

MDBK 세포 배양에서 *Eimeria tenella* 발육 상황 및 닭 비장세포에 의한 발육 항진 효과*

서울대학교 의과대학 기생충학교실 및 풍토병연구소, 서울대학교 의과대학 소아과학교실*
채종일 · 이순형 · 김웅률* · 윤종구*

요 약 : 닭의 맹장 상피세포에 기생하여 출혈, 설사 등을 일으키는 구충류(球蟲類; Coccidia)인 *Eimeria tenella*는 감염 초기에 상피 내 림프구(intraepithelial lymphocyte; IEL)와 같은 면역계 세포로 먼저 침입하는 것이 잘 알려져 있다. 이 연구는 *E. tenella*가 면역계 세포 내로 들어가는 것이 추후 충체 생존 및 발육에 도움이 되는 과정인지를 알아보기 위한 것으로, 분리하기 쉬운 닭의 비장세포를 면역계 세포로 이용하고 MDBK(Madin-Darby bovine kidney) 세포를 시험관 내(*in vitro*) 숙주세포로 하여 *E. tenella*의 생존 및 발육 능력을 정량적으로 측정한 것이다. 실험 과정은 3단계로 나누어 첫째 MDBK 세포가 숙주세포로 적합한지 우선 형태학적으로 관찰한 후, 둘째 *E. tenella* sporozoites의 발육, 증식 상황을 ^3H -uracil 동위원소 흡수시험으로 정량화할 수 있는지 알아보고, 셋째 이 방법을 이용하여 sporozoites를 비장세포와 혼합배양한 후에는 그 발육, 증식 능력이 어떻게 변화하는지 관찰하였다.

MDBK 세포에 탈낭 직후의 정상 sporozoites를 직접 감염시켜 발육상황을 형태학적으로 관찰한 바 감염 3~4일에 영양형 및 분열체(schizonts)가 완성되고 merozoites가 터져 나와 다른 세포로 침입하는 분열증식(schizogony)이 활발히 영위되고 있는 것이 확인되었다. 또 ^3H -uracil 흡수는 감염 12시간부터 뚜렷이 나타났고 48~60시간에 peak에 달한 다음 서서히 감소하였다. ^3H -uracil 흡수량은 sporozoites 감염 농도에 따라서도 변화하였으나 탈낭 후 MDBK 세포 감염까지의 시간 경과에 따라 현저히 감소하였다. 그러나 sporozoites를 비장세포와 함께 4~12시간 시험관 내에서 먼저 혼합배양한 다음 MDBK 세포에 감염시켰을 때 ^3H -uracil 흡수량은 sporozoites만을 배양한 대조군에 비해 항상 높아 비장세포와의 혼합배양 후 발육증식이 더욱 활발해지는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 *E. tenella*의 sporozoites가 생체 내에서 IEL과 같은 면역계 세포에 침입하는 것이 충체 생존이나 발육에 있어서 비록 필수적인 것은 아니지만 자신의 생존이나 발육능력을 보존 또는 항진시키는데에 도움을 주는 과정의 하나로 판단되었다.

Keywords: *Eimeria tenella*, ^3H -uracil, radioisotope, sporozoites, spleen cells, chicken

서 론

인체나 동물에 있어서 비장, 흉선, 끌수 등은 세균이나 바이러스와 같은 이물질에 대하여 면역반응을 나타내는 각종 림프계 세포를 생산함으로써 이들에 대한 저항성을 나타내게 하는 중요한 면역기관으로 알려져 있다. 그러나 기생충이 이물질로 작용할 경우에는 각종 면역기관의 역할이 어떠한지, 뚜렷한 면역반응을 나

타낼 수 있는지에 대하여 많은 연구에도 불구하고 경립된 학설은 아직 없는 형편이다. 기생충 중에서도 특히 숙주의 세포 내에 기생하는 원충류(intracellular protozoa)의 경우에는 그 기생 장소가 숙주세포 내이므로 숙주 면역반응을 교묘히 회피하게 된다는 것이 잘 알려져 있다(Cohen and Sadun, 1976). 더구나 숙주의 림프구(lymphocyte)나 림프계 세포로 침입하는 종류도 몇 가지 알려져 있는 바, *Toxoplasma gondii*는 마우스나 사람의 비장, 림프선 등에서, *Theileria parva*는 소의 비장이나 림프선 등에서 그 생애의 일부를 보내게 된다(Beaver et al., 1984; Soulsby, 1978). 이런 기생충의 경우에 기생충과 숙주세포가 어떤 구체적 관계를 유지하고 있는지 또 림프계 세포가 기생충에 대하여 그 고유의 방어기능을 할 수 있는지에 대해서는 아직 상세히 알려져 있지 않다.

* 이 연구는 1989년도 서울대학교병원 특진연구비의 보조로 이루어진 것임.

* 이 연구는 미국 농무성 산하 Beltsville Agricultural Research Center의 Animal Parasitology Institute(現 Livestock and Poultry Sciences Institute)의 협조에 의해 이루어졌음.

기생충 면역학 연구에 있어서 동물 기생충의 모델로 흔히 이용되는 것 중 하나로 *Eimeria tenella*라는 원충류가 있다. *E. tenella*는 닭의 맹장에 기생하며 맹장 벽을 파괴하여 장출혈, 설사 등을 일으키며 중감염의 경우 속주를 사망하게 할 수도 있는, 병원성이 매우 강한 원충류이지만 만일 속주가 생존하면 감염 7일 후에는 oöcyst 형태로 모두 대변으로 배출되어 자연 치유되며 얼마 후 재감염되어도 속주가 뚜렷한 저항성을 나타내므로 기생충 면역학의 입장에서 매우 흥미있는 기생충이다(Rose, 1985). 이 원충은 외계에서 성숙한 oöcyst가 속주인 닭에 섭취됨으로써 생활사를 계속하게 되는데 섭취된 oöcyst는 소장에서 탈낭하고 sporozoite가 유출된 다음 이 sporozoite가 장 상피층을 뚫고 들어가 영양형(trophozoite), 분열체(schizont)로 변형되어 분열체 내에 여러 개의 merozoite를 형성한다. 성숙한 분열체에서 터져 나온 merozoite는 각기 다른 상피세포로 침입하며 또다시 분열체가 된 다음 제 2 세대 또는 제 3 세대 merozoite로 분열 증식 한다. 이렇게 상피세포를 파괴한 다음 일부는 자성 및 웅성 생식세포(gametocytes)로 되고 zygote를 거쳐 껌질을 뒤집어쓴 다음 oöcyst가 되어 속주 체외로 배출된다.

그런데 흥미있는 것은 sporozoite가 처음에 장 상피층을 뚫고 들어간 다음 상피층 내 림프구(intraepithelial lymphocyte; IEL)에 들어가며 그후 IEL이 선와(crypt) 쪽으로 이동하면서 IEL에서 sporozoite가 나와 선와 상피세포로 침입한 다음 분열 증식한다는 점이다(Lawn and Rose, 1982). 그러나 sporozoite가 IEL에 들어가는 것이 반드시 필요한 과정인지 또는 기생충 쪽으로 보아 전혀 필요하지 않은 과정인지에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다. 또, IEL 가운데에는 암세포나 바이러스 등에 대하여 자연적인 멸살 작용을 나타내는 자연 살세포(natural killer cells; NK cells)가 포함되어 있음이 알려져(Tagliabue *et al.*, 1982; Nauss *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1986), 이들이 외부로부터 침입하는 원충류인 sporozoite에 대해서도 살세포 작용(cytotoxicity)을 나타내지 않을까 추측되기도 한다. 그러나 자연 살세포 작용은 작동세포(effectector cell)와 표적세포(target cell)의 접촉에 의해 나타나는 것임에 반하여(Herberman, 1981) sporozoite는 IEL 세포 내로 침입하므로 이 경우 IEL이 sporozoite에 대하여 과연 뚜렷한 살세포 작용을 나타낼 수 있을지에 대해서는 의문이 있다 하겠다.

이 연구는 이러한 속주-기생충 상호관계에 대한 연구의 일환으로 닭의 IEL 대신 분리하기 쉬운 비장 림프계 세포를 추출하여 작동세포로 하고 이들이 세포 내 기생 원충류인 *E. tenella* sporozoite에 대하여 어떤 작용을 나타내는지를 알아보기 위해 시험한 것이다.

