

Acanthamoeba culbertsoni 감염에 있어서 세포 매개성 면역*

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

金明俊 · 慎珠沃 · 任敬一

요약 : 병원성이 강한 *Acanthamoeba culbertsoni*에 감염된 마우스를 감염 정도에 따라 경(輕) 감염, 중(中)등 감염, 중(重)감염 실험군으로 나누었을 때 감염 기간에 따라 발현되는 세포 매개성 면역반응의 차이를 지연형 과민반응, T와 B림프구의 아세포화 정도 및 자연 살세포의 세포 독성을 통하여 관찰하고 또한 혈청내 항체를 측정하였다. 감염 마우스의 사망률은 3×10^3 개의 아메바 영양형을 감염시킨 경(輕) 감염군에서는 17%였으며 1×10^4 개를 감염시킨 중(中)등 감염군에서는 34%, 1×10^5 개를 감염시킨 중(重) 감염군에서는 65%였다. 세포 매개성 면역을 관찰하기 위한 지연형 과민반응의 변동을 보면 각 실험군 모두에서 감염 후 7일째 발바닥의 두께가 유의하게 증가하였으나 감염 후 14일째에는 감소하였고 각 실험군 간에 유의한 차이를 발견할 수 없었으며 각 실험군과 대조군 간에도 유의한 차이가 없었다. *A. culbertsoni* lysate 및 B 림프구 mitogen인 LPS에 의한 비장세포의 아세포화는 관찰되지 않았으며, T림프구 mitogen인 con. A로 처리한 비장세포의 아세포화 정도는 각 실험군 모두에서 감염 7일 이후 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며 B림프구 mitogen인 poly I 처리하는 실험군 모두에서 대조군과 차이가 없었다. 그리고 con. A와 poly I에 의한 아세포화 정도에 있어서 각 실험군 간에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 자연살세포의 세포 독성은 실험군 모두에서 대조군에 비해 감염 후 1일째에 증가되었고 감염 후 5일째에는 유의하게 감소하였다. 그러나 각 실험군 간에 세포독성의 유의한 차이는 발견할 수 없었다. 혈청내 항체는 각 실험군 모두에서 감염 7일 이후부터 대조군에 비해 계속 증가하였으나 각 실험군 간에 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

Key words: *Acanthamoeba culbertsoni*, cell-mediated immunity, lymphocyte blastogenesis, natural killer cell, antibody, ELISA

서 론

병원성 자유생활 아메바에 의한 인체의 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)이 Fowler and Carter(1965)에 의해 처음 보고된 이래 자유생활 아메바에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이들 자유생활 아메바 중 강한 병원성을 지닌 것으로는 *Naegleria*, *Acanthamoeba* sp.를 들 수 있다 (Martinez *et al.*, 1973).

우리 나라에서는 아직 임상 보고가 없으나 세계 여러 곳에서 이들 자유생활 아메바에 의한 인체 감염례가 140례 정도 보고되었으며(Lallinger *et al.*, 1987) 자연 환경 여러 곳에서 병원성 또는 비병원성 아메바들이 검출, 보고되고 있다(Schmoller, 1964; Carter, 1968; Richards, 1968; Kingston and Warhust, 1969). 우리 나라에서 황 등(1976)과 황 등(1980)이 *Naegleria* sp.를 서울시내 청계천에서, *Acanthamoeba* sp.인 YM-2

주와 YM-3주를 저수지에서 각각 분리하고 마우스에 감염시켜 병원성을 인정한 바 있다.

이러한 원충의 감염은 주로 수영하는 동안 비강을 통해 인체에 들어와 후정막과 사상관을 뚫고 후신경을 타고 중추신경계를 침범하여 괴사성 출혈성 수막뇌염을 일으킨다고 보고된 이래(Martinez *et al.*, 1973) 아메바성 수막뇌염 발생시 발현되는 숙주의 면역반응에 대한 연구가 많이 이루어졌다. Curson *et al.* (1980)은 *Acanthamoeba* sp.에 있어서 체액성 면역이 여러 가지 방어기능을 증진시킴으로써 면역학적 방어기전에 중요역할을 한다고 보고하였으며 마우스에 배양 상층액을 복강내에 주사하면 방어 면역이 유도되며 동시에 응집항체가 높아진다고 하였다(Ferrante and Thong, 1979; Thong *et al.*, 1979). 또한 살아있는 아메바나 면역혈청을 마우스 복강 내로 주었을 경우 방어면역이 증가되나, 면역된 비장세포를 주었을 경우는 증가되지 않는다고 보고하였다(Thong *et al.*, 1978). 이러한 면역된 마우스에 있어서의 항체는 전혈로를 통해 보체를 활성화시킴으로써 염증 반응의 폭을 증가시켜 비정막에 중성구가 충분히 축적되도록 하여 아메바의 활성을

* 이 연구의 일부는 1990학년도 연세대학교 의과대학 유한조교 연구비에 의해 수행되었음.

저지시켜 증후신경계로의 이동을 막을 수 있다고 했다 (Rowan-Kelly *et al.*, 1980). 또한 보체의 진행로 뿐 아니라 대행로도 활성화시킴이 *Acanthamoeba culbertsoni*에서도 보고되었다(Rowan-Kelly *et al.*, 1980; Holbrook *et al.*, 1980; Ferrante and Rowan-Kelly, 1983).

이와같이 원발성 아메바성 수막뇌염 발생시 야기되는 숙주의 체액성 면역에 대해서는 많은 연구가 진행되었으나 세포 매개성 면역에 대하여는 연구가 미흡한 실정이다. 그러나 여러 종류의 기생충 감염시 즉 Malaria (Michel *et al.*, 1979), *Leishmania* sp. (Barbier *et al.*, 1985), 이질아메바(Diamanstein *et al.*, 1981), *Schistosoma* sp. (Dov and Kenneth, 1970), 크루스트리파노조마(Dean and Kuhn, 1980), 톡소플라스마·곤디(Strickland *et al.*, 1975) 등에서 세포 매개성 면역이 관여됨이 보고되었다.

Curson *et al.* (1980)은 *Naegleria fowleri* 감염시 림프구에서 분리되는 lymphokine의 일종인 대식세포유주 저지인자가 검출되는 것으로 보아 세포 매개성 면역이 숙주 방어기전에 중요함을 시사하였고 Ferrante and Smith(1984)는 *N. fowleri* 영양형의 lysate가 마우스 비장 세포 중 T림프구를 아세포화시키는 반면에 *A. culbertsoni*의 lysate는 이와 같은 작용이 없다고 보고하였다.

또한 특이적 방어기전과는 달리 생체에서 항원에 대한 사전 감각없이 비특이적 방어기전에 있어 가장 선두에 작용하는 것으로 알려진 자연살세포가 원충인 *Trypanosoma* sp., *Babesia* sp. 및 *Plasmodium* sp. 감염시에도 작용하는 것으로 보고되었다(Clark and Allison, 1974; Trischmann *et al.*, 1978; Hatcher and Kuhn, 1981).

