

폐흡충(*Paragonimus westermani*) 피낭유충에 대한 대식세포의 세포독성에 있어서 항체 및 보체가 미치는 영향*

한양대학교 의과대학 기생충학교실

민득영 · 안명희 · 김경민 · 임미혜 · 박순용

요 약 : 폐흡충(*Paragonimus westermani*) 피낭유충을 흰쥐(Wistar) 및 고양이에 감염시키고 감염 현청이나 분획분리된 IgG 또는 보체가 정상 또는 감염 흰쥐 복강 대식세포의 폐흡충 유충 살충에 어떠한 영향을 미치는지 부착 실험(adherence assay) 및 세포독성을 통하여 관찰하였다. 폐흡충 감염은 복강 대식세포를 비특이적으로 활성화시켜 대식세포의 유충에 대한 부착률 및 세포독성을 증가시켰으며, 감염 현청을 첨가하였을 때 항체-의존 세포매개성 세포독성에 의해 배양 6시간 후에 세포 부착률 및 세포독성이 가장 강하였다. 감염 현청을 56°C에서 30분간 가열하였을 때 IgE 항체 번성에 의해 세포독성이 저하되었다. IgG 및 보체를 첨가한 경우 세포 부착률은 낮았으나 24시간 후에는 유충이 사멸하였다. 그러나 보체의 단독적인 역할은 이 실험에서 알 수 없었다.

Key words: *Paragonimus westermani*, antibody, complement, macrophage, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

서 론

폐흡충증(paragonimiasis)은 한국을 포함하여 일본 · 중국 · 동남아시아 · 아프리카 · 중남미 등에 넓게 만연되어 있고, 특히 우리 나라에서는 남해안 지역 및 산간지역에 만연되어 간흡충증과 더불어 중요한 기생충 질환으로 인정되고 있으며 그 원인 기생충으로 *Paragonimus westermani*가 알려져 있다(蘇, 1987).

폐흡충은 제 2 중간숙주로부터 감염기 유충(metacercaria)이 섭취되어 장벽을 뚫고 복강, 횡격막 등을 거쳐 폐장에 도달하여 성숙함으로써 기생생활을 영위하게 되는 것으로, 섭취되어 성숙체가 되기까지 조직이행 행을 하거나 폐실질 내에 기생함으로써 숙주체내에서 림프구의 활성화, 조직내 대식세포의 활성화, 혈액내 보체의 활성화 등 일련의 면역학적 반응이 야기될 것으로 추정된다. 또한 조직내 기생 성충의 주변에는 호산구 침윤을 동반한 염증반응이 나타나며 육아종성 포낭을 형성하는 과민성 조직반응을 보인다(Beaver *et al.*, 1984). 그러나 아직도 폐흡충에 의해 야기되는 숙주-기생충 관계에서 숙주의 방어기전이나 기생충의 숙주 방어기전 중 도피에 관한 연구 보고는 최소한 실경이다.

대식세포는 생체내에서 여러 가지 기전에 의해 숙주의 방어기전에 직접 또는 간접으로 관여한다. 유충 감염에서 BCG 또는 *Corynebacterium parvum*으로 활성화된 대식세포는 시험관 내에서 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*) schistosomula를 살멸시키는 비특이적 기능을 보이며(Mahmoud *et al.*, 1979), 특히 IgE 항체의 존재하에서 대식세포가 기생충을 살멸시키거나 IgE항체와 호산구(eosinophil)의 관여로 대식세포가 기생충을 살멸시키는 등 특이적 항체-의존 세포매개성 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC)을 보이기도 한다(Capron *et al.*, 1975; Haque *et al.*, 1980 & 1981; Metha *et al.*, 1980; Oxenham *et al.*, 1984).

이 연구에서는 폐흡충 유충의 조직 이행 시기에 발생할 수 있는 숙주의 방어 면역기전 중 대식세포(macrophage)의 역할을 알아보고자 항체-의존 세포매개성 세포독성 및 보체(complement)의 역할 등을 시험관 내에서 대식세포의 유충에 대한 부착(adherence)과 유충의 사멸을 통하여 관찰하였다.

실험재료 및 방법

1. 폐흡충 피낭유충의 수집

폐흡충 만연지역의 하나인 진라남도 완도군 보길도에서 폐흡충의 제 2 중간숙주인 참가재(*Cambaroides similis*)를 채집하여 마쇄한 후 인공소화액(pepsin 0.2 g,

* 이 논문은 1988년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구구성비에 의하여 연구되었음.

농엽산 0.7 ml, 증류수 99.3 ml)에 처리하고 피낭유충(metacercaria)을 분리하였다.

2. 피낭유충의 흰쥐 및 고양이 감염

분리한 피낭유충 20개 내외를 150~200 g 정도의 음성 Wistar주 흰쥐 및 고양이에게 경구적으로 감염시켰다. 감염된 흰쥐는 감염 6주 후 혈청을 분리하거나 복강내 대식세포를 얻기 위해 이용하였으며, 고양이는 감염 6주 후 희생시켜 혈청을 분리, IgG 항체를 분획하는데 이용하였다. 흰쥐 및 고양이의 폐흡충 감염은 혈청을 이용한 한천이중확산법으로 항체 생성을 확인하고 대변내 충란을 검출함으로써 감염을 확인하였다.

3. 피낭유충의 탈낭(excystation)

분리한 피낭유충을 세척한 후 40°C~41°C Tyrode 용액(pH 7.4)에서 2시간 배양하여 탈낭시켰다. 탈낭 과정의 모든 조작은 무균상태로 시행하였다. Tyrode 용액의 조성은 다음과 같다(NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, CaCl₂ 0.2 g, MgCl₂ 0.1 g, NaH₂PO₄·H₂O 1.0 g, NaHCO₃ 1.0 g, 증류수 1.0 l).

4. 항혈청의 분리

감염된 흰쥐는 후안와 경맥총(retro-orbital plexus)에서, 고양이는 심장에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 한편 참고 자료를 얻고자 폐흡충 감염 환자에서도 혈청을 분리하여 사용하였다.