재료 및 방법

1. *E. tenella* sporozoite의 분리

계대감염시킨 닭(Leghorn 암컷 및 수컷) 50마리를 회생시키고 맹장을 적출하여 *E. tenella*(Beltsville strain, USA)의 oöcyst를 분리한 다음, 이를 oöcyst로부터 sporozoite를 획득하였다. 즉, 맹장을 절개하고 장 점막을 가볍게 긁은 다음 점막 조직을 0.85% 생리식 염수에 담고 magnetic stirrer 위에서 약 30분간 흔들어 oöcyst가 유리되도록 하였다. 이렇게 만든 oöcyst 혼탁액을 거즈에 거른 다음 50ml씩 원침 시험관에 넣고 4°C 3,000rpm에서 10분간 원침하여 oöcyst를 획득하였다. 획득한 oöcyst에 조직파편 등이 거의 포함되지 않았을 때 이 oöcyst를 멀균 종류수로 2~3회 씻은 다음 28°C 진탕 수조에서 산소 공급하에 10일간 배양하였다. 배양 도중 일부 부유액을 검경하여 oöcyst 내에 각각 4개의 sporocysts가 형성되어 있고 sporocyst 내에 각각 2개의 sporozoites가 발육되어 있는지 관찰하였다. 약 70~80% 이상의 oöcyst가 sporozoites를 함유하고 있을 때 배양을 중단하고 2.5% potassium dichromate를 첨가하여 살균한 다음 4°C 냉장고에 보관하면서 필요시 실험에 사용하였다.

Sporozoite는 실험 당일 oöcyst로부터 분리하여 즉시 사용하였다. 불순물이 거의 섞이지 않은 oöcyst 약 1×10⁸개씩을 원침하여 상층액은 버리고 침전물을 극소량의 생리식염수로 emulsify한 다음 teflon-coated tissue homogenizer에 넣고 700~800rpm으로 4~5분간 마쇄하여 sporocyst를 분리하였다. Oöcyst 80% 이상이 깨어져 sporocyst가 터져 나왔을 때 마쇄를 중지하고 생리식염수를 넣은 다음 4°C 3,000rpm으로 10분간 원침하여 순수한 sporocyst를 얻었다. Sporocyst를 깨어 그 속에 들어있는 sporozoite를 얻고자 침사에 인공탈낭액(artificial excystation fluid)을 20~25ml 첨가한 다음 41°C 진탕 수조에서 60~90분간 배양하면서 80% 이상의 sporocyst가 탈낭했는지 관찰하였다. 탈낭률(excystation rate)이 충분히 높을 때 배양을 중단하고 차가운 생리식염수로 씻은 다음 다시 Hank's balanced salt solution(HBSS)과 10% fetal calf serum(FCS), 5% tryptose phosphate broth(TPB), 1mM의 non-essential amino acid(NEAA), 항생제(penicillin-streptomycin) 등을 첨가한 완전배지(complete medium)로 바꾼 다음 4°C 냉장고에 보관하면서 빠른 시간 내에 실험에 사용하였다.

2. Sporozoite의 MDBK 세포 감염 시험 및 형태학적 관찰

*E. tenella*의 시험관 내(세포 내) 배양에 있어서 좋은 속주세포로 알려진 MDBK/441(Madin-Darby bovine kidney) cell line을 실험에 이용하였다(Schmatz *et al.*, 1986). 이 cell line은 American Type Culture Collec-

tion(ATCC)에서 분양받은 것이며 5% FCS, 5% TPB, 1mM NEAA 및 항생제를 포함한 Earle's balanced salt solution(EBSS) 및 Eagle's minimum essential medium(EMEM)의 혼합배지(1:1), 즉 EBSS-EMEM 완전배지에서 계대하였다. 배양은 5% CO₂와 95% 공기의 CO₂ 배양기에서 하고 주 2회 계대배양하였다.

배양 용기는 바닥이 평평한 것을 사용하여 실험 목적에 따라 15~50ml 배양 플라스크나 96-well plate 또는 유리 슬라이드 위에 소형 플라스크를 접착시킨 Lab-tek(Nunc, Inc.) 배양 슬라이드 등을 이용하였다. 세포 분주(subculture) 농도는 1×10⁵cells/ml로 하였고 MDBK 세포가 배양 용기 바닥에서 2~3일간 자라 monolayer를 완전히 형성하면 trypsin-versene(0.25% trypsin과 1mM EDTA 혼합액) 또는 AT-1 solution (1,000cc 중 0.5g trypsin, 0.2g EDTA, 8g NaCl, 0.4g KCl, 1g dextrose 및 0.58g NaHCO₃ 함유)을 넣고 20~30분간 두어 세포가 바닥으로부터 완전히 박리되면 완전배지로 씻고 다시 분주하는 방법을 이용하였다.

E. tenella sporozoite의 감염 시험은 MDBK 세포가 96-well plate 또는 Lab-tek 슬라이드 바닥에서 거의 monolayer를 형성했을 때 5μg/ml의 mitomycin C로 30분간 처리하여 MDBK의 급격한 세포분열을 막은 다음, 배지(EBSS-EMEM)를 1×10⁶개 이상의 sporozoite 가 들어 있는 새로운 것으로 바꾸어 3~4시간 배양함으로써 시행하였다. 감염시에는 각 well당 0.5~32(×10⁴)개의 sporozoites를 주입하였고 여기에서 가장 적당한 sporozoite 주입농도를 결정한 후 다음 실험에 이용하였다.

감염된 MDBK 세포를 41°C CO₂ 배양기에서 배양하면서 sporozoite가 영양형(trophozoite), 분열체(schizont) 및 merozoite로 발육, 분열하는지를 도립현미경으로 관찰하였다. 감염 1일부터 7일까지 매일 배양중인 Lab-tek 슬라이드 2~3매를 Bouin's 고정액에 넣어 고정한 다음 sporozoite의 refractile globule에 대한 특수염색법인 modified acid-fuchsin 염색(Peirce, 1980)을 거쳐 globule의 변화 과정과 충체 자체의 변형, 형태 발육 등을 관찰하였다.

3. Sporozoite 발육 능력의 평가

E. tenella sporozoite가 MDBK 세포에 침입하여 얼마나 잘 생존, 발육하는가를 판단하는 데 있어서 형태학적 관찰만으로는 비교가 매우 어렵다. 따라서 sporozoite의 감염력 및 생존 능력을 정량화해야 할 필요가 있다. 따라서 이 연구에서는 Schmatz *et al.* (1986)의 ³H-uracil 흡수시험 방법을 응용하였다. 이 방법은 coccidian parasite의 sporozoite가 속주세포보다 uracil을 선택적으로 잘 흡수하기 때문에 그 구체적인 방법은 다음과 같다.

즉, MDBK 세포에 *E. tenella*의 sporozoite를 감염

시키고 약 24시간 정도 완전배지에서 자라게 한 다음 uracil을 첨가하되 1 well(200μl 부피) 당 1μCi의 ³H-uracil(New England Nuclear Co.)을 배지에 첨가하여 군별로 비교하였다. 흡수량 측정은 각 well의 MDBK 세포 내에 들어있는 총 ³H-uracil 양을 재는 방법을 이용하였다. 즉 배양 well로부터 MDBK 세포(세포 내의 *E. tenella* 포함)를 모두 박리하여 회수한 다음 Ph. D. cell harvester(Cambridge Technology Inc., Cambridge, MA)를 통해 작은 여과지에 모으고 95% ethanol로 탈수하였다. 각 표본에 대하여 liquid scintillation counter(Beckman Instruments Inc., Columbia, MD)에서 β-ray의 방사능을 측정하였다.