이에 본 연구에서는 병원성이 강한 *A. culbertsoni*를 마우스에 감염 정도에 따라 경(輕)감염, 중(中)등 감염 및 중(重) 감염시켰을 때 그 감염기간에 따라 발현되는 세포 매개성 면역반응의 차이를 지연형 과민반응, T와 B림프구의 아세포화 정도 및 자연 살세포 독성을 통하여 관찰하고 또한 혈청내 항체를 측정하였다.

실험 재료 및 방법

1. *A. culbertsoni*의 배양

Jardin, J.B.로부터 분양받은 *A. culbertsoni*(Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Belgium)를 37°C 5% CO₂ 흡습 항온기(NaPCO, U.S.A.)에서 CGV(casitone-glucose-vitamine) 배지(Willaert, 1975)를 사용, 무균적으로 계대 배양하여 사용하였다.

2. 실험동물

생후 약 6~8주 된 C3H/HeJ 마우스를 한국과학기술원 생물학 검정실에서 공급받아 사용하였다.

3. *A. culbertsoni*의 감염

마우스 체중 g당 secobarbital 0.06 mg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후 아메바 영양형을 5 μ l 생리식염수에 함유되도록 한 후 마우스의 오른쪽 비강에 떨어뜨려 감염시켰다. 대조군은 감염군과 마찬가지로 마취시키고 생리식염수를 비강 내로 떨어뜨렸다.

4. 실험군의 설정

감염 정도에 따라 마우스의 사망률이 10%내외, 30~40%, 70~80% 내외가 되도록 예비실험을 통하여 아메바 영양형의 수를 결정한 후, 각각 3 \times 10³, 1 \times 10⁴, 1 \times 10⁵개의 아메바 영양형을 감염시켜 경(輕)감염, 중(中)등 감염, 중(重) 감염군으로 나누었다.

5. *A. culbertsoni* lysate의 제조

배양된 아메바 영양형을 모아 아세포화 실험을 위하여는 RPMI(Rosewell Park Memorial Institute) 1640 (Gibco Lab., U.S.A.) 기본배지로, 지연형 과민반응 실험에서는 생리식염수로 2~3회 세척 후 초음파 분쇄기로 아메바 영양형을 파괴시키고 4°C, 20,000 g로 2시간 원심 침전한 후 상층액을 취하여 0.2 μ m pore size의 여과지로 여과하여 사용하였다. 이들 lysate의 단백질함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법에 의하여 측정하였다.

6. 세포 매개성 면역반응 측정

가. 지연형 과민반응

각각의 아메바 영양형의 수를 다르게 하여 마우스에 감염시킨 후 2일, 7일, 14일에 각각 마우스의 한쪽 발바닥(footpad)에는 *Acanthamoeba* lysate를, 다른 한쪽에는 생리식염수를 0.03 ml씩 피내로 주사한 후 48시간 후에 발바닥 두께를 digital micrometer(Fowler)를 사용하여 측정하였다. 발바닥 두께의 정도는 lysate로 처리한 측정치에서 생리식염수로 처리한 측정치를 제한 값을 실측치로 하였으며 실험대조군으로 lysate 대신 bovine serum albumin(BSA) (Sigma, U.S.A)을 사용하였다.

나. 비장세포의 아세포화

아메바를 마우스에 감염시킨 후 비장세포의 아세포화 정도를 알아보기 위해 마우스를 희생시켜 그 비장세포에 림프구 mitogen 및 *A. culbertsoni* lysate를 넣고 10% fetal calf serum, L-glutamine(2 mM/ml), penicillin(100 unit/ml) 및 streptomycin(100 μ l/ml)을 함유시킨 RPMI 1640 완전배지에서 약 2일 배양한 후 (³H)-thymidine을 첨가하고 6시간 경과한 후 방사능을 측정하였다.

마우스의 복막을 절개한 후 비장을 적출하여, RPMI 1640 완전배지를 멸균된 50 ml 비이커에 넣고 가위 및 1 ml 주사기로 비장을 잘게 부수어 비장세포 부유액을 만들었다. 0.16M tris-NH₄Cl(pH 7.2)을 넣어 적혈구를 용혈시키고 RPMI 1640 완전배지로 2~3회 세척한 후 96 well polystyrene plate(Costar, U.S.A.)에 well 당 5 \times 10⁵개의 세포를 200 μ l의 RPMI 완전배지에 포함시킨 후 각각 concanavalin A (Con. A), lipopoly-

saccharide(LPS), polyinosinic acid(poly I)와 *Acanthamoeba* lysate를 첨가시켰다. 37°C, 5% CO₂ 흡습 항온기에서 42시간 배양 후 methyl-(³H)-thymidine (Amersham, England)을 well 당 1 μCi씩 넣고 다시 6시간 배양한 후, 세포수확기(Titretrek)에서 glass filter fiber로 세포를 수확한 후 scintillation cocktail(xylene 1,000 ml, popop 0.1 g, ppo 5 g) 3 ml를 넣은 scintillation vial에서 각각을 용해시켜 liquid scintillation counter를 사용하여 방사능을 측정하였다.

아세포화 정도를 관찰하는 데는 흡착된 (³H)-thymidine의 양으로 측정하였으며 다음 공식에 의해 자극 지수를 산출하였다.

$$\text{자극지수} = \frac{\text{실험물질로 처리된 비장세포의 방사능(cpm)}}{\text{처리 안된 비장세포의 방사능(cpm)}}$$

아메바를 감염시키지 않은 대조군에서도 감염시킨 실험군과 같은 방법으로 비장세포를 분리하여 con. A, LPS, poly I, *Acanthamoeba* lysate로 처리한 후 (³H)-thymidine을 넣어 방사능을 측정하였다.

다. 비장세포의 자연살세포 특성

(1) 표적 세포 : 자연살세포에 의한 세포독성을 측정하기 위한 표적세포로는 YAC-1(A/Sn mouse lymphoma; Cikes *et al.*, 1973) 세포를 사용했다. 세포배양을 위한 배지는 RPMI 완전배지를 사용하여 계대 배양하였다.

(2) 주효세포(effector cell) : 마우스를 각각 시간별로 희생시켜 무균적으로 비장을 채취한 후, RPMI 1640 완전배지를 사용하여 단세포 부유액을 만들었다. 0.16 M Tris-NH₄Cl(pH 7.2)를 넣어 적혈구를 용혈시키고 이를 다시 RPMI 완전배지에 부유시킨 다음 plastic petri dish(60 mm×15 mm, Costar, U.S.A.)에 넣어 37°C 5% CO₂ 흡습 항온기에서 1시간 배양한 후 가볍게 흔들어 부유되어 있는 비 부착성 세포만을 채취하여 사용하였다.

(3) 세포 독성 검사 : 자연살세포의 세포독성은 표적세포인 YAC-1 세포를 이용하여 4시간 ⁵¹Cr 방출방법으로 수행하였다(Ullberg and Jonadal, 1981).

