

# *Acanthamoeba culbertsoni* 감염에 있어 자연살세포의 활성화\*

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

玄東根 · 慎珠沃 · 任敬一

요 약 : 원발성 아메바성 수막뇌염을 일으키는 병원성이 강한 자유생활 아메바인 *Acanthamoeba culbertsoni*의 영양형을 C3H/HeJ 마우스에  $1 \times 10^4$ 과  $1 \times 10^5$ 마리씩을 각각 감염시킨 후 12시간, 1일, 2일, 5일, 10일 째에 감염 마우스를 희생하여 비장 세포의 부유액을 만들어 YAC-1 표적세포에 대한 세포독성을  $^{51}\text{Cr}$  방출 검사법으로 측정하였고 단세포 독성 검사법으로 표적세포 결합능, 활성화 자연살세포, 더 나아가 최대 자연살세포 살해능 및 최대 재순환능을 측정하였다. 감염 마우스의 사망률은 아메바 영양형  $1 \times 10^4$ 마리를 감염시켰을 때 34%이었으며  $1 \times 10^5$ 을 감염시켰을 때는 65%이었다. 또한 접종 후 20일까지 사망한 마우스의 평균 생존 기간은 각각  $16.40 \pm 3.50$ ,  $13.20 \pm 4.09$ 일이었다. 자연살세포의 세포독성은 두 실험군 모두에서 아메바 접종 후 12시간 째에 대조군에 비하여 유의하게 증가하기 시작하여 접종 후 1일 째 가장 높았다. 2일 후에는 대조군과 비슷한 수준을 보였고 접종 후 10일 째에는 대조군에 비해 저하되었으며, 두 실험군 간에 차이는 발견할 수 없었다. 아메바 영양형  $1 \times 10^5$ 마리를 감염시킨 군에서 표적세포 결합능은 접종 후 12시간, 1일 째에 유의하게 증가하였고 활성화 자연살세포도 비슷한 경향으로 증가하였으나 재순환능은 감염 경과 시간 별로 대조군과 비교하여 차이를 발견할 수 없었다. 이상의 결과를 종합하면 *A. culbertsoni* 감염에 의해 비장세포의 자연살세포 독성이 증가하였는데, 이는 자연살세포의 표적세포 결합능과 활성화 자연살세포수의 증가와 유의한 상관관계가 있고( $p < 0.05$ ) 자연살세포의 재순환능과는 무관한 것으로 나타났다.

**Key words:** Natural killer cell, C3H/HeJ mouse, single cell cytotoxicity, *Acanthamoeba culbertsoni*

## 서론

병원성 자유생활 아메바인 *Acanthamoeba culbertsoni*는 자연 환경에 널리 존재하며 인체에 감염되어 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amebic meningoencephalitis)을 일으키는 것으로 보고되어 있다(Derrick, 1948; Carter, 1970). 이들 자유생활 아메바 중 강한 병원성을 지닌 것으로는 *A. culbertsoni* 외에도 *Naegleria* sp.를 들 수 있으며(Martinez *et al.*, 1973), 이들 자유생활 아메바는 인체의 뇌에 급성으로 감염되며(Kenny, 1971), 비인두(Eldridge and Tobin, 1967)와 눈(Nagington *et al.*, 1974)으로부터 분리되고 있다.

우리 나라에서는 아직 임상보고 예가 없으나 세계 여러 곳에서 이들 자유생활 아메바에 의한 인체 감염예가 140여 정도 보고되었으며(Lallinger *et al.*, 1987) 자연 환경 여러 곳에서 병원성 또는 비병원성 아메바들

이 검출 보고되고 있다(Carter, 1968; Richards, 1968). 우리 나라에서 黃濤瑞 등(1976)과 黃英南 등(1980)이 *Naegleria* sp.를 서울 시내 청계천에서, *Acanthamoeba* sp.인 YM-2주와 YM-3주를 저수지에서 각각 분리하고 병원성을 인정한 바 있다. 이러한 원종의 감염은 주로 수영하는 동안 비강을 통해 인체에 들어와 후결막과 사상판을 뚫고 후신경을 타고 중추 신경계를 침범하여 괴사성 출혈성 수막뇌염을 일으킨다고 보고되었다(Martinez *et al.*, 1973). 마우스 비강 내로 *A. culbertsoni*를 감염시킬 경우 인체 내에서의와 같은 원발성 아메바성 수막뇌염을 유발하는 것으로 밝혀진 후(Martinez *et al.*, 1973) 마우스를 모델로 많은 연구가 진행되어 왔는데, 아메바성 수막뇌염 발생시 발견되는 숙주의 체액성 면역반응(Ferrante and Thong, 1979; Curson *et al.*, 1980; Rowan-kelly *et al.*, 1980) 뿐만 아니라 세포 매개성 면역 반응에 대해서도 그 연구가 진행되고 있다(Curson *et al.*, 1980; Ferrante and Smith, 1984).

자연살(natural killer; NK)세포는 1970년대 중반 종양세포에 대한 세포 매개 독성 연구 중(Herberman *et al.*, 1975) 발견된 이후 활발한 연구 대상이 되었고

\* 위 논문은 1992년도 연세의대 조교 연구비로 일부 수행 되었음.

생체에서 자연살세포의 특성이 규명되기 시작하면서 다양한 생물학적 기능에 연관되어 있음이 밝혀지고 있다. 특히 이들은 중요 조직적합항원(major histocompatibility antigens)에 제한됨이 없이 바이러스에 감염된 세포 혹은 종양세포 등을 살해할 수 있는 능력이 있으며(Bloom, 1982; Herberman, 1985), 암세포 증식의 자연적 억제 및 미생물이나 기생충 감염에 대한 저항의에도 급성 조직 이식 거부반응(acute graft rejection), 신형성(neoplasia)과 전이(metastasis) 저지에 중요한 조절 역할을 한다(Talmadge *et al.*, 1980; Bloom, 1982). 이외에도 erythroid와 myeloid와 같은 조혈세포 및 림프구의 성장 및 분화에도 조절 기능을 갖는 것으로 알려지고 있다(O'Brien *et al.*, 1983). 또한 다양한 면역 반응, 즉 Interferon(IFN), Interleukin-2(IL-2), B cell growth factor(BCGF), colony stimulating factor(CSF)와 같은 lymphokine의 생성(Kasahara *et al.*, 1983), B 림프구에 항원을 제시하는 기능(Gary *et al.*, 1982) 등을 가지고 있어 숙주의 면역 기능 및 감시 기전에 중요한 역할을 하며(Warner *et al.*, 1982), 생물학적 체제 내에서 항상성(homeostasis) 유지에 필요한 기본적인 기능을 나타내는 것으로 알려지고 있다.

이들 자연살세포에 대한 연구가 계속되어 오고 있지만 그 작용 기작에 대해서는 부분적으로만 알려져 있다. 이러한 자연살세포의 반응에 관여하는 조절 기전을 보다 자세히 규명하기 위해서는 세포독성 반응이 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 매개체(mediator)를 분비한다는 자극분비(stimulation-secretion)설을 제안한 이후 최근에는 몇몇 증거들을 기초로 자연살세포와 자연살세포감수성 표적세포 사이의 작용에 대해 몇가지 단계, 즉 1) 표적세포를 인식하고 부착하는 단계, 2) 표적세포를 용해하는 단계, 3) 표적세포에서 떨어진 후 다른 세포에 붙어서 작용을 반복하는 단계로 나누고 있다(Ulberg and Jondal, 1981; Roder *et al.*, 1982; Duke *et al.*, 1983).