4. 닭의 비장세포 분리

통상 이용되는 실험동물 비장세포의 무균적 분리 방법에 따라 하되 1개 군 당 3마리 씩의 닭(FP strain)을 경추탈구법으로 회생시킨 다음 복부를 열고 위(stomach) 뒷쪽에 붙어있는 비장을 멸균된 가위 및 핀셋을 이용하여 적출하였다. HBSS 배지와 항생제가 들어 있는 petri dish 내에 세포분리용 wire mesh를 놓고 그 위에 비장을 옮겨 놓은 다음 멸균된 주사기 손잡이를 이용하여 부드럽게 눌러 마쇄하였다. 비장 세포들이 분리되었을 때 mesh 위에 남은 찌꺼기는 버리고 HBSS에 부유된 세포들을 피펫으로 회수하였다. 회수된 세포는 실온에 약 1~2분간 방치하였다가 상층액만을 다시 분리하였다. 수집된 세포는 HBSS 완전배지로 2회 씻은 다음 세포농도를 80×10⁶/ml로 조정하였다. 적혈구를 제거하기 위하여 5ml의 세포 부유액을 취하여 5ml의 Ficoll-Hypaque density-gradient medium 위에 한 방울씩 조심스럽게 overlay한 다음 실온에서 2,500rpm으로 20분간 원침하였다. 배지와 density gradient 사이에 생긴 하얀 백혈구 ring을 피펫으로 뽑아내어 HBSS 완전배지에 2회 씻고 세포 농도를 20×10⁶/ml로 조정한 다음 실험에 사용하였다.

5. 비장세포와 sporozoite의 혼합배양 및 MDBK 세포 감염

준비된 닭의 비장세포를 작동세포(effecter cell: E)로, *E. tenella*의 sporozoite를 표적세포(target cell: T)로 하고, E:T 비율을 100:1, 50:1, 25:1 및 12.5:1로 하여 섞은 다음 50ml 시험관에 각각 2~3ml 씩 넣고 실온하에 500rpm 정도로 가볍게 2~3분 원침한 다음 41°C CO₂ 배양기에서 4시간 또는 16시간 동안 배양하였다. 배양 후 비장세포가 sporozoite의 감염력이나 발육능력에 영향을 주었는지 보기 위하여 각 시험관으로부터 200μl씩 취하여 MDBK 세포가 자라고 있는 96-well plate에 넣되 1개 군 당 3개 well 이상씩 넣고 3시간 동안 41°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 비장세포와 접촉시키지 않은 sporozoite를 대조군으로 하여 따로 MDBK 세포에 감염시켰다. 각 군에서 ³H-uracil 흡수시험을 이용하여 비장세포가 sporozoite의 생존 및 발육에 미치는 영향을 관찰하였다.

연 구 성 적

1. *E. tenella* sporozoite의 형태학적 발육

MDBK 세포(Fig. 1)에 정상 sporozoite를 감염시켜 발육과정을 관찰함으로써 MDBK 세포가 이 실험 목적에 적합한 숙주세포인가를 확인하였다.

Sporozoite 감염 3시간 동안 때때로 세포 내 침입 과정을 도립현미경 하에서 관찰하였던 바 일부 sporozoite는 주입 후 매우 빠른 속도로 MDBK 세포로 들어가는 것이 확인되었다. 그러나 주입 후 약 10분이 지나면서부터는 세포 내로 들어갔던 것들이 다시 배지로 나오는 경우도 있었고 세포 주위를 맴돌고 있던 것들이 뒤늦게 세포 내로 들어가는 경우도 관찰되어 MDBK 세포 감염 방식은 sporozoite 개체마다 다른 것으로 생각되었다. 한가지 뚜렷한 현상은 배양 시간이 경과함에 따라 MDBK 세포 내에 들어가 있는 총 sporozoite의 수가 뚜렷이 증가한다는 점이었다.

Sporozoite 감염 후 7일까지 매일 2~3매의 Lab-tek 슬라이드를 고정, 염색하고 형태학적 발육 상황을 관찰한 바 Fig. 2부터 Fig. 12에서 보인 바와 같이 MDBK 세포 내에서 *E. tenella*의 분열증식환(schizogonic cycle)이 잘 영위되고 있음을 알 수 있었다. 증식환은 감염 4일 이내에 최소한 2회 이상 계속되었고 감염 5일부터는 일부 merozoite가 gametogony를 영위하는 것이 관찰되었으나 oöcyst까지 생산하는지는 확인되지 않았다.

이러한 형태학적 발육을 날자별로 보면 다음과 같다. 감염 1일째에는 대부분의 sporozoite가 큰 변화를 보이지 않고 MDBK 세포의 세포질 내에서 공포를 형성하여 그 속에 들어 있었으나(Fig. 2 및 3), 일부는 그 형태가 길다란 오이 모양에서 점차 구형으로 되어 가며 영양형으로 변화되었다(Fig. 4). 충체는 hematoxylin-acid fuchsin-orange G 염색에서 청색의 핵과 선홍색의 refractile globule을 가진 것이 특징이었고 refractile globule은 크기도 다양하지만 수도 다양하여 한 충체에 2개, 3개 관찰되는 경우도 있었다.

감염 2일째 표본에서는 아직 sporozoite 상태로 남아 있는 것들도 많았으나 영양형이나 미성숙 분열체(im-

mature schizont)로 된 것도 있었고 드물지만 성숙 분열체(mature schizont)가 관찰되기도 하였다. 어떤 영양형은 분열체로 성숙하지 못하고 사멸되고 있는 것이 관찰되기도 하였고(Fig. 5), 그 크기가 2~3배로 커져 있는 것들도 발견되었다(Fig. 6). 미성숙 분열체는 작은 크기의 초기 단계에서부터(Fig. 7), 비교적 크고 여러 개의 핵으로 뚜렷이 분열된 제 1세대 미성숙 분열체(Fig. 8)에 이르기까지 다양한 형태들이 관찰되었다.

감염 3일, 4일 및 5일째의 표본은 날자에 관계없이 서로 거의 비슷한 형태들을 보이고 있었다. 그 중에는 아직까지 sporozoite 상태로 그냥 남아 있는 것도 있었고, 제 1세대 영양형이나 분열체의 형태로 관찰되는 것도 있었다. 그러나 이런 것들보다는 200~250개 정도의 미성숙 또는 성숙 merozoite를 포함하고 있는 제 2세대 미성숙 분열체(Fig. 9) 또는 성숙 분열체(Fig. 10 및 11)를 형성한 경우가 더 흔히 관찰되었다. 또 제 2세대 성숙 분열체에서 merozoite가 더져 나와 주위의 다른 MDBK 세포에 침입하는 장면도(Fig. 12) 관찰되었고, 이들이 자성 또는 웅성 생식세포(gametocytes)로 발육되는 것도 관찰되었으나 나아가 oöcyst 형태까지 발육할 수 있는지는 확인되지 않았다. 어쨌든 이상의 결과는 *E. tenella*가 MDBK 세포에서 감염 5일 이내에 제 1세대 및 제 2세대 분열증식환을 성공적으로 영위할 수 있음을 보여 주었다. 따라서 MDBK 세포는 sporozoite의 생존 및 발육능력을 평가할 수 있는 시험관 내 숙주세포로서 손색이 없는 것으로 판정되었다.

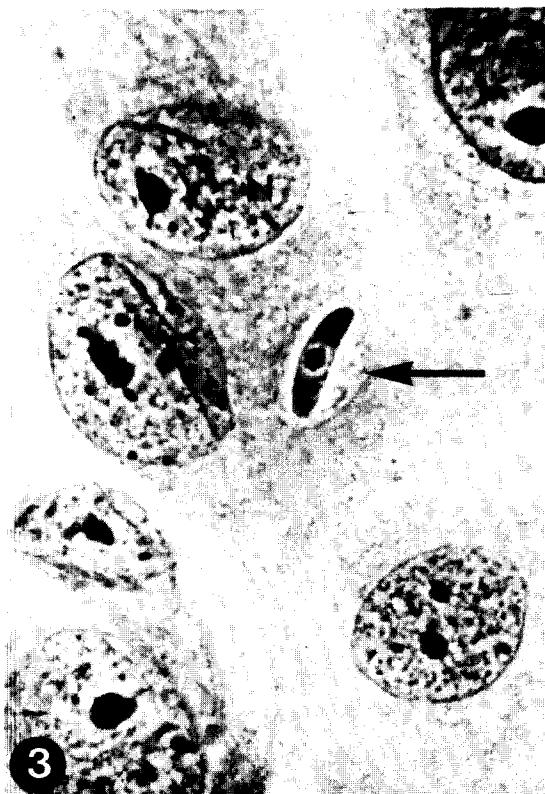
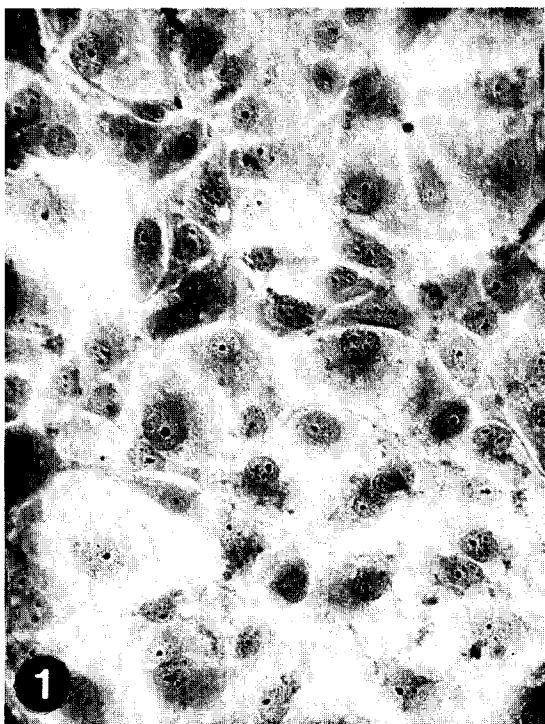
2. 정량적 방법에 의한 *E. tenella* sporozoite의 발육 증식에 대한 관찰