즉 YAC-1 세포 1×10⁶ cells/0.2 ml을 100 μCi Na₂⁵¹CrO₄ (1 mCi/ml, NEZ-0305, New England Nuc. Co., Boston, MA, U.S.A.)와 진탕 37°C 항온조에서 1시간 표지화시켰다. 그 후 2회 세척하여 ⁵¹Cr이 표지된 세포를 96 well microplate(Costar, U.S.A.) 각 well 당 1×10⁴ cells/0.1 ml 되게 넣고 주효세포 : 표적세포의 비율(E:T ratio)을 100 : 1이 되도록 주효세포를 10⁶ cells/0.1 ml 넣어 37°C 5% CO₂ 흡습 항온기에서 4시간 배양하였다. 이때 maximal release를 유발시키기 위해 1N NaOH를 가하였고 spontaneous release를 측정하기 위해서는 ⁵¹Cr이 표지된 표적세포만을 배양하였다. 배양 후 100 μl의 상층액을 수거하여 gamma counter(Packard, U.S.A.)로 방사능을 측정하였으며 자연살세포 독성은 다음 공식에 의하여 계산하였다.

cytotoxicity(%)

$$= \frac{\text{test release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximal release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

7. 혈청내 항체가 측정

마우스에 아메바를 감염시킨 후 경과된 날자별로 오른쪽 눈의 후안와 경맥총(retro-orbital venous plexus)에서 파이펫을 이용하여 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 -30°C에서 저장하였다가 사용하였다. Voller *et al.* (1976)이 시행한 효소표식 면역검사법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)으로 혈청내 항체를 측정하였다.

효소표식 면역검사법에 사용된 항원 *A. culbertsoni* lysate를 bicarbonate 완충액(Na₂CO₃ 0.15 g, NaHCO₃ 0.293 g, 증류수 100 ml, pH 9.6)으로 polystyrene plate well당 5 μg/ml이 들어가도록 희석한 후 4°C에서 하루밤 방치하여 항원을 부착시켰다. 세척액(NaCl 9 g, Tween 20 0.5 ml, 증류수 1,000 ml)으로 3분 간격으로 2~3회 세척한 후 혈청을 희석완충액(NaH₂PO₄ 0.04 g, Na₂HPO₄ 0.26 g, NaCl 1.76 g, Tween 20 0.1 ml, BSA 1 g, 증류수 200 ml, pH 7.4)으로 1 : 100으로 희석하여 항원이 부착된 각 well에 100 μl씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 세척한 후 희석 완충액으로 1 : 100이 되게 희석한 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG(Cappel, U.S.A)를 각 well에 넣고 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 세척한 후 기질을 넣고 암실(실온)에서 30분간 반응시켰다. 기질은 0.1M phosphate citric acid 완충액(pH 5.0) 10 ml에 *o*-phenylene diamine(OPD) 5 mg과 과산화수소수 4 μl를 혼합하여 사용하였다. 2N H₂SO₄를 각 well에 넣어 반응을 정지시켰다. 모든 과정이 끝난 microwell plate는 효소표식 면역검사법 판독기(Dynatech, U.S.A.)로 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 원발성 아메바성 수막뇌염의 병리학적 검사

자유생활 아메바인 *A. culbertsoni*의 병원성의 정도를 확인하고자 마우스 비강을 통하여 감염시킨 후 사망하였거나 사망 직전에 이들을 부검하였으며 뇌조직의 일부를 떼어내어 일부는 CGV 배지에 넣어 배양하였고 일부는 hematoxylin-eosin 염색을 하여 조직의 병리학적 변화를 관찰하였고 동시에 아메바 영양형의 존재 여부를 확인하였다.

실험 성적

1. 감염 마우스의 사망률

아메바 영양형 3×10³개를 감염시킨 경(輕)감염군에서는 감염 후 20일까지 29마리 중 3마리(17%)가 사망하였으며, 1×10⁴개를 감염시킨 중(中)등 감염군에서는 10일째부터 사망하기 시작하여 20일까지 29마리 중 9마리(34%)가 사망하였고 1×10⁵개를 감염시킨 중(重)감염군에서는 감염 후 7일부터 사망하기 시작하여 29

Table 2. Elicitation of footpad swelling with *A. culbertsoni* lysates in mice infected with the amoeba

No. of trophozoites inoculated		Thickness(mm: Mean±SEM) of hind footpad of mice at days:		
		2	7	14
3×10 ³	lysate	1.3±0.3	2.1±0.4*	1.7±0.8
	BSA	0.6±1.4	0.5±0.2	0.7±0.4
1×10 ⁴	lysate	1.6±0.4	3.6±0.5*	2.1±0.5
	BSA	0.8±0.6	0.6±0.4	1.1±0.4
1×10 ⁵	lysate	1.1±0.3	2.6±0.3*	1.7±0.5
	BSA	0.7±2.0	1.1±4.8	0.9±1.3
Control	lysate	1.7±0.5	2.0±0.6	1.5±0.4
	BSA	1.5±0.4	0.6±0.4	1.2±0.5

*p<0.05 vs lysate at 2 days

Table 3. Blastogenic response(stimulation index) of the splenocytes treated with amoeba lysates in mice infected with *A. culbertsoni* and non-infected(control) mice

Amoeba lysates (μg/ml)	Stimulation index(Mean±SEM)	
	Non-infected	Infected*
100	1.01±1.03	0.81±0.13
50	1.03±0.13	1.05±0.12
10	0.98±0.11	0.97±0.12
5	1.20±0.14	1.34±0.12
2.5	1.24±0.18	1.10±0.19
1.25	1.08±0.18	1.26±0.19

*Infected with 1×10⁵ trophozoites 7 days previously

후까지 대조군과 비교할 때 차이가 없었으나 감염 후 7일과 14일에 아세포화 정도가 대조군과 비해 유의하게 감소하였다(p<0.05). Poly I로 비장세포를 처리했을 때의 아세포화는 대조군과 비교해 유의한 차이가 없었다(Table 5).

Table 5. Blastogenic response(stimulation index) of the splenocytes treated with con. A or poly I in mice infected with 3×10³ trophozoites of *A. culbertsoni* and non-infected(control) mice

Day post-infection	Stimulation index(Mean±SEM)			
	Non-infected		Infected	
	con. A	poly I	con. A	poly I
1	0.95±0.23	1.07±0.03	1.14±0.13	1.45±0.18
4	1.39±0.81	1.44±1.39	1.12±0.12	1.45±0.12
7	1.74±0.63	1.90±0.90	0.37±0.34	0.96±0.09*
10	1.89±0.44	1.10±0.72	0.77±0.05	1.12±0.07*
14	1.17±0.63	0.88±0.90	0.69±0.103*	1.28±0.14*

* p<0.05 vs non-infected, con. A or poly I

Table 4. Blastogenic response (stimulation index) of the splenocytes treated with LPS in mice infected with *A. culbertsoni* and non-infected (control) mice

LPS(μg/ml)	Stimulation index(Mean±SEM)	
	Non-infected	Infected*
100	2.10±0.39	2.05±0.29
200	2.25±0.30	1.94±0.29
50	1.80±0.32	1.95±0.30
25	2.47±0.33	2.34±0.32
12.5	2.46±0.32	2.19±0.32
6.25	2.13±0.33	1.13±0.43

*Infected with 1×10⁵ trophozoites 7 days previously

중(中)등 감염된 실험군에서 con. A 처리시 아세포화 정도는 대조군에 비하여 감염 7일 후부터 14일까지 계속 유의하게 감소하였다. 그러나 Poly I로 처리했을 때의 아세포화 정도는 대조군과 유의한 차이가 없었다(Table 6).