Grimm and Bonavida(1979)는 agarose를 이용한 단세포 세포독성 검사(single cell cytotoxicity)에 의해 표적세포 결합능(target binding capacity: TBC)과 활성 자연살(active NK)세포를 측정함으로써 자연살세포의 세포독성 기전을 연구하였다(Bradley and Bonavida, 1982). 또한 1981년 Ulberg and Jondal은 위의 측정법과  $^{51}\text{Cr}$  방출 검사법을 조합하여 한개의 자연살세포에 의해서 최대로 용해할 수 있는 표적세포수  $V_{\text{max}}$ 와 최대 재순환능(maximal recycling capacity: MRC)를 측정하여 자연살세포의 세포독성 기전을 연구하였다.

이러한 자연살세포의 세포독성이 원충인 *Toxoplasma*

*sp.*, *Trypanosoma sp.*, *Babesia sp.* 및 *Plasmodium sp.* 감염시에도 자연살세포의 세포독성이 관여되는 것으로 보고되어 왔다(Clark and Allison, 1974; Trischman *et al.*, 1978; Hatcher and Kuhn, 1981 a & b; Hauser *et al.*, 1982).

본 실험에서는 기생충성 감염증에 있어서 발현되는 자연살세포의 세포독성을 알아보고자 사망률에 차이가 있도록 *A. culbertsoni* 영양형을 마우스에 감염시켜, 표적세포 결합능(TBC)과 활성 자연살(active NK)세포 및 최대 재순환능(MRC)을 측정함으로써 그 작용 단계마다의 세포독성 활성도를 측정하여 *A. culbertsoni* 감염 때 발현되는 자연살세포의 세포독성을 관찰하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. *A. culbertsoni*의 배양

Dr. Jardin(Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Belgium)으로부터 분양받은 *A. culbertsoni*를 37°C 5% CO<sub>2</sub> 흡습 항온기(NAPCO, Portland, Oregon)에서 CGV(Casiton-Glucose-Vitamine)배지를 사용, 무균적으로 계대 배양하여 사용하였다. CGV 배지의 조성은 다음과 같다.

CGV medium	
Bactocastone	20 g
NaCl	5 g
Folic acid	2 mg
Biotin	20 mg
Glucose	1 g
Penicillin	500,000 unit
Streptomycin	50,000 µg
Distilled water	1,000 ml

#### 2. 실험동물

생후 6~8주 된 음성 C3H/HeJ 마우스를 한국 과학 기술원 생물학 검정실에서 공급받아 사용하였다.

#### 3. *A. culbertsoni*의 접종

마우스 체중 g 당 secobarbital 0.06 mg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후 *A. culbertsoni* 영양형  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ 마리씩을 각각 5 µl 생리 식염수에 함유되도록 한 후 마우스의 오른쪽 비강에 떨어뜨려 접종하였다. 실험대조군은 실험군과 같은 방법으로 마취시키고 생리 식염수를 비강 내로 떨어뜨려 접종하였다. 아메바 접종 후 20일까지 사망률과 생존기간을 관찰하였고, 마우스가 사망하였거나 사망 직전에 뇌조직의 일부를 떼어내어 배지에 넣어 배양하여 아메바 영양형의 존재 여부 및 병리학적 조직변화를 관찰하였다.

#### 4. 실험군의 설정

*A. culbertsoni*의 영양형  $1 \times 10^4$ 과,  $1 \times 10^5$ 마리씩을

각각 마우스에 접종한 후 12시간, 1일, 2일, 5일, 10일  
째에 비장을 적출하여 그 비장세포를 사용하여 자연살  
세포의 세포 독성을 측정하였다. 실험군에 있어서 실  
험동물은 각각 6마리 이상 사용하였다. 각 실험군은  
항상 대조군과 함께 실행하였다.

5. 비장세포의 자연살세포 독성의 측정

가. 표적세포 : 자연살세포에 의한 세포독성을 측정하  
기 위한 표적세포로는 YAC-1(A/Sn mouse lymphoma;  
Cikes *et al.*, 1973) 세포를 사용했다. 세포 배양을 위  
한 배지는 10% 우태아 혈청, L-glutamine(2 mM/ml),  
penicillin(100 units/ml) 및 streptomycin(100 µg/ml),  
10 mM HEPES를 함유시킨 RPMI 1640 배지(이하  
RPMI 완전 배지로 약함)를 사용하여 체내 배양하였다.

나. 주요세포 : 마우스를 각각 시간별로 희생시켜 무  
균적으로 비장을 채취한 후, RPMI 완전 배지를 사용  
하여 단세포 부유액을 만들었다. 여기에 0.16 M Tris-  
NH<sub>4</sub>Cl(pH 7.2)를 넣어 적혈구를 용혈시키고 이를 다  
시 RPMI 완전 배지에 부유시킨 다음 60 mm×15 mm  
의 plastic petri dish(Costar, Cambridge, M.A.)에 넣  
어 37°C 5% CO<sub>2</sub> 흡습 항온기에서 1시간 배양한 후  
가볍게 흔들어 부유되어 있는 비부착성 세포단을 채취  
하여 사용하였다.

다. 자연살세포 독성 검사 : 자연살세포의 세포독성  
은 4시간 <sup>51</sup>Cr 방출 방법으로 수행하였다(Ulberg and  
Jondal, 1981). YAC-1 세포 1×10<sup>7</sup> cells/0.2 ml에 100  
µCi Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>(1 mCi/ml, NEZ-0305, New England  
Nuclear, Boston, M.A.)을 넣고 37°C 항온조에서 1시  
간 표지화시켰다. 그 후 2회 세척하여 <sup>51</sup>Cr이 표지된  
세포를 microplate 각 well당(Costar, round bottom  
96 wells, Cambridge, M.A.) 1×10<sup>4</sup> cells/0.1 ml 되  
게 넣고 주요세포 : 표적세포의 비율(E : T ratio)을  
100 : 1이 되도록 주요세포를 10<sup>6</sup> cells/0.1 ml 넣어 37°C  
5% CO<sub>2</sub> 흡습 항온기에서 4시간 배양하였다. 이때 최  
대 방출을 유발시키기 위해 1 N NaOH를 가하였고 자  
연 방출을 측정하기 위해서는 <sup>51</sup>Cr이 표지된 표적세포  
만을 배양하였다. 배양 후 100 µl의 상층액을 수거하여  
gamma counter(Packard, Downers Grove, I.L.)로 방  
사능을 측정하였으며 자연살세포 독성은 다음 공식에  
의하여 계산하였다.

