기 생 충 학 잡 지 제29권 제3호
The Korean Journal of Parasitology
Vol. 29, No. 3, 267-277, September 1991

*Naegleria fowleri*가 자연살세포의 활성에 미치는 영향*

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

李 圭 來·愼 珠 沃·任 敬 一

요 약: 원발성 아메바성 수막 뇌염을 일으키는 병원성이 강한 자유 생활 아메바인 ***Naegleria fowleri***의 영양형을 마우스 비강에 접종시킨 후 12시간, 1일, 2일, 3일 및 5일째에 비장 세포의 자연살세포 독성을 측정하였다. ^{51}Cr 방출 검사법과 단세포 독성 검사에 의하여 표적 세포 결합능, 활성 자연살세포, Vmax 및 재순환능을 측정하였다. 감염 마우스의 사망률은 접종 후 20일까지 76.7%이었으며 사망한 마우스의 평균 생존 기간은 12.87±0.71일이었다. 자연살세포의 독성은 아메바 접종후 12시간째에 대조군에 비하여 유의하게 증가하기 시작하여 접종후 1일째 가장 증가하였다. 표적 세포 결합능간에는 경과 기간별로 유의한 차이가 없었으며 활성 자연살세포와 재순환능은 자연살세포의 독성이 증가함에 따라 증가하였다. ***N. fowleri***가 감염되었을 때 자연살세포의 활성에 미치는 영향을 보면 자연살세포의 독성이 증가함에 따라 활성 자연살세포 및 재순환능이 증가하였고, 표적 세포 결합능에는 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

Key words: Natural killer cell, natural killer activity, *Naegleria fowleri*

서 론

자유생활 아메바인 *Naegleria fowleri*(이하 *N. fowleri*로 약함)는 하수, 토양, 공기, 물 등 자연환경에 널리 서식하며 인체에 감염되었을 때 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)을 일으키는 원충이다(Carter, 1970). Fowler and Carter(1965)에 의해 병원성 자유생활 아메바에 의한 인체의 원발성 아메바성 수막뇌염이 처음 보고된 이래 자유생활 아메바에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이들 자유생활 아메바 중 강한 병원성을 지닌 것으로는 *Naegleria* sp. 외에 *Acanthamoeba* sp.를 들 수 있으며(Martinez *et al.*, 1973; Bhagwandeen *et al.*, 1975) 이들 아메바는 인체에 급성으로 뇌에 감염되며(Kenny, 1971; Bhagwandeen *et al.*, 1975), 감염된 사람의 비인두(Eldridge and Tobin, 1967)와 눈(Nagington *et al.*, 1974; Jones and Robinson, 1975)으로부터 분리되어졌다.

우리 나라에서는 아직 임상보고가 없으나 세계 여러 곳에서 이들 자유생활 아메바에 의한 인체 감염예가 140예 정도 보고되었으며(Lallinger *et al.*, 1987) 자연환경 여러 곳에서 병원성 또는 비 병원성 아메바들이 검출 보고되고 있다(Schmoller, 1964; Carter, 1968; Richards, 1968; Kingston and Warhust, 1969). 우리 나라에서 黃 등(1976)이 *Naegleria* sp.를 서울 시내 청계천에서, 黃 등(1980)이 *Acanthamoeba* sp.인 YM-2와 YM-3 주를 저수지에서 각각 분리하고 마우스에 감염시켜 병원성을 인정한 바 있다.

이러한 원충의 감염은 주로 수영하는 동안 비강을 통해 인체에 들어와 후점막과 사상판을 뚫고 후신경을 타고 중추 신경계를 침범하여 괴사성 출혈성 뇌수막염을 일으킨다고 보고된 이래(Martinez *et al.*, 1973) 아메바성 수막뇌염 발생시 발현되는 숙주의 체액성 면역반응(Ferrante and Thong, 1979; Thong, 1979; Curson *et al.*, 1980; Rowan-kelly *et al.*, 1980) 뿐만 아니라 세포매개성 면역반응에 대해서도 그 연구가 진행되어져 왔다(Curson *et al.*, 1980; Ferrante and Smith, 1984).

자연살세포(natural killer cell: NK)는 1970년대 중반 종양세포에 대한 세포 매개 독성연구 중 발견된(Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975) 이후 활발한 연구가 되어오고 있는데 형태학적으로는 호 아주르성(azurophilic) 세포질 과립을 가진 큰 과립상 림프구(large granular lymphocyte)에 속하고(Reynolds *et al.*, 1981; Timonen *et al.*, 1982) 부유성(non-adherent), 비 식작용(non-phagocyte)의 특징을 가지며(Otaldo and Herberman, 1984) 인체에서는 CD3나 T세포 수용체는 나타내지 않으나 CD 16이나 CD 56(NKH-1)을 표식자로 가지며(Zarling and Kung, 1980; Abo and Balch, 1981), 생쥐에서는 NK-1.1/

* 위 논문은 1991년도 연세대학교 의과대학 유학 조교 연구비에 의해 일부 수행되었음.

NK-2.1을 표식자로 갖는다(Gilmcher *et al.*, 1977; Burton and Winn, 1981).

이들은 생체에서 중요 조직적합 항원(major histocompatibility antigens)에 제한됨이 없이 바이러스에 감염된 세포 혹은 종양세포 등을 살해할 수 있는 능력이 있으며(Herberman and Ortaldo, 1981; Bloom, 1982; Herberman, 1985), 대식세포, 단핵구, 과립구, T 및 B림프구와는 구분되어지는 세포군으로(Zarling and Kung, 1980; Rumpold *et al.*, 1982; Galli *et al.*, 1982), 암세포 자연적 억제 및 미생물이나 기생충 감염에 대한 저항 외에도 급성 조직이식 거부반응(acute graft rejection), 신형성(neoplasia)과 전이(metastasis) 저지에 중요한 조절 역할을 하는(Lopez, 1975; Kasia *et al.*, 1979; Talmadge *et al.*, 1980; Bloom, 1982) 등 숙주의 면역 감시 기전에 중요한 역할을 하는 것으로(Warner *et al.*, 1982) 추측되고 있다.

자연살세포의 활성도는 많은 요인에 의해 변화되어지는데 인터페론(interferon; IFN), 인터페론 유도체와 interleukin-2(IL-2)는 자연살세포의 독성을 증가시키며(Gidlund *et al.*, 1978; Henney *et al.*, 1981) 반대로 prostaglandin E(PGE), glucocorticoid와 같은 면역 약리학적 물질들은 자연살세포의 독성을 억제하는 것으로 보고되었다(Omsrud and Torsby, 1981; Lang *et al.*, 1982; Holbrook *et al.*, 1983; Gatti *et al.*, 1986).