중(重) 감염된 실험군에서 보면 con. A로 처리된 비장세포의 아세포화는 감염 7일 이후 대조군에 비해 유의하게 감소하였고 Poly I 처리에 의한 비장세포의 아세포화 정도는 대조군과 비교할 때 차이가 없었다(Table 7).

실험군 모두에서 con. A 처리에 의한 비장세포의 아세포화 정도는 7일 이후 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 특히 감염 후 4일에 경(輕) 감염군과 중(重) 감염군, 중(中)등 감염군과 중(重) 감염군에서, 감염 후 7일에 경(輕) 감염군과 중(中)등 감염군, 중(中)등 감염군과 중(重) 감염군에서 유의한 차이를 발견할 수 있었고 Poly I 처리는 대조군과 차이가 없었다. 그리고 각 실험군간에는 con. A와 Poly I를 처리했을 때 모두에서 아세포화 정도에 있어서 현저한 차이는 발견할 수 없었다(Fig. 3).

Table 6. Blastogenic response(stimulation index) of the splenocytes treated with con. A or poly I in mice infected with 1×10^4 trophozoites of *A. culbertsoni* and non-infected(control) mice

Day post-infection	Stimulation index(Mean \pm SEM)			
	Non-infected		Infected	
	con. A	poly I	con. A	poly I
1	0.95 \pm 0.23	1.07 \pm 0.03	1.14 \pm 0.08	1.21 \pm 0.22
4	1.39 \pm 0.81	1.44 \pm 1.39	1.04 \pm 0.08*	0.88 \pm 0.04*
7	1.74 \pm 0.63	1.90 \pm 0.90	0.80 \pm 0.05*	1.45 \pm 0.17*
10	1.89 \pm 0.44	1.10 \pm 0.73	0.69 \pm 0.00*	1.01 \pm 0.07*
14	1.17 \pm 0.63	0.88 \pm 0.90	0.59 \pm 0.03*	1.24 \pm 0.08*

* $p < 0.05$ vs non-infected, con. A or poly I

Table 7. Blastogenic response(stimulation index) of the splenocytes treated with con. A or poly I in mice infected with 1×10^5 trophozoites of *A. culbertsoni* and non-infected(control) mice

Day post-infection	Stimulation index(Mean \pm SEM)			
	Non-infected		Infected	
	con. A	poly I	con. A	poly I
1	0.95 \pm 0.23	1.07 \pm 0.03	1.28 \pm 0.13	1.87 \pm 0.21
4	1.39 \pm 0.81	1.44 \pm 1.39	1.44 \pm 0.80	1.25 \pm 0.07*
7	1.75 \pm 0.63	1.90 \pm 0.90	0.41 \pm 0.04*	1.67 \pm 0.06
10	1.89 \pm 0.44	1.10 \pm 0.72	0.64 \pm 0.09*	0.87 \pm 0.11*

* $p < 0.05$ vs non-infected, con. A or poly I

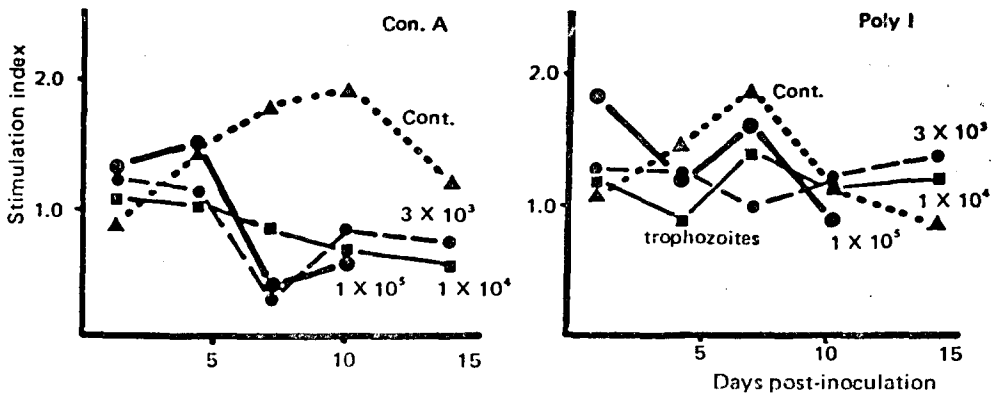


Fig. 3. Blastogenic responses(stimulation index) of con. A or poly I treated splenocytes in *A. culbertsoni* infected mice and non-infected(control) mice.

4. 자연살세포 독성

자연살세포 독성을 시간 경과별로 측정하였다. 대조군에서의 자연살세포의 세포독성은 $8.13 \pm 0.36\%$ 이었으며, 경(輕) 감염군에서는 감염 후 1일째에 유의하게 증가하였고, 감염 후 2일째에 대조군 수준으로 감소하였으며 감염 후 5일째에는 세포독성이 대조군에 비해 유의하게 저하되었다. 중(中)등 감염군에서의 자연살

세포 세포독성은 감염 후 1일째에 증가 후 경(輕) 감염군과 비슷한 경향으로 감소하였다. 중(重) 감염군에서는 경(輕) 감염군과 중(中)등 감염군과 비슷한 경향으로 증가 후 감소하였으나 감염 후 1일째 경(輕) 감염군($11.09 \pm 1.06\%$), 중(中)등 감염군($9.96 \pm 1.59\%$)에 비해 세포독성이 매우 증가하였다($19.04 \pm 0.02\%$). 실험군 모두에서 감염 후 1일째에 자연 살세포가 활

Table 8. Natural killer cell cytotoxicity against YAC-1 target cells in mice infected with *Acanthamoeba culbertsoni*

Time after inoculation	% Cytotoxicity (Mean ± SEM) †			
	Control	Splenocytes from mice inoculated with		
		3 × 10 ³ trophozoites	1 × 10 ⁴ trophozoites	1 × 10 ⁵ trophozoites
12 hrs.	7.14 ± 0.06	7.18 ± 0.42	6.79 ± 0.49*	6.40 ± 0.23*
1 day	7.75 ± 2.47	11.09 ± 1.06*	9.96 ± 1.59*	19.04 ± 0.02*
2 days	7.85 ± 0.02	6.87 ± 2.17	6.49 ± 2.88	9.11 ± 1.14
3 days	8.90 ± 0.07	2.53 ± 0.21*	4.28 ± 1.34	2.87 ± 0.60*
5 days	9.00 ± 0.14	0.81 ± 0.65*	1.64 ± 0.34*	1.53 ± 0.88*