% Cytotoxicity

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

라. 단세포 세포독성 검사 : 단세포 세포독성 검사는  
Grimm and Bonavida(1979)와 Bradley and Bonavida  
(1982)의 방법을 따랐다. 요약하면 2×10<sup>5</sup>개의 주요세  
포와 표적세포를 15 ml conical tube에 넣고 RPMI 완  
전 배지로 총 용량이 0.2 ml가 되게 잘 섞은 후 실온  
에서 500 g로 2분간 원심하였다. 그 후 37°C에서 15분  
간 5% CO<sub>2</sub> 흡습 항온기에 방치한 후 100 µl micropi-  
pette로 진탕시킨 다음에 42°C로 유지시킨 0.5%

agarose-RPMI 완전배지 0.5 ml을 조심스럽게 첨가시  
켰다. Agarose-세포 혼합액을 plastic petri dish(60  
mm×15 mm, Costar, Cambridge, M.A.)에 잘 쏟아  
붓고, 이 agarose-세포 혼합액이 굳은 후, 약 5~6 ml  
의 RPMI 완전 배지를 첨가 하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> 흡습  
항온기에서 약 3시간 동안 배양하였다. 그 후 0.1%  
tryphan blue로 5분간 염색하였다. 그 후 냉 인산 완  
충액(pH 7.4)으로 3번 세척한 다음 1% formaldehyde  
로 고정하였다. 표적세포 결합능의 계산은 현미경 하  
(×100)에 관찰된 250개의 림프구 중에 표적세포와 결  
합한 림프구의 수를 백분율로 환산하였으며, 주요세  
포와 결합한 후 죽은 표적세포의 비율은 50개의 결합  
세포 중 표적세포가 청색으로 염색된 죽은 세포의 수를  
백분율로 나타내었다. 주요세포를 넣지 않고 표적세포  
만을 넣었을 때 죽는 표적세포의 비율을 구하여 back-  
ground death로 계산하였다. 활성 자연살세포의 백분  
율(%)은 agarose에서 단세포 세포독성검사가 끝난 후  
각 실험마다 다음의 공식에 의해 계산하였다.

$$\% \text{ active NK cells} = \% \text{ TBC} \times A - (A \times B)$$

여기서 % TBC는 표적세포와 결합한 림프구의 백분  
율, A는 표적세포가 죽은 conjugates의 백분율, B는  
표적세포의 background death의 백분율이다.

마. 최대 재순환능(Maximal recycling capacity:  
MRC) 검사 : 주요세포들의 최대 독성능(Vmax)과 최  
대 재순환능은 <sup>51</sup>Cr 방출 검사법과 단세포 세포독성  
검사를 혼합하여 계산한 Ulberg and Jondal(1981)의  
방법을 따랐다. 요약하면, 1×10<sup>5</sup> cells/0.1 ml 비부착  
성 주요세포에 <sup>51</sup>Cr이 표지된 표적세포를 5번 배수 희  
석(1×10<sup>5</sup>/0.1 ml 세포에서 0.625×10<sup>4</sup>/0.1 ml 세포까  
지)하여 넣어준 후 round bottom microplate(Costar,  
96 wells, Cambridge, M.A.)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 흡  
습 항온기에서 3시간 배양하였다. 배양 후 100 µl의 상  
층액을 각 well에서 수거하여 희석된 표적세포의 <sup>51</sup>Cr  
방출량을 측정하였다. <sup>51</sup>Cr 방출 검사법에 의한 dose-  
response curve의 결과는 Michaelis-Menten kinetics  
와 일치한다. 이것은

$$V = \frac{V_{\text{max}} \times T}{K_m + T} \text{로 나타낼 수 있는데}$$

여기서 V는 죽은 표적세포의 수이고 T는 최초에  
넣어준 표적세포의 수이다. Vmax는 표적세포를 최대  
한 넣어 주었을 때 얻어지는 죽은 표적세포의 수이다.  
Km은 Vmax치의 절반을 나타내는 표적세포의 수이다.  
여러가지 다른 비율의 E : T ratio의 Vmax치와 Km치  
는 Line Weaver-Burk equation을 사용해서 결정할 수  
있는데 그 공식은 다음과 같다.

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

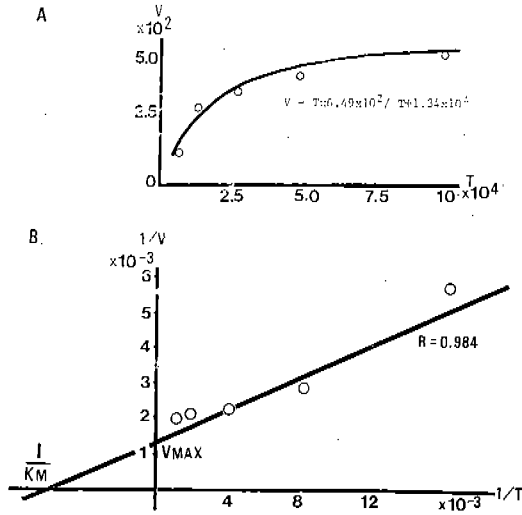
이 식에서 1/V와 1/T은 직선적인 관계(linear rela-  
tionship)를 갖는다. 즉, V와 T의 역수치를 점으로  
나타내고 least squares linear regression analysis를

**Table 1.** An experiment showing data used for calculation of Vmax and Km\*

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 <sup>5</sup>	1×10 <sup>5</sup>	0.54	5.40×10 <sup>2</sup>	1×10 <sup>-5</sup>	1.85×10 <sup>-3</sup>
2	1×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>4</sup>	0.97	4.85×10 <sup>2</sup>	2×10 <sup>-5</sup>	2.06×10 <sup>-3</sup>
3	1×10 <sup>5</sup>	2.5×10 <sup>4</sup>	1.69	4.23×10 <sup>2</sup>	4×10 <sup>-5</sup>	2.36×10 <sup>-3</sup>
4	1×10 <sup>5</sup>	1.25×10 <sup>4</sup>	2.71	3.39×10 <sup>2</sup>	8×10 <sup>-5</sup>	2.95×10 <sup>-3</sup>
5	1×10 <sup>5</sup>	0.625×10 <sup>4</sup>	2.86	1.79×10 <sup>2</sup>	1.6×10 <sup>-5</sup>	5.59×10 <sup>-3</sup>

\* Least squares regression analysis gives Y=a+bX.

r=0.984, a=1.44×10<sup>-3</sup>, b=24.62, Vmax=1/a=694.44, Km=b/a=1.71×10<sup>4</sup>



**Fig. 1.** An example of figures showing Vmax and Km values. (A) Data from Table 1 are used to exemplify the calculation of Vmax. 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. (B) A Line Weaver-Burk plot is used to calculate Vmax and Km. 1/T=X plotted against 1/V=Y. Data are taken from Table 1 and Fig. 1(A). Regression analysis is used to obtain a straight line(r=0.984). Vmax equals the reciprocal of the Y intercept and Km equals the negative reciprocal of the X intercept.

사용하여 직선을 얻는다. Vmax는 Y축을 가로질러 지나가는 값(Y절편)의 역수로부터, Km은 X축을 가로질러 지나가는 값(X절편)의 마이너스 역수치(negative reciprocal value)로부터 구할 수 있다. Table 1과 Fig. 1에서 위에 서술한 대로 Vmax와 Km 값을 계산하는 한 예를 들었다. 최대 계순환능은 하나의 활성 자연살세포가 배양하는 시간 동안 죽일 수 있는 최대 한의 표적세포의 수를 가리킨다. 즉, 표적세포를 포화 상태로 만들었을 때 lytic assay에서 얻을 수 있는 이론적인 수치를 나타낸다. 최대 계순환능(MRC)은 이와 같이 하여 측정된 Vmax값을 Vmax값 검사에서 사용한 주효세포의 수와 활성 자연살세포를 곱한 값으로 나누어서 얻을 수 있었다.

MRC=Vmax/percent of active NK cells × number of effector cell in Vmax assay

### 6. 마우스 뇌조직의 병리학적 검사

*A. culbertsoni*를 마우스 비강을 통하여 접종시킨 후 사망하였거나 사망 직전의 쥐들을 부검하여 뇌조직의 일부를 떼내어 일부는 CGV 배지에 넣어 배양하였고 일부는 hematoxylin-eosin 염색을 하여 조직의 병리학적 변화를 관찰하였고 동시에 *A. culbertsoni* 영양형의 존재 여부를 확인하였다.