5. 항혈청내의 IgG의 분리

(1) 총 면역글로블린의 분리

감염이 확인된 고양이를 마취시켜 심장에서부터 혈액을 채취하여 실온에서 1시간 가량 방치한 후 4°C에서 2~3시간 저장하고 원침하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 Johnstone and Thorpe(1987)의 방법에 따라 총 면역글로블린을 분리하였다. 즉 분리된 혈청을 25°C로 유지시킨 다음 sodium sulfate를 18%(w/v) 되게 서서히 첨가하며 저어, 25°C 항온기에 30분 동안 둔 다음 25°C, 300 g에서 30분간 원심분리하였다. 얻어진 침사를 혈청량 1/2정도의 증류수에 녹여 14%(w/v)로 sodium sulfate를 첨가한 다음 위와 같은 방법으로 원심분리하였으며, 이때 얻어진 침사를 0.05M Tris(pH 7.2) 완충 용액으로 녹여 4°C에서 0.05M Tris(pH 7.2) 완충 용액으로 2일간 투석하였다. 투석 후 일부는 냉동건조시켜 총 면역글로블린으로 사용하였으며, 일부는 총 면역글로블린에서 IgG를 분리하는 데에 사용하였다.

(2) Ion exchange chromatography

IgG를 분리하기 위하여 총 면역글로블린을 filter(pore size, 0.45µm)에 여과하여 ion exchange chromatography를 시행하였다. 즉 anion exchanger를 사용한 TSK DEAE-5PW(LKB 2133-500, 8×75 mm, Bromma, Sweden) column을 0.05M Tris(pH 7.2)완충 용액으로 equilibrium시킨 다음, 동일한 완충 용액을 0.5 ml/min의 유속으로 high performance liquid chromatography (HPLC)를 시행하였다. Fraction collector(Superrac

2211, LKB, Bromma, Sweden)로 30초 마다 각 분획을 수집하였고 동시에 파장 280 nm에서 UV detector(LKB, Bromma, Sweden)로 추적하여 IgG를 분리하고 냉동건조한 다음 농축하여 사용하였다.

6. 대식세포의 분리

정상 Wistar주 흰쥐(200 g 내외)에 멸균된 경광유(light mineral oil, Sigma, St. Louis, MO)를 10 ml 복강내로 주입한 4일 후에 흰쥐를 희생시키고 30 ml의 RPMI 1640(GIBCO, Grand Island, NY)을 복강에 주입하여 1분간 복부 마사지한 후 복강 삼출액(peritoneal exudate)을 수집하였다. 수집한 복강 삼출액은 4°C 250 g로 원심분리시켜 광유 부분을 제거하고 RPMI/10% fetal calf serum(FCS)으로 3회 세척하였다. 세척된 복강 삼출세포(peritoneal exudate cell: PEC)는 1×10⁷ cells/plate로 배양접시(polystyrene tissue culture dish, COSTAR, Cambridge, Mass.)에 분주하여 36°C 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 배양 2시간 후 RPMI 1640으로 씻어 비부착 세포를 제거하고 부착된 세포를 실험에 사용하였다. 배양 접시에 부착능이 있는 세포는 Adams(1979)의 방법에 따라 non-specific esterase staining을 한 결과 90% 이상이 대식세포였다.

7. 탈낭유충에 대한 항체 및 보체와 대식세포의 영향

탈낭유충은 24 well plate(COSTAR, Cambridge, Mass.)의 각 well에 20마리 내외가 되도록 하여 RPMI/FCS배지에 배양하였다.

탈낭유충(target)과 대식세포(effector cell)와 적정 비율을 정하기 위하여 탈낭유충:대식세포의 비율 1:1×10², 1:1×10³, 1:1×10⁴, 1:1×10⁵, 1:1×10⁶으로 하여 예비실험한 결과 탈낭유충의 생존률(viability)에 영향을 미치지 않으면서 세포부착 측정에 적당한 1:1×10⁴을 적정비율로 하여 실험하였다.

감염 혈청, 총 면역글로블린과 IgG의 첨가량을 알아보기 위하여 탈낭유충, 대식세포, 보체를 넣고 배양 6시간 후에 탈낭유충의 운동성과 대식세포의 부착을 관찰한 결과 감염 혈청은 100 µl, 총 면역글로블린은 3.6 mg/ml, IgG는 3 mg/ml이 최적 농도로 나타나 이 농도를 첨가하여 세포 부착실험을 시행하였다. 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 측정하였다. 보체는 상판화된 토끼의 혈청 보체(GIBCO, Grand Island, NY)를 150 ml씩 첨가하였으며 대식세포, 항체, 보체의 최종 부피는 1ml가 되게 하여 36°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하면서 유충에 대한 대식세포의 부착과 유충의 운동성 변화를 시간 경과에 따라 관찰하였다.

배양 후 6시간, 24시간, 48시간에 탈낭유충에 대한 대식세포의 부착 정도와 48시간 후의 탈낭 유충의 운동성 변화 여부를 관찰하였으며, 폐흡충의 탈낭유충에 대한 대식세포의 부착은 각 유충의 표면에 5개 이상의 대식세포가 부착되었을 때 세포부착으로 계산하였다 (Chung *et al.*, 1982).

모든 비운동성 유충은 새 배지에 옮겨 24시간 동안 관찰하여 사멸을 확인하였다.

폐흡충 탈낭유충에 대한 항체 및 보체와 대식세포의 영향을 관찰하기 위하여 다음과 같이 실험군을 분리하였다.