Sporozoite의 숙주세포에 대한 감염 능력 및 발육 능력을 정량적으로 평가하기 위하여 먼저 2가지 조건에 대하여 관찰하였다. 즉, 정상적인 sporozoites를 oöcyst에서 분리하여 곧바로 MDBK 세포에 감염시킬 경우 활발한 분열증식이 일어날 만한 적당한 sporozoite 주입 농도를 결정하였고 또 감염 후 5일까지 ^3H -uracil 흡수가 언제 가장 활발한지 흡수곡선을 관찰하였다. 그 결과는 Table 1과 Fig. 13에서 보는 바와 같다.

먼저 sporozoite 주입 농도를 보면 주입 시기가 언제인가에 거의 관계없이 농도 $16 \times 10^4/\text{well}$ 일 때 가장 높은 uracil 흡수량을 보였다(Table 1 및 Fig. 13). 다만

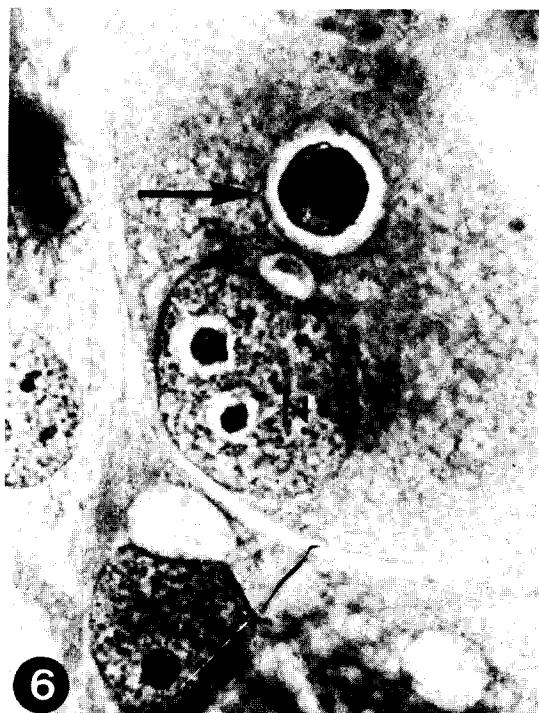
(→)

- Fig. 1.** MDBK (Madin Darby bovine kidney) cell monolayer, obtained 2 days after subculture with 1×10^5 cells/ml suspended in EBSS-EMEM medium. Hematoxylin-acid fuchsin-orange G (HT-AF-OG) stain, $\times 100$.
- Fig. 2.** A sporozoite of *E. tenella* (arrow) in the cytoplasm of MDBK cell surrounded by a parasitophorous vacuole of host origin, nearby the host cell nucleus(N). The sporozoite shows its nucleus at center and refractile vacuole at left terminal portion. One-day culture. HT-AF-OF stain, $\times 400$.
- Fig. 3.** *Ibid*, another big sporozoite (arrow). The nucleus of sporozoite is seen in the center. One-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$.
- Fig. 4.** A round-up and an elongated form (trophozoite) of *E. tenella* in the cytoplasm of a MDBK cell, enveloped by surrounding parasitophorous vacuoles. One-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$.





5



6



7



8

Table 1. ^3H -uracil uptake by *E. tenella* according to the dosage of sporozoite inoculum and time after inoculation into MDBK cell culture

Dosage of sporozoite ($\times 10^4/\text{well}$)	^3H -uracil uptake/hr (count per min)*						
	Time(hr) after sporozoite inoculation						
	0~12	12~24	24~36	36~48	48~60	60~84	84~108
32	20.9	65.0	66.8	110.4	134.6	78.8	60.5
16	18.4	63.8	61.0	113.0	153.7	94.1	113.4
8	14.2	42.7	48.7	61.7	94.5	64.6	83.8
4	15.8	38.1	33.3	41.0	58.0	44.4	50.5
2	13.0	27.1	21.0	30.4	50.5	37.0	N.D.
1	12.8	24.7	27.6	21.2	35.4	19.5	N.D.
0.5	13.1	14.0	16.4	18.2	31.2	17.9	N.D.
MDBK only	13.1	12.8	13.2	15.0	15.9	12.1	11.5

*Values are mean of triplicate wells. S.D. never exceeded 1/3 of the mean.

감염 초기인 0~36시간 까지는 $32 \times 10^4/\text{well}$ 에서 가장 흡수율이 높았다. 따라서 전체적으로 $16 \times 10^4/\text{well}$ 의 sporozoite 농도가 MDBK 세포 감염에 가장 적합한 농도인 것으로 판정되었다. 그러나 농도가 $2 \times 10^4/\text{well}$ 보다 높기만 하면 sporozoite 발육 능력을 비교 평가하는 데에 이용할 수 있을 것으로 판단되었다. MDBK 세포만 들어 있는 대조군 well의 ^3H -uracil 흡수량은 배양 시간에 관계없이 최하 수준(background level)을 넘지 않았다.

한편 sporozoite 농도를 $2 \times 10^4/\text{well}$, $4 \times 10^4/\text{well}$, ..., $32 \times 10^4/\text{well}$ 까지로 했을 때 ^3H -uracil 흡수량이 가장 많은 시기를 보면 MDBK 세포 감염 후 48~60시간 대인 것으로 나타났다(Table 1 및 Fig. 13). 그러나 전체 흡수곡선을 보면 감염 후 0~12시간인 경우만 제외하고 12시간 이후 108시간까지 어느 때라도 뚜렷한 일정량의 ^3H -uracil 흡수를 인정할 수 있었다.

따라서 위의 결과를 종합하면 sporozoite의 발육 능력을 비교 평가하는 데 있어서 농도 $2 \times 10^4/\text{well}$ 이상의 sporozoite를 MDBK 세포에 감염시키고 감염 12시간부터 약 4일 이내에 ^3H -uracil을 12시간 또는 24시간 동안 첨가한 다음 세포 내 방사능을 측정하면 sporozoite의 생존 또는 발육 능력을 평가할 수 있을 것으로 판단되었다.

3. Sporozoite의 전 배양(preincubation) 시간에 따른 생존 능력의 평가

닭의 비장세포와 *E. tenella*의 sporozoite를 혼합 배양한 다음 다시 MDBK 세포에 감염시킬 경우, 대조군으로 설정해야 할 sporozoite만의 배양군에 있어서 전 배양시간 자체, 즉 세포 외에서 지내야 하는 시간 그 자체 때문에 sporozoite의 생존력이 감소될 수 있다. 따라서 비장세포와 혼합하지 않은 sporozoite를 일정시간 전 배양(preincubation)한 다음 MDBK 세포에 감염시키고 발육 능력을 측정함으로써 전 배양에 의한 차연적인 생존력 소실을 관찰하였다.