이들 자연살세포에 대한 연구가 계속되어 오고 있지만 그 작용 기작에 대해서는 부분적으로만 알려지고 있다. 이러한 자연살세포의 반응에 관여하는 조절 기전을 더 자세히 규명하기 위하여 세포독성반응이 이루어지는 모든 단계를 검사하는 것이 기초적인 자료가 된다. Roder *et al.*(1978)이 자연살세포가 표적(targets)을 인지, 부착하고 난 후에 표적을 파괴하는 세포 독성 매개물(mediator)을 분비한다는 자극—분비(stimulation-secretion)설을 제안한 이후 최근에는 몇몇 증거들을 기초로 자연살세포와 자연살세포—감수성 표적 세포 사이의 작용에 대해 몇가지 단계, 1) 표적 세포를 인식하고 부착하는 단계, 2) 표적 세포를 용해하는 단계, 3) 표적 세포에서 떨어지서 다른 표적 세포에 붙어 작용을 반복하는 단계로 나누고 있다(Ulberg and Jondal, 1981; Hiserodt *et al.*, 1982 a & b; Quan *et al.*, 1982).

Grimm and Bonavida(1979)는 agarose를 이용한 단세포 세포 독성 검사(single cell cytotoxicity)에 의해 표적 세포 결합능(target binding capacity: TBC)과 활성(active) 자연살세포를 측정함으로써 자연살세포의 세포 독성 기전을 연구하였다(Bradley and Bonavida, 1982). 또한 1981년 Ulberg and Jondal은 위의 측정법과 ^{51}Cr 방출 검사법에 의해 한 개의 자연살세포에 의해서 용해된 표적 세포수(Vmax)와 재순환능(recycling capacity: RC)를 측정하여 그 기전을 연구하였다.

이러한 자연살세포의 세포 독성이 자유생활 아메바인 *Acanthamoeba* sp.를 마우스에 접종하였을 때 증가되었음이 보고된 바 있으며(金, 1989) 이외에도 원충인 *Trypanosoma* sp., *Babesia* sp. 및 *Plasmodium* sp. 감염시에도 자연살세포의 세포 독성이 작용하는 것으로 보고되었다(Clark and Allison, 1974; Trischman *et al.*, 1978; Hatcher and Kuhn, 1981).

따라서 본 실험에서는 기생충성 질환에 있어서 발현되는 숙주의 비특이 세포매개성 면역에 대한 연구의 일환으로 병원성 자유생활 아메바인 *N. fowleri*를 마우스에 접종하여 그 초기에 자연살세포의 세포 독성에 미치는 영향에 대해 알아보고자 ^{51}Cr 방출검사법과 단세포 독성 검사법에 의해 표적 세포 결합능(target binding capacity: TBC)과 활성 자연살세포를 측정하고 재순환능(recycling capacity)을 측정함으로써 자연살세포의 각 단계마다의 작용을 측정하여 *N. fowleri* 접종이 자연살세포의 세포독성에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. *Naegleria fowleri*의 배양

Jardin, J.B.(Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Belgium)로부터 분양받은 *N. fowleri*를 37°C, 5% CO_2 항습항온기(NaPCO, Portland, Oregon)에서 CGVS(Casiton-Glucose-Vitamin-Serum) 배지(Willaert, 1975)를 사용, 무균적으로 계대배양하여 사용하였다.

2. 실험동물

생후 약 6~8주 된 백색, 웅성 ICR 마우스를 사용하였다.

3. *N. fowleri*의 접종

마우스 체중 gm당 secobarbital 0.06 mg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후 *N. fowleri* 영양형 1×10^5개를 5 μl 생리 식염수에 함유되도록 한 후 마우스의 오른쪽 비강에 떨어뜨려 접종하였다. 실험 대조군은 실험군과 같은 방법으로 마취시키고 생리 식염수를 비강 내로 떨어뜨려 접종하였다.

4. 실험군의 설정

*N. fowleri*를 마우스에 접종한 후 12시간 1일, 2일, 3일 및 5일째에 비장 세포의 자연살세포의 세포 독성을 측정하였다.

5. 비장 세포의 자연살세포 독성

(1) 표적 세포 : 자연살세포에 의한 세포 독성을 측정하기 위한 표적 세포로는 YAC-1(A/Sn mouse lymphoma; Cikes *et al.*, 1973) 세포를 사용하였다. 세포 배양을 위한 배지는 10% fetal calf serum, L-glutamine (2 mM/ml), penicillin(100 unit/ml) 및 streptomycin

(100 μl/ml), 10 mM HEPES를 함유시킨 RPMI 1640 배지(이하 RPMI 완전 배지로 약함)를 사용하여 계대 배양하였다.

(2) 주효 세포 : 마우스를 각각 시간별로 희생시켜 무균적으로 비장을 채취한 후, RPMI 완전 배지를 사용하여 단세포 부유액을 만들었다. 여기에 0.16M Tris-NH_4Cl(pH 7.2)를 넣어 적혈구를 용혈시키고 이를 다시 RPMI 완전 배지에 부유시킨 다음 60 mm×15 mm의 plastic dish(Costar, Cambridge, M.A.)에 넣어 37°C, 5% CO_2 항습 항온기에서 1시간 배양한 후 가볍게 흔들어 부유되어 있는 비 부착성 세포만을 채취하여 사용하였다.

(3) 자연살세포 독성 검사 : 자연살세포의 세포 독성은 4시간 ^{51}Cr 방출 방법으로 수행하였다(Ullberg and Jondal, 1981). YAC-1세포 1×10^5 cells/0.2ml에 100 μCi $Na_2{}^{51}CrO_4$(1 mCi/ml, NEZ-0305, New England Nuclear, Boston, M.A.)을 넣고 37°C 항온조에서 1시간 표지화시켰다. 그 후 2회 세척하여 ^{51}Cr이 표지된 세포를 microplate 각 well당(Costar, 96 wells, Cambridge, M.A.) 1×10^6 cells/0.1ml되게 넣고 주효 세포 : 표적 세포의 비율(E : T ratio)을 100 : 1이 되도록 주효 세포를 10^4 cells/0.1ml 넣어 37°C, 5% CO_2 항습 항온기에서 4시간 배양하였다. 이때 maximal release를 유발시키기 위해 1N NaOH를 가하였고 spontaneous release를 측정하기 위해서는 ^{51}Cr이 표지된 표적 세포만을 배양하였다. 배양 후 100 μl의 상층액을 수거하여 gamma counter(Packard, Downers Glove, I.L.)로 방사능을 측정하였으며 자연살세포독성(cytotoxicity)은 다음 공식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \frac{\text{test release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximal release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

