

자유생활아메바의 병원성에 따른 자연살세포의 활성화도

金基赫, 慎珠玉, 任敬一*

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

국문초록: 원발성 아메바성 수막뇌염을 일으키는 병원성 자유생활아메바인 *Naegleria fowleri* 및 *Acanthamoeba culbertsoni*를 C3H/HeJ 마우스에 감염시켜 자연살세포를 활성화시킬 수 있는 감염 최소량 및 활성도를 최대치까지 이르게 하는 감염 최대량을 결정하여 수막뇌염의 발생여부 및 사망율을 조사하고, 이와 함께 비병원성 자유생활아메바인 *Naegleria gruberi*를 감염시켜 자연살세포가 활성화되는지 조사하였다. 자연살세포 활성도를 병원성 자유생활아메바 감염군과 비교하였으며, 병원성, 비병원성 자유생활아메바 감염군에서의 자연살세포의 세포독성의 변화를 단세포 독성 검사법을 이용하여 표적세포 결합능, 활성 자연살세포, 더 나아가 최대 재순환능을 측정하여 조사하였다. *Naegleria fowleri* 감염군에서 자연살세포를 활성화 시킬 수 있는 감염 최소량인 아메바 영양형 1×10^4 개 감염군에서 사망률이 5.9%이었으며 최대량인 1×10^5 개 영양형 감염군에서는 72.2%이었다. *Acanthamoeba culbertsoni* 감염군에서의 감염 최소량인 아메바 영양형 1×10^3 개 감염군에서의 사망률은 6.9%이었으며 최대량인 1×10^5 개 감염군에서는 65.5%이었다. 자연살세포의 세포독성은 병원성 자유생활아메바 감염군 모두에서 감염후 1일째에 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였으며, 감염후 2일과 5일째에는 감소하였고, 아메바 감염량간에는 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 아메바 감염군에서의 자연살세포의 활성화도의 증가는 표적세포 결합능 및 활성 자연살세포의 증가에 기인한 것이었으며 재순환능에는 차이가 없음을 알 수 있었다. 비병원성 자유생활아메바인 *Naegleria gruberi* 감염군에서는 자연살세포의 활성화도는 대조군과 비교하여 유의한 차이를 발견할 수 없었으며, 병원성 자유생활아메바 감염군과는 자연살세포의 세포독성이 통계학적으로 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다.

서 론

원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)의 인체 발병례가 Derrick (1948)에 의해 보고되면서, 자유생활아메바인 *Naegleria* 속과 *Acanthamoeba* 속이 수막뇌염의 원인 원충으로 알려졌다(Carter, 1970). 이들 원충의 감염은 주로 비강을 통해 이루어지며 후점막과 사상관을 뚫고 후신경을 따라 중추신경계를 침범하여 후뇌를 비롯한 뇌의 기저부에 피사성 출혈성 수막뇌염을 일으킨다(Martinez et al., 1973).

자연살 (natural killer: NK) 세포는 1970년대

중반 종양세포에 대한 세포 매개 독성 연구중 (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975) 발견된 이후 활발한 연구가 되어 오고 있는데 이들 자연살세포에 대한 연구는 계속 되어 오고 있지만 그 작용 기전에 대해서는 부분적으로만 알려져 있는 실정이다. 이러한 자연살세포의 반응에 관여하는 조절 기전을 더 자세히 규명하기 위하여는 세포 독성 반응이 이루어지는 모든 단계를 검사하는 것이 기초적인 자료가 되는데 Roder et al.(1978)이 자연살 세포가 표적세포를 인지, 부착하고 난 후에 표적을 파괴하는 세포 독성 매개체(mediator)를 분비한다는 자극-분비설(stimulation-secretion theory)을 제안한 이후 최근에는 몇몇 증거들을 기초로 자연살세포와 자연살세포-감수성 표적 세포 사이의 작용에 대해 몇 가지 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; Duke et al., 1983).

* 논문접수 1993년 5월 29일, 수정재접수 1993년 7월 31일

* 이 연구의 일부는 1993년도 연세대학교 의과대학 연구강사 연구비에 의하여 이루어졌음.

