

## *Tetrahymena pyriformis*에 의한 마우스 복강내 대식세포의 활성화

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

金正泰·鄭坪林·任敬一

**요 약 :** 자유생활 담수 섬모충류의 일종인 *Tetrahymena pyriformis*는 비특이적으로 복강 대식세포를 활성화하여 미생물 살멸효과가 있음이 밝혀졌으나 한국에서 순수분리 배양된 GL 주(株)에 대한 평가는 시행된 바 없어 본 섬모충의 추출액을 ICR 마우스 복강 내로 주사하여 복강 대식세포를 활성화한 다음 실험실 내에서 표적 기생 원충인 *Toxoplasma gondii* (RH 주)를 접촉시켜 시간별로 *Toxoplasma* 살멸 효과를 보아 대식세포의 활성도를 평가하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

표적 기생 원충으로서 살아있는 *Toxoplasma* 영양형을 주입하였을 경우, 대식세포 활성화 처리 실험군은 물론 대조군에서도 모두 처리 1분 이내에 *Toxoplasma*가 숙주 세포내로 침입 내지 탐식되었으며 이때 탐식지수 범위는 15~51%였다. 대조군에서는 배양 시간에 따라 100개의 대식세포당 총 탐식 표적 기생충 수가 증가하였으나 활성화 처리군에서는 배양 20시간에 그 수가 모두 줄었고 *Tetrahymena* 처리군에서는 총 표적 기생충 수가 14, 탐식지수 10%로서 가장 왕성한 대식세포 활성도를 나타내었다. 화학 합성 활성화제로서는 dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA)가 *Tetrahymena*와 대차 없는 대식세포 활성화효과를 보였다. 표적 기생 원충으로서 열처리 *Toxoplasma* 영양형을 주입하였을 경우, 대조군을 포함한 모든 실험군에서 처리 1분 이내에 역시 *Toxoplasma*가 숙주 세포에 의해 탐식되었으며 탐식지수 범위는 8~25%여서 살아있는 영양형을 처리하였을 때 보다 낮은 범위를 보였다. 이때 *Tetrahymena* 처리군에서는 탐식지수 4%, 대식세포 100개당 표적 세포 총수가 4로서 *Toxoplasma* 추출액 처리군과 함께 가장 우수한 활성화제로 평가되었으며 화학합성 활성화제로서는 DDA, dextran sulfate, complete Freund's adjuvant 순으로 활성 효과가 높았다.

이상의 결과로 보아 *T. pyriformis* (GL 주)는 화학합성 활성화제보다 우수한 *Toxoplasma* 살멸 효과를 나타내었고, 실험실 내에서 대량 무균 배양될 수 있어 앞으로 대식세포 활성화제로서, 나아가 *Toxoplasma* 감염 억제제로서 널리 이용될 가능성이 있을 것으로 생각되었다.

**Key words:** *Tetrahymena pyriformis*, *Toxoplasma gondii*, mouse, macrophage, anti-parasitic activity

### 서 론

대식세포(macrophage)는 비 특이성 자극으로 활성화되어 비 자기 이물질(non-self)을 공격함이 알려지면서 세포면역학 분야에서 더욱 각광을 받게 되었고 그 면역학적 기전을 밝히기 위한 많은 연구가 수행되어 왔다. 그 중 최근에는 adjuvants 및 BCG, *Mycobacterium bovis*, *Corynebacterium parvum* 등과 같은 박테리아의 비특이적 자극이 대식세포의 활성화를 극대화하여 바이러스, 박테리아, *Candida* spp. 등의 감염에 대한 숙주의 비특이적 저항성이 인정되면서 대식세포에 대한 비특이적 공격기전을 밝히고자 하는 노력이 경주되고 있다(Larson *et al.*, 1971; Adlam *et al.*, 1972; Makioka *et al.*, 1982; Hilgers *et al.*, 1985;

McLeod *et al.*, 1985).

일면 자유생활 담수 섬모충류의 일종인 *Tetrahymena pyriformis*는 세포생물학 및 생화학분야에서 널리 연구되어 무균 배양이 가능하고 빠른 속도로 증식하며 이들의 형태와 생화학적 특성이 잘 알려진 원충으로 역시 대식세포의 비특이성 활성화제로서 가치가 있음이 밝혀진 바 있다(Makioka *et al.*, 1982). 즉 그 활성화의 정도는 *M. bovis*로 마우스 복강 내에 면역시켰을 때와 비슷하다 하였고 Makioka and Kobayashi (1983)는 *Tetrahymena*의 주사량에 따라 숙주 대식세포의 활성도가 증감함을 지적하였다.

숙주 면역세포 중의 하나인 대식세포는 *Toxoplasma* 감염시 면역기전에도 참여하는 동시에 숙주 세포로서의 역할을 하기 때문에 양자간의 상호작용을 규명하려는 노력이 현재까지도 활발하다. 최근에는 *Toxoplasma*

*gondii* 감염시 일차 방어기전은 대식세포의 활성화에 의한다고 하며 그 활성화는  $\gamma$ -interferon에 의한다는 것이 밝혀지기도 하였다(Suzuki *et al.*, 1988). 그러나 비특이 활성화 자극제를 숙주 대식세포에 자극시켰을 때 *Toxoplasma tachyzoite*에도 영향을 미치는지, 그리고 그 영향을 미쳤을 때 기생 원충과 숙주 세포 상호간에 어떤 상호작용이 있는지, 더우기 *Toxoplasma*가 대식세포 내에서 발견되었다면 대식세포의 탐식작용(phagocytosis)에 의한 것인지, *Toxoplasma*의 자발적 침입(active invasion)에 의한 것인지 명확치 않아 현 시점에서는 이 방면의 기초 연구가 절실히 요구된다.