(4) 단세포 세포 독성 검사 : 단세포 세포 독성 검사는 Grimm and Banavida(1979)와 Bradley and Bonavida(1982)의 방법을 따랐다. 요약하면 2×10^5의 주효 세포와 표적 세포를 15 ml conical tube에 넣고 RPMI 완전 배지로 총 용량이 0.2 ml가 되게 잘 섞은 후 실온에서 500 *g*로 2분간 원심하였다. 그 후 37°C에서 15분간 5% CO_2 항습 항온기에 방치한 후 100 μl micropipette으로 진탕시킨 다음에 42°C로 유지시킨 0.5% agarose RPMI 완전 배지 0.5 ml을 조심스럽게 첨가시켰다. Agarose-세포 혼합액을 plastic petridish(60 mm×15 mm, Costar, Cambridge, M.A.)에 잘 쏟아 붓고, 이 agarose-세포 혼합액이 굳은 후 약 5~6 ml의 RPMI 완전배지를 첨가하여 37°C, 5% CO_2 항습 항온기에서 약 3시간 동안 배양하였다. 그후 0.1% trypan blue로 5분간 염색하였다. 그후 cold phosphate buffered saline으로 3번 세척해낸 다음 1% formaldehyde로 고정하였다. 표적 세포 결합능의 계산은 현미경 하(×100)에 관찰된 250개의 림프구 중에 표적 세포와 결합한 림프구의 수를 백분률로 환산하였으며, dead conjugates는 50개의 conjugate 중 표적 세포가 청색으로 염색된 즉, 죽은 세포의 수를 백분률로 나타내었다. 표적 세포의 backgroud death는 control dishes에서 그 죽은 표적 세포를 계산하였다. 환성 자연살세포의 %는 agarose에서 단세포 세포 독성 검사가 끝난 후 각 실험마다 다음의 공식에 의해 계산하였다.

$$\%\ NK = \%\ TBC \times A - (A \times B)$$

여기서 % TBC는 표적 세포와 결합한 림프구의 %, A는 표적 세포가 죽은 conjugates의 %, B는 표적 세포의 background death의 %이다.

(5) 재순환능 검사 : 주효 세포들의 최대 자연살세포의 potential(V_{max})과 재순환능은 ^{51}Cr 방출 검사법과 단세포 세포 독성 검사를 합하여 계산한 Ulberg and Jondal(1981)의 방법을 따랐다. 요약하면 1×10^5/0.1ml 비 부착성 주효 세포에 ^{51}Cr이 표지된 표적 세포를 5번 배수 희석(1×10^5/0.1ml 세포에서 0.625×10^4/0.1ml 세포까지)하여 넣어준 후 round bottom microplate(Costar, 96 wells, Cambridge, M.A.)에서 37°C, 5% CO_2 항습 항온기에서 3시간 배양하였다. 배양 후 50μl의 상층액을 각 well에서 수거하여 희석된 표적 세포의 ^{51}Cr 방출량을 측정하였다. ^{51}Cr 방출검사법에 의해 dose-response curve의 결과는 Michaelis-Menten Kinetics와 일치한다. 이것은

$$V = \frac{V_{max} \times T}{K_m + T}$$

로 나타낼 수 있는데,

여기서 V는 죽은 표적 세포의 수이고, T는 최초에 넣어준 표적 세포의 수이다. V_{max}는 표적 세포를 최대한 넣어주었을 때 얻어지는 죽은 표적 세포의 수이다(number of target cells killed when $T\to\infty$). K_m은 V_{max}치의 절반을 나타내는 표적 세포의 수이다(number of target cells that produces one-half of V_{max}). 여러가지 다른 비율의 $E:T$ ratio의 V_{max}치와 K_m치는 Lineweaver-Burk equation을 사용해서 결정할 수 있는데 그 공식은 다음과 같다.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{T} + \frac{1}{V_{max}}$$

이 식에서 $1/V$과 $1/T$은 직선적인 관계(linear relationship)을 갖는다. 즉, V와 T의 역수치를 점으로 나타내고 regression analysis를 사용하면(method of least squares) 직선을 얻을 수 있다. V_{max}는 Y축을 가로질러 지나가는 값(Y절편)의 역수에서, K_m은 X축을 가로질러 지나가는 값(X절편)의 마이너스 역수치(negative reciprocal value)로부터 구할 수 있다. Table 1과 Fig. 1에서 위에 서술한 대로 V_{max}와 K_m치를 계산하는 한 예를 들었다.

재순환능은 하나의 활성 자연살세포가 배양하는 시간 동안 죽일 수 있는 최대한의 표적 세포의 수를 가르킨다. 즉, 표적 세포를 포화 상태로 만들었을 때 lytic assay에서 얻을 수 있는 이론적인 수치를 나타낸다. 재순환능은 이와 같이 하여 측정한 V_{max}치를 V_{max}

Table 1. A representative experiment showing data used for calculations of V_{max} and K_m

Dilution number	Number of effector cells	Number of target cells (T)	Percent of dead target cells (%)	Number of dead target cells (V)	$1/T=X$	$1/V=Y$
1	1×10^5	1×10^5	0.53	5.30×10^2	1×10^{-5}	1.89×10^{-3}
2	1×10^5	5×10^4	0.97	4.85×10^2	2×10^{-5}	2.06×10^{-3}
3	1×10^5	2.5×10^4	1.26	3.15×10^2	4×10^{-5}	3.18×10^{-3}
4	1×10^5	1.25×10^4	2.43	3.04×10^2	8×10^{-5}	3.29×10^{-3}
5	1×10^5	0.625×10^4	2.54	1.59×10^2	1.6×10^{-5}	6.29×10^{-3}

Regression analysis gives: $Y=a+bX$; $r=0.990$ (Fig. 1.B); $a=3.17\times10^{-4}$; $b=31.39$;
$V_{max}=1/a=3,150.60$; $K_m=b/a=1.00\times10^5$

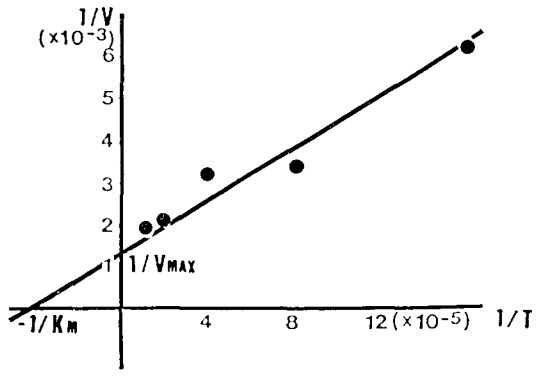

Fig. 1. Data from Table 1 are used to exemplify the calculation of V_{max}. Initial number of target cells(T) is plotted against number of dead target cells(V) at the end of the test. The points fit well to the theoretical Michaelis-Menten saturation curve. A Line-weaver-Burk plot is used to calculate V_{max} and K_m. $1/T=X$ plotted against $1/V=Y$. Data are taken from Table 1 and Fig. 1. Regression analysis is used to obtain a straight line ($r=0.990$). V_{max} equals the reciprocal of the Y intercept and K_m equals the negative reciprocal of the X intercept.