* p < 0.05 vs non-infected

† Ratio of effector to target cells, 100 : 1

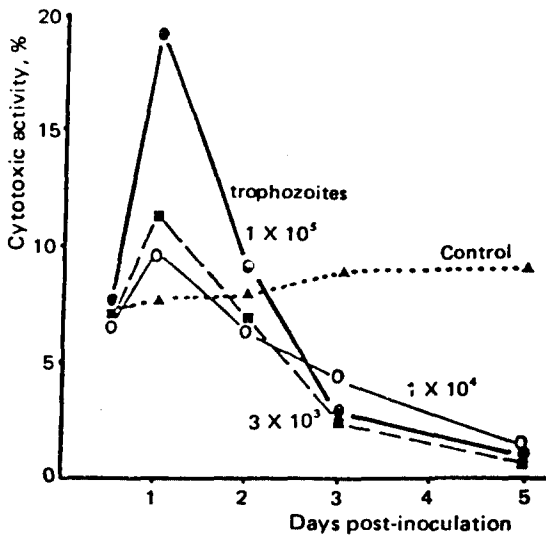


Fig. 4. Natural killer cell cytotoxicity against YAC-1 target cells in mice infected with *A. culbertsoni*.

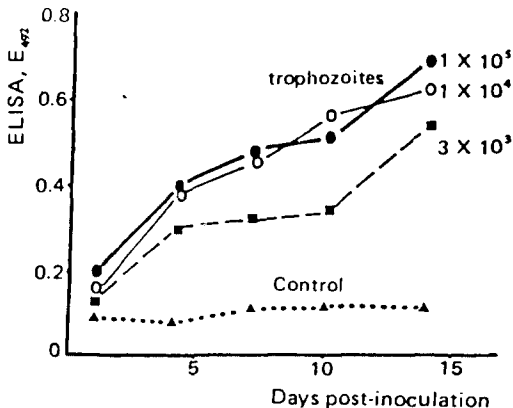


Fig. 5. Circulating antibody titers in mice infected with *A. culbertsoni*.

성화되었고 각 실험군 간에 자연살세포의 세포 독성능의 유의한 차이를 발견할 수 없었다 (Table 8; Fig. 4).

5. 혈청내 항체가 의 측정

마우스에 아메바를 감염시킨 후 경과시간별로 혈청을 분리하여 항체가 측정을 위하여 효소표식 면역검사법 (ELISA)을 시행하였다.

각 실험군 모두에서 7일 이후 계속해서 대조군에 비해 혈청내 항체가 증가됨을 알 수 있었으며 각 실험군 간의 혈청내 항체에 있어서 유의한 차이점은 발견할 수 없었다 (Fig. 5).

고 찰

병원성 자유생활 아메바인 *Acanthamoeba* spp.와 *Naegleria* spp.는 하수, 토양, 공기, 물 등 자연환경 여러 곳에서 서식하며 주로 수영하는 동안 비강을 통해 인체에 들어와 수막뇌염을 일으키며 세계 여러 곳에서 인체 감염이 보고되어 있으나 (Lallinger *et al.*, 1987), 우리나라에서는 아직 임상보고가 없다.

본 실험에서는 *A. culbertsoni*를 감염 정도를 달리하여 마우스에 감염시켰을 때 각각 17%, 34%, 65%의 마우스 사망률이 관찰되었는데, 이 사망률을 기준으로 경(輕) 감염, 중(中)등 감염, 중(重) 감염으로 정의 하였을 때 발현되는 세포 매개성 면역반응의 차이를 관찰하고자 하였다.

가용성 항원을 피내 주사하여 부종의 정도를 측정하는 지연형 과민반응은 10,000 dalton 이하의 강한 호전자성을 띠는 분자가 피부에 존재하는 sulfhydryl group 이나 amino protein group과 공유결합을 이루어 나타나는 것으로 T 림프구와 phagocyte 간의 일련의 세포성 반응을 *in vivo*에서 거시적으로 측정하는 것이다 (Revillard, 1982).

기니피에 *N. fowleri*를 감염시켰을 때, *N. fowleri* 영양형의 가용성 항원을 피내에 주사하면 지연형 과민반응이 나타난다고 하였으며 (Diffley *et al.*, 1976),

Curson *et al.* (1980)은 *N. fowleri*, *N. jardi*, *N. gruberi*의 영양형으로 제조한 가용성 항원을 기니픽에 면역시킨 후 각각 동질의 항원을 주사했을 때 지연형 과민반응의 정도가 있음을 관찰하였다.

본 실험에서 시행한 *A. culbertsoni* 감염시 감염 정도에 따른 지연형 과민반응의 결과는 각 실험군 모두에서 7일째에 증가 후 14일째 감소하였으나, 각 실험군간에 유의한 차이를 인정할 수 없었다.

이러한 결과는 지연형 과민반응에 사용한 것과 동일한 *A. culbertsoni*의 영양형으로 제조한 가용성 항원으로 마우스 비장세포의 아세포화 정도를 측정하였을 때 mitogenicity를 나타내지 않았는데 이때 항원의 mitogenicity가 나타나지 않는 점이 지연형 과민반응을 유도해 내지 못한 것과 관계가 있을 것이라고 생각된다. 특정한 항원에 대해 지연형 과민반응을 나타내는 주체로부터 나온 림프구를 동일한 항원이나 mitogen과 함께 배양하면 임파구의 아세포화가 일어나는데 이러한 *in vitro*에서의 아세포화는 반드시 지연형 과민반응의 결과와 일치하지는 않으며, *in vivo*에서 지연형 과민반응이 나타나지 않더라도 *in vitro*에서 아세포화는 일어날 수 있다고 하였다(Bloom, 1971; Revillard, 1982; Liew, 1986).

원충에 감염되었을 때 면역반응이 저하되어 있음은 많이 보고되어 왔는데, 말라리아 원충에 감염되면 면역계가 활성화되어 있음에도 불구하고 양 적혈구를 비롯한 여러 항원으로 면역시킬 때 항체 형성이 저하되어 있다고 하였으며(Salaman and Wedderburn, 1969; Sengers *et al.*, 1971; Baker, 1971; Greenwood *et al.*, 1971) *Leishmania sp.*와 *Toxoplasma sp.*에 감염된 마우스나 인체에서 감염 초기, 즉 급성 감염기에 아세포화 정도가 억제됨이 보고되었다(Selkirk *et al.*, 1981; Barbier *et al.*, 1985; Britten and Hudson, 1986; Schurrs *et al.*, 1986). 또한 *Toxoplasma gondii* 및 *Trypanosoma cruzi*에 감염된 마우스 비장세포에서 감염 초기에 대조군에 비해 아세포화 정도가 감소하였다가 만성기에 점차 증가함이 알려졌다(Strickland *et al.*, 1975; Hay *et al.*, 1985; Britten and Hudson, 1986). 또한 Ferrante and Smith(1984)는 *N. fowleri*의 lysate가 마우스 T 림프구에 아세포화 효과가 있어 mitogen이 될 수 있음을 보고하였다.