이에 본 연구는 dextran sulfate와 같은 대식세포 활성화제와 함께 우리 나라산 *Tetrahymena*가 대식세포 활성화제로서 가치가 있는지의 여부와 활성화된 대식세포가 toxoplasmacidal activity가 있는지의 여부를 대식세포를 숙주세포로 하는 *Toxoplasma gondii* (RH strain)를 대상 기생충으로 하여 평가하고자 한 것이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 대상 기생충

본 실험에 사용된 기생 원충은 연세대학교 의과대학 기생충학교실에서 계대 배양중인 *Toxoplasma gondii* (RH株)였으며 체중 15~20 g되는 마우스를 사용하여 감염 3~4일만에 1회씩 계대하였다. 즉 *Toxoplasma* 감염 마우스 복강 내에 소독된 생리식염수 5 ml를 주사하고 수초간 복면을 맞사지 한 후 가능한 많은 양의 복수를 채취하여 다시 적당량의 생리식염수를 첨가한 후 이를 약 0.25~0.5 ml씩 취하여 건강한 새 마우스 복강 내로 주사하여 계대하였다.

실험에 사용할 *Toxoplasma*를 수집할 경우에는 채취된 복수에 생리식염수를 적당량 첨가하여 500 rpm에서 5분간 원침하여 *Toxoplasma*가 부유된 상청액을 취하여 모든 다음에 다시 1,500 rpm에서 10분간 원침하였다. *Toxoplasma*가 함유된 침사를 모아 소독된 생리식염수로 2회 세척한 다음 실험 계획에 따라 생리식염수로 적당량의 *Toxoplasma* 부유액을 만들어 실험에 사용하였다.

### 2. 대식세포의 활성화

#### 1) 생물학적 활성화

##### ① *Tetrahymena pyriformis* (GL strain)

서울대학교 사범대학 세포생물학 교실에서 무균 배양되고 있는 *T. pyriformis* GL주(株)를 분양받아 본 실험에 사용하였으며 계대 배양은 무균 PYD 배지(Watanabe and Ikeda, 1965)에서 계대 배양하였다. 즉 30 ml짜리 screw-capped test tube에서 배양된 *T. pyriformis*를 300 ml의 배지가 함유된 1 l짜리 삼각 flask에 분주, 25°C에서 배양하여 충수를 늘리었고 약 1개월에 한번씩 계대 배양하였다.

이때 사용된 PYD 배지 구성은 아래와 같으며 배지

는 증기멸균(15 lbs, 15분)하여 사용하였다.

Proteose peptone	2 gm
Yeast extract	0.1 gm
Dextrose	0.08 gm
in distilled water	100 ml

충체는 850 g에서 5분간 원침하여 수집하였으며 무기 배지(NaCl 8.5 g, KCl 0.4 g, CaCl<sub>2</sub> 0.6 g in 1 l D.W.)로 1회 세척하여 사용하였다. 실험에 사용될 *Tetrahymena* 추출액(lysate)은 적당량의 무기 배지 내에 모아진 충체를 60 grade에서 수초간 초음파 분쇄하여 30,000 g로 4°C에서 30분간 원침분리하여 그 상청액을 -70°C에 보관하면서 추출물 시료로 사용하였다. 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 정량하였으며 실험 마우스 마리당 단백질 함량이 590  $\mu$ g/ml이 되도록 한 추출액을 복강 내로 주사하였다.

##### ② *Toxoplasma gondii* (RH strain)

감염 마우스 복강액으로부터 얻은 *Toxoplasma* 부유액( $7.6 \times 10^7$ /ml)을 grade 60에서 초음파 분쇄하여 30,000 g로 4°C에서 30분간 원침하고 그 상청액을 추출물 시료로 사용하였다. *Toxoplasma* 추출액은 -70°C에 보관, 사용하였으며 단백질 함량은 상기 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 정량하였으며 실험 마우스당 단백질 함량이 590  $\mu$ g/ml이 되도록 한 추출액을 복강 내로 주사하였다.

##### 2) 기타 비특이 활성화제

Polyanionic agent의 일종인 dextran sulfate (M.W. 500,000; Sigma Chemical Co.)와 계면 활성제의 일종인 dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA; Sigma Chemical Co.), 그리고 complete Freund's adjuvant (CFA; Difco)를 대조 활성제로 사용하였으며 dextran sulfate의 사용 용량은 마우스 마리당 2.5  $\mu$ g, DDA의 사용량은 마리당 625  $\mu$ g, CFA의 경우에는 마리당 0.5 ml의 생리식염수와 혼합한 0.5 ml의 CFA였다. 이상의 약제는 모두 *Candida* spp.의 살멸 효과를

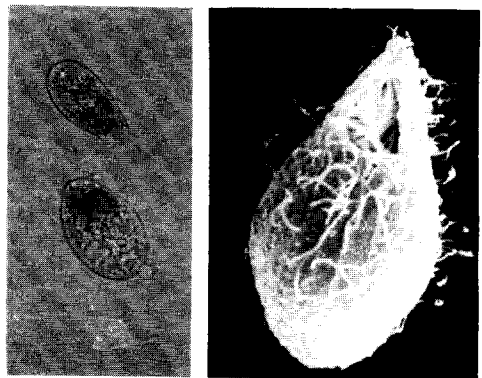


Fig. 1. *T. pyriformis* trophozoites.

나타내는 대식세포의 활성화제로 사용된 바 있어 용량은 이에 준하였다(Hilgers, 1985).