치 검사에서 사용한 작동 세포의 수와 환성 자연살 세포를 곱한 값으로 나누어 줌으로 얻을 수 있었다. 즉,

$$RC=\frac{V_{max}}{\text{percent active NK cells}\times\text{number of effector cells in } V_{max} \text{ assay}}$$

6. 마우스 뇌조직의 병리학적 검사

자유생활 아메바인 *N. fowleri*의 병원성의 정도를 확인하고자 마우스 비강을 통하여 접종시킨 후 사망하였거나 사망 직전에 이들을 부검하였으며 뇌조직의 일부를 떼내어 일부는 CGVS배지에 넣어 배양하였고 일부는 hematoxylin-eosin염색을 하여 조직의 병리학적 변화를 관찰하였고 동시에 아메바 영양형의 존재 여부를 확인하였다.

실 험 성 적

1. 감염 마우스의 사망률

*N. fowleri*를 접종시킨 마우스는 6일부터 사망하기 시작하여 20일 후까지 30마리 중 23마리(76.70%)가 사망하였으며 사망한 마우스의 접종 후 사망할 때까지의 평균 생존기간은 12.87±0.71일이었다. 사망한 마우스를 부검하여, 뇌 조직에서 출혈성 괴사와 *N. fowleri* 영양형의 존재를 광학현미경으로 관찰할 수 있었고 뇌조직의 일부를 배양하여 아메바의 증식을 확인할 수 있었다(Table 2).

2. *N. fowleri* 접종시 자연살세포의 세포 독성

N. fowleri 영양형 1×10^5개를 마우스에 접종한 후 경과 기간별로 자연살세포의 세포 독성을 측정하였다. 대조군에서의 자연살세포의 세포 독성은 0.23±0.41%이었으며, 아메바 접종 후 12시간째의 세포 독성은 1.73±0.34%로 대조군과 비교하여 유의하게 차이가 있었다($p<0.05$). *N. fowleri* 접종 후 1일째에 자연살세포의 세포 독성이 7.02±1.04%로 증가하였으며 ($p<0.05$), 아메바 접종후 2일째의 세포 독성은 1.86±0.31%로 대조군과 비교하여 유의하게($p<0.05$) 증가되어 있었고 접종 후 3일째에는 1.42±0.31%였다. 접종 후 5일째에는 자연살세포의 세포독성이 0.08±0.01%였다(Table 3, Fig. 2).

Table 2. Cumulative number of death in mice inoculated intranasally with *Negleria fowleri*

Group	No. of Mice	Cumulative number of death of mice at days: 6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Mortality (%)	Survival Time(days; Mean±S.E.)
N. fowleri	30	1	—	2	4	5	8	10	13	18	19	20	—	21	22	23	76.70	12.87±0.71

Remark: no death in non-infected mice

Table 3. NK activity, V_{max}, TBC, fraction of dead conjugates, and estimation of active NK & their maximal recycling capacity*

Time after inoculation	NK activity (%)	V_{max} ($\times 10^2$)	TBC (%)	Fraction of dead conjugates(%)	Active NK cells(%)	Estimated MRC
Control	0.23±0.41	5.01± 0.96	15.17±0.56	36.45±4.86	5.27±0.16	0.95±0.60
12 hr	1.73±0.34**	31.50± 5.10**	15.70±0.73	43.16±4.26**	6.49±0.26**	4.85±1.96**
1 day	7.02±1.04**	40.20± 1.04**	15.64±0.30	45.29±1.88**	6.85±0.01**	5.87±1.04**
2 day	1.86±0.31**	9.04±23.60	14.66±0.83	41.50±2.49**	5.67±0.26	1.60±9.07
3 day	1.42±0.31**	17.92± 3.24**	14.47±0.51	40.63±4.90**	5.60±0.16	3.20±2.03
5 day	0.08±0.01	16.82± 0.63**	15.30±0.56	30.29±1.88**	4.39±0.12	3.80±0.53

* Mean±S.E.

** $p<0.05$ versus control

Ratio of effector to target cell in NK activity; 100 : 1

Ratio of effector cells to target cell in MRC; from 1 : 1 to 1 : 16

Ratio of effector cells to target cell in TBC, fraction of dead conjugate and active NK cells; 1 : 1

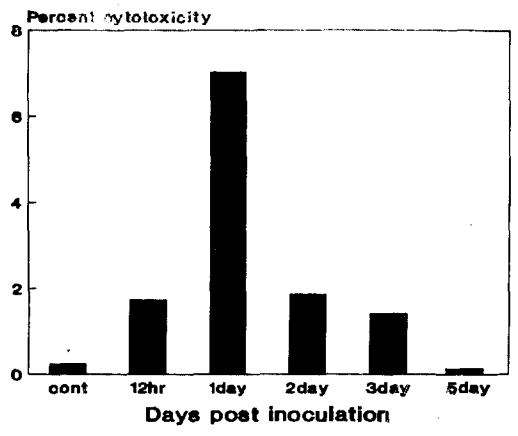

Fig. 2. Natural killer cell cytotoxic activity against YAC-1 target cells in mice infected with *Naegleria fowleri.*

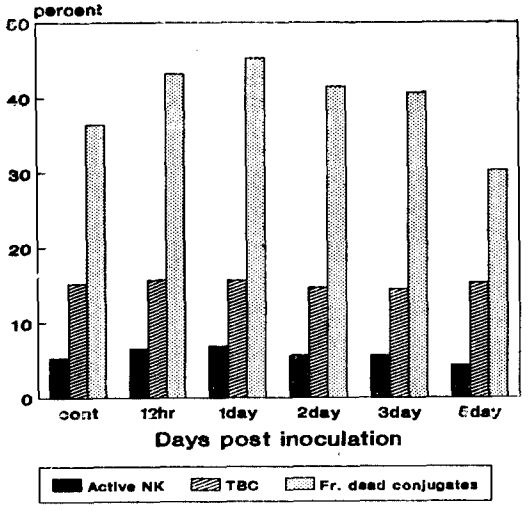

Fig. 3. Single cell cytotoxic activity against YAC-1 target cells in mice infected with *Naegleria fowleri.*

3. 표적 세포 결합능(TBC)과 활성 자연살세포

단세포 세포 독성 검사를 시행한 결과 표적 세포 결합능은 대조군에서 15.17±0.56%, 아메바 접종 후 12시간째에 15.70±0.73%, 접종 후 1일째에 15.64±0.30%, 2일째에 14.66±0.83%, 3일째에 14.47±0.51%, 5일째에 15.30±0.56%로 나타났으며 대조군과 비교하여 아메바 접종 후 경과 시간별로 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Table 3, Fig. 3). Agarose petri dish에서 3시간 동안 배양하였을 때 나타난 활성 자연살세포는 대조군에서 5.27±0.16%였으며 아메바 접종 후 12시간째(6.49±0.26%)와 접종후 1일째(6.85±0.01%)에 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 아메바 접종 후 2일째에는 대조군 수준으로 감소하는 경향을 보였으며, 아메바 접종 후 5일째에는 대조군과 비교하여 유의하게($p<0.05$) 감소하였다(4.39±0.12%) (Table 3, Fig. 3).