### 실험 성적

#### 1. 감염 마우스의 사망률

*A. culbertsoni*의 영양형 1×10<sup>4</sup>마리를 접종시킨 실험군에서 마우스가 10일부터 사망하기 시작하여 20일

**Table 2.** Cumulative death of mice inoculated intranasally with *A. culbertsoni*

No. trophozoites inoculated	No. of mice	Cumulative number of death of mice at days:																Mortality rate(%)	Survival time(days; mean±SEM)
		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20				
1 × 10 <sup>4</sup>	29	0	0	0	1	1	1	2	3	3	4	5	5	5	5		34	16.40±3.50	
1 × 10 <sup>5</sup>	29	1	2	4	6	8	10	11	12	13	14	15	16	18	19		65	13.20±4.09	
Control	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	—	

후까지 29마리 중 9마리(34.0%)가 사망하였으며,  $1 \times 10^5$ 마리의 아메바 영양형으로 접종시킨 실험군에서는 접종 후 7일부터 사망하기 시작하여 29마리 중 19마리(65%)가 사망하였다. 마우스의 감염에서 사망시까지 생존기간은 각각  $16.40 \pm 3.50$ 일과  $13.20 \pm 4.09$ 일로 차이가 있었다( $p < 0.05$ ) (Table 2).

2. 병리학적 소견

*A. culbertsoni*에 감염된 마우스의 뇌조직에는 급성 염증세포의 침윤이 있었고 염증세포 사이에 많은 아메바 영양형이 관찰되었으며 핵이 뚜렷하였고 세포질에서 많은 공포(vacuole)를 관찰할 수 있었다.

3. 자연살세포의 활성도

가. 비장세포의 자연살세포 특성: *A. culbertsoni* 영양형  $1 \times 10^4$ 마리 및  $1 \times 10^5$ 마리를 마우스에 접종한 후 시간 경과별로 자연살세포의 세포독성을 측정하였다. 대조군에서의 세포독성은  $2.24 \pm 0.16\%$ 이었으며, 영양형  $1 \times 10^4$ 마리를 접종시킨 실험군에서 12시간과 1일째의 세포독성은 각각  $3.75 \pm 0.21\%$ 과  $4.76 \pm 0.42\%$ 로 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 2일, 5일 및 10일째의 세포독성은 각각  $2.51 \pm 0.45\%$ 와  $2.14 \pm 0.30\%$  및  $1.93 \pm 0.35\%$ 로서 대조군과 비슷한 수준이었다. 영양형  $1 \times 10^5$ 마리를 접종시킨 실험군에서의 세포독성은 12시간째  $3.65 \pm 0.43\%$ 로 대조군과 비교하여 유의하게 차이가 있었으며( $p < 0.05$ ), 1일째에 자연살세포의 세포독성은  $5.47 \pm 0.50\%$ 로 가장 높은 활성도를 보였다( $p < 0.05$ ). 2일부터 5일까지는 각각  $2.42 \pm 0.32$ ,  $2.69 \pm 0.32\%$ 로 대조군과 비슷한 수준을 보였고 10일째에는  $1.32 \pm 0.38\%$ 로 대조군보다 유의하게 낮은 세포독성을 나타냈다( $p < 0.05$ ). 또한 두 실험군 간에는 시간 경과에 따른 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 2, Table 3).

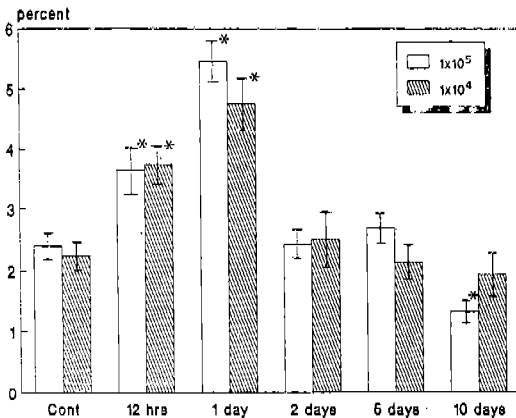


Fig. 2. Natural killer cell cytotoxic activity against YAC-1 target cells in mice infected with  $1 \times 10^5$  (□),  $1 \times 10^4$  (▨) *A. culbertsoni* trophozoites.  
\*  $p < 0.05$  versus control

Table 3. Natural killer cell cytotoxic activity\*\* against YAC-1 target cells in mice infected with *A. culbertsoni*

Time after inoculation	Cytotoxicity (%)*** by inoculated trophozoites	
	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
12 hrs	$3.75 \pm 0.21^*$	$3.65 \pm 0.43^*$
1 day	$4.76 \pm 0.42^*$	$5.47 \pm 0.50^*$
2 day	$2.51 \pm 0.45$	$2.42 \pm 0.32$
5 days	$2.14 \pm 0.30$	$2.69 \pm 0.32$
10 days	$1.93 \pm 0.35$	$1.32 \pm 0.38^*$
Control	$2.24 \pm 0.16$	$2.40 \pm 0.10$

\*  $p < 0.05$  versus control

\*\* Ratio of effector cells to target cells; 100 : 1.

\*\*\* Mean ± SEM

나. 표적세포 결합능(TBC)과 활성 자연살(active NK) 세포 결합: 영양형  $1 \times 10^5$ 마리를 접종시킨 실험군에서 단세포 세포독성 검사를 시행한 결과 표적세포 결합능은 대조군에서  $27.17 \pm 1.93\%$ , 아메바 접종 후 12시간째에  $31.94 \pm 1.21\%$ , 1일째에  $37.96 \pm 3.21$ 로 대조군과 비교하여 유의하게 높게 나타났으며( $p < 0.05$ ), 2일과 5일째에는 각각  $28.26 \pm 2.09\%$ 와  $28.27 \pm 0.80\%$ 로 대조군과 비슷한 수준을 보였고 10일째에는  $19.60 \pm 19.04\%$ 로 대조군과 비교하여 유의하게 낮게 나타났으며( $p < 0.05$ ) (Fig. 3, Table 4). Agarose petri dish에서 3시간 동안 배양하였을 때 나타난 활성 자연살세포는 대조군에서  $5.44 \pm 0.26\%$ 였으며 12시간째  $10.96 \pm 0.57\%$ 와 1일째에  $13.23 \pm 1.06\%$ 으로 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 2일째

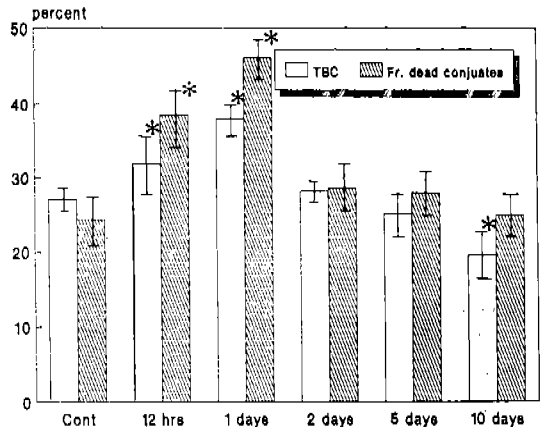


Fig. 3. Single cell cytotoxic activity against YAC-1 target cells in mice infected with  $1 \times 10^5$  *A. culbertsoni* trophozoites.  
□ TBC      ▨ dead conjugate  
\*  $p < 0.05$  versus control