3. 대식세포의 활성화 실험

1) 활성화 대식세포의 배양

먼저 체중 20 g 정도의 ICR 마우스 복강 내에 *Tetra-hymena* 추출액을 비롯한 기타 활성제를 실험군별로 일정 용량(Table 1) 주사하고 1주일간 마우스 복강 대식세포를 활성화시켰으며 대조군에게는 동량의 생리 식염수만을 주사하였다. 활성화제 주사 1주일 후 각 실험 마우스 복강 내에 5 ml의 fetal calf serum(FCS; Gibco)이 10% 함유된 Hank's balanced salt solution (HBSS)을 18 gauge 바늘이 달린 10 ml짜리 주사기로 주사하고 복부를 약 2분간 마사지 한 후 복수를 동일 주사기로 채취하였다. 4~5마리 ICR 마우스로 구성된 각 실험군의 마우스로부터 채취한 복수는 HBSS로 2회 원침세척(1,500 rpm, 5분)하였고 복강 추출물로부터 대식세포만을 얻기 위하여 원침된 추출물(peritoneal exudate)을 10% FCS가 첨가된 RPMI 1640(Hazleton)이 함유된 60×15 mm 짜리 조직배양 petri dish(Falcon)에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 동안 배양시켰다. 2시간 배양 후 상층액을 버리고 10% FCS가 첨가된 RPMI 1640으로 다시 배양시켰고 24시간에 한번씩 배지를 교환하여 주면서 배양기 하면에 monolayer가 생길 때까지 약 3일간 배양하였다.

2) 대상 기생 원충의 주입

대식세포 monolayer가 배양되고 있는 각 배지에 2×10<sup>7</sup>개의 *Toxoplasma tachyzoite*를 주입하고 주입 후 1분 및 1시간에 *Toxoplasma* 침입 현황을 관찰한 다음 동일 배양액으로 대식세포 주위에 남아있는 충체를 세척하였다. 숙주 대식세포 내에 침입한 충체만을 남게 하여 다시 신선한 10% FCS가 함유된 RPMI 1640에서 20시간 배양하여 활성화 대식세포의 *Toxoplasma* 살멸효과를 판정하였다. 즉 20시간 배양 후 배양액을 버리고 배양기 하면을 100% methanol로 고정한 다음 Giemsa 염색하였다. 염색된 대식세포 내의 *Toxoplasma*를 광학현미경 하에서 관찰하고 대식세포의 활성화도는

% phagocytic index로 산출한 바 감염된 대식 세포의 백분율과 100개의 대식세포 내에 감염된 충체의 총 수로 산정하였다(Makioka and Kobayashi, 1983).

% Phagocytic Index (PI)

$$= \frac{\text{No. of macrophages infected} \times 100}{\text{No. of macrophages observed}}$$

한편, 대식세포의 탐식능만을 측정하기 위하여 충체를 56°C에서 15분간 열처리하여 죽인 다음 대식세포의 monolayer와 접촉시켰고 대식세포 활성화도 측정은 위와 같았다.

실험 성적

1. 살아있는 *Toxoplasma* 영양형에 대한 활성화 대식세포의 살멸효과

대식세포 활성화제로서 단백질 함량이 590 µg/ml인 *T. gondii*와 *T. pyriformis*의 추출액 그리고 화학합성 활성화제인 dextran sulfate (2.5 µg/ml), DDA (625 µg/ml), CFA (0.5 ml+0.5 ml saline)를 ICR 마우스

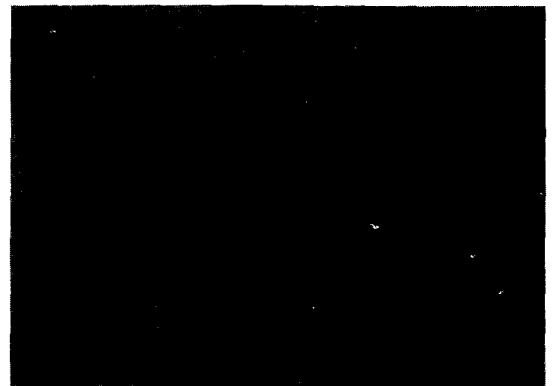


Fig. 2. Mouse peritoneal macrophage activated with *T. pyriformis* and infected with *T. gondii* tachyzoites, 20 hrs after incubation.

Table 1. Anti-*Toxoplasma* activities of peritoneal macrophages from mice inoculated with various activators\*

Activators	Dose/mouse	% Macrophage infected ( <i>Toxoplasma</i> /100 macrophages)		
		1 min	1 hr	20 hrs
Control	none	15 (16)	55 (114)	27(213)
<i>Tetrahymena pyriformis</i> lysate	590 µg/ml	15 (20)	59 (310)	10 (14)
<i>Toxoplasma gondii</i> lysate	590 µg/ml	51(155)	92(1,044)	22 (62)
Dextran sulfate (M.W. 500,000)	2.5 µg/ml	46(105)	76 (657)	68(364)
Complete Freund's adjuvant	CFA 0.5 ml+ saline 0.5 ml	33 (65)	56 (113)	45 (92)
DDA	625 µg/ml	26 (26)	50 (101)	10 (15)