4. V_{max}의 측정

최대 자연살세포의 potential(V_{max})은 대조군에서는 5.01±0.96($\times 10^2$)로 나타났으며, 아메바 접종 후 12시간째에는 31.50±5.10($\times 10^2$)로 대조군과 비교하여 유의하게($p<0.05$) 증가하였다. 아메바 접종 후 1일째의 V_{max}값은 40.20±1.04($\times 10^2$)로 가장 높게 나타났으며($p<0.05$) 그후 감소하여 접종 후 2일째에는 9.04±23.6($\times 10^2$), 3일째에는 17.92±3.24($\times 10^2$), 5일째에는 16.82±0.63($\times 10^2$)으로 대조군과 비교하여 높게 나타났다(Table 3, Fig. 4).

5. 재순환능의 측정

재순환능은 대조군에서 0.95±0.60으로 나타났으며 아메바 접종 후 12시간째에 대조군과 비교하여 유의하게($p<0.05$) 높게 나타났다(4.85±1.96). 아메바 접종

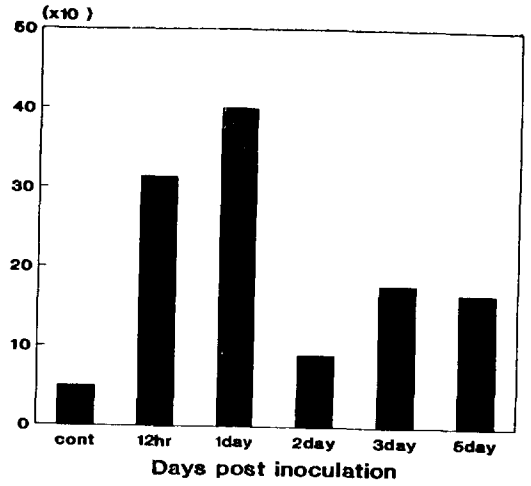

Fig. 4. V_{max} against YAC-1 target cells in mice infected with *Naegleria fowleri*.

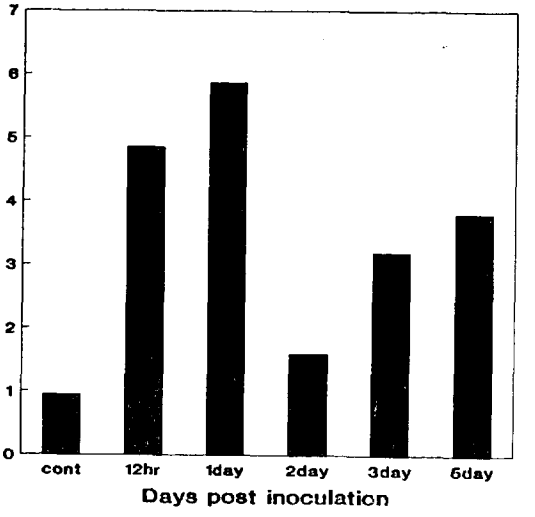

Fig. 5. Maximal recycling capacity against YAC-1 target cells in mice infected with *Naegleria fowleri*.

후 1일째의 재순환능 값은 5.87±1.04로 나타났으며, 접종 후 2일째에는 1.60±9.07, 3일째에는 3.20±2.03, 5일째에는 3.80±0.53으로 아메바 접종 후 1일째보다 저하되는 양상을 보였으나 대조군 보다는 증가되어 나타났다(Table 3, Fig. 5).

이상의 결과를 종합하여 V_{max}, 표적 세포 결합능, 활성 자연살세포, 재순환능 및 자연살세포의 세포독성간의 상관 관계를 살피 보면 표적 세포 결합능과 자연살세포의 세포 독성간에는 $r=0.35$의 낮은 상관 관계를 보였으며, 활성 자연살세포와 표적 세포 결합능 간에는 $r=0.40$으로 비교적 낮은 상관 관계를 나타냈다. V_{max}와 활성 자연살세포 간에는 서로 $r=0.74$의 상관 관계를 발견할 수 있었다. 또한 활성 자연살세포와 자연살세포의 세포 독성간의 상관 관계는 $r=0.84$로 비교적 높은 상관 관계를 나타냈으며 재순환능과 자연살세포의 세포 독성간에는 $r=0.62$의 상관 관계를 보였다(Table 4). 따라서 *N. fowleri*를 마우스에 접종하면 자연살세포의 표적 세포 결합능에는 전혀 영향을 미치지 않으나 활성 자연살세포의 수가 증가하고, 표적 세포에 결합하여 살해 작용을 수행한 뒤 다시 다른 표적 세포에 결합하는 재순환능에도 영향을 주어 자연살세포의 세포 독성 작용을 수행하는 것으로 보여진다.

Table 4. Correlation matrix between V_{max}, TBC, active NK, MRC and NK activity

	V_{max}	% TBC	% Active NK	MRC	% NK activity
V_{max}	1.0				
% TBC	0.66	1.0			
% Active NK	0.74	0.40	1.0		
MRC	0.97	0.64	0.56	1.0	
% NK activity	0.76	0.35	0.84	0.62	1.0

*N. fowleri*를 마우스 비강을 통하여 접종시킨 후 사망하였거나 사망직전에 뇌조직의 일부를 떼어내어 CGVS 배지에 넣어 배양하여 아메바 영양형의 존재 여부를 확인하였고 일부는 hematoxylin-eosin 염색을 하여 조직의 병리학적 변화를 관찰하였다. *N. fowleri*에 감염된 마우스의 뇌조직에는 급성 염증세포의 침윤이 있었고 염증세포 사이에 많은 아메바 영양형이 관찰되었으며 핵이 뚜렷하였고 세포질에서 많은 공포(vacuole)을 관찰할 수 있었다.

고 찰

자연 환경에 널리 존재하는 자유생활 아메바인 *N. fowleri*는 주로 수영하는 동안 비강을 통해 인체에 들어와 중추신경계를 침범하여 과사성 출혈성 수막뇌염을 일으켜 환자의 대부분이 감염 후 1주일 이내에 사망한다고 알려져 있다(Curson and Brown, 1976). 이러한 병원성 자유생활 아메바에 의한 아메바성 수막뇌염 발생시 숙주의 세포매개성 면역의 발현이 숙주의 방어 기전에 중요한 역할을 한다는 것이 여러 사람에 의해 보고되었으며(Diffley *et al.*, 1976; Curson *et al.*, 1980; Ferrante and Smith, 1984; 김, 1989) 세포 매개성 면역반응 중 특이적 방어 기전과는 달리 생체에서 항원에 대한 사전 감작없이 비 특이적 방어 기전으로 가장 선두에서 자연살세포가 작용함을 보고한 바 있다(金, 1989).