* 별책 요청 저자

Grimm and Bonavida(1979)는 agarose를 이용한 단세포 세포 독성 검사(single cell cytotoxicity)에 의해 표적세포 결합능(target binding capacity: TBC)과 활성 자연살세포(active NK)를 측정함으로써 자연살세포의 세포독성 기전을 연구하였다(Bradley and Bonavida, 1982). 또한 Ulberg and Jondal(1981)은 위의 측정법과 ^{51}Cr 방출검사법을 종합하여 한개의 자연살세포에 의해서 최대로 용해할 수 있는 표적 세포수인 V_{max} 와 재순환능(recycling capacity: RC)을 측정하여 자연살세포의 세포독성 기전을 연구 하였다. 자유생활 아메바인 *Naegleria* 속과 *Acanthamoeba* 속을 마우스에 접종하였을때 자연살세포의 세포독성이 증가하였음을 보고하였고(金明俊, 1989; 李圭來, 1990), *A. culbertsoni* 감염시 사망율에 따라 감염량을 달리하였을때 자연살세포의 세포독성의 변화를 조사한 바 있다 (玄東根, 1991).

따라서 본 실험은 병원성 자유생활아메바의 감염량을 달리하였을 때 발현되는 병원성의 정도와 자연살세포의 활성도가 어떠한 상관관계가 있는지 알아보고 또한 비병원성 자유생활아메바인 *Naegleria gruberi*(이하 *N. gruberi*로 약함) 감염군과 병원성 자유생활아메바인 *Naegleria fowleri*(이하 *N. fowleri*로 약함) 및 *Acanthamoeba culbertsoni*(이하 *A. culbertsoni*로 약함)를 감염시켰을때 감염군간에 자연살세포의 활성화 정도에 어떠한 차이가 있는지 자연살세포 활성도가 높은 마우스로 알려진 C3H/HeJ 마우스에서 알아보려고 했다.

따라서 *N. fowleri* 및 *A. culbertsoni*의 자연살세포를 활성화시킬 수 있는 최소 감염량 및 자연살세포의 활성도를 최대치까지 이르게 하는 최대 감염량을 마우스에 접종하여 이때 발현되는 자연살세포의 활성도를 조사하고, 또한 비병원성인 자유생활아메바 *N. gruberi*를 감염시켜 자연살세포의 활성도를 측정하였다. ^{51}Cr 방출 검사법과 단세포 독성 검사법에 의해 표적세포 결합능(TBC)과 활성 자연살세포(active NK) 및 재순환능(MRC)을 측정함으로써 작용 단계마다의 세포독성을 측정하여 병원성 및 비병원성 자유생활아메바 감염에 의한 자연살세포의 활성도를 관찰하였으며 병원성 자유생활아메바의 감염량을 달리하였을 때 발현되는 자연살세포의 활성도를 측정하여 감염후 경과 기간에 따른 자연살세포의 세포독성의 변동을 알아보려고 한다.

재료 및 방법

1. 자유생활아메바의 배양

A. culbertsoni, *N. fowleri* 및 *N. gruberi*를 37°C 5% CO₂ 흡습 항온기(NAPCO, Portland, Oregon)에서 각각 CGV 배지 및 CGVS 배지

(Willaert, 1975)를 사용, 무균적으로 계대 배양하여 사용하였다.

2. 실험동물

생후 6-8주 된 음성 C3H/HeJ 마우스를 한국 과학기술원 생물학 검정실에서 공급받아 사용하였다.

3. 자유생활 아메바의 접종

마우스 체중 gm당 secobarbital 0.06mg을 복강내로 주사하여 마취시킨후 아메바 영양형 일정량을 각각 5 μ l 생리 식염수에 함유되도록 한 후 마우스의 오른쪽 비강에 떨어뜨려 접종하였다. 실험 대조군은 실험군과 같은 방법으로 마취시키고 생리 식염수를 비강내로 떨어뜨려 접종하였다. 아메바 접종 후 20일까지 사망율과 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 × 10³, 1 × 10⁵, *N. fowleri*의 영양형 1 × 10⁴, 1 × 10⁵, *N. gruberi*의 영양형 1 × 10⁵를 각각 마우스에 접종한 후 1일, 2일, 5일째에 비장을 적출하여 그 비장세포를 사용하여 자연살세포의 세포독성을 측정하였다. 각 실험군에 있어서 실험동물은 각각 6마리 이상 사용하였다.