\* Macrophages infected with live *Toxoplasma*

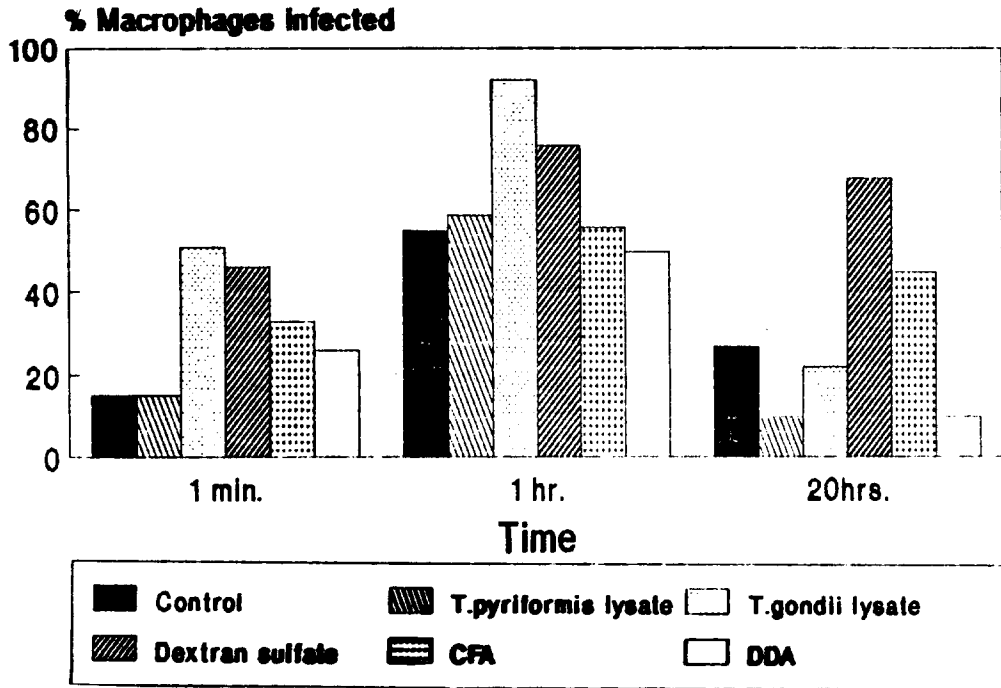


Fig. 3. Percentages of mouse peritoneal macrophages treated with various activators and infected with live *T. gondii*.

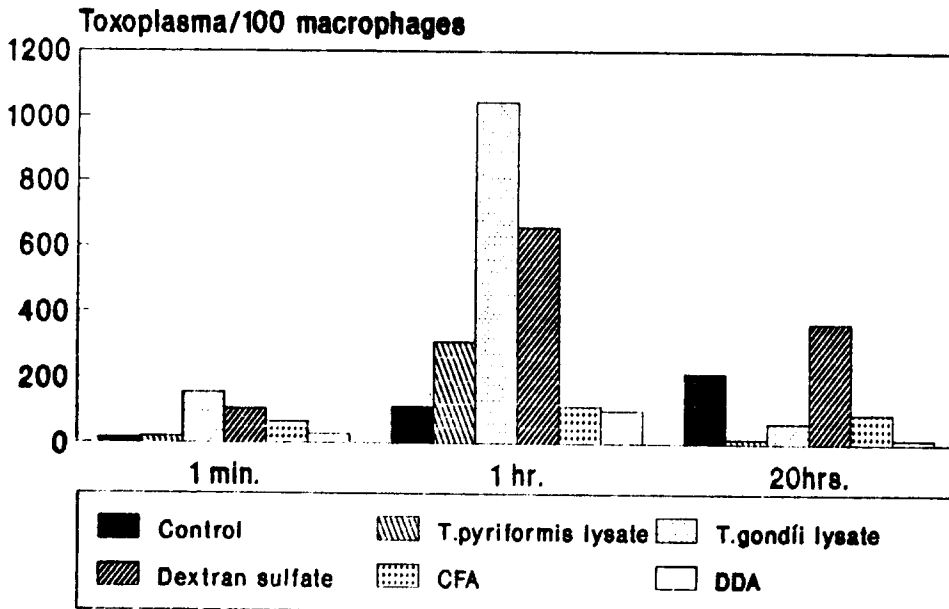


Fig. 4. Total numbers of live *T. gondii* per 100 mouse peritoneal macrophages treated with various activators.

복강 내에 주사하고 일주일간 방치, 복강 대식세포를 환성화시킨 다음 *in vitro*에서 살아있는 *Toxoplasma* 영양형의 살멸효과를 관찰한 바 대조군을 포함한 전 실험군에서 실험 1분 내에 이미 *Toxoplasma*가 대식세포 내로 침입 내지 탐식됨을 알 수 있었다. 실험 1시간에는 *Toxoplasma* 추출액으로 감작시켰던 실험군에서 탐식지수 (PI) 92%, 대식세포 100개당 *Toxoplasma*의 총수가 1,044마리로 가장 높은 수치를 보였으며, 다음이 dextran sulfate 실험군으로서 탐식지수 76%, 총충체수 657마리였고, *Tetrahymena* 감작군은 탐식지수 59%, 총충체수 310마리였다. 그 외 CFA 및 DDA 감작군은 각각 탐식지수 56%, 50%, 총충체수 113, 101로서 대조군의 55%, 114와 대차 없음을 보였다.

대식세포 외에 있는 충체를 모두 제거하고 제 배양 20시간 후의 결과는 *Tetrahymena* 감작의 경우 대식세포의 탐식지수 10%, 총충체수가 14이어서 10%, 15를 나타낸 DDA 처리군과 함께 가장 낮은 수치를 나타내어 *Toxoplasma* 살멸효과가 가장 높은 것으로 나타났다. 이 때 대조군은 탐식지수 27%, 총충체수 213이었다. 그 외 *Toxoplasma* 추출액 처리군에서는 탐식지수 22%, 총충체수는 62를 기록하였고, CFA 처리군은 탐식지수 45%, 총충체수 92였다. 본 실험에서 가장 *Toxoplasma* 살멸효과가 낮은 군은 dextran sulfate 처리군으로서 대조군의 탐식지수 27%, 총충체수 213에 비하여 68%, 364를 기록하였다(Table 1; Figs. 3 & 4).