- 제 1군 정상 흰쥐 대식세포+탈낭유충
- 제 2군 감염 흰쥐 대식세포+탈낭유충
- 제 3군 정상 흰쥐 대식세포+정상 흰쥐혈청+탈낭유충
- 제 4군 감염 흰쥐 대식세포+정상 흰쥐혈청+탈낭유충
- 제 5군 정상 흰쥐 대식세포+감염 흰쥐혈청+탈낭유충
- 제 6군 정상 흰쥐 대식세포+비동 감염 흰쥐혈청+탈낭유충
- 제 7군 정상 흰쥐 대식세포+감염 고양이 총 면역글로블린+보체+탈낭유충
- 제 8군 정상 흰쥐 대식세포+감염 고양이 IgG+보체+탈낭유충

결 과

1. 복강삼출 대식세포의 폐흡충 유충에 대한 부착
복강 대식세포들은 그 기원(origin)이나 배양 조건에 따라 탈낭유충에 대한 부착률에 차이는 있으나 전반적으로 배양 6시간 및 14시간 사이에 가장 높은 부착률을 보였으며 그 이후에는 점차 감소하였다(Table 1; Fig. 1).

비감염 정상 흰쥐의 복강 대식세포와 탈낭유충만의 배양(Ⅰ군)에서 6시간 및 14시간 후에 각각 25.8%의 부착률을 보였으며 이후 48시간까지 차차 부착률이 감소하는 경향을 보였다. 한편 폐흡충 감염 흰쥐의 복강 대식세포와 탈낭유충을 배양(Ⅱ군)하였을 때 6시간 및 14시간 후에 각각 35.3%의 부착률을 보였으며 이후 약간씩 감소하였는데 이는 정상 대식세포의 부착률(Ⅰ군)보다 전반적으로 높은 율을 보였다(Table 1; Fig. 2). 비감염 정상 흰쥐의 혈청, 비감작 대식세포를 함께 배양(Ⅲ군)하였을 때 혈청 첨가의 영향없이 정상 복강세포와 탈낭유충을 배양하였을 때와 비슷한 부착률을 보였다. 그러나 정상 혈청을 첨가하고 감염 흰쥐의 복강세포를 배양(Ⅳ군)하였을 때에는 부착률이 6시간 후에 가장 높아 51.5%이었으며 이후 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였으나 Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ군에 비해 월등히 높은 부착률을 보였다(Table 1; Fig. 2).

2. 감염 흰쥐의 혈청 및 비동화 혈청 첨가에 따른 정상 복강 대식세포의 부착

감염 흰쥐의 혈청내 항폐흡충 항체 및 보체가 대식세포의 부착에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 감염 흰쥐의 혈청을 첨가하였을 때(Ⅴ군)와 56°C에서 30분간 비동화된 혈청을 첨가하였을 때(Ⅵ군) 배양 6시간, 14시간, 24시간 및 48시간 후에 각각 55.1%, 44.9%, 42.9%, 38.8%(Ⅴ군)와 36.4%, 31.8%, 20.5%, 13.6%(Ⅵ군)의 부착률을 보여 혈청내 항폐흡충 항체 및 보체가 존재할 때 높은 부착을 보였다. 이러한 높은 부착률은 감염 흰쥐의 복강 대식세포의 부착률(Ⅳ군)과 비슷하였으나 비동화시켰을 때(Ⅵ군)는 부착률이 현저

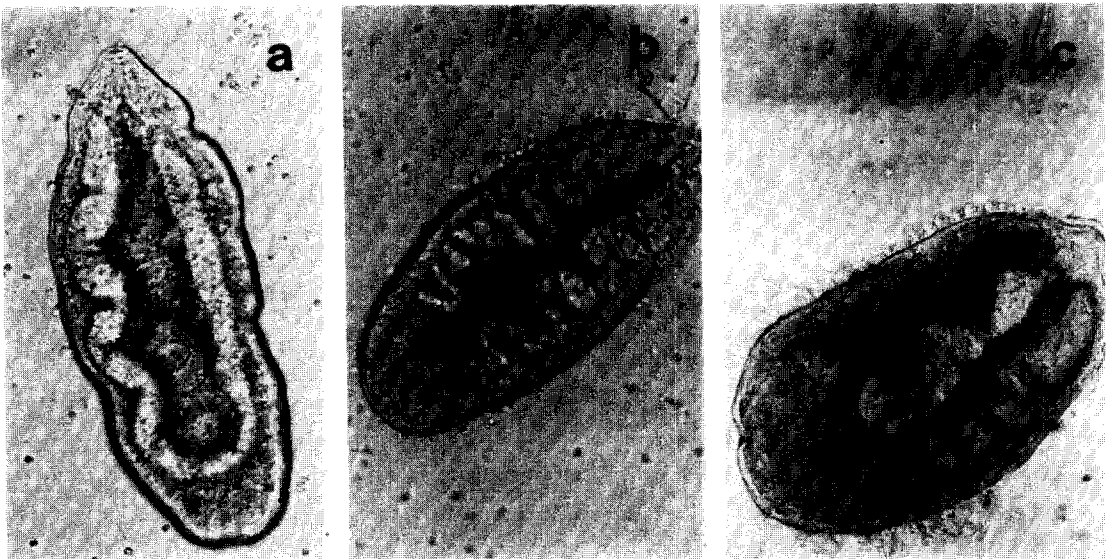


Fig. 1. *P. westermani* metacercariae incubated with rat peritoneal macrophages in RPMI/FCS. After 6 hour incubation in various conditions cell adherence was classified as negative response (a), moderate (b) or extensive attachment (c).

Table 1. The percent of metacercariae showing peritoneal macrophage adherence after being incubated with cells, sera or IgG antibody from normal rats or rats infected with *P. westermani*

Conditions*	Incubation time (hours) (No. adherent/No. exam, %)**			
	6	14	24	48
I. NC	8/31(25.8)	8/31(25.8)	6/31(19.4)	6/31(19.4)
II. Inf. C	12/34(35.3)	12/34(35.3)	9/34(26.5)	11/34(32.4)
III. NRS+NC	14/50(28.0)	13/50(26.0)	9/50(18.0)	7/50(14.0)
IV. NRS+Inf. C	24/47(51.1)	21/47(44.7)	21/47(44.7)	18/47(38.3)
V. Inf. RS+NC	27/49(55.1)	22/49(44.9)	21/49(42.9)	19/49(38.8)
VI. Inact-Inf. RS+NC	16/44(36.4)	14/44(31.8)	9/44(20.5)	6/44(13.6)
VII. T-Ig+C+NC	18/55(32.7)	N. D.***	15/55(27.3)	14/55(25.5)
VIII. IgG+C+NC	9/38(23.7)	N. D.	0/38(0)	0/38(0)