자연살세포는 경상적인 동물과 사람에 존재하며 바

이러스에 감염된 세포, 그리고 변형된(neoplastic) 표적 세포에 자연적인 세포 독성을 나타내는 림프구의 이형적 아집단(heterogeneous subpopulation)으로(Herberman *et al.*, 1975; Jondal and Pross, 1975) 자연살세포의 유래에 대해서는 많은 사람들이 T림프구, B림프구, 대식 세포 및 단핵구와 구분하여 분류하나(Herberman and Holden, 1978; Zarling and Kung, 1980; Galli *et al.*, 1982; Rumpold *et al.*, 1982) 다양한 조혈 기능계의 세포들이 분화 단계 중 특정한 수용체를 발현함으로써 특정 단계에서 자연살세포의 기능을 나타낼 것이라는 가능성도 제시되어지고 있다(Ortaldo, 1982). 또한 이들은 다른 면역 담당 세포의 분화와 증식에도 영향을 미침으로써 면역계를 조절하여 숙주의 방어 기전에 중요 역할을 하는 것으로 알려지고 있다(Arai *et al.*, 1983). 따라서 자연살세포의 세포 독성이 질병의 단계를 측정할 수 있는 parameter로 사용되어질 수 있음이 암 환자나 기생충성 질병 등에서 보고되고 있다(Trischman *et al.*, 1978; Hatcher and Kuhn, 1981; Esther *et al.*, 1982).

자연살세포의 작용 기작에 대해서는 독성 매개체 분비와 관련된 2가지 주요 기작이 제안되어 지고 있는데 그 첫번째가 Henkart and Henkar(1982), Young *et al.*(1986)에 의한 세포 독성 매개체의 막 삽입(membrane insertion)설이다. 이 설은 자연살세포와 T림프구의 과립으로 부터 유효한 세포 독성 인자들이 지질 이중층 속으로 고리같은 구조(ring like structure)를 삽입함으로써 수분 내에 표적 세포를 비 선택적으로 파괴할 수 있다는 것이다. 두번째로는 Wright *et al.*(1981, 1983 & 1986)과 Bradly and Bonavida(1982)가 제안한 더 선택적인 방법에 의해 감수성 표적 세포를 파괴시키는 용해성 인자 분비설로 자연살세포와 자연살세포-감수성 표적 세포와의 상호 작용에 의해 자연살세포 독성 인자(Natural Killer Cytotoxic Factor: NKCF)가 생성되어져서 세포매개성 독성에 관여한다는 것이다. 이러한 기작들이 제안된 이후에 자연살세포와 자연살세포-감수성 표적세포 사이와의 작용에 대해 1) 표적 세포를 인식하고 부착하는 단계, 2) 표적 세포를 용해하는 단계, 3) 표적 세포에서 떨어지서 다른 표적 세포에 붙어서 작용을 반복하는 단계로 나누고 있으며(Ulberg and Jondal, 1981; Quan *et al.*, 1982) 이러한 조절 기전을 자세히 규명하고자 단세포 세포 독성 검사(Single cell cytotoxicity)에 의한 표적 세포 결합능(TBC)과 활성 자연살세포를 측정하고(Grimm and Bonavida, 1979; Bradly and Bonavida, 1982) 1981년 Ulberg and Jondal이 위의 측정법과 ^{51}Cr 방출 검사법에 의해 한 개의 자연살세포에 의해서 용해된 표적 세포 수(V_{max})와 재순환능(recycling capacity)을 측정하는 방법을 개발하였다. 따라서 본 실험에서는 기생충성 질환에 있어서 발현되는 숙주의 비특이 세포매개성 면역 반응에 대한 연구의 일환으로 병원성 자유생활 아메바인 *N. fowleri*를 마우스의 비강에 접종하여 자연살세포의 세포 독성에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다. 자연살세포의 세포 독성은 아메바를 마우스에 접종한지 12시간째에 대조군에 비하여 유의하게 증가하기 시작하였으며 아메바 접종 후 1일째에 가장 증가하였으며 그 후 감소하여 *N. fowleri* 접종 후 5일째에는 대조군 보다 감소하는 경향으로 나타났다. 이러한 세포 독성의 조절 기전을 단계적으로 알아보기 위해 실시한 단세포 세포 독성 검사에 의한 표적 세포 결합능은 아메바 접종 후 경과 기간별로 차이를 나타내지 않았으며 대조군에 비해서도 차이를 발견할 수 없었다. 따라서 *N. fowleri*를 마우스에 접종하였을 때 증가하는 자연살세포의 세포 독성은 자연살세포의 표적 세포 결합능의 차이에 기인한 것이 아님을 알 수 있었다. 또한 표적 세포와 결합하여 conjugates를 형성한 세포들 중 표적 세포를 살해한 정도는 자연살세포의 세포 독성이 가장 증가한 *N. fowleri* 접종 후 1일째에 가장 높게 나타났으며 이 결과는 활성 자연살세포의 수가 증가하는 것과도 잘 일치하는 것이다. 따라서 *N. fowleri*의 접종이 자연살세포의 표적 세포 결합능에는 영향을 주지 않으나 활성 자연살세포의 수를 증가시킴을 알 수 있었다. 또한 표적 세포와 결합하여 conjugate를 살해한 정도는 자연살세포의 세포 독성이 가장 증가하였던 아메바 접종 후 1일째에도 50% 미만으로 나타났는데 이것은 표적 세포 결합능과 자연살세포의 독성과의 상관 관계가 $r=0.86$으로 나타났던 Roder 등(1978)의 결과와는 잘 일치하지 않는 것이다. 또한 표적 세포 결합능은 온도에는 영향을 받지 않으며, 면역되지 않는 세포에서 보다 면역되어진 세포에서 더 높게 나타나며(Berke and Gabison, 1975; Grimm and Bonavida, 1977) 에너지를 필요로 하지 않는 반응으로 보고되었으며(Cerottini and Brunner, 1977; Ryser *et al.*, 1977) 자세히 알려지 있지는 않으나 H-2 complex와 연관된 유전자의 조절을 받는 것으로 알려졌다(Kiessling *et al.*, 1975; Petranyi *et al.*, 1976). 따라서 표적 세포와 결합한 세포들을 velocity sedimentation technique 등에 의하여(Grimm and Bonavida, 1977; Ryser *et al.*, 1977) 분리하여 주효 세포들의 표현형을 규정짓고 자연살세포 및 비활성 자연살세포가 차지하는 정도를 조사하는 것이 본 실험에 선행되어져야 할 것으로 생각된다. 또한 한 개의 자연살세포에 의해서 용해되어질 수 있는 최대한의 표적 세포수를 나타내는 V_{max}값과 자연살세포의 세포 독성간의 상관 관계는 $r=0.76$이었으며, 자연살세포의 세포 독성이 증가함에 따라 활성 자연살세포의 수가 증가할 뿐만 아니라($r=0.84$) 재순환능도 증가함을($r=0.62$) 알 수 있었다. 따라서 *N. fowleri* 접종시 발현된 자연살세포의 세포 독성 기작은 표적 세포 결합능과 살해 능력이 분리되어지서 작동함을 알 수 있었다. 본 실험은

*N. fowleri*에 감염되었을 때 발현되는 비특이적 세포 매개성 면역 중 아직 연구된 바 없는 자연살세포의 독성 기작에 관한 실험이라는 것에 의미를 찾을 수 있으며 앞으로 자연살세포의 세포 독성과 혈청내 억제인자, 면역 복합체 및 림프구와 같은 전반적인 면역 기능과 어떻게 관계되고 있는 지를 연구하는 것이 과제로 남아있다 하겠다.