2. 열처리 *Toxoplasma gondii* 영양형에 대한 활성 대식세포의 살멸효과

*Toxoplasma*는 대식세포를 숙주 세포로 하여 충체 자체가 침입할 수 있으며 일면 대식세포 자체는 탐식작용(phagocytosis)에 의해 충체를 탐식할 수 있을 것이다. 환성 대식세포의 탐식작용과 살멸효과 자체만을 관찰하기 위하여 *Toxoplasma*를 열처리하여 환성 대식세포 배양기에 투입하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 실험 1분 후 모든 실험

군에서 대식세포는 대상 기생충을 탐식하였으며 탐식지수 범위는 8~25%, 대식세포 100개당 탐식 원충 총수의 범위는 10~35개였다. 이 중 가장 탐식능이 떨어진 대조군에서의 탐식지수는 8%, 총충체수는 10개이었다. 실험 1시간 후에는 모든 실험군에서 탐식지수와 탐식 총충체수가 실험 1분 후와 비교하여 증가하였으며 탐식지수 범위는 27~83%, 탐식 총충체수의 범위는 39~603개를 나타내었다. 역시 대조군에서 가장 낮은 탐식지수와 탐식 총충체수를 나타내었고 (27%, 39), *Toxoplasma* 추출액으로 처리한 실험군에서 가장 높은 탐식지수와 탐식 총충체수를 나타내었다(83%, 603).

배양 20시간 후에는 대식세포 환성체를 처리하지 않은 대조군에서 탐식지수 31%, 탐식 총충체수 49를 보여 배양 1분 후부터 계속 증가되는 수치들을 보이는 반면 기타 환성체 처리군에서는 모두 탐식지수나 탐식 총충체수가 급격히 감소하는 경향을 보여 다소간의 차이는 있으나 모두 대상 기생충의 살멸 효과가 있음을 알 수 있었다. 배양 20시간 후 가장 큰 살멸효과를 보인 것은 *Toxoplasma* 추출액 처리군으로서 탐식지수 2%, 탐식 총충체수 2를 기록하였고 다음으로 대차는 없으나 *Tetrahymena* 처리군에서 탐식지수 4%, 탐식 총충체수 4를 나타낸 바 4개의 대식세포만이 각각 1개씩의 충체를 함유하고 있었다. 다음으로 충체 살멸효과가 높은 실험군은 DDA 처리군으로서 탐식지수 6%, 탐식 총충체수 8이었고 dextran sulfate 처리군은 탐식지수 17%, 탐식 총충체수 19, CFA 처리군에서는 탐식지수 18%, 탐식 총충체수 20을 나타내었다 (Table 2; Figs. 5 & 6).

이상의 실험 성적으로 보아 *Tetrahymena* 추출액을 처리한 실험군에서 대상 기생충을 살아있는 *Toxoplasma*로 했을 경우 가장 우수한 살멸효과를 보였고, 열처리 *Toxoplasma*를 대상 기생충으로 했을 경우에도 *Toxoplasma* 추출액으로 처리한 실험군과 함께 우수한 살멸효과를 나타내었다.

Table 2. Anti-*Toxoplasma* activities of peritoneal macrophages from mice inoculated with various non-specific activators\*

Activators	Dose/mouse	% Macrophage infected ( <i>Toxoplasma</i> /100 macrophages)		
		1 min	1 hr	20 hrs
Control	none	8(10)	27 (39)	31(49)
<i>Tetrahymena pyriformis</i> lysate	590 µg/ml	10(10)	50(122)	4 (4)
<i>Toxoplasma gondii</i> lysate	590 µg/ml	19(26)	83(603)	2 (2)
Dextran sulfate(M.W. 500,000)	2.5 µg/ml	25(35)	62(203)	17(19)
Complete Freund's adjuvant	CFA 0.5 ml+ saline 0.5 ml	9(15)	44 (82)	18(20)
DDA	625 µg/ml	15(19)	30 (42)	6 (8)

\* Macrophage infected with heat-killed *Toxoplasma*

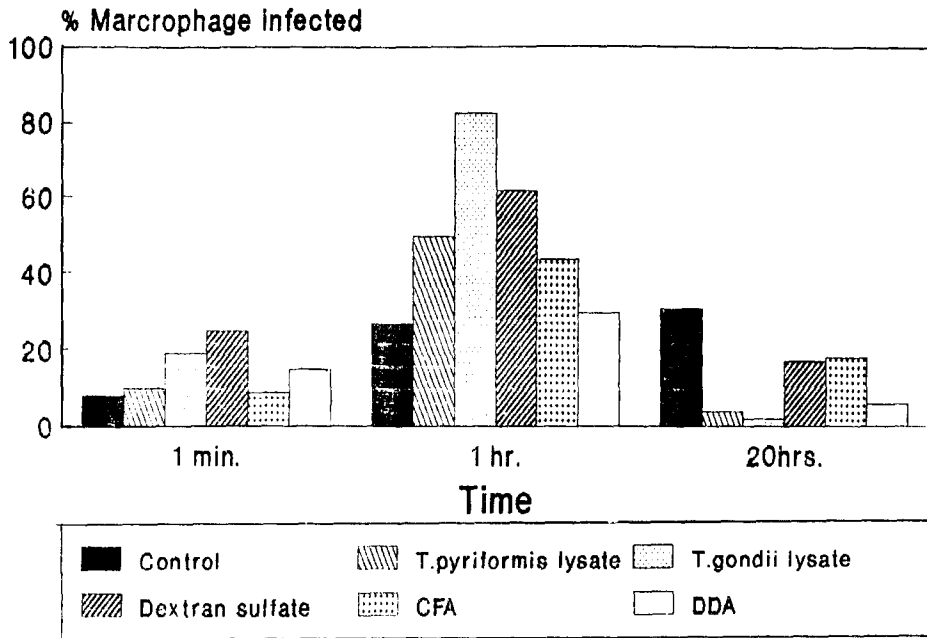


Fig. 5. Percentages of mouse peritoneal macrophages treated with various activators and infected with heat-killed *T. gondii*.