본 실험 성적에 의하면 *A. culbertsoni*를 감염시킨 마우스의 비장세포에 T 림프구 mitogen인 con. A를 처리했을 때 아세포화 정도는 각 실험군 모두에서 감염 후 7일부터 유의하게 감소하였으며, 각 실험군 간에도 감염 후 4일에 경(輕) 감염과 중(中)등 감염, 중(中)등 감염과 중(重) 감염군에서, 감염 후 7일에는 경(輕) 감염과 중(中)등 감염, 중(中)등 감염과 중(重) 감염군 간에 유의한 차이를 발견할 수 있었다. 이것은 아메바 감염 후 마우스가 사망하기 시작하는 7일 이후와 잘 일치되는 것으로 이 시기에 마우스의 면

역기능이 매우 억제되는 것으로 사료되며 원충에 감염되었을 때 급성 감염기에 면역 억제현상이 일어난다는 다른 보고들과도 일치하는 것이다(Selkirk *et al.*, 1981; Barbier *et al.*, 1985; Schurr *et al.*, 1986).

이러한 원충 감염시 림프구의 기능이 억제되는 것에 대해서 여러 사람이 가설을 세웠는데 비장에 있는 T 림프구가 mitogen에 반응하지 않는 대식세포같은 세포로 회색되었거나 T 림프구가 이미 말초혈액으로 이동하여 blastoid 세포로 변화되어 더 이상 mitogen에 반응하지 못하거나 T 림프구의 기능을 억제하는 비특이적 억제세포, 또는 활성화된 대식세포에 의하여 면역 억제 현상이 일어난다고 하였다(Ramos *et al.*, 1979; Kierszenbaum, 1982; Suzuki and Kobayashi, 1984). 또한 T 림프구의 mitogen인 con. A에 의한 비장세포의 아세포화는 interleukin-2에 의존적으로 일어나는데 이러한 interleukin-2의 생성은 Thy-1-positive, I-A-negative인 T 림프구와 I-A-positive, Thy-1-negative인 대식세포가 함께 작용하여 생성되는 것으로 알려졌는데, 이러한 대식세포가 용해성 인자를 분비함으로써 T 림프구의 면역기능을 억제하고 interleukin-2의 생성을 억제하는 것으로 보고되어 있다(Jacobson and Herzenberg, 1971; Hersh *et al.*, 1974; Strickland *et al.*, 1975; Larsson *et al.*, 1980; Kramer and Koszinowski, 1982; Suzuki and Kobayashi, 1984; Wright and Bonavida, 1984).

따라서 *A. culbertsoni* 감염 7일 이후에 나타나는 면역 억제 현상에 대해서 그 정확한 기작을 밝히는 것이 과제로 남아 있다.

또한 본 실험에 사용한 C3H/HeJ 마우스에 대해 B 림프구 mitogen인 LPS에 의한 아세포화 현상은 관찰되지 않았는데, 이는 T 림프구나 대식세포의 기능에는 이상이 없으며, B 림프구의 autosomal loci가 LPS의 결정인자(determinant)를 읽지 못하기 때문인 것으로 알려졌다(Glode *et al.*, 1976; Glode and Pavid, 1976).

따라서 본 실험에서는 B 림프구 mitogen으로 poly I를 사용했으며, *A. culbertsoni* 감염시 poly I에 대한 아세포화 정도는 대조군과 비교해 유의한 차이가 없었으며 각 실험군 간에도 현저한 차이는 발견할 수 없었다. 다른 원충에 감염되었을 때에도 B 림프구 mitogen 처리시에 아세포화 정도가 대조군과 별 차이 없었음이 여러 연구에서도 보고된 바 있다(Selkirk *et al.*, 1981; Ferrante and Smith, 1984; Hay *et al.*, 1985).

본 실험에서도 *A. culbertsoni* 감염시 B 림프구는 대조군과 비교해 면역기능이 억제되지 않은 것으로 생각되어지며 T 림프구의 기능이 억제되었더라도 항체 형성에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 생각된다.

자연살세포는 1970년대 중반 중앙세포에 대한 세포매개독성 연구 중 발견된(Herberman and Holden, 1978) 이후 활발한 연구가 되어오고 있는데 형태학적으로 큰 과립상 림프구(large granular lymphocyte)에 속하고 (Reynold *et al.*, 1981; Timonen *et al.*, 1982),

비 부착성, 비 식작용의 특징을 가지며(Ortaldo and Herberman, 1984) 성숙한 T림프구와는 달리 기능적으로 재배열된 T림프구 수용기 유전자를 가지지 않으며(Lanier *et al.*, 1986 a & b) 생체에서 항원에 대한 사전 감각없이 바이러스에 감염된 세포 혹은 종양세포 등을 파괴시키는 능력이 있다(Herberman and Ortaldo, 1981; Bloom, 1982). 이러한 자연살세포의 세포독성이 원충인 *Trypanosoma* sp., *Babesia* sp. 및 *Plasmodium* sp. 감염시에도 작용하는 것으로 보고되었다(Clark and Allison, 1974; Trischmann *et al.*, 1978; Hatcher and Kuhn, 1981).

본 실험에서 *A. culbertsoni* 감염시 자연살세포 독성은 각 실험군 모두에서 감염 후 1일째에 유의하게 증가하였다. 감염 후 2일에는 실험군 모두에서 대조군 수준으로 감소하였으며 감염 후 5일째에 세포독성이 대조군에 비해 유의하게 저하되었다. 이것으로 미루어 보아 아메바에 감염된 후 5일째에 이미 마우스의 면역체계가 억제되었음을 짐작할 수 있다. 효소표식 면역검사법을 이용하여 *A. culbertsoni*에 감염된 마우스의 림프내 항체가를 측정할 결과 각 실험군 모두에서 감염 후 7일 이후부터 계속하여 대조군에 비해 림프내 항체가가 증가됨을 알 수 있었으나 각 실험군간에 유의한 차이는 발견할 수 없었다.

Schwartz (1971)는 이러한 항체가 감작된 림프구와 항원에 대해 경쟁적으로 작용하여 무감작 현상을 일으킬 수 있으며, 세포 매개성 면역에 억제 현상을 나타낼 수 있음을 시사하였다(Bryceson *et al.*, 1972; Schurr *et al.*, 1986).