그 결과는 Table 2 및 Fig. 14에서 보는 바와 같으며 동일한 조건으로 3회 실험을 반복하여 거의 같은 결과를 얻었다. 즉, sporozoite만을 0.5시간, 1시간, 2시간, 4시간, 12시간 및 24시간동안 배양한 후 MDBK 세포에 감염시켰을 때 배양시간이 짧을수록 대조군(MDBK 세포만 배양)에 비해 높은 ^3H -uracil 흡수량을 보였다(Table 2, Fig. 14). 또 전 배양 시간이 4시간 이상 되면 세포 외 환경에서는 sporozoite가 차츰 생존력을 잃게 되는 것으로 판단되었다. 이 결과는 *E. tenella*가 세포 내 기생충이므로 반드시 숙주세포에 들어가야만 생존능력을 유지할 수 있음을 나타낸 것으로 해석되었다.

(→)

Fig. 5. A round-up trophozoite of *E. tenella*, which is probably dead or under degeneration. No nucleus nor globule is recognizable. Two-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$.

Fig. 6. A very big trophozoite of *E. tenella*, under further development. Host cell nucleus(N). Two-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$.

Fig. 7. An immature(developing) schizont of *E. tenella* in the cytoplasm of a MDBK cell. Its nuclear chromatin is divided into 7 or more. The parasite is occupying almost all of the host cell cytoplasm. Two-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$.

Fig. 8. Two immature schizonts of *E. tenella* (arrows), first generation. The upper one has distinctly been divided into about 15 merozoites. Two-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$,

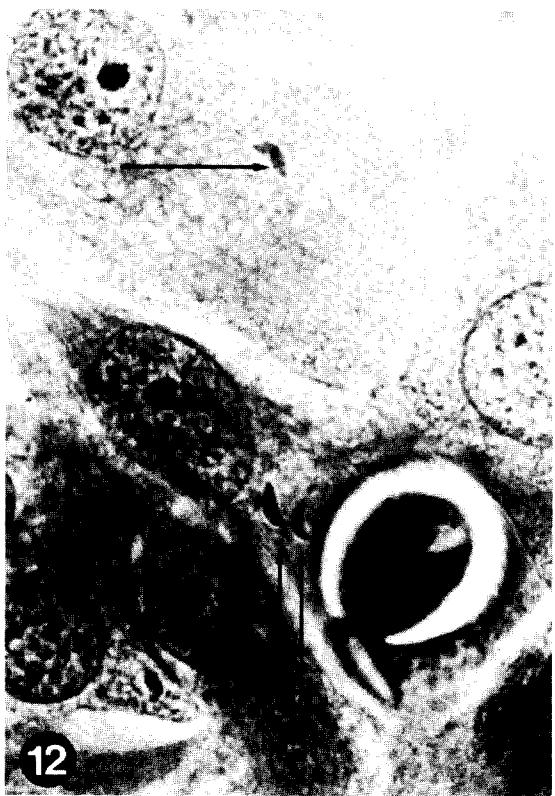
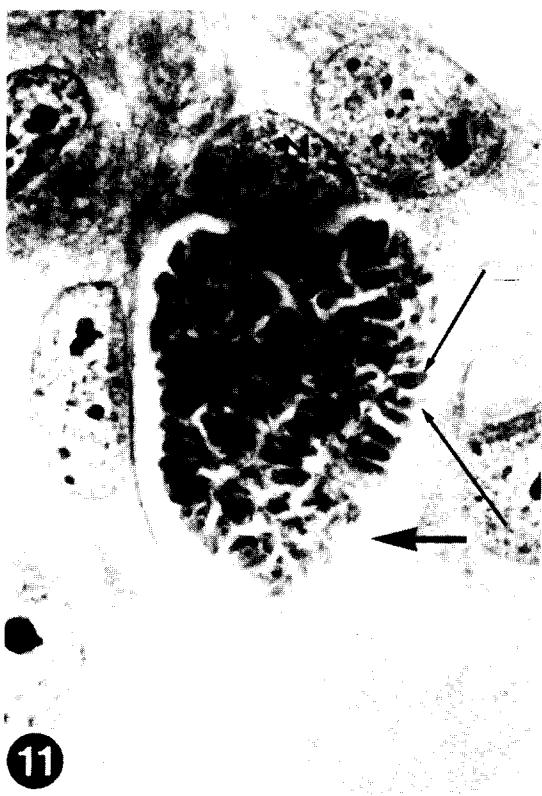
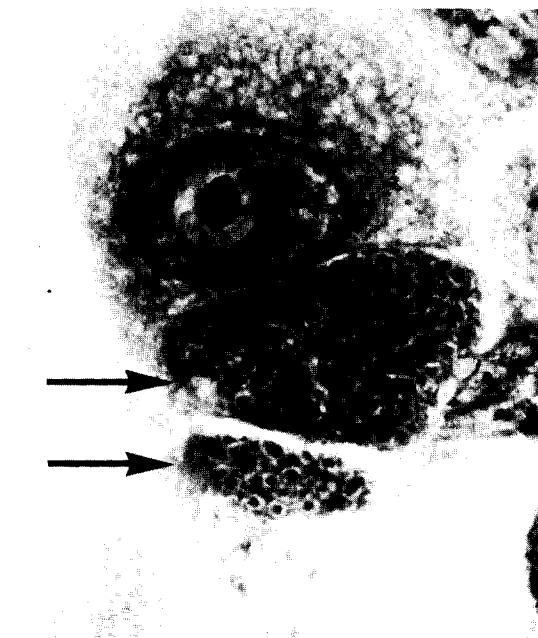


Table 2. ^3H -uracil uptake by *E. tenella* sporozoites according to preincubation time†

Preincubation time(hr)	^3H -uracil uptake/hr (count per min)*		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
0.5 MDBK control	15.2	15.8	12.2
sporozoite inoculated**	60.2	61.5	70.2
1 MDBK control	11.5	15.9	14.8
sporozoite inoculated	42.1	39.8	37.7
2 MDBK control	18.1	17.2	15.3
sporozoite inoculated	28.7	30.1	31.5
4 MDBK control	13.4	13.4	14.3
sporozoite inoculated	21.0	23.8	15.1
12 MDBK control	16.4	15.1	16.8
sporozoite inoculated	18.1	22.1	20.4
24 MDBK control	18.8	25.1	16.2
sporozoite inoculated	25.1	18.2	18.8

† Time delay after excystation until inoculation into MDBK cells

* Values are mean of triplicate wells. S.D. never exceeded 1/3 of the mean.

** Inoculum dose: $8 \times 10^4/\text{well}$

*** Uracil pulse: during 36~48hrs after infection

4. 비장세포와 sporozoite의 혼합배양이 sporozoite의 생존 능력에 미치는 영향

이 실험에서는 닭의 비장세포를 *E. tenella* sporozoite와 혼합하여 전 배양하면 ^3H -uracil 흡수량이 어떻게 변화하는지 알고자 할 것으로 2가지 대조군을 두고 5회 반복 실험하였고 그 중 대표가 될 만한 2회의 자료를 Table 3에 제시하였다. 대조군으로는 sporozoite만 배양한 군과 sporozoite와 닭의 적혈구를 혼합배양한 군 (sporozoite : 적혈구=1:50 또는 1:100)을 두었고, sporozoite의 농도는 $8 \times 10^4/\text{well}$ 로 하였다.

Sporozoite만을 전 배양한 군에서는 4시간 또는 12시간 배양 후 MDBK 세포에 감염시켰을 때 매우 낮은 동위원소 흡수량(4시간군; 2회 실험에서 각각 17.0 및 18.1, 12시간군; 17.6 및 24.8)을 보였다(Table 3). 그러나 이와는 달리 비장세포와 혼합배양한 군에서는 E:T ratio가 1:100일 때 26.4 및 35.4(4시간군), 또

(-)

Fig. 9. Two immature schizonts of *E. tenella* (arrows), second generation. Numerous immature merozoites are seen at this stage. Host cell nucleus(N). Three-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$.

Fig. 10. A mature schizont (second generation) of *E. tenella* (arrow), containing numerous second generation merozoites. Three-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$.

Fig. 11. A fully mature schizont(large arrow) containing numerous mature merozoites(small arrows). The host cell is almost entirely occupied by the parasite and is about to rupture. Four-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$.

Fig. 12. Second generation merozoites (arrows) of *E. tenella* penetrating into new MDBK cells. Four-day culture. HT-AF-OG stain, $\times 400$.