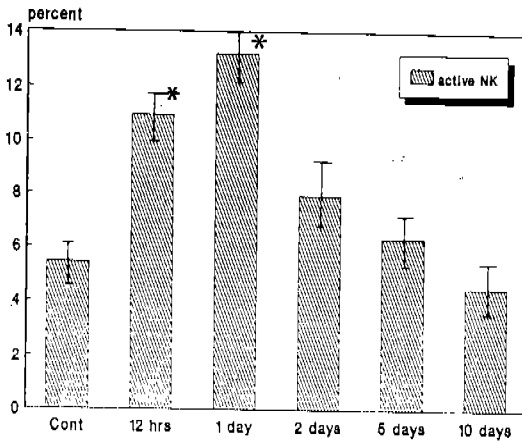
**Table 4.** Single cell cytotoxicity assay\*\*\* of natural killer cell, TBC, fraction of dead conjugates and estimation of active NK cells\*\*

Time after inoculation	TBC (%)	Fraction of dead conjugates(%)	Background death(%)	Active NK cells(%)
12 hrs	31.94±1.21*	38.52±3.59*	1.20±0.19	10.96±0.57*
1 day	37.96±3.21*	46.31±3.05*	0.78±0.43	13.23±1.06*
2 days	28.26±2.09	28.73±2.73	0.54±0.08	7.96±0.76
5 days	28.27±0.80	28.12±0.85	2.02±0.51	7.35±0.42
10 days	19.60±1.04*	25.06±2.41	1.54±0.25	4.53±0.44
Control	27.17±1.93	24.50±1.87	0.96±0.12	5.44±0.26

\* p<0.05 versus control

\*\* Ratio of effector cells to target cells in single cell cytotoxicity is 1 : 1

\*\*\* Mean±SEM



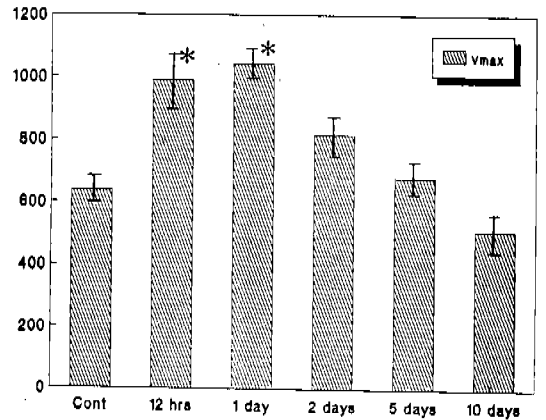
**Fig. 4.** Active NK against YAC-1 target cells in mice infected with  $1 \times 10^5$  *A. culbertsoni* trophozoites.

\* p<0.05 versus control

및 5일 째에는 각각  $7.96 \pm 0.76$ ,  $7.35 \pm 0.42\%$ 로 대조군 수준으로 감소하는 경향을 보였으며, 10일 째에는  $4.53 \pm 0.44\%$ 로 대조군의  $5.44 \pm 0.25\%$ 와 비교하여 다소 감소하였다(Fig. 4, Table 4).

**다. 자연살세포 최대 독성능의 측정 :** 자연살세포의 최대 독성능(Vmax)은 대조군에는  $6.37 \pm 0.25 (\times 10^2)$ 로 나타났으며, 12시간 째에는  $9.66 \pm 1.67 (\times 10^2)$ 로 대조군과 비교하여 유의하게(p<0.05) 증가하였고 1일 째의 Vmax값은  $10.48 \pm 0.56 (\times 10^2)$ 로 가장 높게 나타났다. 그 후 감소하여 2일 째에는  $7.88 \pm 0.46 (\times 10^2)$ , 5일 째에는  $7.80 \pm 0.46 (\times 10^2)$ , 10일 째에는  $5.50 \pm 0.66 (\times 10^2)$ 으로 대조군과 비교하여 비슷한 수준을 보였다(Fig. 5, Table 5).

**라. 최대 재순환능(MRC)의 측정 :** 최대 재순환능은 대조군에서  $1.17 \pm 0.27$ 으로 나타났으며 전체적인 세포 독성이 증가하였던 12시간 째 및 1일 째에도 대조군과 비슷한 수준으로  $0.88 \pm 0.29$ 와  $0.79 \pm 0.08$ 이었으



**Fig. 5.** Vmax against YAC-1 target cells in mice infected with  $1 \times 10^5$  *A. culbertsoni* trophozoites.

\* p<0.05 versus control.

**Table 5.** Maximum NK potential (Vmax) and maximal recycling capacity\*\*

Time after inoculation	Vmax*** ( $\times 10^2$ )	MRC***
12 hrs	9.66±1.67*	0.88±0.29
1 day	10.48±0.56*	0.79±0.08
2 days	7.88±0.46	0.99±0.17
5 days	7.80±0.24	1.06±0.17
10 days	5.50±0.66	1.15±0.11
Control	6.37±0.25	1.17±0.21

\* p<0.05 versus control

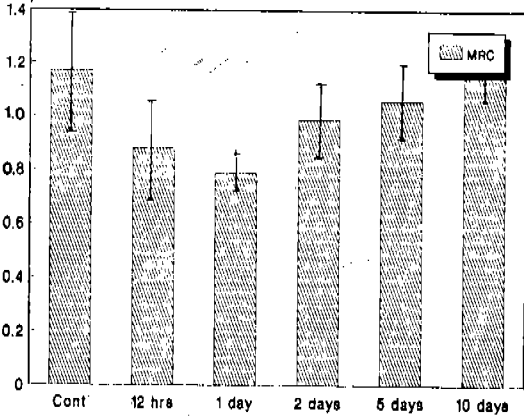
\*\* Ratio of effector cells to target cells in MRC from 1 : 1 to 1 : 16.

\*\*\* Mean±SEM

며, 5일 째 및 10일 째에도 유의있는 변화를 보이지 않았다(Fig. 6, Table 5).

**Table 6.** Correlation matrix among NK cell cytotoxicity, TBC, active NK cells, Vmax and MRC

	NK cytotoxicity	TBC	Active NK	Vmax	MRC
NK cytotoxicity	1				
TBC	0.97	1			
Active NK cells	0.95	0.94	1		
Vmax	0.93	0.95	0.99	1	
MRC	-0.88	-0.80	-0.89	-0.87	1



**Fig. 6.** Maximal recycling capacity against YAC-1 target cells in mice infected with  $1 \times 10^5$  *A. culbertsoni* trophozoites.

자연살세포의 세포독성능에 대한 결과로 최대 자연살세포 독성능(Vmax), 표적세포 결합능, 활성 자연살세포, 최대 재순환능 및 자연살세포의 세포독성 간의 상관관계를 살펴 보면, 표적세포 결합능과 자연살세포의 세포독성 간에는  $r=0.97$ , 활성 자연살세포와 표적세포 결합능 간에는  $r=0.94$ 로 높은 상관관계를 나타냈다. 그리고 Vmax와 활성 자연살세포 간에는  $r=0.99$ , 활성 자연살세포와 자연살세포의 세포독성 간의 상관관계는  $r=0.95$ 로 역시 높은 상관관계를 나타냈으나 재순환능과 자연살세포의 세포독성 간에는 전혀 상관 관계를 보이지 않았다(Table 6).