이상의 성적을 종합하여 볼 때 *A. culbertsoni*를 감염 정도를 달리하여 경(輕) 감염, 중(中)등 감염, 중(重) 감염 시켰을 때 급성기에 발현되는 세포 매개성 면역반응에 있어서의 차이는 발견할 수 없었으나 미감염 대조군과의 사이에는 유의한 차이를 인정할 수 있어 *Acanthamoeba* 감염시에는 세포 매개성 면역기전이 관여함을 알 수 있었으며 경(輕) 감염, 중(中)등 감염 되었을 때에는 만성기로 이행될 수 있으므로 만성기에 있어서의 세포 매개성 면역체계가 어떻게 유도되는지에 대해서는 더 연구해야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

Baker, L.R. (1971) Experimental malaria: Effects upon the immune response to different antigens. *J. Infect. Dis.*, **123**:99-101.
 Barbier, D., Goyot, P. and Dedet, J.P. (1985) *Leishmania braziliensis guyanensis* dermal leishmaniasis: cell-mediated immunity related to clinical features. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**: 47-50.
 Bloom, B.R. (1971) *In vitro* approach to the mecha-

nism of cell-mediated immune reactions. *Advances in Immunol.*, **13**:101-208.
 Bloom, B.R. (1982) Natural killers to rescue immune surveillance? *Nature*, **300**:214-222.
 Britten, V. and Hudson, L. (1986) Immune suppression to *Trypanosoma* immunization. *Trop. Med. Parasit.*, **37**:97-100.
 Bryceson, A.D.M., Preston, P.M., Bray, R.S. and Dumonde, D.C. (1972) Experimental cutaneous leishmaniasis: II. Effects of immunosuppression and antigenic competition on the course of infection with *Leishmania henriettii* in the guinea pig. *Clin. Exp. Immunol.*, **10**:305-335.
 Carter, R.F. (1968) Primary amoebic meningoencephalitis: Clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J. Pathol. Bacteriol.*, **96**:1-25.
 Cikes, M., Friberg, S. and Klein G. (1973) Progressive loss of H-2 antigens with concomitant increase of cell surface antigen determined by *Moloney leukemia virus* in cultured murine lymphomas. *J. Nat. Cancer Inst.*, **50**:347-351.
 Clark, I.A. and Alison, A.C. (1974) *Babesia microti* and *Plasmodium berghei yoelii* infections in nude mice. *Nature*, **252**:318-325.
 Curson, R.T.M., Brown, T.J., Keys, E.A., Moriarty, K.M. and Till, D. (1980) Immunity to pathogenic free-living amoebae: Role of cell-mediated immunity. *Infect. Immun.*, **29**:408-410.
 Dean, S.C. and Kuhn, R.E. (1980) *Trypanosoma cruzi*-induced suppressor substance I. Cellular involvement and partial characterization. *J. Immunol.*, **124**:2122-2129.
 Diamanstein, T., Klos, M., Gold, D. and Hahan, H. (1981) Interaction between *E. histolytica* and the immune system. *J. Immunol.*, **126**:2084-2086.
 Diffley, P., Skeels, M.R. and Sogandares-Bernal, F. (1976) Delayed type hypersensitivity in guinea pigs infected subcutaneously with *Naegleria fowleri*. *Z. Parasitenkd.*, **49**:133-137.
 Dov, L.B. and Kenneth, S.W. (1970) Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.*, **132**:488-501.
 Ferrante, A. and Rowan-Kelly, B. (1983) Activation of the alternative pathway of complement by *Acanthamoeba culbertsoni*. *Clin. Exp. Immunol.*, **54**:477-485.
 Ferrante, A. and Smith, C. (1984) Mitogenicity of

- Naegleria fowleri* extracts for murine T lymphocytes. *Immunology*, **51**:461-468.
- Ferrante, A. and Thong, Y.H. (1979) Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Int. J. Parasit.*, **9**:599-601.
- Fowler, M. and Carter, R.F. (1965) Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* series: a preliminary report. *Br. Med. J.*, **2**:740-742.
- Glode, M.L. and David, L.R. (1976) Genetic control of B cell activation by bacterial lipopolysaccharide is mediated by multiple distinct genes or alleles. *J. Immunol.*, **117**:2061-2066.
- Glode, M.L., Irwin, S., Barbara, O. and David, L.R. (1976) Cellular mechanism of endotoxin unresponsiveness in C3H/HeJ mice. *J. Immunol.*, **116**:454-461.
- Greenwood, B.M., Playfair, J.H.L. and Torrigiani, G. (1971) Immunosuppression in murine malaria. I. General characteristics. *Clin. Exp. Immunol.*, **8**:467-478.
- Hatcher, F.M. and Kuhn, R.E. (1981) Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science*, **218**:295-296.
- Hay, J., Dutton, G.N. and Hair, D.M. (1985) Blastogenic responses of splenic lymphocytes to toxoplasmal and retinal antigens and T and B cell mitogens in mice with congenital ocular toxoplasmosis. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **79**(1):113-115.
- Herberman, R.B. and Holden, H.T. (1978) Natural cell-mediated immunity. *Advances in Cancer Res.*, **27**:305-377.
- Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R. (1981) Natural killer cells: Their role in defenses against disease. *Science*, **214**:23-30.
- Hersh, E.M., McCredie, K.B. and Freireich, E.J. (1974) Inhibition of *in vitro* lymphocyte blastogenesis by inhibitor produced by cultured human lymphoblasts. *Clin. Exp. Immunol.*, **17**:463-468.
- Holbrook, T.W., Boackle, R.J., Parker, B.W. and Vesely, J. (1980) Activation of the alternative complement pathway by *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.*, **30**:58-61.
- 黃瀚琦·尹德鎮·任敬一·蘇鎮璋(1976) 자유생활 아메바의 병원성에 대한 실험적 연구. 연세의대 논문집, **9**:86-98.
- Jacobson, E.B. and Herzenberg, L.A. (1971) Active suppression of immunoglobulin allotype synthesis I. Chronic suppression after perinatal exposure to maternal antibody to paternal allotype in (SJLX-BALB/C)F mice. *J. Exp. Med.*, **135**:1151-1158.
- Kierszenbaum, F. (1982) Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease(*Trypanosoma cruzi* infection): Role of non-adherent, nonspecific, esterase-positive splenic cells. *J. Immunol.*, **129**:2202-2205.
- Kingston, D. and Warhust, D.C. (1969) Isolation of amoeba from the air. *J. Med. Microbiol.*, **2**:27-36.
- Kramer, M. and Koszinowski, U. (1982) T cell-specific suppressor factors with regulatory influence on interleukin II production and function. *J. Immunol.*, **128**:784-790.
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.L., Loken, M.R. and Philips, J.H. (1986a) The relationship of CD 16(Leu-11) and Leu-19(NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, **137**:4480-4484.
- Lanier, L.L., Phillips, J.H., Jackett, J. Jr., Tutt, M. and Kuman, V. (1986b) Natural killer cells: Definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.*, **137**:2735-2739.
- Lallinger, G.J., Reiner, S.L., Cooke, D.W., Toffaletti, D.L., Perfect, J.R., Granger, D.L. and Duract, D.T. (1987) Efficacy of immune therapy in early experimental *Naegleria fowleri* meningitis infection. *Immunology*, **55**:1289-1293.
- Larsson, E.L., Norman, N.J. and Antonio, C. (1980) Two distinct factors are required for induction of T-cell growth. *Nature*, **283**:664-666.
- Liew, F.Y. (1986) Cell-mediated immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasit. Today*, **2**:264-270.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.
- Martinez, A.J., Duma, R.J., Nelson, E.C. and Morreta, P.L. (1973) Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Preparation of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic change produced: A light and electron microscope study. *Lab. Invest.*, **29**:121-133.
- Michel, J.C., Lagrange, P.H. and Hurtrel, B. (1979) Modulation by malaria infection of the induction of T lymphocyte-dependent delayed type hypersensitivity and antibody formation to sheep erythrocytes in mice. *Parasite Immunol.*, **1**:267-275.
- Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B. (1984) Heterogeneity of natural killer cells. *Ann. Rev. Immunol.*, **2**:359-402.
- Ramos, C., Schadtler-Siwon, I. and Ortiz-Ortiz, L. (1979) Suppressor cells present in the spleen of

- Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Immunol.*, **122**:1243-1247.
- Revillard, J.P. (1982) In "Immunology" (Bach JF, Ed), John Wiley and Sons, New York, pp.365-398.
- Reynolds, C.W., Timonen, T. and Herberman, R.B. (1981) Natural killer cell activity in the rat I. Isolation and characterization of the effector cells. *J. Immunol.*, **127**:282-286.
- Richards, C.S. (1968) Two new species of *Hartmannella* amoeba infecting fresh water mollusks. *J. Protozool.*, **15**:651-656.
- Rowan-Kelly, B., Ferrante, A. and Thong, Y.H. (1980) Activation of complement by *Naegleria*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**:333-356.
- Salaman, M.H. and Wedderburn, N. (1969) The immunodepressive effect of a murine *Plasmodium* and its interaction with murine oncogenic viruses. *J. General Microbiol.*, **59**:383-391.
- Schmoller, H. (1964) Beschreibung einiger Kultramben mariner Herkunft. *J. Protozool.*, **11**:497-502.
- Schurr, E., Kidane, K., Yemaneberhan, T. and Wunderlich, F. (1986) Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. Lymphocyte transformation and antibody titre. *Trop. Med. Parasit.*, **37**:403-408.
- Schwartz, R.S. (1971) In "Progress in Immunology" (Amos, B. ed) Academic Press New York, pp. 1081-1092.
- Selkirk, M.E., Ogilvie, B.M., Plattis-Mills, T.A.E. (1981) Activation of human peripheral blood lymphocytes by a trypanosome-derived mitogen. *Clin. Exp. Immunol.*, **45**:615-620.
- Sengers, R.C.A., Jerusalem, C.R. and Doesburg, W.H. (1971) Murine malaria IV. Disturbed immunological responsiveness during *Plasmodium berghei* infection. *Exp. Parasit.*, **34**:41-53.
- Strickland, G.T., Ahmed, A. and Sell, K.W. (1975) Blastogenic response of *Toxoplasma*-infected mouse spleen cells to T- and B-cell mitogens. *Clin. Exp. Immunol.*, **22**:167-176.
- Suzuki, Y. and Kobayashi, A. (1984) Macrophage-mediated suppression of immune responses in *Toxoplasma* infected mice. *Cell. Immunol.*, **85**:417-427.
- Thong, Y.H., Ferrante, A., Rowan-Kelly, B. and Okeefe, D.E. (1979) Immunization with culture supernatant in experimental amoebic meningoencephalitis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **73**:684-685.
- Thong, Y.H., Ferrante, A., Shephered, C. and Rowen-Kelly, B. (1978). Resistance of mice to *Naegleria* meningoencephalitis transferred by immune serum. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **72**:650-652.
- Timonen, T.C., Reynolds, C.W., Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B. (1982) Isolation of human and rat natural killer cells. *J. Immunol. Methods*, **51**:269.
- Trischmann, T., Herbert, T., Murray, W. and Barry, B. (1978) *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune responses in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasit.*, **45**:160-168.
- Ullberg, M. and Jonadal, M. (1981) Recycling and target binding capacity of human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, **153**:615-628.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. WHO*, **53**:55-65.
- 黃英南・関得映・蘇鎮卓(1980) 자유생활 아메바(*Acanthamoeba* species)의 숙주에 대한 면역학적 반응. 연세의대논문집, **13**:259-273.
- Willaert, E. (1975) Recherches immuno-taxonomiques compress sur les amibes du groupe "Limax". Acad. R. Sc. outre-Mer, Mem. Class Sc. nat. Med. sous press.
- Wright, S.C. and Bonavida, B. (1984) Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, **133**:3415-3423.

==Abstract==

Cell-mediated immunity in mice infected with *Acanthamoeba culbertsoni*

Myung-Joon Kim, Chu-Og Shin and Kyung-Il Im

*Department of Parasitology, College of Medicine & Institute of Tropical Medicine,
Yonsei University, Seoul 120-752, Korea*

Observations were made on the differences of cell-mediated responses in mice of three infection groups differently scheduled in their severity with pathogenic *Acanthamoeba culbertsoni*. Infections were done by dropping 5 μ l saline suspension containing 3×10^3 , 1×10^4 , or 1×10^5 trophozoites, respectively. Amoebae were cultured axenically in CGV medium and inoculated into the right nasal cavity of C3H/HeJ mice aging around 6~8 weeks, under the anesthesia by intraperitoneal injection of secobarbital.

Delayed type hypersensitivity (DTH) responses in footpad and blastogenic responses of mouse spleen cells using (3 H)-thymidine and the serum antibody titer were measured up to day 14 after infection, and natural killer cell activities were measured up to day 5 after infection. The results obtained in this study were as follows:

1. The mice infected with 3×10^3 trophozoites showed mortality rate of 17%, and 34% in the mice infected with 1×10^4 trophozoites and 65% with 1×10^5 trophozoites.
2. In regard to DTH responses in all experimental groups, the level increased on day 7 and declined on day 14 after infection, but their differences could not be noted between infected and control groups.
3. The blastogenic responses of splenocytes treated with amoeba lysates and lipopolysaccharides (LPS) showed no difference from the control group. The blastogenic responses of splenocytes treated with concanavalin A were declined significantly in the experimental group as compared with the control group, but the blastogenic responses of splenocytes treated with polyinosinic acid were not different from the control group. There was also no difference among three infected groups.
4. The cytotoxic activity of the natural killer cells was activated on day 1 after infection and declined to the level of control group on day 2 in all experimental groups. On day 5 after infection, the natural killer cell cytotoxicity was significantly suppressed as compared with the control groups.
5. The serum antibody titers of the infected mice increased after day 7, but there was no statistical difference between the three infected groups.

In summary of the results, there was no difference in cell-mediated immune responses of three experimental groups scheduled with different infection intensities. But there was a significant difference in cell-mediated immune responses between infected and control mice. It is considered that cell-mediated immune responses should be involved in murine model infected with *A. culbertsoni*.

[Korean J. Parasit., 28(3):143-154, September 1990]