참 고 문 헌

金明俊(1989) *Acanthamoeba culbertsoni* 감염에 있어 세포 매개성 면역에 관한 연구. 연세대 대학원 박사 학위 논문.

黃英南, 閔得映, 蘇鎭璋(1980) 자유생활 아메바(*Acanthamoeba* species)의 숙주에 대한 면역학적 반응. 연세의대 논문집, **13**:393-407.

黃瀚琦, 尹德鎭, 任敬一, 蘇鎭璋(1976) 자유생활 아메바의 병원성에 관한 실험적 연구. 연세의대 논문집, **9**:182-194.

Abo, T. and Balch, C.M. (1981) A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J. Immunol.*, **127**:1024-1031.

Arai, S., Yamamoto, K.I. and Kumagai, K. (1983) Suppressive effect of human natural killer cells on pokeweed mitogen-induced B cell differentiation. *J. Immunol.*, **138**:651-658.

Berke, G. and Gabison, D. (1975) Energy requirements of the binding and lytic steps of T lymphocyte mediated cytolylsis of leukemic cells *in vitro*. *Eur. J. Immunol.*, **5**:671-677.

Bhagwandeen, S.B., Carter, R.F., Abrik, K.G. and Levitt, D. (1975) A case of hartmannellid amoebic meningoencephalitis in Zambia. *Am. J. Clin. Pathol.*, **63**:483-492.

Bloom, B.R. (1982) Natural killers to rescue immune surveillance? *Nature*, **300**:214-222.

Bradley, T.P. and Bonavida, B. (1982) Mechanism of cell mediated cytotoxicity at the single cell level. *J. Immunol.*, **129**:2260-2267.

Burton, R.C. and Winn, H.J. (1981) Studies on natural killer(NK) cells. I. NK cell specific antibodies in CE anti-CBA serum. *J. Immunol.*, **126**:1985-1991.

Carter, R.F. (1968) Primary amoebic meningoencephalitis: Clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J. Porth. Bacteriol.*, **96**:1-25.

Cerottini, J.C. and Brunner, K.T. (1977) Mechanism of T and K cells mediated cytolysis. In Loor, F. & Roelants. G.E.(eds.) B and T cells in immune recognition. Wiley London.

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. Natl. Cancer Inst.*, **50**:347-351.

Clark, I.A. and Allison, A.C. (1974) *Babesia microti* and *Plasmodium berghei yoelii* infections in nude mice. *Nature*, **252**:318-325.

Cursons, R.T.M. and Brown, T.J. (1976) Identification and classification of the aetiological agents of primary meningoencephalitis. *N.I.J. Mar. Freshwater Res.*, **10**:245-262.

Cursons, 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.

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.

Eldridge, A. and Tobin, J. (1967) Ryan virus. *Br. Med. J.*, **1**:299-303.

Esther, S.H., Angela, T.D., Suden, R. and Anna, S.K. (1982) Defective natural cytotoxicity in patients with cancer: Normal number of effector cells but decreased recycling capacity in patients with advanced disease. *J. Immunol.*, **129**:2255-2259.

Ferrante, A. and Thong, Y.H. (1979) Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Int. J. Parasitol.*, **9**:599-601.

Ferrante, A. and Smith, C. (1984) Mitogenicity of *Naegleria fowleri* extracts for murine T lymphocytes. *Immunology*, **51**:461-468.

Fowleri, M. and Carter, R.F. (1965) Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* series: a preliminary report. *Br. Med. J.*, **2**:740-742.

Galli, S., Dvorak, A., Ishizaka, T., Nabel, G., Simonian, H., Canter, H. and Dvorak, H. (1982) A cloned cell with NK function resembles basophils by ultrastructure and expresses IgE receptors. *Nature*, **298**:288-294.

Gatti, G., Cavallo, R., Sartori, M.L., Marinone, C. and Angeli, A. (1986) Cortisol at physiological concentrations and prostaglandin E_2 are additive inhibitor of human natural killer cell activity. *Immunopharmacology*, **11**:119-127.

Gidlund, M., Orn, A., Wigzell, H., Senik, A. and

Gresser, I. (1978) Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature*, **273**:759-768.

Glimcher, L., Shen, F.W. and Cantor, H. (1977) Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell. *J. Exp. Med.*, **145**:17.

Grimm, E.A. and Bonavida, B. (1977) Studies on the induced and expression of T cell mediated immunity. IV. Heterogeneity of lytic efficiency exhibited by isolated cytotoxic T lymphocytes prepared from highly enriched populations of effect-target conjugates. *J. Immunol.*, **119**:1041-1047.

Grimm, E.A. and Bonavida, B. (1979) Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. I. Estimation of cytotoxic T lymphocyte frequency and relative lytic efficiency. *J. Immunol.*, **123**: 2861-2868.

Hatcher, F.M. and Kuhn, R.E. (1981) Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science*, **218**:295-296.

Henkart, M.P. and Henkart, P.A. (1982) Lymphocyte mediated cytolysis as a secretory process. In: Mechanism in cell mediated cytotoxicity. E. Clark and P. Goldstein, Eds., Plenum Press, New York, p. 227.

Herberman, R.B., Nunn, M.E. and Lavrin, D.H. (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer*, **16**:216-222.

Herberman, R.B. and Holden, H.T. (1978) Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.*, **27**: 305-312.

Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R. (1981) Natural killer cells: Their role in defences against disease. *Science*, **214**:24-30.

Herberman, R.B. (1985) Mechanism of cytotoxicity by natural killer cells. R.B. Herberman ed. Academic Press, Inc., pp. 1-2.

Henney, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E. and Gillis, S. (1981) Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, **291**:335-339.

Hiserodt, J.C., Britvan, L.J. and Targan, S.R. (1982a) Characterization of the cytolytic reaction mechanism of the human natural killer lymphocytes: Resolution into binding, programming, and killer cell-independent steps. *J. Immunol.*, **135**:1782-1786.

Hiserodt, J.C., Britvan, L.J. and Targan, S.R. (1982b) Differential effects of various pharmacologic agents on the cytolytic reaction mechanism of the human natural killer lymphocyte: Further resolution of programming for lysis and KCIL into discrete stages. *J. Immunol.*, **136**:2272-2278.

Holbrook, N.J., Cox, W.I. and Horner, H.C. (1983) Direct suppression of natural killer activity in human peripheral blood leukocyte cultures by glucocorticoids and its modulation by interferon. *Cancer Res.*, **43**:4019-4025.

