. (1973) Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Preparation of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: A light and electron microscope study. *Lab. Invest.*, **29**:121-133.

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.

朴光徹·柳在淑·任敬一(1987) 실험적 뇌수막염에 있어 *Naegleria fowleri* 항원에 대한 세포매개성 면역반응. 기생충학잡지, **25**:1-6.

Reilly, M.F., White, K.L. and Bradley, S.G.(1983) Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* Infections. *Infect. Immun.*, **42**:645-652.

Rosner, F., Iarrabi, M.H., Benach, J.L. and Habicht, G.S. (1984) Babesiosis in splenectomized adults. *Am. J. Med.*, **76**:696-701.

Ruben, F.L., Hankins, W.A., Ieigler, I., Norden, C.W., Harrison, A., Winkelstein, A. and Herrmana, D.J. (1984) Antibody responses to meningococcal polysaccharide vaccine in adults without spleen. *Am. J. Med.*, **76**:115-121.

辛皓俊·任敬一·崔林淳(1985) 비장 적출(splenectomy)이 원발성 아메바성 뇌수막염의 발생에 미치는 영향. 기생충학잡지, **23**:156-164.

Sullivan, J., Ochs, H.D., Schiffman, G., Hammerschlag, M.R., Miser, J., Vichinsky, E. and Wedgwood, R.J.(1978) Immune response after splenectomy. *Lancet*, **1**:178.

Thong, Y.H., Ferrante, A., Shepherd, C. and Rowan-Kelly, B. (1978a) Protective immunity to *Naegleria fowleri* in experimental amebic meningoencephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **27**:238-240.

Thong, Y.H., Ferrante, A., Shepherd, C. and Rowan-Kelly B.(1978b) Resistance of mice to *Naegleria* meningoencephalitis transfered by immune serum. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **72**:650-652.

Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A.(1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. WHO.*, **53**:55-65.

Willaert, E.(1976) Etude immunotaxonomique des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba* (Protozoa; Amoebida). *Acta Zool. Pathol*(Antwerp)., **65**:1-239.

=**Abstract**=

Immunization Effect on *Naegleria fowleri* Infection in Splenectomized Mice

Kwang-Hyub Han, Myoung-Hee Ahn* and Duk-Young Min*

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-749, and Department of Parasitology, Hanyang University College of Medicine, Seoul 133-791, Korea*

A pathogenic free-living amoeba, *Naegleria fowleri*, is a causative protozoan parasite of primary amebic meningoencephalitis in human and experimental animals. It is known that humoral and cellular immunity contribute as the defence mechanism of host against this organism. Recently splenectomy has been argued on its effect on host defence mechanisms.

The present study was aimed to observe the effect of immunization in splenectomized mice. For immunization, $5\sim10\times10^5$ trophozoites of *Naegleria fowleri* o 359 were intraperitoneally inoculated once a week for two weeks to BALB/c mice, and $5\sim10\times10^4$ of ameba trophozoites were intranasally inoculated for infection after splenectomy and/or immunization. ELISA technique was applied for the detection of seum IgG antibody levels. Experimental animals were divided into 4 groups; I. splenectomized and immunized; II. splenectomized only; III. immunized only; IV. not splenectomized nor immunized.

The results obtained were as follows:

1. Mortality rates of splenectomized and immunized mice in group I (38.1%) and immunized only in group III (25.0%) were lower than those of not immunized mice in group II (50%) and control group, IV (46.4%).

2. Survival times of mice in group I, II, III and IV were 20.1 ± 3.6, 17.3 ± 4.5, 20.4 ± 7.0 and 19.6 ± 7.6 days respectively, and there were no significant differences between them.

3. ELISA values (absorbance at 492nm) of group I (1.10 ± 0.29) and group III (1.31 ± 0.28) were significantly higher than that of group IV(0.24 ± 0.37) at day 31 of infection ($p<0.05$).

Conclusively, it is presumed that humoral immunity against *N. fowleri* may operate as ever, after immunization, even though the mouse was splenectomized.