**고 활**

*A. culbertsoni*는 자연 환경에 널리 존재하는 자유생활 아메바의 한 종류로 주로 수영하는 동안 비강을 통해 인체에 들어와 증추 신경계를 침범하여 괴사성 출혈성 수막뇌염을 일으킨다고 알려져 있다(Curson and Brown, 1976). 이 병원성 자유생활 아메바에 의한 아메바성 수막뇌염 발생시 숙주의 세포매개성 면역반응의 발현이 방어 기전에 중요한 역할을 한다는 여러 연구보고가 있으며(Curson et al., 1980; Ferrante and Smith, 1984; 金 1989), 세포 매개성 면역반응 중 특이 방어 기전과는 달리 생체에서 항원에 대한 사전 감

작없이 비특이 방어 기전으로 가장 선두에서 자연살세포가 작용함을 보고한 바 있다(金, 1989; 李 1990).

자연살세포는 정상적인 상태의 포유동물에서 뿐만 아니라 무척추 동물에도 널리 존재하고(Deker et al., 1981; Roder et al., 1981) 특히 사람에서는 태아기에 이미 자연살세포가 형성된다. 이들은 바이러스에 감염된 세포 및 종양 세포에 자연적인 세포 독성을 나타내는 것으로 알려졌다(Herberman et al., 1975; Jondal and Pross, 1975). 자연살세포의 발생 유래에 대해서는 아직 확실하게 알려진 바 없으나 많은 연구자들이 T림프구, B림프구, 대식세포 및 단핵구와 구분하여(Galli et al., 1982; Rumpold et al., 1982) 림프구의 이형적 아집단(heterogeneous subpopulation)으로 분류하며, Ortaldo(1982)는 그 유래에 대해 다양한 조혈기능계의 세포들이 분화 단계 중 특정한 수용체를 발현함으로써 특정 단계에서 자연살세포의 기능을 나타낼 것이라는 가능성을 제시하였다. 이외에도 자연살세포 기능은 매우 다양해서 적혈구계 세포와 골수성 세포와 같은 조혈세포와 림프구의 성장 및 분화를 조절하고(O'Brien et al., 1983), 다양한 면역반응, 즉 Interferon(IFN), Interleukin-2(IL-2), B cell growth factor(BCGF), colony stimulating factor(CSF)와 같은 lymphokine을 생성(Kasahara et al., 1983)할 뿐만 아니라 항체 형성을 돕기 위해 항원을 B 림프구에 제시하는 기능을 하여(Gary et al., 1982) 숙주의 면역 감시 기전에 중요한 역할을 한다(Warner and Dennert, 1982). 이와 같이 자연살세포는 생물학적 체계 내에서 항상성(homeostasis) 유지에 필요한 기본적인 수행을 하고 있는 것으로 알려지고 있다.

자연살세포의 작용 기작에 대해서는 특정 매개체 분비와 관련된 두가지 주요 기전이 제안되고 있는데 그 첫번째가 Henkart and Henkart(1982)에 의한 세포독성 매개체의 세포막 삼입설이다. 이 가설은 자연살세포와 T림프구의 파립으로부터 유효한 세포독성 인자들이 지질 이중층속으로 고리같은 구조를 삼입함으로써 수 분 이내에 표적세포를 비선택적으로 파괴할 수 있다는 것이다. 두번째 가설은 Bradly and Bonavida(1982)가 제안한 것으로 보다 더 선택적인 방법에 의해 감수성 표적세포를 파괴시킨다는 용해성 인자 분비설이다. 즉, 자연살세포와 자연살세포-감수성 표적세포와의 상호 작용에 의해 자연살세포 독성 인자(natural

killer cytotoxic factor)가 생성되어 세포 매개성 독성에 관여한다는 것이다. 여러 연구자들은 자연살세포와 자연살세포-감수성 표적세포 사이의 작용 기작에 대해 몇가지 단계, 즉 1) 표적세포를 인식하고 부착하는 단계 2) 표적세포를 용해하는 단계 3) 표적세포에서 떨어져서 다른 표적세포에 붙어서 작용을 반복하는 단계로 나누고 있으며(Ulberg and Jondal, 1981), Grimm and Bonavida(1979)는 이러한 조절 기전을 자세히 규명하고자 agarose를 이용한 단세포 세포 독성 검사(single cell cytotoxicity)에 의한 표적세포 결합능(target binding capacity)과 활성 자연살(active NK) 세포를 측정함으로써 자연살세포의 작용 독성 기전을 연구하였고(Bradly and Bonavida, 1982), 한개의 세포에 의해서 최대로 용해될 수 있는 표적세포수인  $V_{max}$ 와 최대 재순환능(maximal recycling capacity)을 측정하는 방법을 개발하였다.

이들 자연살세포에 대한 많은 연구에도 불구하고 표적세포를 인식하고 부착하는 첫번째 단계에서 인식 수용기 및 표적세포의 구조에 대해서는 부분적으로만 알려져 있으며, 표적세포에 부착하는 과정은  $Mg^{++}$  등 2가 이온에 의존적인 과정이며 칼슘 결합 단백질인 calmodulin이 조절 인자로 알려지고 있고 tunicamycin이나 N-acetylglucosamine 등이 자연살세포가 표적세포에 부착하는 단계를 억제하는 물질로 알려지고 있다(Pohajdaz et al., 1984).

자연살세포의 원충류에 대한 저항성이 보고되었으며 *Toxoplasma sp.*, *Trypanosoma sp.*, *Babesia sp.* 및 *Plasmodium sp.* 감염시 자연살세포의 세포독성이 관여하는 것으로 보고되고 있다(Clark and Allison, 1974; Trichsman et al., 1978; Hatcher and Kuhn, 1981).

Hatcher and Kuhn(1981a, b & 1982) 및 Hatcher et al.(1981)은 PI:PC로 처리하거나 *Trypanosoma cruzi*로 감염시킨 비장 세포로부터 얻은 자연살세포가 시험관 내 실험에서 *T. cruzi*의 epimastigote와 혈액 내에 존재하는 trypomastigote를 직접 파괴함을 보고하였다. 이러한 연구 결과에 따라 자연살세포의 세포독성의 변동이 병리 변화의 진행 과정과 서로 어떤 상관관계에 있는가에 대한 질문이 야기되었고 이에 대한 연구도 많이 이루어지고 있다(Penschow and Mackay, 1980; Hauser et al., 1982; Leung et al., 1982).

자연살세포의 세포 독성이 병변의 상태에 따라 어떻게 발현되는가에 대해서는 자연살세포의 활성화로 virus 혹은 기생충에 감염된 세포를 직접 살해하여 만성 감염으로 진행되는 것을 막고, 항 virus의 활성을 나타내는  $\alpha$ -interferon이나 interleukin-2와 같은 lymphokine을 분비하여 항원에 특이한 면역반응을 활성화하여 숙주의 방어 기능에 일익을 담당할 수 있을 것으로 추측하였다(Herberman et al., 1981; Matheson et al., 1981). 또한 자가면역 질환(autoimmune disea-

se)에서 보는 것처럼 그 방어 조절에 실패해서 만성적인 질환 상태로 진행되는 두번째 경우도 있을 것이다(Herberman and Ortaldo, 1981; Kato and Minagawa, 1981; Timonen et al., 1981). 이러한 예는 비악성 종양 질환(non-malignant disease)시에도 많이 보고되고 있다(Welsh, 1980; Pross et al., 1982).