*NC : adherent cells from normal rat peritoneal exudate cells (PEC)
 Inf. C : adherent cells from rat PEC infected with *P. westermani*
 NRS : serum from normal rat
 RS : serum from rat infected with *P. westermani*
 Inact-Inf. RS : inactivated Inf. RS at 56°C for 30 minutes
 T-Ig : total immunoglobulins from cat infected with *P. westermani*
 IgG : IgG fraction from cat infected with *P. westermani*
 C : complement
 ** Experiments were repeated in duplicate.
 *** N.D. : Not done

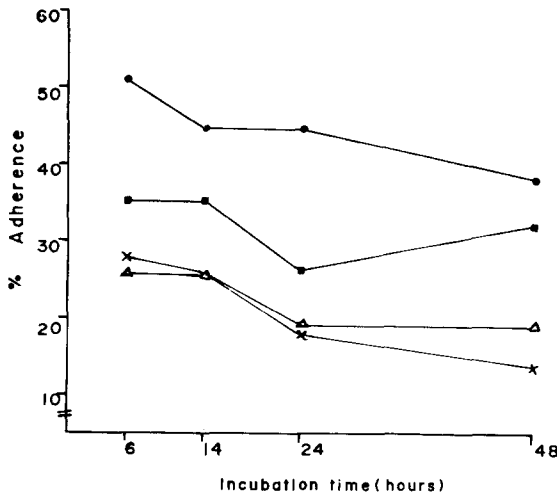


Fig. 2. The peritoneal macrophage adherence on *P. westermani* metacercaria after incubation with various conditions.
 (Δ-Δ: cells from normal rat,
 ■-■: cells from infected rat,
 ×-×: cells from normal rat + normal rat serum,
 ●-●: cells from infected rat + normal rat serum).

리 저하되어 정상 흰쥐 대식세포의 부착률(I군)보다 약간 높은 양상을 보였다(Table 1; Fig. 3). 한편 V

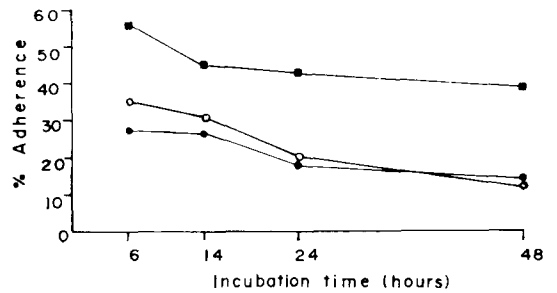


Fig. 3. The effects of fresh and inactivated sera from *P. westermani* infected rat after incubation with normal peritoneal macrophages.
 (●-●: normal rat serum,
 ■-■: infected rat serum,
 △-△: heat-inactivated infected serum at 56°C for 30 minutes)

군에서는 48시간 후 대부분의 대식세포들이 총체 주변에 응집되어 있었다.

3. 항페흡충 총 면역글로블린 및 IgG 항체 분획에 의한 복강 대식세포의 부착률

현청내 면역글로블린 이외의 요인을 제거하고 총 면역글로블린(T-Ig)과 IgG를 분리하여 각각 보체의 공존하에서 관찰하였을 때 T-Ig가 첨가된 경우(VII군), 정상 대조군(I군) 보다는 약간 높은 부착률을 보였으나 IgG가 첨가된 경우(VIII군) 배양 6시간 후 I군과 비슷한 낮은 부착률을 보였다. 그러나 배양 24시간 이후에는

세포의 부착을 전혀 관찰할 수 없었으며 모든 탈낭 유충 역시 비동화(immobilization)되어 있었다. 또한 V 군에서와 마찬가지로 복강 대식세포들이 배양 12~14 시간 후에 탈낭유충 주변에 응집(aggregation)되어 있음을 관찰할 수 있었다(Table 1).

4. 폐흡충 감염 흰쥐의 혈청, 항체, 보체 및 복강 대식세포에 의한 탈낭유충의 운동성 변화 및 세포독성

폐흡충 감염 흰쥐의 항체음성 항원침 및 정상 복강 대식세포의 탈낭유충에 대한 운동성 변화를 관찰한 나 현침 첨가 없이 복강 대식세포와 배양한 경우 배양 48 시간까지 대부분의 유충이 활발히 움직이거나 중등도 이상의 운동성을 유지하고 있었으나 항원침을 첨가한

경우 배양 6시간 후 모두 생존하였으나 이미 운동성이 약간 저하되었으며 14시간 후에 36.7%, 24시간 후에 44.9%, 48시간 후에는 100%의 비운동성을 보였고 모든 비운동성 유충은 사멸됨을 관찰할 수 있었다(Table 2 & 3). 그러나 감염 혈청을 56°C에서 30분간 가열하여 열불안정성(heat-labile) IgE 항체 및 보체를 비동화시켰을 때 배양 6시간 후에 모든 유충은 36.4%의 대식세포 부착률에도 불구하고 모두 운동성이 활발하였고 14시간 후까지 대부분에서 중등도 이상의 운동성을 보였으며 배양 24시간 후 비운동성 31.8%, 48시간 후 47.7%로 관찰되어 유충의 반 이상에서 운동성은 저하되었으나 생존함을 관찰할 수 있었다(Table 2 & 3). 한편 분획 분리된 IgG 및 보체를 첨가하여 배양한

Table 2. The number of non-motile metacercariae after incubation with anti-serum or IgG antibody and peritoneal macrophages from normal rat