5. 비장세포의 자연살세포 독성의 측정

1) 표적세포: 자연살세포에 의한 세포독성을 측정하기 위한 표적세포로는 YAC-1(A/Sn mouse lymphoma; Cikes et al., 1973) 세포를 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 10% 우태아 혈청, L-glutamine (2 mM/ml), penicillin(100 units/ml) 및 streptomycin(100 g/ml), 10mM HEPES를 함유시킨 RPMI 1640 배지(이하 RPMI 완전 배지로 약함)를 사용하여 계대배양 하였다.

2) 주효세포: 마우스를 각각 시간별로 희생시켜 무균적으로 비장을 채취한 후, RPMI 완전 배지를 사용하여 단세포 부유액을 만들었다. 여기에 0.16M Tris-NH₄Cl(pH 7.2)을 넣어 적혈구를 용혈시키고 이를 다시 RPMI 완전 배지에 부유시킨 다음 60mm × 15mm의 plastic petri dish(Costar, Cambridge, M.A.)에 넣어 37°C 5% CO₂ 흡습 항온기에서 1시간 배양 한 후 가볍게 흔들어 부유되어 있는 비부착성 세포만을 채취하여 사용하였다.

3) 자연살세포 독성 검사: 자연살세포의 세포독성은 4시간 ^{51}Cr 방출 검사법으로 수행하였다(Ulberg and Jondal, 1981). YAC-1 세포 1 × 10⁷ cells/0.2ml에 100 μ Ci Na₂⁵¹CrO₄ (1mCi/ml, NEZ-0305, New England Nuclear,

Boston, M.A.)를 넣고 37°C 항온조에서 1시간 표지화시켰다. 그후 2회 세척하여 ⁵¹Cr이 표지된 세포를 microplate 각 well당(Costar, round bottem 96 wells, Cambridge, M.A.) 1 × 10⁴ cells/0.1ml 되게 넣고 주효세포 : 표적세포의 비율(E : T ratio)을 100 : 1이 되도록 주효세포를 10⁶ cells/0.1ml 넣어 37°C 5% CO₂ 항습 항온기에서 4시간 배양하였다. 이때 최대 방출을 유발시키기 위해 1N NaOH를 가하였고 자연 방출을 측정하기 위해서는 ⁵¹Cr이 표지된 표적세포만을 배양하였다. 배양후 100 μl의 상층액을 수거하여 gamma counter(Packard, Downers Grove, I.L.)로 방사능을 측정 하였으며 자연살세포 독성은 다음 공식에 의하여 계산하였다.

$$\% \text{ 세포독성} = \frac{\text{실험방출량} - \text{자연방출량}}{\text{최대방출량} - \text{자연방출량}} \times 100$$

4) 단세포 세포독성 검사: 단세포 세포독성 검사는 Grimm and Bonavida(1979)와 Bradley and Bonavida(1982)의 방법을 따랐다. 요약하면 2 × 10⁵개의 주효세포와 표적세포를 15ml conical tube에 넣고 RPMI 완전 배지로 총 용량이 0.2ml 가 되게 잘 섞은 후 실온에서 500 × g로 2분간 원심하였다. 그 후 37°C 에서 15분간 5% CO₂ 항습 항온기에 방치한 후 100 μl micropipette으로 진탕시킨 다음에 42°C로 유지시킨 0.5% agarose-RPMI 완전배지 0.5ml을 조심스럽게 첨가시켰다. Agarose-세포 혼합액을 plastic petri dish(60mm × 15mm, Costar, Cambridge, M.A.)에 잘 쏟아 붓고, 이 agarose-세포 혼합액이 굳은 후, 약 5-6ml의 RPMI 완전 배지를 첨가하여 37°C 5% CO₂ 항습 항온기에서 약 3시간 동안 배양하였다. 그 후 0.1% trypan blue로 5분간 염색하였다. 그 후 냉 인산 완충액(pH 7.4)으로 3번 세척한 다음 1% formaldehyde로 고정하였다. 표적세포 결합능의 계산은 현미경 하(×100)에서 관찰된 250개의 림프구 중에 표적세포와 결합한 림프구의 수를 백분율로 환산하였으며, 주효세포와 결합한 후 죽은 표적세포의 비율은 50개의 결합 세포중 표적세포가 청색으로 염색된 죽은 세포의 수를 백분율로 나타내었다. 주효세포를 넣지않고 표적세포만을 넣었을 때 죽은 표적세포의 비율을 구하여 Background death로 계산하였다. 활성 자연살세포의 백분율(%)은 agarose에서 단세포 세포독성 검사가 끝난 후 각 실험 마다 다음의 공식에 의해 계산하였다.