따라서 본 실험에서는 기생충성 감염증에 있어서 발현되는 자연살세포의 세포독성을 *A. culbertsoni*를 감염시켰을 때 그 감염 정도를 달리하여 마우스에 영양형  $1 \times 10^4$  및  $1 \times 10^5$ 을 각각 접종한 후 자연살세포의 세포독성의 발현을  $^{51}Cr$  방출 검사법과 단세포 독성 검사법에 의해 표적세포 결합능과 활성 자연살세포 및 최대 재순환능을 측정함으로써 그 작용 단계마다의 세포독성 활성도를 측정하여 *A. culbertsoni* 감염 정도에 따른 자연살세포 세포독성의 발현의 차이를 알아 보았다. 영양형  $1 \times 10^4$ 을 접종시킨 실험군에서의 자연살세포의 세포독성은 아메바를 마우스에 접종한 지 12시간째에 대조군에 비하여 유의하게 증가하기 시작하였으며 1일 째에 가장 증가하였으며 그 후 감소하여 5일째부터 10일 째까지 대조군과 비슷한 수준이었다. 영양형  $1 \times 10^5$ 을 접종시킨 실험군에서도 비슷한 경향을 보였으며 두 실험군 간에는 차이를 발견할 수 없었다.

이러한 세포독성의 정도를 단계적으로 알아보기 위해 실시한 단세포 독성검사는 4시간  $^{51}Cr$  방출 검사법에서 감염시킨 영양형 수가 다른 두 실험군 간에 차이를 발견할 수 없었으므로 아메바 영양형  $1 \times 10^5$ 을 감염시킨 실험군에서만 실시하였다. 표적세포 결합능은 자연살세포의 세포독성이 높아짐에 따라 15~40% 사이에서 증가하였음을 알 수 있었으며 활성 자연살세포는 표적세포와 결합한 세포들 중에 5~10% 정도를 차지하였고, 최대 독성능인  $V_{max}$ 도 전체 자연살세포의 세포독성 결과와 서로 잘 일치되었다. 최대 재순환능은 감염 경과 시간에 따라 대조군과 비교하여 비슷한 수준을 보였으며 최대 재순환능이 대조군과 비교하여 차이를 보이지 않았다는 것으로 미루어 보아 자유생활 아메바 감염에 의해 자연살세포의 운동성과 재순환능에 필요한 생리적 기능에는 손실이 없었음을 추측할 수 있었다.

단세포 독성 검사는 자연살세포의 조절 기전을 단계적으로 알아볼 수는 있으나 그 결과가 매우 주관적이고 시간이 소모되는 실험으로 생각되며 그 실험값의 해석은 절대적인 수치로 해석하기 보다는 단지 표적세포를 살해할 수 있는 능력만을 알 수 있을 것으로 생각되고, 그 살해 정도는  $^{51}Cr$ -방출 검사법에 의한 결과에 따라 해석하는 것이 더 정확하리라 생각된다.

실험에 사용된 세포들이 정확히 자연살세포인지 확인하기 위하여 표적세포와 결합한 세포들만을 velocity sedimentation technique에 의하여(Grimm and Bonavida, 1977) 분리하여, 자연살세포-감수성 표적세포에 결합한 주효세포들의 표현형을 규정짓고, 또 자연살세



포 및 비활성 자연살세포가 차지하는 비율을 조사하는 것이 본 실험에 선행되어야 할 것으로 생각된다.

이러한 자연살세포의 세포독성이 대부분의 경우 질환의 병적 상태와는 잘 일치되지 않는 것으로 보고되고 있으나 자유생활 아메바에 의한 수막뇌염과 같은 급성 질환의 경우 초기에는 자연살세포의 세포독성이 증가하며 시일이 지날수록 정상보다 낮은 수준으로 감소하여 가장 병변이 활발하게 진행되는 시기에는 자연살세포의 세포독성이 가장 낮은 결과를 보였다. 초기에 자연살세포의 세포독성이 증가되는 것은 항원에 의해  $\gamma$ -IFN과 같은 lymphokine의 분비 증가 및 일시적인 면역 기능의 활성화 때문으로 생각되며, 질환이 만성으로 진행될수록 혈청 내에 circulating immune complex가 생성되고 이들이 표적세포들에 결합하여 자연살세포가 결합할 수 있는 표적세포들을 감소시킴으로써 자연살세포의 세포독성을 감소시킬 수 있을 것이다. 또한 단핵세포에서 생성된 prostaglandin E<sub>2</sub>에 의해 T세포에서 IL-2의 분비를 감소시켜 간접적으로 자연살세포의 세포독성을 억제시킬 수 있을 것으로 사료된다.

아메바 감염 후 10일 쯤에 자연살세포의 활성도가 가장 낮게 나타난 것은 수막뇌염이 가장 활발히 진행되는 시기로 자연살세포 기능에 손상을 입어 자연살세포의 수 혹은 표적세포에 부착할 수 있는 능력이 감소되거나 살해 능력에 이상이 왔기 때문으로 생각된다. 또한 IL-1이나 IL-2 혹은 IFN을 생성하는 능력 및 이에 반응할 수 있는 능력에 손상이 있으리라 생각되며, 단핵세포에서 생성된 prostaglandin E<sub>2</sub> 외에도 T cell suppressor 및 아직 확인되지 않은 여러 물질들에 의해 자연살세포의 세포독성이 저해되었기 때문이라 추측된다.

본 실험에 있어서 감염량을 달리하여 아메바 영양형을 감염시켰을 때 두 실험군 사이의 자연살세포의 세포독성은 차이가 없었으며 다만 감염 후 경과 기간별로 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보였다.