Conditions* incubated	No. of metacercariae examined	No. of adherent or non-motile metacercariae by incubation time(hours)							
		6		14		24		48	
		A**	N-M***	A	N-M	A	N-M	A	N-M
NC	31	8(25.8)	0(0)	8(25.8)	0(0)	6(19.4)	0(0)	6(19.4)	0(0)
Inf. RS+NC	49	27(55.1)	0(0)	22(44.9)	18(36.7)	21(42.9)	22(44.9)	19(38.8)	49(100.0)
Inact. Inf. RS+NC	44	16(36.4)	0(0)	14(31.8)	0(0)	9(20.9)	14(31.8)	6(13.6)	21(47.7)
IgG+C+NC	38	9(23.7)	0(0)	N. D.	N. D.	0(0)	38(100.0)	0(0)	38(100.0)

*NC : adherent cells from normal rat peritoneal exudate cells(PEC)
 Inf. RS : serum from rat infected with *P. westermani*
 Inact. Inf. RS: inactivated Inf. RS at 56°C for 30 minutes
 IgG : IgG fraction from cat infected with *P. westermani*
 C : complement
 **A : No. (%) adherent metacercariae
 ***N-M : No. (%) non-motile metacercariae
 All non-motile metacercariae were not reinforced in movement during 24 hours of incubation in fresh medium.

Table 3. Motility changes of survived metacercariae after incubation with antiserum or IgG antibody and peritoneal macrophages from normal rat

Conditions* incubated	No. of metacercariae examined	% survived and motility** of metacercariae by incubation time(hours)			
		6	14	24	48
NC	31	(100)‡	(100)‡	(100)‡	(100)‡
Inf. RS+NC	49	(100)‡	(63.3)‡	(55.1)+	(0)–
Inact. Inf. RS+NC	44	(100)‡	(100)‡	(68.2)‡	(52.3)+
IgG+C+NC	38	(100)‡	N. D.	(0)–	(0)–

*NC : adherent cells from normal rat peritoneal exudate cells(PEC)
 Inf. RS : serum from rat infected with *P. westermani*
 Inact. Inf. RS: inactivated Inf. RS at 56°C for 30 minutes
 IgG : IgG fraction from cat infected with *P. westermani*
 C : complement
 **Motility : ‡ active, † moderate, + sluggish, – non-motile
 All non-motile metacercariae were not reinforced during 24 hours of incubation in fresh medium.

Table 4. The percent of metacercariae showing peritoneal macrophage adherence after being incubated with cells and sera from paragonimiasis patient

Conditions* incubated	No. adherent metacercariae/No. exam (%) by incubation time(hours)		
	14	18	48
NC	8/31(25.8)	8/31(25.8)	7/31(22.6)
Inf. HS+NC	12/26(46.2)	17/26(65.4)	9/26(34.6)
Inf. HS+Inf. C	17/26(65.4)	19/26(73.1)	12/26(46.2)

*NC : adherent cells from normal rat peritoneal exudate cells(PEC)

Inf. C : adherent cells from rat PEC infected with *P. westermani*

Inf. HS: sera from paragonimiasis patient

경우 배양 6시간 후에 대식세포 부착률은 23.7%이었으나 모두 살아있었으며 운동성은 중등도로 저하되었다. 그러나 배양 24시간 후에는 모두 운동성을 잃고 사멸하였음을 관찰할 수 있었다(Table 2 & 3).

5. 폐흡충 환자의 혈청에 의한 정상 및 폐흡충 감염 흰쥐 복강 대식세포의 탈낭유충에 대한 부착
정상 복강세포와 탈낭유충만을 배양하였을 때 배양 14시간, 18시간, 48시간 후의 부착률은 각각 25.8%, 25.8% 및 22.6%이었다. 그러나 정상 복강세포에 감염 혈청을 첨가하였을 때에는 각각 46.2%, 65.4% 및 34.6%로 높은 부착률을 보였으며, 감염 혈청 및 감염 흰쥐 복강세포를 함께 첨가하여 배양하였을 때에는 65.4%, 73.1% 및 46.2%로 시간이 경과함에 따라 부착률이 감소하였으나 정상 세포 첨가군에 비해 2배 이상 높은 부착률을 보였으며 감염 환자의 혈청을 첨가한 경우 배양 18시간 후에 가장 높은 부착률을 보였다(Table 4).

고 찰

대식세포의 암세포에 대한 세포독성은 이미 오래 전부터 알려져 왔으나 기생 유충(helminths)에 대한 숙주 대식세포의 면역학적 기능에 대해서는 근래에야 알려지고 있다. Capron *et al.* (1975)이 정상 흰쥐의 복강 대식세포가 특이 IgE 항체 존재 하에서 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*) schistosomule에 부착하여 충체를 파괴함을 보고한 이래 대식세포의 기생충에 대한 면역학적 기능에 관한 많은 연구가 보고되고 있다. Dean *et al.* (1975)은 만손주혈흡충 schistosomule이 감염된 기니피크의 항혈청에서 분리된 IgG₂ 항체 및 heat-labile factor에 의해 죽는 것을 관찰하였으며 이때 보체의 역할은 중요치 않은 것으로 보고하였으며, Butterworth *et al.* (1975)는 같은 기생충 모형에서 호산구에 의한 항체-의존성 세포독성을 보고하였다. Perez and Smithers(1977) 역시 같은 기생충 모형에서 감염된 백서의 혈청과 대식세포를 혼합배양할 때 기생충에 대식세포가 부착하여 포피구조를 변형시켜 죽이며, 이때 보체 의존성은 없다고 하였다. Haque *et al.*(1980,

1981 & 1982)은 사상충 *Dipetalonema viteae* microfilaria가 흰쥐 복강 대식세포에 의한 특이 IgE 항체매개 세포독성으로, 빠리는 혼합배양 3시간 이후에 80% 이상이, 16~24시간 이내에 90% 이상이 사멸된다고 하였으며, 항혈청을 56°C에서 2시간 가열하여 비동화시켰을 때 이러한 사멸은 현저히 감소한다 하여 대식세포의 microfilaria 사멸 기전에 특이 IgE가 중요한 요인이 됨을 보고하였다. 이러한 대식세포의 IgE 의존 활성화(IgE-dependent activation)는 대식세포에 IgE 수용체(IgE receptor, Fcε)에 IgE의 Fc부위가 결합함으로써 이루어지며(Dessaint *et al.*, 1979; Joseph and Capron, 1985) 이때 선택적인 β-glucuronidase의 유리 및 중성 단백질 효소(neutral proteases)의 배설을 증가시키며 superoxide anion을 생성함(Capron *et al.*, 1983)으로써 기생충 사멸에 관여하게 된다.