Jondal, M. and Pross, H. (1975) Surface markers on human B and T lymphocytes. VI. Cytotoxicity against cell lines as a functional marker for lymphocyte subpopulations. *Int. J. Cancer*, **15**: 596-602.

Jones, D. and Robinson, N. (1975) Isolation, identification and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **24**:784-790.

Kasia, M., Leclerc, J.C., Mavay-Boudreau, L., Shen, T.W. and Cantor, H. (1979) Direct evidence that natural killer cells in nonimmune spleen cell population prevent tumor growth *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **149**:1260-1267.

Kenny, M. (1971) The micro-Kolmer complement fixtion test in routine screening for soil amoeba infection. *Health Lab. Sci.*, **8**:5-10.

Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H. (1975) "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, **5**:112-118.

Kingston, D. and Warhust, D.C. (1969) Isolation of amoeba from the air. *J. Med. Microbiol.*, **2**: 27-36.

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.

Lang, N.P., Ortaldo, J.R., Bonnard, G.D. and Herberman, R.B. (1982) Interferon and prostaglandins: Effects on human natural and lectin-induced cytotoxicity. *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**:339-347.

Lopez, C. (1975) Genetics of natural resistance to herpes virus infections in mice. *Nature*, **258**:152-158.

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.

Negington, J., Watson, P.G., Playfair, J.J., McGill, J., Jones, B.R. and McSteel, A.D. (1974) Amoeba infection of the eye. *Lancet*, ii:1537-1540.

Omsrud, M. and Torsby, E. (1981) Influence of *in vivo* hydrocortison on some human blood lymphocyte populations. *Scand. J. Immunol.*, **13**:573-577.

Ortaldo, J.R. (1982) Natural killer cells; a separate lineage? In NK cells and other natural effector cells. Herberman RB, ed. Academic Press, New York, p. 265.

Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B. (1984) Heterogeneity of natural killer cells. *Ann. Rev. Immunol.*, 2:355-359.

Petranyi, G., Kiessling, R., Povey, S., Klein, G., Herzenberg, L. and Wigzell, H. (1976) The genetic control of natural killer cell activity and its association with *in vivo* resistance against a Moloney lymphoma isograft. *Immunogenetics*, 3: 15-22.

Quan, P.C., Ishizaka, T. and Bloom, B.R. (1982) Studies on the mechanism of NK cell lysis. *J. Immunol.*, **128**:1786-1792.

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 *Hartmanella* amoeba infecting fresh water mollusks. *J. Protozool.*, **15**:651-656.

Roder, J.C., Kiessling, R., Biberfeld, P. and Anderson, B. (1978) Target-effector interaction in the natural killer(NK) cell system. II. The isolation of NK cells and studies on the mechanism of killing. *J. Immunol.*, **121**:2509-2516.

Rowan-Kelly, B., Ferrante, A. and Thong, Y.H. (1980) Activation of complement by *Naegleria*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**:333-356.

Rumpold, H., Kraft, D., Obexer, G., Bock, G. and Gebhart, W. (1982) A monoclonal antibody against a surface antigen shared by human large granular lymphocytes and granulocytes. *J. Immunol.*, **129**: 1458-1464.

Ryser, JE., Sordat, B., Cerottini, J.C. and Brunner, K.T. (1977) Mechanism of target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. I. Characterization of specific lymphocyte and target cell conjugates separated by velocity sedimentation. *Eur. J. Immunol.*, **7**:110-115.

Schmoller, H. (1964) Beschreibung einiger Kultramoben mariner Herkunft. *J. Protozool.*, **11**:497-502.

Talmadge, J.E., Meyers, D.P. and Starkey, J.R. (1980) Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. *Nature*, **284**:622-628.

Timonen, T., Reynolds, C.W., Ortaldo, J.R. and herberman, R.B. (1982) Isolation of human and rat natural killer cells. *J. Immunol. Method*, **51**: 269-274.

Thong, Y.H., Ferrante, A., Rowen-kelly, B. and Ckeefe, D.E. (1979) Immunization with culture supernatant in experimental amoebic meningoencephalitis. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.*, **73**: 684:685.

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.

Ulberg, M. and Jondal, M. (1981) Recycling and target binding capacity of humand natural killer cells. *J. Exp. Med.*, **153**:615-628.

Warner, J.E. and Donnert G. (1982) Effects of a cloned cell line with NK activity on bone marrow transplants, tumor development and metastasis *in vivo*. *Nature*, **300**:31-36.

Willaert, E. (1975) Recherches immuno-taxonomiques comparees sur les amibes du groupe "Limax". Acad. R. Sc. Outre-Mer Mem. *Class Sc. Nat. Med.*

Wright, S.C. and Bonavida, B. (1981) Selective lysis of NK-sensitive target cells by soluble mediator released from murine spleen cells and human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, **125**: 1561-1567.

Wright, S.C., Milber, S.M., Kahle, R., Granger, G.A. and Bonavida, B. (1983) Studies on the mechanism of natural killer cytotoxic factors (NKCF) selectively cytotoxic to NK-sensitive target cells. *J. Immunol.*, **130**:2479-2485.

Wright, S.C. and Bonavida, B. (1986) Evidence for the involvement of proteolytic enzymes in the production of natural killer cytotoxic factors. In: Natural Killer Activity and its Regulation. T. Hashimo, ed. Excerpta Medica, Amsterdam, p. 145.

Young, J.D., Podack, E.R. and Cohn, Z.A. (1986) Properties of a purified pore-forming protein (perforin-1) isolated from H-2 restricted cytotoxic T cell granules. *J. Exp. Med.*, **164**:144-148.

Zarling, J.M. and Kung, P.C. (1980) Monoclonal

antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, 288: 394-396.

=Abstract=

Natural killer cell activity in *Naegleria fowleri* infected mice

Kyu-Rae Lee, Chu-Og Shin and Kyung-il Im

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

The natural killer (NK) cell activity of splenocytes and recycling capacity of NK cells were observed by combining the ^{51}Cr-release cytotoxicity assay and single cell cytotoxicity assay against YAC-1.

The ICR mice were infected intranasally with *Naegleria fowleri*, that is a pathogenic free-living amoeba. The mice infected with 1×10^5 trophozoites showed mortality rate of 76.7% and mean survival time of 12.9 days.

The cytotoxic activity of NK cells in infected mice was significantly higher than that of non-infected mice during the period between 12 hours and day 3 after infection, and highest on day 1. The target-binding capacity of NK cells in infected mice was not different from that of non-infected ones. Maximal killing potential and maximal recycling capacity were remarkably increased in infected mice as compared with the control.

The results obtained in this observation indicated that elevated NK cell activity in mice infected with *N. fowleri* was not due to target-binding capacity of NK cells but due to the increased activity of NK cells and increased recycling capacity of individual NK cells.

〔Korean J. Parasit., 29(3):267-277, September, 1991〕