따라서 앞으로 자연살세포를 활성화시킬 수 있는 *A. culbertsoni*의 감염 최소량을 결정하고, 더 나아가 다른 여러 종류의 *Acanthamoeba* sp.에 의해 감염된 숙주에서의 자연살세포의 세포독성을 측정하여, 원충의 병원성 및 비병원성과 자연살세포의 세포독성간의 상관관계를 관찰함이 필요하리라 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 金明俊(1989) *Acanthamoeba culbertsoni* 감염에 있어 세포 매개성 면역에 관한 연구. 연세대 대학원 박사학위 논문.
- 李奎來(1990) *Naegleria fowleri*가 자연살세포의 활성화에 미치는 영향. 연세대 대학원 석사학위논문.
- 黃英南·閔得映·蘇鎮琿(1980) 자유생활 아메바(*Acanthamoeba* species)의 숙주에 대한 면역학적 반응. 연세대의 논문집, 13:393-407.
- 黃瀚琦·尹德鎮·任敬一·蘇鎮琿(1976) 자유생활 아메바의 병원성에 관한 실험적 연구. 연세대의 논문집, 9:182-194.
- 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.
- 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. 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.
- Curons, R.T.M. and Brown, T.J. (1976) Identification and classification of the etiological agents of primary meningoencephalitis. *N.I.J. Mar. Freshwater Res.*, 10:245-262.
- Curons, 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.
- Decker, J.M., Elmholt, A. and Muchmore, A.V. (1981) Spontaneous cytotoxicity mediated by invertebrate mononuclear cells toward normal and malignant vertebrate targets: Inhibition by defined mono and disaccharides. *Cell Immunol.*, 59:161-164.
- Derrick, E.H. (1948) A fatal case of generalized amebiasis due to a protozoon closely resembling, if not identical with, *Iodamoeba butschlii*. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.*, 42:191-198.
- Duke, R.C., Chervenak, R. and Cohen, J.J. (1983) Endogenous endonuclease induced DNA fragmentation; an early event in cell mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:6361-6364.
- Eldridge, A. and Tobin, J. (1967) Ryan virus. *Br. Med. J.*, 1:299-303.
- 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.
- Galli, S., Dvorak, A., Ishizaka, T., Nabel, G., Simonian, H., Cantor, H. and Dvorak, H. (1982) A cloned cell with NK function resembles basophils by ultrastructure and expresses IgE receptors. *Nature*, 298:288-294.
- Gary, A.K., Daniele, R.P. and Nowell, P.C. (1982) A phorbol ester (TPA) can replace macrophages in human lymphocyte cultures stimulated with a mitogen but not with an antigen. *J. Immunol.*, 128:1776-1781.
- 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. (1981a) Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science*, 218:295-296.
- Hatcher, F.M. and Kuhn, R.E. (1981b) Spontaneous lytic activity against allogeneic tumor cells and depression of specific cytotoxic responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 126:2436-2441.
- Hatcher, F.M. and Kuhn, R.E. (1982) Natural killer (NK) cell activity against extracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. In NK cells and other natural effector cells. Herberman R.B. Ed. Academic Press New York, 1091-1111.
- Hatcher, F.M., Kuhn, R.E., Cerrone, M.C. and Burton, R.C. (1981) Increased natural killer cell activity in experimental american trypanosomiasis. *J. Immunol.*, 127:1126-1130.
- Hauser, W.E., Sharma, S.D. and Remington, J.S. (1982) Natural killer cells induced by acute and chronic *Toxoplasma* infection. *Cell Immunol.*, 69:330-332.
- Henkart, M.P. and Henkart, P.A. (1982) Lymphocyte mediated cytotoxicity as a secretory process. In Mechanism in cell mediated cytotoxicity. E. Clark and P. Goldstein, Eds., Plenum Press, New York, 227-235.
- 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, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E. and Gillis, S. (1981) Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, 291:335-339.
- Herberman, R.B. (1985) Mechanism of cytotoxicity by natural killer cells. R.B. Herberman E.B. Academic Press Inc., 1-2.
- Jondal, M. and Pross, H. (1975) Surface markers on human B and T lymphocytes. VI. Cytotoxicity against cell lines as a functional markers for lymphocyte subpopulations. *Int. J. Cancer*, 15:596-602.
- Kasahara, T., Djeu, J.Y., Dougherty, S.F. and Oppenheim, J.J. (1983) Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokines: interleukin 2, interferon, and colony stimulating factor. *J. Immunol.*, 131:2379-2383.
- Kato, T. and Minagawa, T. (1981) Enhancement of cytotoxicity of human peripheral blood lymphocytes by interferon. *Microbiol. Immunol.*, 25:837-842.
- Kenny, M. (1971) The micro-Kolmer complement fixation test in routine screening for soil amoeba infection. *Health Lab. Sci.*, 8:5-10.
- Lallinger, G.J., Reiner, S.L., Cooke, D.W., Toffaletti, D.L., Perfect, J.R., Granger, D.L. and Durack, D.T. (1987) Efficacy of immune therapy in early experimental *Naegleria fowleri* meningitis infection. *Immunology*, 55:1289-1293.
- Leung, D.Y.M., Siegel, R.L., Grady, S., Krensky, A., Meade, R., Reinherz, E.L. and Geha, R.S. (1982) Immunoregulatory abnormalities in mucocutaneous lymph node syndrome. *Immunopathology*, 23:100-105.
- 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.
- Matheson, D.S., Green, B. and Tan, Y.H. (1981) Human interferons  $\alpha$  and  $\beta$  inhibit T cell dependent and stimulate T cell independent mitogenesis and natural cell cytotoxicity: relationship to chromosome 21. *Cell Immunol.*, 165:366-371.

- Nagington, 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.
- O'Brien, T., Kendra, J., Stephens, H., Knight, R. and Barrett, A.J. (1983) Recognition and regulation of progenitor marrow elements by NK cells in the mouse. *Immunology*, 49:717-722.
- Ortaldo, J.R. (1982) Natural killer cells: a separate lineage? *In* NK cells and other natural effector cells. Herberman R.B. E.d. Academic Press New York, 265-271.
- Penschow, J. and MacKay, I.R. (1980) NK and K cell activity of human blood: differences according to sex, age, and disease. *Ann. Rheum. Dis.*, 39: 82-86.
- Pohajdak, B., Wright, J.A. and Greenberg, A.J. (1984) An oligosaccharide biosynthetic defect in concanavalin A resistant chinese hamster ovary (CHO) cells that enhances NK reactivity *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 133:2423-2427.
- Pross, H.F., Pater, J., Dwosh, I., Giles, A., Galliner, L.A., Rubin, P., Corbett, W.E.N., Galbraith, P. and Baines, M.G. (1982) Studies of human natural killer cells. III. Neutropenia associated with unusual characteristics of antibody-dependent and natural killer cell mediated cytotoxicity. *J. Clin. Immunol.*, 2:126-129.
- Richards, C.S. (1968) Two new species of *Hartmannella* amoeba infecting fresh-water mollusks. *J. Protozool.*, 15:651-656.
- Roder, J.C., Arbov, S., Klein, M., Petersson, C., Kiessling, R., Anderson, K. and Hansson, M. (1980) Target-effector cell interaction in the natural killer cell system. V. Energy requirements, membrane integrity, and the possible involvement of lysosomal enzymes. *Immunology*, 40:107-113.
- Roder, J.C., Helfand, S.L., Werkmeister, J., McGarry, R., Beaumont, T.J. and Duwe, A. (1982) Oxygen intermediates are triggered early in the cytolytic pathway of human NK cells. *Nature*, 298:569-574.
- Roder, J.C., Karre, K. and Kiessling, R. (1981) Natural killer cells. *Prog. Allerg.*, 28:66-74.
- 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.*, 121:2509-2519.
- 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., 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.
- 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., Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B. (1981) Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J. Exp. Med.*, 153:569-573.
- 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. Parasitol.*, 45:160-168.
- Ulberg, M. and Jondal, M. (1981) Recycling and target binding capacity of human natural killer cells. *J. Exp.*, 153:615-628.
- Warner, J.F. and Dennert, G. (1982) Effects of a cloned cell line with NK activity on bone marrow transplants, tumor development and metastasis *in vivo*. *Nature*, 300:31-34.

=Abstract=

**Natural killer cell activity in mice infected with *Acanthamoeba culbertsoni***

Dong-Kun Hyun, 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 cell activity of splenocytes and TBC, active NK cells, recycling capacity of natural killer cells were observed by means of both the  $^{51}\text{Cr}$ -release cytotoxicity assay and single cell cytotoxicity assay against YAC-1. C3H/HeJ mice were infected intranasally with  $1 \times 10^4$  or  $1 \times 10^5$  trophozoites of pathogenic *Acanthamoeba culbertsoni*. The infected mice showed mortality rate of 34% in  $1 \times 10^4$  group and 65% in  $1 \times 10^5$  group, and mean survival time was  $16.40 \pm 3.50$  and  $13.20 \pm 4.09$  days respectively. The cytotoxic activity of natural killer cells of the 2 groups was significantly higher than that of non-infected mice from the 12th hour to the 2nd day after infection, showing the highest on the first day. On the 10th day after infection, the cytotoxic activity of natural killer cells was significantly suppressed as compared with that of the control. There was no significant difference in NK cell cytotoxicity between two infected groups. The target-binding capacity and active NK cells of natural killer cells in  $1 \times 10^5$  trophozoite infected mice was significantly increased on the 12th hour and the first day after infection as compared with the control group. Maximal recycling capacity(MRC) was not changed during the observation period. The present results indicated that the elevation of natural killer cell activity in the mice infected with *A. culbertsoni* was due to elevation of target-binding capacity and increased active NK cells of natural killer cells, and not due to the maximal recycling capacity of the individual NK cell, and there was no difference between two experimental dose groups.

[Korean J. Parasit., 29(2):101-112, June 1992]