유충 감염에서 IgE 항체의 상승은 흔히 볼 수 있다(Jarrett, 1972; Kojima *et al.*, 1972; Jarrette and Bazin, 1974). 関 등(1980)은 간흡충 감염 백서의 혈청내 총 IgE 및 특이 IgE 항체를 측정하고 감염 4주 후에 그 값이 결정에 이르며 정상치의 약 40배에 이른다고 하였으며, 또한 간흡충 감염 환자에서 (Min and Soh, 1983) 혈청내 IgE 상승은 평균 정상인의 약 7배에 이른다고 하였고, Yokogawa *et al.* (1976)의 폐흡충 감염 환자에서 총 IgE의 높은 상승을 보고한 바 있다. 이러한 IgE 상승을 관찰하기 위한 즉시형 과민반응인 피내반응 검사가 폐흡충 및 간흡충 감염 진단을 위한 검사법으로 흔히 이용되고 있으며 폐흡충 감염시 강한 양성 반응을 나타냄으로써 IgE 항체의 생성 및 증가를 진단한다.

이 실험에서는 폐흡충 감염 흰쥐의 혈청, 분리된 IgG 및 보체가 흰쥐 복강 대식세포의 폐흡충 유충에 대한 세포독성에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 이 실험에서 감염된 흰쥐의 혈청과 정상 복강세포를 넣어주었을 때 유충에 대한 부착률이 배양 6시간 후 55.1%로 가장 높았으며 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향이 있었으나 다른 실험군에 비해 월등히 높았으며 세포독성도 높았다. 한편 감염 흰쥐 혈청을 56°C에서 30분간 가열하였을 때 부착률은 배양 6시간 후에 36.4%

로 가열 전보다 훨씬 저하되었음을 알 수 있었으며 48 시간의 관찰에서 세포독성도 감염 현청을 넣어준 실험군에 비해 절반 정도 저하되었음을 알 수 있었다(Table 1, 2 & 3). 이러한 결과는 감염 현청을 가열함으로써 보체가 비동화됨과 동시에 감염 현청내 IgE 항체가 특성을 잃어 대식세포에 영향을 주지 못함으로써 일어나는 현상으로 해석된다. 실제로 농축된 IgG 항체와 보체의 존재하에서 배양 6시간 후 부착률은 23.7%에 불과하였으며(Table 1) 이러한 부착률은 배지에 대식세포만을 배양하였을 때와 비슷한 양상을 보여(IgG 항체 중 특이 IgG 항체는 일부일지라도) IgG 항체와 보체의 역할은 최소한 배양 6시간 까지는 대식세포의 세포독성에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 생각된다. 그러나 IgG 항체와 보체를 넣어준 경우 시간이 경과함에 따라 배양 초기의 낮은 부착률에도 불구하고 배양 24시간 이후에는 모두 운동성을 잃고 사멸하였다(부착률 0%). 이러한 결과는 대식세포의 IgE 매개 부착(IgE-mediated adherence) 또는 IgE 매개 세포독성(IgE-mediated cytotoxicity)은 배양 6시간 이내에 결정에 이르게 의미하며 IgG 항체 또는 보체에 의한 사멸은 배양 6시간 이후에 진행되는 것으로 생각된다. Pestel *et al.* (1981)은 흰쥐 복강 대식세포는 IgG 항체에 의해 macrophage-triggering이 유발되어 효소 유리나 glucosamine incorporation이 증가하며 이때 aggregated IgG 양에 비례한다고 하였으며 대식세포의 IgE 의존 활성화는 10분부터, IgG에 의한 활성화는 6시간 이후에 보인다고 하였다. 또한 IgE dimer는 IgG 의존 활성화를 유의하게 증가시키나 IgG 또는 IgG 면역복합체(immune complex)에 의한 IgE 의존 활성화는 관찰할 수 없다고 하여 이 실험에서 IgG 및 보체에 의한 사멸이 6시간 이후에야 일어나는 결과와 유사하였다. Haque *et al.* (1981)은 사상충 *D. viteae* microfilaria 모형에서 IgE 항체 존재하에서 대식세포의 부착은 배양 초기에 일어나며, 이때 호산구 자체 또는 호산구 과립이 기생충에서부터 유래되는 호산구 화학주성인자(eosinophil chemotactic factor)가 관여한다고 하여 대식세포의 IgE 의존 활성화는 초기에 야기됨을 제시하고 있다.

이 실험에서 보체의 역할은 최소한 항체의 존재하에서만 대식세포의 세포독성을 증가시킬 수 있었으나(Table 1; group V 및 group W) 보체의 단독적인 역할에 대해서는 어떠한 영향을 줄 것인지 알 수 없다. Metha *et al.* (1980)은 감염현청을 56°C에서 3시간 가열하였을 때 대식세포의 어떠한 세포독성도 관찰할 수 없었으나 56°C에서 30분간 가열하고 16시간 후에 신선 혈청(fresh serum)을 첨가하면 낮은 율의 세포독성이 일어난다고 하여 보체의 부분적 회복에 의한 사멸로 추정하였다. Haque *et al.* (1982)은 *D. viteae* 감염시 혈중 항체 없이도 부경로(alternative pathway)를 통한 보체의 활성화로 충체에 대한 대식세포의 부착 및 사멸이 가능하다고 하였고, 이때 충체표면에는 C₃분자

가, 대식세포에는 C₃-수용체가 있으나 부착작용에는 충분치 않아 여기에 호산구나 그 생성물이 있어야 한다고 하였다. Oxenham *et al.* (1984) 역시 사상충 *B. pahangi* 감염 마우스의 혈청을 56°C, 30분간 가열하였을 때 정상 복강 대식세포는 1% 내외의 부착률을 보였으며 비감염 혈청을 아무런 처치를 하지 않았을 때 37±2%의 부착율을 보인다고 하고 heat-labile 항체와의 관계에서 보체의 보조적 역할을 제시하였다. 그러나 보체에 대한 수용체가 대식세포에 발현하는 과정이나 수용체의 양, 결합 후 세포활동에 의한 기생충 살멸 기전 등에 관한 보체의 단독적 역할 등은 앞으로 연구되어야 할 과제이다.