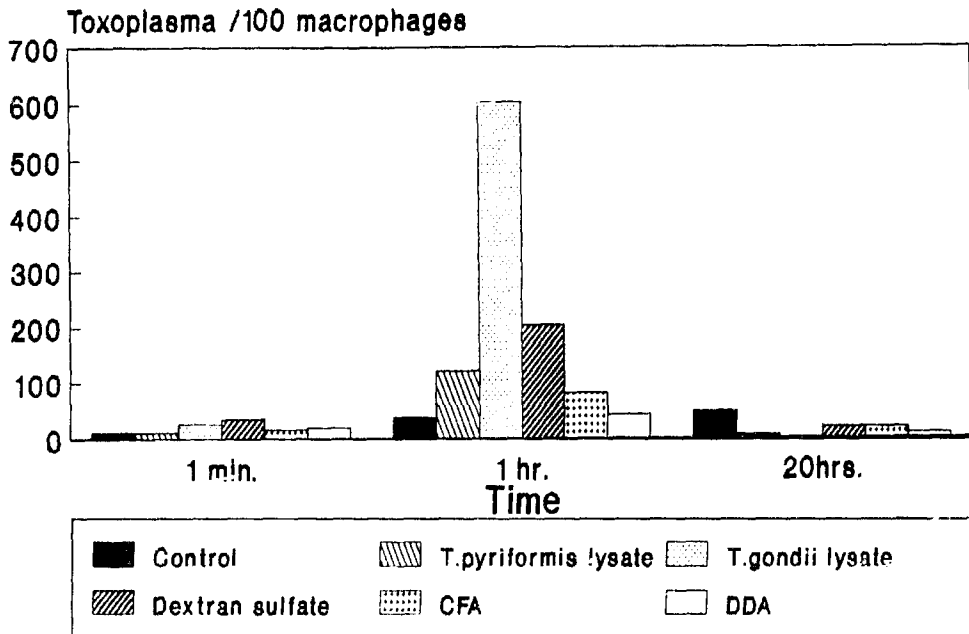


Fig. 6. Total numbers of heat-killed *T. gondii* per 100 mouse peritoneal macrophages treated with various activators.

## 고 찰

*Tetrahymena pyriformis*는 자유생활 담수 섬모충류의 일종으로서 송사리(*Poecilia reticulatus*)나 배기(*Ictalurus punctatus*) 등 담수어에 기생하여 이들의 피부, 근육층 또는 내장에 염증을 유발하는 조직학적 결핵을 유발하기도 한다. (Hoffman *et al.*, 1975). 근래에 이 섬모충은 세포생물학, 생화학 분야에서 널리 연구대상으로 하여 왔기 때문에 이들의 생물학적, 생화학적 성상이 비교적 소상히 알려졌다. 특히 *T. pyriformis* W strain은 비특이적으로 대식세포를 활성화할 수 있으며 이 *Tetrahymena* 항원은 복강 대식세포 유도제로 쓰이는 glycogen이나 양 적혈구(sRBC)와 같은 비환성 물질과는 전혀 다른 생물학적 특성이 있음이 밝혀지면서 (Makioka *et al.*, 1982; Makioka and Kobayashi, 1983) 기생충 감염에 대한 방어제로서 각광을 받기 시작하였다.

본 실험은 우리 나라에서 분리 배양되고 있는 *T. pyriformis* GL strain을 활성화제로 하여 활성화된 대식세포가 *T. gondii*에 대한 살멸 효과가 있는지를 판정하고 앞으로 *Toxoplasma* 방어제로서의 개발 가능성 유무를 보고자 한 것이다. 실험 결과 전반적으로 *Tetrahymena* 추출액은 적어도 화학 합성 활성화제보다는 월등한 항 *Toxoplasma* 살멸효과를 나타내었고, 화학 합성 활성화제로서는 DDA가 가장 우수한 살멸효과를 보였다(Table 1 & 2). 단, 기초 실험으로서 *Tetrahymena*를 비롯한 각 활성화제의 최소 용량과 효용 기간 등이 결정되어야 했으나 본 실험에서는 문헌적 근거에 따라 용량을 정하였고 *Tetrahymena*의 경우는 실험 마우스당  $1 \times 10^6$ 개의 총체가 최소 용량이며 활성화 효과는 2~3주간 지속된다는 Makioka *et al.* (1982)의 보고에 따른 것이다. 그러나 우리 나라산 GL 주(株)의 경우 활성화 효과나 효용 지속기간이 다른 경우도 있고 면역 자극제(immunostimulant)로 개발 여지도 있으므로 앞으로 보완 실험이 기대된다.

Makioka *et al.* (1982)은 대식세포 활성화제로 널리 쓰이는 BCG와 *Tetrahymena*를 혼합하여 주입하였을 때 대식세포 활성화에는 단독 주입시와 대차 없음을 보고하였고, Smrkovski and Strickland (1978)는 말라리아 감염 마우스에 대하여 BCG 반복 주사의 경우에도 일회 주사의 경우와 대차없는 항 말라리아 효과를 본 바 있다. 본 실험에서는 활성화제 혼합처리 효과 및 단일활성제의 반복처리 효과를 본 바 없어 위 실험 결과와 현재로서는 비교할 수 없다.

Krahenbuhl *et al.* (1972)은 마우스 모델에서 살아 있는 비독성(avirulent) *Toxoplasma*로 면역시킬 경우 죽인 *Toxoplasma*나 BCG와 같은 비특이 백신으로 면역시킬 경우보다 독성을 가진 *Toxoplasma* 감염으로 인한 마우스의 사망률을 월등히 감소시킴을 보고한 바

있고 특이 면역과 비특이 백신 처리로 인한 예방효과와의 비교는 별개의 영역이라고 하였다. 이는 특이 항원으로 감각된 T 세포가 관여하는 세포매개성 면역기전으로 설명될 수 있으나 본 실험에서는 *in vitro*에서 대식세포만을 배양하여 항 *Toxoplasma* 살멸효과를 본 것이므로 T 세포가 직접 관여된 바 없고 대식세포가 *Toxoplasma* 추출액과 같은 특이 항원과 *Tetrahymena* 추출액과 같은 비특이 항원에 활성화된 기전에 대하여는 설명하기 어렵다. 그러나 특이 또는 비특이 항원으로 일주일간 전처리 하는 과정에서 기타 면역세포들이 관여했을 가능성은 배제할 수 없다. 본 실험에서는 *Toxoplasma* 추출액과 *Tetrahymena* 추출액으로 전처리된 마우스 복강 대식세포가 배양 20시간 후에 대조군과 비교하여 가장 월등한 *Toxoplasma* 살멸효과를 나타내었다(Table 2).