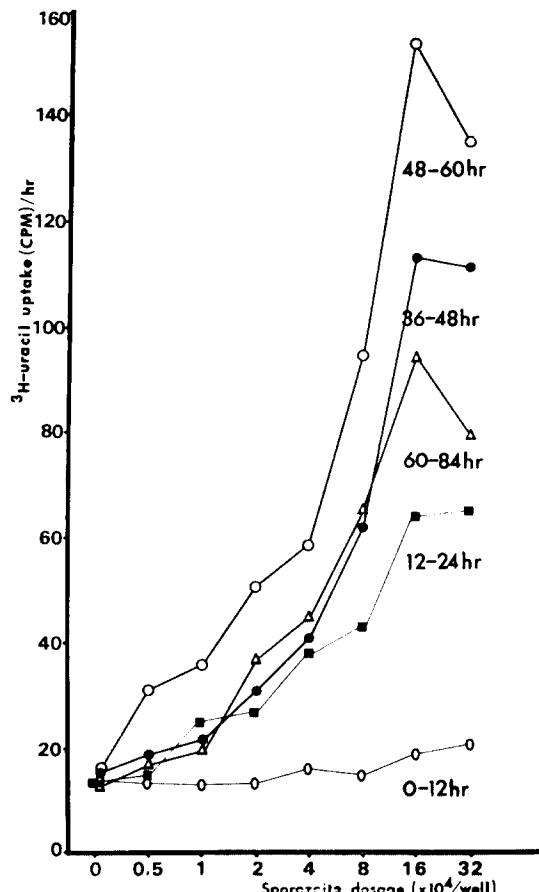


Fig. 13. ^3H -uracil uptake by *E. tenella* cultured in MDBK cell monolayer.

는 31.7 및 33.7(12시간군)로 나타나 sporozoite의 발육 능력이 항진된 것으로 나타났다. 또 E:T ratio가 1:100일 때 뿐만 아니라 1:50 또는 1:25인 경우에도 뚜렷이 발육 능력이 항진되는 것으로 나타났다.

이러한 sporozoite 발육 능력의 항진 효과가 반드시 비장세포와의 혼합배양 때문인지지를 알고자 닭의 적혈구와 혼합배양한 대조군을 두었던 바 sporozoite만을 전 배양한 군보다는 높으나 비장세포와 혼합배양한 군 보다는 낮은 동위원소 흡수량을 보였다.

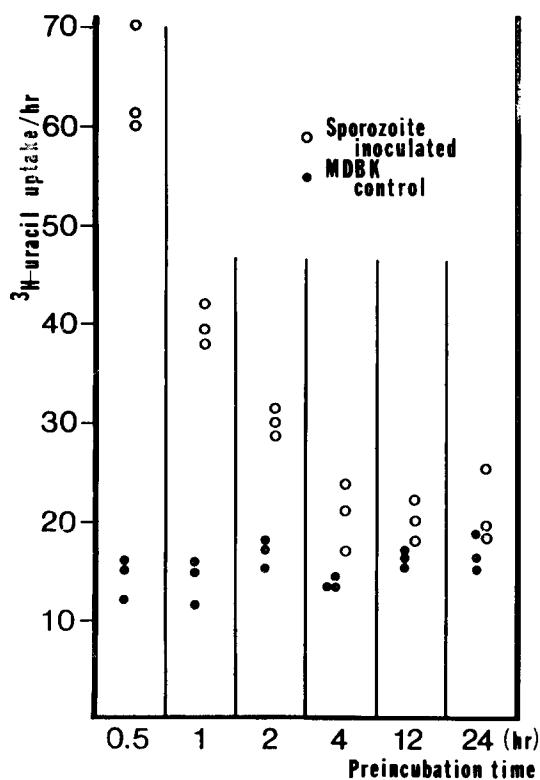


Fig. 14. ^3H -uracil uptake by *E. tenella* sporozoites preincubated in culture medium.

고 츠

이 연구는 닭의 비장세포와 *E. tenella*의 sporozoite를 혼합 배양했을 때 비장세포가 sporozoite에 대하여 자연 살세포 작용(natural 또는 spontaneous cytotoxicity)을 나타내는지, 아니면 그 생존이나 발육에 대하여 항

진 효과를 나타내는지를 알아보고자 시행한 것이다. 그 결과는 이미 제시한 바와 같이 닭의 비장세포가 *E. tenella* sporozoite의 생존 및 발육 능력을 항진시키는 것으로 나타났다.

이 실험에서 *E. tenella* sporozoite의 발육 능력을 평가하기 위하여 MDBK 세포를 시험관 내 숙주세포로 하여 감염시험을 하였던 바 최소한 생식세포(gameteocyte)까지는 발육하는 것이 확인되었다. MDBK 세포는 소의 신(kidney)에서 얻은 cell line의 하나로 Crane et al.(1984)이 이 세포를 방사선으로 조사(irradiation)한 후 *E. tenella*의 시험관 내 숙주세포로 처음 이용하였다. 또한 Schmatz et al.(1986)은 *E. tenella*의 발육에 따른 ^3H -uracil 흡수량 측정에 이 세포를 이용하였다. Kogut and Lange(1989)는 MDBK 세포를 γ -interferon으로 전처리한 후 *E. tenella*를 감염시킨 마 세포 내 parasite수가 감소하고 발육도 저연됨을 관찰하였다. 그러나 MDBK 세포에 감염된 *E. tenella*의 형태학적 발육 상황을 관찰, 기술한 논문은 없었다.

이 연구에서는 *E. tenella*의 발육 상황을 형태학적으로 상세히 관찰하였으나 oöcyst까지 생성되는 것을 확인하지는 못하였다. 따라서 MDBK 세포를 시험관 내에서의 oöcyst 생산 목적으로 사용할 수 있는지는 확실하지 않다. *E. tenella*의 세포 내 배양 목적으로 조류, 즉 chicken, quail, turkey 등의 신세포를 1차 배양(primary culture)하여 숙주세포로 사용하면 oöcyst 까지 발육시킬 수 있다고 하나(Doran, 1982), 매 배양시마다 조류를 희생시키고 신세포를 분리해야 하므로 대단히 번거로워서 응용하기가 어렵다. 따라서 계대배양이 가능한 MDBK 세포를 이용하여 *E. tenella*를 oöcyst까지 발육시킬 수 있는지에 대한 연구가 앞으로 필요하다.

자연 살세포 작용은 Rosenberg et al.(1972)이나 Takasugi et al. (1973)이 cytotoxic T-림프구(CTL)의 살세포 작용을 연구하던 중 관찰된 것으로, 대조군으로 설정했던 림프구, 즉 항원(암세포)으로 면역시키지 않은 동물의 림프구가 암세포에 대하여 살세포 작

Table 3. ^3H -uracil uptake by *E. tenella* preincubated for 4 or 12 hours

Culture conditions	^3H -uracil uptake*/hr(count per min)			
	4-hr preincubation		12-hour preincubation	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Sporozoites only	17.6±4.0	24.8±2.1	17.0±3.7	18.1±4.1
Sporozoites preincubated with spleen cells	31.7±1.8	33.7±4.5	26.4±7.3	35.4±6.1
	1 : 50	38.8±7.7	50.1±2.8	37.0±7.5
Sporozoites preincubated with RBC	33.5±5.3	59.4±2.1	23.3±3.3	40.1±4.8
	1 : 100	26.4±2.2	31.4±2.2	—
	1 : 50	29.3±3.8	36.8±4.0	25.2±0.5

* during 36~48 hrs after inoculation into MDBK monolayer

용을 보인 점을 보고함으로써 관심을 끌게 되었다. 이어서 Herberman(1974)은 이를 림프구를 자연 살세포(natural killer cells; NK 세포)라 부르고 T-림프구, B-림프구 이외에 하나의 독립된 림프구 계열(subset)로 취급하였다. 이러한 NK 세포는 면역학적으로 정상인 모든 개체에 존재하며, 말초 혈액, 비장, 골수, 흉선, 장(intestine) 등에 널리 분포되어 있다. NK 세포의 표적이 되는 것은 주로 암세포, 보통 세포(수명이 다른 경우 등), 바이러스 등으로 알려져 있으나(Herberman, 1981), 최근에는 각종 기생충도 표적이 될 수 있다는 것이 알려져 있다.