이 실험에서 감염 흰쥐의 복강세포 단독 배양군에서 전 관찰기간 동안 정상 복강세포 단독 배양군 보다 높은 부착률을 보였으며, 정상 혈청을 첨가하고 감염 흰쥐의 복강세포를 배양하였을 때에는 훨씬 높은 부착률을 보였고 실제로 세포독성도 높아 항체나 보체가 함께 있을 때 뿐만 아니라 폐흡충 감염으로 활성화된 대식세포는 단독으로도 세포독성을 보임을 알 수 있다. Mahmoud *et al.* (1979)은 BCG 및 *C. parvum*으로 활성화된 대식세포의 비특이적 세포독성을, Kubelka *et al.* (1982)은 T 세포군으로부터 얻어진 림포카인들(lymphokines, LK)에 의해 활성화된 대식세포의 비특이적 세포독성을, James *et al.* (1982)은 *S. mansoni* 감염 백서의 복강 대식세포의 세포독성을 보고한 바 있으며, Cster and Nacy(1984)는 LK로 처리한 resident peritoneal macrophage는 세포내 기생 원충인 *Leishmania tropica*의 감염에 대해 저항성을 갖게되며 그 기능은 LK처리 8시간 후에 결정에 도달하여 72시간 이상 지속되고 아울러 대식세포 내에 포함된 원충(amastigote형)을 파괴할 수도 있다고 하였다. Nacy *et al.* (1985)은 BCG로 면역된 마우스의 비장세포 배양액이나 ConA로 감작된 비감염 마우스 비장세포 배양액으로부터 얻어진 LK, recombinant interferon- γ (rIFN- γ) 및 non-interferon LK 등이 대식세포를 활성화시켜 *Leishmania major* amastigote형의 대식세포내 원충을 세포내에서 파괴하였다고 하였다. 또한 같은 연구팀(Davis *et al.*, 1988)은 BCG로 면역된 마우스 비장세포의 배양액으로부터 얻어진 LK에서 IFN- γ 를 고갈(deplete)시켰을 때 대식세포는 감염에 대한 저항을 나타내지 않았으며 IFN- γ 자체만으로는 대식세포를 활성화할 수 없어 IFN- γ 와 LK의 협조에 의해서만 세포가 활성화될 수 있음을 보고하여 활성화된 대식세포의 비특이적 세포독성을 제안하였다. 이 실험에서 폐흡충 감염 흰쥐의 복강 대식세포는 비감염 복강 대식세포에 비해 부착률이나 세포독성이 더 높았을 때 폐흡충 감염에 따라 어떤 경로로 대식세포가 활성화되었는지 이 실험 결과로는 알 수 없으며 폐흡충 항원 자체에 의한 macrophage activating factor(MAF)의 유리 여부 역시 더불어 연구되어야 할 과제로 생각된다.

참 고 문 헌

- Adams, D.O. (1979) Macrophages. In: Methods in Enzymology, vol. 58. Cell Culture, Jakoby, W.B. and Pastan; I.H. (editors) Academic Press, N.Y. pp.494-506.
- Beaver, P.C., Jung, R.C. and Cupp, E.W. (1984) Clinical parasitology, Lea & Febiger, Philadelphia, 9th ed. pp.464-470.
- Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Houba, V., Mahmoud, A.A.F., Sher, A. and Rees, P.H. (1975) Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*, 256:727-729.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M. (1975) Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophage to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*, 253:474-475.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Haque, A., Auriault, C. and Joseph, M. (1983) Macrophage as effector cells in helminth infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77(5):631-635.
- Chung, P.R., Ash, H.L. and Bruce, J.I. (1982) Antibody-dependent murine macrophage-mediated damage to *Schistosoma mansoni* schistosomula *in vitro*. *Cell. Immunol.*, 74:243-259.
- Davis, C.E., Belosevic, M., Meltzer, M.S. and Nacy, C.A. (1988) Regulation of activated macrophages antimicrobial activities. Cooperation of lymphokines for induction of resistance to infection. *J. Immunol.*, 41:627-635.
- Dean, D.A., Wistar, R. and Chen, P. (1975) Immune response of guinea pigs to *Schistosoma mansoni*. I. *In vitro* effects of antibody and neutrophils, eosinophils and macrophages on schistosomula. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24(1):74-82.
- Dessaint, J-P., Torpier, G., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. (1979) Cytophilic binding of IgE to the macrophage. I. Binding characteristics of IgE on the surface of macrophages in the rat. *Cell. Immunol.*, 46:12-23.
- Haque, A., Joseph, M., Ouaiissi, M.A., Capron, M. and Capron, A. (1980) IgE antibody-mediated cytotoxicity of rat macrophages against microfilaria of *Dipetalonema viteae* *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.*, 40:487-495.
- Haque, A., Ouaiissi, A., Joseph, M., Capron, M. and Capron, A. (1981) IgE antibody in eosinophil and macrophage-mediated *in vitro* killing of *Dipetalonema viteae* microfilariae. *J. Immunol.*, 127:716-725.
- Haque, A., Ouaiissi, A., Santoro, F., Moutis, I.D. and Carpon, A. (1982) Complement-mediated leukocyte adherence to infective larvae of *Dipetalonema viteae* (Filariodea): Requirement for eosinophils or eosinophil products in effecting macrophage adherence. *J. Immunol.*, 129(5):2219-2225.
- James, S.L., Sher, A., Lazdins, J.K. and Meltzer, M.S. (1982) Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. II. Killing of newly transformed schistosomula *in vitro* by macrophages activated as a consequence of *Schistosoma mansoni* infection. *J. Immunol.*, 128(4):1535-1540.
- Jarrette, E.E.E. (1972) Helminth infection and the biosynthesis of IgE antibodies. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66:546.
- Jarrette, E.E.E. and Bazin, H. (1974) Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature*, 251:613-614.
- Johnstone, A. and Thorpe, R. (1987) Purification of immunoglobulins, constituent chains and fragments. In: Immunochimistry in Practice. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications. London. pp.48-85.
- Joseph, M. and Capron, A. (1985) IgE receptors on macrophages: Biological significance. *Agents and Actions*, 16:27-29.
- Kojima, S., Yokogawa, M. and Tada, T. (1972) Raised levels of serum IgE in human helminthiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21:913-918.
- Kubelka, C., Ruppel, A., Kees, U., Krammer, P.H. and Gemsa, D. (1982) Induction of macrophage killing of *S. mansoni* schistosomula by lymphokines from T cell clones. *Immunobiol.*, 162:382.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A.L. Farr and Randell, H.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Mahmoud, A.A.F., Peters, A.S., Civil, R.H. and Remington, J.S. (1979) *In vitro* killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by BCG and *C. parvum* activated macrophages. *J. Immunol.*, 122: 1655-1662.
- Metha, K., Sindhu, R.K., Subrahmgam, D. and Nelson, D.S. (1980) IgE-dependent adherence and cytotoxicity of rat spleen and peritoneal cells to *Litomosoides carinii* microfilariae. *Clin. Exp. Immunol.*, 41:107-114.
- 閔得映·蘇鎮璋, Capron, A. (1980) 감홍충감염백서