면역 자극제에 의한 대식세포 활성화의 기전으로서 T 세포 참여 여부에 관하여 많은 논의가 있어 왔다. Mackaness (1969)는 정상 대식세포가 표적 미생물인 *Listeria*와 BCG로 처리된 마우스의 면역 입파구의 증대로 활성화될 수 있다 하였고, 반면 Kaplan *et al.* (1974)은 pyran copolymer로 T세포를 억제한 마우스에서 얻은 활성화 대식세포가 종양세포에 세포독성을 나타내었다고 보고하였다. Madraso and Cheers (1978)는 polyadenylic acid-polyuridylic acid (poly A:U)의 *in vitro*에서의 단독 처리로서도 대식세포를 직접 활성화시킬 수 있다 하였고, *P. acnes* 처리는 T 세포 참여 없이 독립적으로 대식세포를 활성화하여 종양세포를 파괴할 수 있다는 보고는 여러 곳에서 찾아볼 수 있다 (Christie and Bomford, 1975; Bomford and Christie, 1975; Ghaffar *et al.*, 1975; Woodruff and Warner, 1977). Makioka and Kobayashi (1983)도 *Tetrahymena*로 전처리된 nude mouse (nu/nu)와 정상 마우스에서 얻은 대식세포가 모두 동일한 양상으로 활성화됨을 보아 *Tetrahymena* 처리에 의한 대식세포의 활성화는 T 세포의 참여와는 무관한 것으로 보고하였다.

일면 Schultz *et al.* (1977)은 dextran sulfate와 같은 polyanionic agent가 interferon을 유도할 수 있는 약제이기 때문에 대식세포를 활성화시킬 수 있다고 하였으나 Hilgers *et al.* (1985)은 interferon의 증가를 입증할 수 없었고 사용 활성화제 내에 LPS도 검출할 수 없어 대식세포 활성화가 어떤 endotoxin의 영향으로 간주될 수 없다고 하였다. 그러나 대식세포 활성화의 과정은 동일 활성화제 처리의 경우라도 실험 조건, 즉 실험 동물의 종류, 대상 기생충의 독성, 활성화제의 주입기간 및 주입 경로에 따라 서로 다를 것이므로 본 연구 결과와 직접 비교할 수는 없을 것이다.

Hilgers *et al.* (1985)은 여러 가지 다른 adjuvant를 마우스에 전처리하여 얻은 마우스 복강 대식세포의 *Candida parapsilosis* 살멸효과를 본 바 있다. 여기에서도 *Corynebacterium parvum*과 같은 생물학적 활성

제가 dextran sulfate, DDA와 같은 화학합성 환성제보다 살멸효과가 있으며 같은 *C. parvum*이라 하더라도 주(株)별로 서로 그 살멸효과가 차이가 있음을 지적하였다. 본 연구 결과와도 일치하는 바도 있으나 환성제로 널리 쓰이는 dextran sulfate 경우에는 상반된 결과를 보였다. 즉, dextran sulfate는 methylamine, heparin, suramin 등과 같은 동일한 polyanionic agent 보다는 우수한 *Candida* 살멸효과를 보였으나 본 실험에서는 대조군보다도 낮은 *Toxoplasma* 살멸효과를 보인 경우도 있었다(Table 1). 이는 같은 환성제라 하더라도 표적 기생충의 종류 및 독성에 따라 대식세포의 활성화에 차이가 있음을 보여준 것이다.

DDA는 계면 환성제의 일종으로서 polyanions 보다는 우수한 *Candida* 살멸효과를 보였던 바 (Hilgers et al., 1985) 본 실험에서도 화학합성 환성제로서는 가장 우수한 항 *Toxoplasma* 효과를 나타내었다. 앞으로 환성 대식세포의 *Toxoplasma* 살멸 실험을 계속할 경우, 좋은 대조 환성제로 쓰여질 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서 실험 진행상 몇가지 관련 요소를 지적한다면 첫째 표적 *Toxoplasma*를 환성 대식세포 단층 배양기 내에 집속시킬 때 수차 세척은 하였으나 숙주로부터 C3b와 같은 보체나 항체와 같은 opsonin이 함유될 경우도 있을 것이다. 이런 경우 대식세포 원형질막에 C3b receptor나 Fc receptor가 있기 때문에 탐식 작용을 촉진시킬 가능성은 있다. 그러나 표적 *Toxoplasma* 영양형은 감염 3~4일째 숙주로부터 채취하였으므로 항체 생성 기간이 짧았고 총체 자체를 열처리한 실험에서도 탐식작용이 환성 대식세포에서 보다 왕성하였으므로 보체 관여 가능성도 희박하다. 둘째로는 대식세포 monolayer에 기타 복강세포(peritoneal exudate cell)가 개재할 가능성이 있다. 수차 세척하여 배양기에 부착된 세포만으로 실험하였으나 세포 동정은 한 바 없다. 셋째로는 현미경 하에서 계수된 표적 기생충이 실제로 대부분이 세포질 내로 탐식된 것이겠지만 주요 세포 표면에 붙어 있을 수 있다는 점이다. 이 실험상 오차를 막기 위하여 현미경 관찰은 한 사람이 계속하였다.