$$\% \text{ 활성 자연살세포} = \frac{\% \text{ 표적세포 결합능} A - (A \times B)}{\% \text{ 표적세포 결합능} A - (A \times B)}$$

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

5) 최대 재순환능(Maximal Recycling Capacity: MRC) 검사: 주효세포들의 최대 독성능(Vmax)과 최대 재순환능은 ⁵¹Cr 방출 검사법과 단세포 세포독성 검사를 혼합하여 계산한 Ulberg and Jondal(1981)의 방법을 따랐다. 요약하면, 1 × 10⁵/0.1ml 비부착성 주효 세포에 ⁵¹Cr이 표지된 표적 세포를 5번 배수 희석(1 × 10⁵/0.1ml 세포에서 0.625 × 10⁴/0.1ml 세포까지)하여 넣어준 후 round bottom microplate(Costar, 96 wells, Cambridge, M.A.)에서 37°C 5% CO₂ 항습 항온기에서 3시간 배양하였다. 배양후 100 μl의 상층액을 각 well에서 수거 하여 희석된 표적세포의 ⁵¹Cr 방출량을 측정하였다. ⁵¹Cr 방출 검사법에 의한 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 표적세포의 수이고 T는 최초에 넣어준 표적세포의 수이다. Vmax는 표적세포를 최대한 넣어 주었을때 얻어지는 죽은 표적세포의 수이다. Km은 Vmax치의 절반을 나타내는 표적세포의 수이다. 여러가지 다른 비율의 E : T ratio의 Vmax치와 Km치는 Line Weaver-Burk equation을 사용하여 결정할 수 있는데 그 공식은 다음과 같다.

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

이 식에서 1/V와 1/T는 직선적인 관계(linear relationship)를 갖는다. 즉, V와 T의 역수치를 점으로 나타내고 least squares linear regression analysis를 사용하여 직선을 얻는다. Vmax는 Y축을 가로 질러 지나가는 값(Y절편)의 역수치로부터, Km은 X축을 가로 질러 지나가는 값(X절편)의 마이너스 역수치(negative reciprocal value)로부터 구할 수 있다. Table 1와 Fig. 1에서 위에 서술한 대로 Vmax와 Km 값을 계산하는 한 예를 들었다. 최대 재순환능은 하나의 활성 자연살세포가 배양하는 시간동안 죽일 수 있는 최대한의 표적세포의 수를 가리킨다. 즉, 표적세포를 포화상태로 만들었을 때 lytic assay에서 얻을 수 있는 이론적인 수치를 나타낸다. 최대 재순환능(MRC)은 이와같이 하여 측정된 Vmax값을 Vmax값 검사에서 사용한 주효세포의 수와 활성 자연살세포를 곱한 값으로 나누어 줌으로 얻을 수 있었다. 즉,

$$\text{최대 재순환능} = \frac{\text{최대독성능}}{\% \text{ 활성 자연살세포 최대독성능 실험에서 사용된 주효세포의 수}}$$

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

Dilution number	No. of effector cells	No. of target cells (T)	Percent of dead target cells (%)	Number of dead target (V)	1/T = X	1/V = Y
1	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	0.55	5.50 × 10 ²	1 × 10 ⁻⁵	1.82 × 10 ⁻³
2	1 × 10 ⁵	5 × 10 ⁴	0.82	4.10 × 10 ²	2 × 10 ⁻⁵	2.44 × 10 ⁻³
3	1 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁴	1.12	2.80 × 10 ²	4 × 10 ⁻⁵	3.57 × 10 ⁻³
4	1 × 10 ⁵	1.25 × 10 ⁴	1.63	2.04 × 10 ²	8 × 10 ⁻⁵	4.90 × 10 ⁻³
5	1 × 10 ⁵	0.625 × 10 ⁴	2.89	1.81 × 10 ²	1.6 × 10 ⁻⁵	5.52 × 10 ⁻³

*Least squares regression analysis $Y = a + bX$

$r = 0.92$, $a = 0.00217708$, $b = 23.76$, $V_{max} = 1/a = 459.35$, $K_m = b/a = 10909.508$