- 의 혈청내 IgE의 변동 및 Allergen의 분리에 관한 연구. 연세의대논문집, 13:94-105.
- Min, D.Y. and Soh, C.T. (1983) Elevation of specific IgE antibody in *Clonorchis sinensis* infection. *Korean J. Parasit.*, 21:27-31.
- Nacy, C.A., Fortier, A.H., Meltzer, M.S., Buchmeier, N.A. and Schreiber, R.D. (1985) Macrophage activation to kill *Leishmania major*: Activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon- γ and non-interferon lymphokines. *J. Immunol.*, 135:3505-3511.
- Oster, C.N. and Nacy, C.A. (1984) Macrophage activation to kill *Leishmania tropica*: Kinetics of macrophage response to lymphokines that induce antimicrobial activities against amastigotes. *J. Immunol.*, 132:1494-1500.
- Oxenham, S., Mackenzie, C.D. and Denham, D.A. (1984) Increased activity of macrophages from mice infected with *Brugia pahangi*: *In vitro* adherence to microfilariae. *Parasite Immunol.*, 6: 141-156.
- Perez, H.A. and Smithers, S.R. (1977) *Schistosoma mansoni* in rat: The adherence of macrophages to schistosomula *in vitro* after sensitization with immune serum. *Int. J. Parasit.*, 7:315-320.
- Pestel, J., Joseph, M., Dessaint, J-P. and Capron, A. (1981) Macrophage triggering by aggregated immunoglobulins. 1. Delayed effect of IgG aggregates or immune complexes. *J. Immunol.*, 126:1887-1891.
- 蘇鎮璋 (1987) 人體寄生蟲學, 新光出版社, 서울 pp. 103-111.
- Yokogawa, M., Kojima, S., Araki, K., Tomioka, H. and Yoshida, S. (1976) Immunoglobulin E: Raised levels in sera and pleural exudates of patients with paragonimiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25:518-586.

=Abstract=

The effects of antibodies and complement in macrophage-mediated cytotoxicity on metacercariae of the lung fluke, *Paragonimus westermani*

Duk-Young Min, Myong-Hee Ahn, Kyong-Min Kim,

Mi-Hyea Leem and Soon-Yong Park

Department of Parasitology, College of Medicine

Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Paragonimus westermani is a tissue migrating parasite in the early stage until arriving at lung, and most of the parasites spend their life spans there. Considerable immune responses including activation of macrophages are taken place during the residence of parasites in the host. However, concerning the immunologic defense mechanisms of the host against this parasite, only a few document is available so far. In this study, the cytotoxic effect of peritoneal macrophages under the presence of antibody and/or complement against metacercariae of *P. westermani* was investigated *in vitro*.

Metacercariae were collected from the crayfish, *Cambaroides similis* and hatched out in Tyrode solution (pH 7.4). Plastic adherent cells from normal or infected rat (Wistar) peritoneal exudates were used as experimental macrophages. Polyclonal antibodies were obtained from infected rats and a cat. Cat IgG was fractioned with ion exchange chromatography. Fresh rabbit complement was used according to experimental scheme. Various combinations of peritoneal macrophages, normal or infected rat serum, complement and cat IgG were incubated at 36°C in 5% CO₂ incubator for 6, 14, 24 and 48 hours.

The results obtained were as follows:

1. *P. westermani* infection activated peritoneal macrophages non-specifically and this activation induced increases of cell adherence and cytotoxicity on metacercariae.
2. In the presence of infected rat serum the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of peritoneal macrophages on metacercariae was significantly increased and showed a peak at 6-hour incubation. But the cytotoxic effect was markedly reduced after inactivation of complement and heat-labile IgE antibody by the heating of infected serum at 56°C for 30 minutes.
3. The highest cytotoxic effect (100%) of concomitant incubation with IgG and complement showed 24 hours after incubation, although cell adherence was relatively low at 6-hour incubation and 0% at 24-hour incubation.
4. Coordinative functions of complement with serum and IgG were effective in cell adherence and in cytotoxicity, but it is not clear the independent role of complement on the macrophage-mediated cytotoxicity in this study.

With these results it is assumed that *P. westermani* infection can induce the non-specific activation of peritoneal macrophages, and serum antibodies including IgE antibody might enhance the cytotoxicity by macrophages,

[*Korean J. Parasit.*, 28(2):91-100, June 1990]