NK 세포는 세균, 바이러스, 기생충 등 병원체 감염시에 더욱 활성화되며 따라서 암세포에 대한 살세포 작용도 항진되는 것으로 보고되어 있다(Herberman, 1981). 기생충 감염에 있어서 암세포에 대한 살세포 작용이 항진된다는 점은 기생 원충류인 *Plasmodium* spp.(Eugui and Allison, 1980; Hunter et al., 1981), *Toxoplasma gondii*(Kamiyama and Hagiware, 1982; Hauser et al., 1982 & 1983), *Trypanosoma cruzi*(Minato et al., 1980; Quan et al., 1983), *Leishmania donovani*(Kirkpatrick and Farrell, 1984), *L. mexicana*(Merino and Cruz, 1984), *Eimeria bovis*(Chambers et al., 1986) 등과 기생 윤충류인 *Schistosoma mansoni*(Attallah et al., 1980)에서도 보고된 바 있다. 그러나 이러한 NK 세포 작용은 기생충 감염 3~4일 후 또는 1주일 후 등 짧은 기간 동안 잠깐 나타나는 정도이며 표적세포가 기생충이 아니고 시험관에서 계대비양된 암세포임으로 직접적인 연관성은 거의 없다고 볼 수 있다. 따라서 만일 기생충 감염에 있어서 NK 세포의 작용이 속주의 감염에 대한 감수성이거나 감염의 경과, 증상의 강약, 자연 치유 여부 등 어느 과정이든 직접 관계하려면 살세포 작용의 대상이 되는 표적세포가 기생충 자체 또는 기생충이 감염된 속주세포가 되어야 한다.

이에 따라 기생충 자체에 대한 NK 세포 작용을 관찰한 연구가 진행된 바 *T. cruzi*의 epimastigote 및 trypomastigote(Hatcher and Kuhn, 1982; Albright et al., 1984), *T. gondii*(Hauser and van Tsai, 1986), *Giardia muris*(Belosevic and Faubert, 1986) 등을 표적으로 한 것들이 있다. 기생충이 감염되어 있는 속주세포를 표적으로 한 연구는 *Plasmodium berghei*에 감염된 적혈구나(Solomon, 1986), *Theileria parva*에 감염된 림프구를 대상으로 한 것(Emergy et al., 1981)들이 알려져 있다.

기생충 감염에 있어서 NK 세포에 대한 관심이 이렇듯 높아지고 있는 것은 과거에 어떤 특정 기생충의 감염을 받은 경험에 전혀 없는 어떤 개체가 그 기생충에 대하여 선천 면역 또는 자연 면역을 나타내는 현상을 설명하는 데에 적합한 점이 많기 때문이다. 특히 자연 면역은 같은 종의 동물이라고 해도 그 유전적 strain에

따라 발현되는 정도가 다른 바 이것이 각 strain별로 NK 세포 작용이 다르기 때문이 아닌가 하는 가설이 자주 제시되고 있다(Eugui and Allison, 1982). 그러나 한편으로는 자연 살세포 작용만으로 기생충 감염시에 나타나는 여러 가지 면역 반응이나 속주—기생충 상호관계를 적절히 설명할 수 없으며 NK 세포 작용과 속주의 감수성은 서로 관계지울 수 없다는 연구결과를 발표한 학자들도 있다(Skamene et al., 1983; Hughes et al., 1987).

이 연구에서 재료로 사용한 *E. tenella*는 기생충에 대한 면역학적 연구의 대상으로 가장 흔히 이용되고 있는 몇 가지 모델 중 하나이다(Rose, 1987). *E. tenella*는 그 oocyst가 닭의 모이나 물 등에 섞여 섭취되면 바로 감염되고 맹장벽으로 침입한 다음 감염 5~6일째에 심한 출혈과 설사를 초래하거나 심하면 속주를 사망하게까지 한다. 그러나 감염 5~6일의 고비를 넘기면 감염 7일부터는 회복되기 시작하여 감염 10일쯤 되면 거의 정상화된다. 한번 감염되었다가 회복한 닭은 거의 영구적인 후천 면역을 획득하게 된다.

이상의 *E. tenella* 감염을 면역학적 측면에서 분석해 보면 몇 가지 흥미로운 점이 있다. 그것은 첫째 oocyst에서 탈낭한 sporozoite가 일단 장 상피 내 림프구(IEL)로 들어간다는 점이다. 이 점은 IEL의 일부가 닭의 암세포에 대하여 살세포 작용을 나타내므로(Chai and Lillehoj, 1988), sporozoite에 대해서도 살세포 작용을 나타낼 수 있지 않겠는가 하는 문제와 관계되기 때문이다. 그러나 만일 자연 살세포 작용을 받게 된다면 어떻게 sporozoite가 IEL에 들어갈 수 있겠는가 설명하기가 곤란하다. 다만 이 연구의 결과로 볼 때 sporozoite가 IEL과 같은 림프계 세포에 들어가는 것이 충체 발육에 반드시 필요한 과정은 아니지만 그렇다고 살세포 작용을 받는 것은 아니며 오히려 sporozoite의 생존력을 유지하는 데에 도움이 되는 단계가 아닌가 생각된다.

Sporozoite가 IEL에 의해 자연 살세포 작용을 받지 않는다면 그 이유는 이들이 IEL 세포 내로 들어가는 속도가 매우 빠르기 때문일지도 모른다. 이것은 자연 살세포 작용이 나타나기 위하여 세포(작동)—세포(표적)의 접촉이 필요하며(Herberman, 1981), 어느 정도의 접촉 시간도 필요하다는 요건에 위배되기 때문이다. 이 실험에서 sporozoite와 비장세포의 혼합배양시 sporozoite가 비장세포로 들어가는지를 직접 확인할 수는 없었다. 그러나 *E. tenella*와 근연종인 *E. acervulina*의 sporozoite가 닭의 말초 혈액 내의 림프구에서도 발견되므로(Pittillo et al., 1986), 세포 내로 들어감으로써 살세포 작용으로부터 보호되었을 가능성도 있다. 다만 적혈구와 혼합배양한 군에서도 sporozoite의 생존 능력이 항진되었던 바 이 경우 sporozoite가 적혈구 내로 들어가 보호되었는지의 여부는 현 단계로서는 알 수 없다.

둘째로는 특별한 치료를 하지 않아도 감염 6일 후부

터 급속도로 병변이 회복되기 시작하는 바 이것은 감염 6일 후라는 매우 빠른 날자로 보아 T 세포나 B 세포에 의한 후천성 면역 반응의 결과로는 설명하기 어렵다. *E. tenella* 감염에 있어서 T 세포성 면역은 최소한 감염 14일 이후에 (Lillehoj, 1986), B 세포성 면역은 7~8일 이후에나 발현되기 때문이다 (Lillehoj and Ruff, 1987). 따라서 이것을 NK 세포의 활성화에 의한 것으로 해석하려는 경향도 있다. 그러나 이 점에 대한 원만한 이해를 위해서는 앞으로도 많은 연구가 시행되어야 할 것으로 생각된다.

[감사의 말씀 : 이 연구의 수행에 여러 가지 도움을 주신 Dr. Hyun S. Lillehoj (Livestock and Poultry Sciences Institute, Beltsville, MD, USA)에게 진심으로 감사드립니다.]