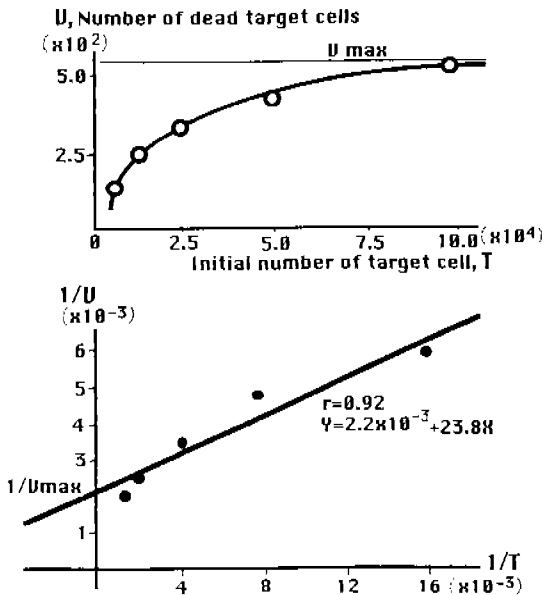


Fig. 1. An example of figures showing Vmax and Km values. (A) Data from Table 1 are used to exemplify the calculation of Vmax. Initial number of target cells (T) is plotted against number of dead target cells (V) at the end of the test. The points fit well to the theoretical Michaelis-Menten saturation 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 ($r = 0.92$). Vmax equals the reciprocal of the Y intercept and Km equals the negative reciprocal of the X intercept.

결 과

1. 감염 마우스의 사망률

*N. fowleri*의 경우, 최소량은 1 × 10⁴개의 아메바 영양형을 접종하였을 때였으며, 이때 마우스가 18일째 1마리가 사망하여 20일 후까지 17마리중 1마리(5.9%)가 사망하였으며, 최대량으로 1 × 10⁵개의 아메바 영양형을 접종시킨 실험군에서는 접종 후 7일부터 사망하기 시작하여 18마리중 13마리(72.2%)가 사망하였다. 각각 생존기간은 19.9일과 12.7일이었다. *A. culbertsoni*의 경우 최소량은 1 × 10³개의 아메바 영양형을 마우스에 접종하였을 때, 13일째 29마리중 2마리(6.9%)가 사망하였고 최대량인 1 × 10⁵개를 접종하였을 때 7일부터 사망하기 시작하여 20일 후까지 29마리중 19마리(65.5%)가 사망하였고 각각 생존기간은 19.7, 13.2일이었다. *N. gruberi*는 1 × 10⁵개의 아메바 영양형을 접종하였을 때 20일 후까지 1마리도 사망하지 않았다(Table 2).

2. 자연살세포의 활성화도

1) 비장세포의 자연살세포 독성: *N. fowleri* 영양형 1 × 10⁴개를 접종한 실험군은 각각 1일, 2일, 5일째에 비장세포의 자연살세포 활성화도가 3.96 ± 0.57, 2.67 ± 0.49, 1.98 ± 0.41%이었고 영양형 1 × 10⁵개를 접종한 실험군은 각각 5.73 ± 0.64, 3.84 ± 0.66, 1.54 ± 0.49%이었다. *N. gruberi* 영양형 1 × 10⁵개를 감염시킨 실험군은 자연살세포의 활성화도가 각각 1일, 2일, 5일째에 3.66 ± 0.42, 2.85 ± 0.41, 2.04 ± 0.62%이었다.

A. culbertsoni 영양형 1 × 10³을 접종시킨 실험군에서 1일, 2일, 5일째의 세포독성은 각각 4.73 ± 0.53, 2.36 ± 0.28, 1.61 ± 0.45%이었고, 영양형 1 × 10⁴을 접종시킨 실험군에서는 각각 4.76 ± 0.42, 2.51 ± 0.45, 2.14 ± 0.30%이었으며 1 × 10⁵을 접종시킨 실험군에서는 1일, 2일, 5일째에 각각 5.47 ± 0.50, 2.42 ± 0.32, 2.69

Table 2. Cumulative number of death in mice inoculated intranasally with the free-living amoebae

Name	No. of trophozoites inoculated	No. of mice	Cumulative number of death of mice at days:																	Mortality (%)	Survival time (days)
			7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20					
<i>Naegleria fowleri</i>	1 × 10 ⁴	17															1	5.90	19.88		
	5 × 10 ⁴	17	1						2						3			4	23.53	18.29	
	1 × 10 ⁵	18	1	2	4	7	8		9	12		13						72.22	12.67		
<i>Naegleria gruberi</i>	1 × 10 ⁵	20																0			
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	1 × 10 ³	29									1						2	6.90	19.69		
	1 × 10 ⁴	29				1					2	3		4	5			34.00	16.40		
	1 × 10 ⁵	29	1	2	4	6	8	10	11	12	13	14	15	16	18	19	65.00	13.20			
Control		20															0				

± 0.32%이었다.