*Tetrahymena*는 무균배양이 가능하고 일반 세균과 같이 빠른 속도로 증식하며 우수한 *Toxoplasma* 살멸효과가 있음이 밝혀졌기 때문에 대식세포 활성화 실험은 물론 앞으로 *Toxoplasma*를 위시한 기타 원충성 기생충 감염 예방 목적으로 널리 응용될 가능성도 있다. 이를 위하여는 *Tetrahymena* 내의 환성화 물질, 효용용량, *Tetrahymena* 처리시 일어날 수 있는 부작용 등 광범한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

<본 실험을 위하여 도와주신 연세대학교 의과대학교실원 특히 張在景 선생에게 감사드립니다.>

### 참 고 문 헌

Adlam, C., Broughton, E.S. and Scott, M.T. (1972) Enhanced resistance of mice to infection with bacteria following pretreatment with *Corynebacterium parvum*. *Nature(London)*, **235**:219-220.

Bomford, R. and Christie, G.H. (1975) Mechanisms of macrophage activation by *Corynebacterium parvum*. II. *In vivo* experiments. *Cell. Immunol.*, **17**:150-155.

Christie, G.H. and Bomford, R. (1975) Mechanisms of macrophage activation by *Corynebacterium parvum*. I. *In vitro* experiments. *Cell. Immunol.*, **17**:141-149.

Ghaffar, A., Cullen, R.T. and Woodruff, M.F.A. (1975) Further analysis of the anti-tumor effect *in vitro* of peritoneal exudate cells from mice treated with *Corynebacterium parvum*. *Br. J. Cancer*, **31**: 15-24.

Hilgers, L.A.T., Snippe, H., Jansze, M. and Willers, J.M.N. (1985) Effect of *in vivo* administration of different adjuvants on the *in vitro* candidacidal activity of mouse peritoneal cells. *Cell. Immunol.*, **90**:14-23.

Hoffman, G.L., Landolt, M., Camper, J.E., Coats, D.W., Stookey, J.L. and Burek, J.D. (1975) A disease of freshwater fishes caused by *Tetrahymena corlissi* Thomson, 1955, and a key for identification of holotrich ciliates of freshwater fishes. *J. Parasitol.*, **61**(2):217-223.

Kaplan, A.M., Morahan, P.S. and Regelson, W. (1974) Induction of macrophage-mediated tumor-cell cytotoxicity by pyran copolymer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**:1919-1921.

Krahenbuhl, J.L., Ruskin, J. and Remington, J.S. (1972) The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, **108**:425-431.

Larson, C.L., Ushijima, R.N., Florey, M.J., Baker, R.E. and Baker, M.B. (1971) Effect of BCG on Friend disease virus in mice. *Nature(London)*, **229**:243-244.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.

Mackness, G.B. (1969) The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activation *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **129**:973-992.



- Madraso, E.D. and Cheers, C. (1978) Polyadenylic acid-polyuridylic acid (poly A:U) and experimental murine brucellosis. II. Macrophages as target cells of poly A:U in experimental brucellosis. *Immunology*, **35**:77-84.
- Makioka, A., Kobayashi, A. and Shichijo K. (1982) Protective effects of immunization with *Tetrahymena pyriformis* on murine toxoplasmosis. *Jap. J. Parasitol.*, **31**(6):561-568.
- Makioka, A. and Kobayashi, A. (1983) Activation of macrophages by *Tetrahymena pyriformis*: Killing of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Jap. J. Parasitol.*, **22**(3):203-210.
- McLeod, R., Estes, R.G. and Mack, D.G. (1985) Effects of adjuvants and *Toxoplasma gondii* antigens on immune response and outcome of per oral challenge. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**:800-804.
- Schultz, R.M., Papamatheakis, J.D. and Chirigos, M.A. (1977) Interferon; An inducer of macrophage activation by polyanions. *Science*, **197**:674.
- Smrkovski, L.L. and Strickland, G.T. (1978) Rodent malaria; BCG-induced protection and immunosuppression. *J. Immunol.*, **121**:1257-1261.
- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D. and Remington, J.S. (1988) Interferon- $\gamma$ ; The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, **240**:516-518.
- Watanabe, Y. and Ikeda, M. (1965) Isolation and characterization of the division protein in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, **39**:443-452.
- Woodruff, M.F.A. and Warner, N.I. (1977) Effect of *Corynebacterium parvum* on tumor growth in normal and athymic (nude) mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**:111-116.

==Abstract==

**Effect of *in vivo* administration of *Tetrahymena pyriformis* on the *in vitro* toxoplasma-cidal activity of mouse peritoneal macrophages**

Chung-Tae Kim, Pyung-Rim Chung and Kyung-Il Im  
*Department of Parasitology, College of Medicine, and Institute of  
 Tropical Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752, Korea*

*Tetrahymena pyriformis* is a free-living ciliate protozoan in the freshwater system. Experiments were carried out to determine whether intraperitoneal administration of *T. pyriformis* (GL strain) to mice activates macrophages to be able to kill *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*.

Mice were also injected intraperitoneally with several synthetic activators; dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA), dextran sulfate, complete Freund's adjuvant (CFA) as well as *Toxoplasma* and *Tetrahymena* lysates in order to activate mouse peritoneal macrophages. One week after the administration of activators, peritoneal cells were harvested and the adherent macrophages were challenged with *Toxoplasma* tachyzoites. Macrophage monolayers were then fixed with absolute methanol after washing, and stained with Giemsa solution. The percentage of the adherent cells infected and total number of organisms per 100 macrophages were calculated to make toxoplasma-cidal activity of macrophages according to the cultivation time.

Peritoneal macrophages from mice administered with *Tetrahymena* exhibited significant protection against target parasites as compared with those treated with synthetic activators. Among non-biological synthetic activators, DDA was evaluated as an excellent activator.

[*Korean J. Parasit.*, **29**(2):129-137, June 1991]