참 고 문 헌

- Albright, A.W., Hatcher, F.M. and Albright, J.F. (1984) Interaction between murine natural killer cells and trypanosomes of different species. *Infect. Immun.*, **44**(2):315-319.
- Attallah, A.M., Lewis, F.A., Urritia-Shaw, A., Folks, T. and Yeatman, T.J. (1980) Natural killer cells (NK) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) components of *Schistosoma mansoni* infection. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, **63**:351-354.
- Beaver, P.C., Jung, R.C. and Cupp E.W. (1984) Clinical Parasitology. 9th ed., Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 162-167.
- Belosevic, M. and Faubert, G.M. (1986) Killing of *Giardia muris* trophozoites *in vitro* by spleen, mesenteric lymph node and peritoneal cells from susceptible and resistant mice. *Immunology*, **59**: 269-275.
- Chai, J.Y. and Lillehoj, H.S. (1988) Isolation and functional characterization of chicken intestinal intraepithelial lymphocytes showing natural killer cell activity against tumor target cells. *Immunology*, **93**:111-117.
- Chambers, W.H., Klesius, P.H. and Campos, M. (1985) Natural cell-mediated cytotoxicity and interferon levels in *Eimeria bovis* infected calves. *Proceedings of Georgia Coccidiosis Conference*, pp. 535-543.
- Cohen, S. and Sadun E. (1976) Immunology of Parasitic Infections. 1st ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne. pp. 1-34.
- Crane, M.S.Jr., Schmatz, D.M., Stevens, S., Habber-
sett, M.C. and Murray, P.K. (1984) *Eimeria tenella*: *in vitro* development in irradiated bovine kidney cells. *Parasitology*, **88**:521-530.
- Doran, D.J. (1982) Behavior of coccidia *in vitro*. In The biology of the coccidia (ed. P.L. Long), University Park Press, Baltimore. pp. 229-285.
- Eugui, E.M. and Allison, A.C. (1982) Natural cell-mediated immunity and interferon in malaria and babesia infections. In NK Cells and Other Natural Effector Cells (ed. Herberman), Academic Press. pp. 1491-1502.
- Hughes, H.P.A., Kasper, L.H., Little, J. and Dubey J.P. (1987) Irrelevance of NK cells in parasite killing in *Toxoplasma gondii* infection (personal communication).
- Hatcher, F.M. and Kuhn, R.E. (1982) Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science*, **218**:295-296.
- Hauser, W.E. Jr., Sharma, S.D. and Remington, J. S. (1982) Natural killer cells induced by acute and chronic *Toxoplasma* infection. *Cell. Immunol.*, **69**:330-346.
- Hauser, W.E. Jr., Sharma, S.D. and Remington, J.S. (1983) Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, **131**(1):458-463.
- Hauser, W.E. Jr. and Tsai, V. (1986) Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* *in vitro*. *J. Immunol.*, **136**(1):313-319.
- Herberman, R.B. (1974) Cell-mediated immunity to tumor cells. *Advances in Cancer Res.*, **19**:207-263.
- Herberman, R.B. (1981) Natural killer (NK) cells and their possible roles in resistance against disease. *Immunol. Rev.*, **1**(1):1-65.
- Hunter, K.W. Jr., Folks, T.M., Sayles, P.C. and Strickland, G.T. (1981) Early enhancement followed by suppression of natural killer cell activity during murine malarial infections. *Immunol. Lett.*, **2**:209-212.
- Kamiyama, T. and Hagiwara, T. (1982) Augmented followed by suppressed levels of natural cell-mediated cytotoxicity in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, **36**(2):628-636.
- Kirkpatrick, C.E. and Farrell, J.P. (1984) Splenic natural killer cell activity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Cell. Immunol.*, **85**:201-214.
- Kogut, M.H. and Lange, C. (1989) Interferon- γ mediated inhibition of the development of *Eimeria tenella* in cultured cells. *J. Parasitol.*, **75**(2):313-

- 317.
- Lawn, A.M. and Rose, M.E. (1982) Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. *J. Parasitol.*, 68(6):1117-1123.
- Lillehoj, H.S. (1986) Immune response during coccidiosis in SC and FP chickens I. *In vitro* assessment of T cell proliferation response to stage-specific parasite antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 13:321-328.
- Lillehoj, H.S. and Ruff, M.D. (1987) Comparison of disease susceptibility and subclass-specific antibody response in SC and FP chickens experimentally inoculated with *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima*. *Avian Dis.*, 31(1):112-119.
- Merino, F and Cruz, I. (1984) Natural killer activity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, 73:347-351.
- Nauss, K.M., Pavlina, T.M., Kumar, V. and Newberne, P.M. (1984) Functional characteristics of lymphocytes isolated from the rat large intestine: response to T-cell mitogens and natural killer cell activity. *Gastroenterology*, 86:468-475.
- Peirce, M.A. (1980) A simple staining technique to demonstrate the sporozoite refractile globule in coccidian parasites. *Parasitology*, 80:551-554.
- Pittilo, R.M., Ball, S.J., Norton, C.C. and Gregory, M.W. (1986) Penetration of chicken peripheral blood lymphocytes by *Eimeria acervulina* sporozoites. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 80(5):569-571.
- Quan, P.C., Rager-Zisman, B., Wittner, M. and Tanowitz, H.B. (1983) Interferon and natural killer cells in murine Chagas' disease. *J. Parasitol.*, 69(6):1164-1166.
- Rose, M.E. (1987) *Eimeria*, *Isospora* and *Cryptosporidium*. In *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis* (ed. E.J.L. Soulsby), Vol. III. Protozoa. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 276-312.
- Rosenberg, E.B., Herberman, R.B., Levine, P.H., Halterman, R.H., McCoy, J.L. and Wunderlich, J.L. (1972) Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins. *Int. J. Cancer*, 9:648-656.
- Schmatz, D.M., Crane, M.S. Jr. and Murray, P.K. (1986) *Eimeria tenella*: Parasite-specific incorporation of ³H-uracil as a quantitative measure of intracellular development. *J. Protozool.*, 33(1): 109-114.
- Skamene, Stevenson, M.M. and Lemieux, S. (1983) Murine malaria: dissociation of natural killer (NK) cell activity and resistance to *Plasmodium chabaudi*. *Parasite Immunol.*, 5:557-565.
- Solomon, J.B. (1986) Natural cytotoxicity for *Plasmodium berghei* *in vitro* by spleen cells from susceptible and resistant rats. *Immunology*, 59:277-286.
- Soulsby, E.J.L. (1978) *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. 6th ed., Bainbridge, Tindall & Cassell Ltd. pp. 724-734.
- Tagliabue, A., Befus, A.D., Clark, D.A. and Bienstock, J. (1982) Characteristics of natural killer cells in the murine intestinal epithelium and lamina propria. *J. Exp. Med.*, 155:1785-1796.
- Wilson, A.D., Stokes, C.R. and Bourne, F.J. (1986) Morphology and functional characteristics of isolated porcine intraepithelial lymphocytes. *Immunology*, 59:109-113.

=Abstract=

**Development of *Eimeria tenella* in MDBK cell culture with a note
on enhancing effect of preincubation with chicken spleen cells**

Jong-Yil Chai, Soon-Hyung Lee, Woong-Heum Kim* and Chong Ku Yun*

Department of Parasitology and Institute of Endemic Diseases, Department of Pediatrics,
College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea*

Eimeria tenella, an intracellular protozoan parasite infecting the epithelial cells of the ceca of chickens, causes severe diarrhea and bleeding that can lead its host to death. It is of interest that *E. tenella* first penetrate into the mucosal intraepithelial lymphocytes(IEL) before they parasitize crypt or villous epithelial cells. This *in vitro* study was undertaken to know whether the penetration of *E. tenella* into such a lymphoid cell is a beneficial step for the parasite survival and development.

Three sequential experiments were performed. First, the *in vitro* established bovine kidney cell line, MDBK cells, were evaluated for use as host cells for *E. tenella*, through morphological observation. Second, the degree of parasite development and multiplication in MDBK cells was quantitatively assayed using radioisotope-labelled uracil (^3H -uracil). Third, the *E. tenella* sporozoites viability was assayed after preincubation of them with chicken spleen cells.

E. tenella oöcysts obtained from the ceca of the infected chickens were used for the source of the sporozoites. Spleen cells (E) obtained from normal chickens (FP strain) were preincubated with the sporozoites (T) at the E:T ratio of 100:1, 50:1 or 25:1 for 4 or 12 hours, and then the mixture was inoculated into the MDBK cell monolayer.

Morphologically the infected MDBK cells revealed active schizogonic cycle of *E. tenella* in 3~4 days, which was characterized by the appearance of trophozoites, and immature and mature schizonts containing merozoites. The ^3H -uracil uptake by *E. tenella* increased gradually in the MDBK cells, which made a plateau after 48~60 hours, and decreased thereafter. The uptake amount of ^3H -uracil depended not only upon the inoculum size of the sporozoites but also on the degree of time delay (preincubation; sporozoites only) from excystation to inoculation into MDBK cells. The ^3H -uracil uptake became lower as the preincubation time was prolonged. In comparison, after preincubation of sporozoites with spleen cells for 4 or 12 hours, the ^3H -uracil uptake was significantly increased compared with that of control group.

From the results, it was inferred that, although the penetration of *E. tenella* sporozoites into the lymphoid cells such as IEL is not an essential step, it should be at least a beneficial one for the survival and development of sporozoites in the chicken intestine.