대조군에서의 세포독성은 접종후 1일, 2일, 5일째에 각각 2.15 ± 0.25, 2.03 ± 0.42, 2.41 ± 0.78이었으며 접종후 1일째에 *N. fowleri* 감염군의 경우 1 × 10⁴개부터 *A. culbertsoni*의 경우는 1 × 10³개 감염군부터 자연살세포가 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다(p < 0.05)(Fig. 2).

2) 표적세포 결합능과 활성 자연살세포 검정: *N. fowleri* 영양형 1 × 10⁴개 접종시에는 표적세포 결합능이 1일, 2일, 5일째에 각각 29.33 ± 2.05, 24.40 ± 0.69, 21.96 ± 2.01%이었고 영양형 1 × 10⁵개 접종시에는 각각 34.41 ± 2.28, 24.46 ± 1.14, 27.57 ± 2.33%이었다. *N. gruberi* 영양형 1 × 10⁵개 접종시에는 각각 29.68 ± 1.69, 19.45 ± 0.73, 22.50 ± 1.21%이었다.

A. culbertsoni 영양형 1 × 10³을 마우스에 접

종한 후 단세포 독성검사를 시행한 결과, 표적세포 결합능은 접종후 1일, 2일, 5일째에 각각 30.21 ± 4.02, 25.20 ± 4.81, 26.69 ± 1.27%이었고 영양형 1 × 10⁵개 접종시에는 37.96 ± 3.21, 28.26 ± 2.09, 28.27 ± 0.80%이었다.

대조군에서의 표적세포 결합능은 접종후 1일, 2일, 5일째에 22.76 ± 0.84, 26.27 ± 1.99, 27.97 ± 2.18%이었다. *N. fowleri* 1 × 10⁵개 감염군과 *A. culbertsoni* 1 × 10⁵개 감염군에서 표적세포 결합능은 접종후 1일째 대조군과 유의한 차이가 있었다(p < 0.05)(Fig. 3).

Agarose petri dish에서 3시간동안 배양하였을 때 활성 자연살세포는 *N. fowleri* 영양형 1 × 10⁴개 접종시 활성 자연살세포는 각각 7.81 ± 0.63, 5.84 ± 0.27, 4.82 ± 0.32%이었고 *N. fowleri* 영양형 1 × 10⁵개 접종시에는 각각 11.37 ± 1.

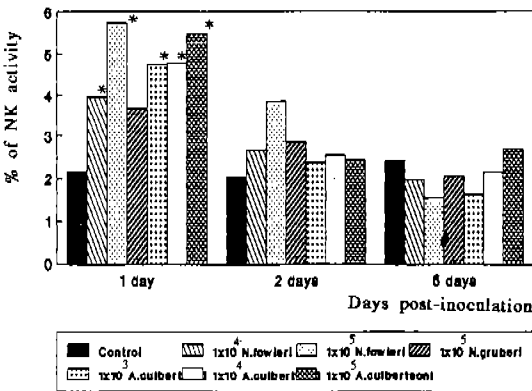


Fig. 2. Natural killer cell cytotoxic activity against YAC-1 target cells in mice infected with free-living amoebae.** *p < 0.05 versus control

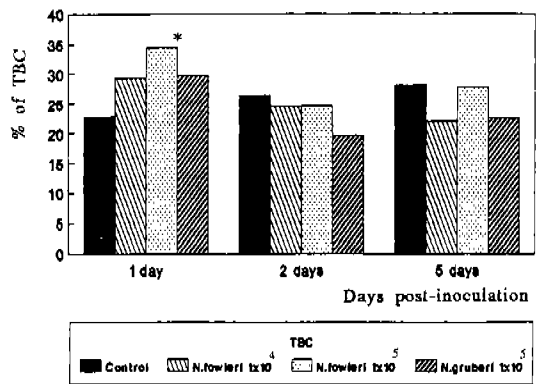


Fig. 3. Target binding capacity by single cell cytotoxicity in mice infected with free-living amoeba.** *p < 0.05 versus control

17, 6.32 ± 1.30 , $5.32 \pm 0.51\%$ 이었으며 *N. gruberi* 영양형 1×10^5 개 접종시에 활성 자연살세포는 각각 7.67 ± 0.53 , 6.18 ± 0.54 , $5.89 \pm 0.35\%$ 이었다. *A. culbertsoni* 영양형 1×10^3 개 접종시에는 1일, 2일, 5일째에 각각 10.21 ± 0.82 , 7.07 ± 1.21 , $7.41 \pm 0.89\%$ 이었고 *A. culbertsoni* 영양형 1×10^5 개 접종시에는 각각 13.23 ± 1.06 , 7.96 ± 0.76 , $7.35 \pm 0.42\%$ 이었다.

대조군에서의 활성 자연살세포 접종후 1일, 2일, 5일째에 각각 5.27 ± 0.16 , 5.44 ± 0.26 , $5.87 \pm 0.26\%$ 이었으며, *N. fowleri* 1×10^5 개 감염군과 *A. culbertsoni* 감염군 모두에서 접종후 1일째 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다($p < 0.05$) (Fig. 4).

3) 자연살세포 최대 독성능의 측정: 자연살세포 최대 독성능(V_{max})은 *N. fowleri* 영양형 1×10^4 개 접종시에는 접종후 1일, 2일, 5일째에 각각 840.34 ± 38.79 , 671.94 ± 59.21 , 609.76 ± 55.92 이었다. *N. fowleri* 영양형 1×10^5 개 접종시에는 각각 950.57 ± 78.47 , 761.57 ± 69.47 , 459.35 ± 29.34 이었고 *N. gruberi* 영양형 1×10^5 개 접종시에는 각각 845.09 ± 48.34 , 706.12 ± 79.21 , 516.69 ± 107.66 이었다. *A. culbertsoni* 영양형 1×10^3 개 접종시에 자연살세포의 최대 독성능은 접종후 1일, 2일, 5일째에 각각 943.40 ± 151.32 , 714.29 ± 25.78 , 801.07 ± 87.31 이었고 *A. culbertsoni* 영양형 1×10^5 개 접종시에는 각각 $1,048.58 \pm 56.12$, 788.77 ± 46.29 , 780.13 ± 66.73 이었다.

대조군에서의 자연살세포 최대 독성능은 접종후 1일, 2일, 5일째에 각각 637.24 ± 25.20 , 703.12 ± 66.20 , 690.21 ± 90.13 이었다. 실험군 모

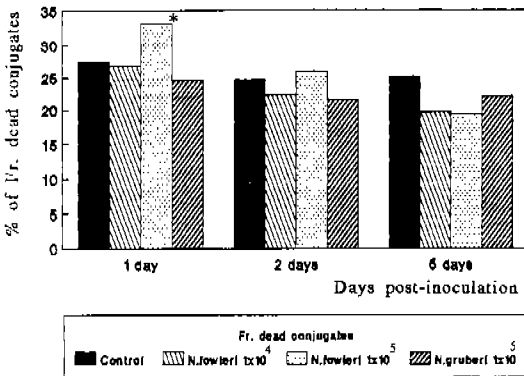


Fig. 4. Fraction of dead conjugates by single cell cytotoxicity in mice infected with free-living amoeba. ** * $p < 0.05$ versus control

두에서 V_{max} 값은 대조군과 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 6).

4) 최대 재순환능의 측정: 최대 재순환능은 *N. fowleri*의 영양형 1×10^4 개 접종시에는 각각 1일, 2일, 5일째에 1.08 ± 0.06 , 1.30 ± 0.22 , 1.26 ± 0.18 이었다. *N. fowleri*의 영양형 1×10^5 개 접종시에는 각각 0.84 ± 0.07 , 1.06 ± 0.16 , 0.86 ± 0.06 이었다. *N. gruberi* 영양형 1×10^5 개 접종시에 최대 재순환능은 경과 시간별로 1.10 ± 0.09 , 0.98 ± 0.15 , 0.88 ± 0.28 이었다. *A. culbertsoni* 영양형 1×10^3 개 접종시 각각 1일, 2일, 5일째에 0.93 ± 0.15 , 1.01 ± 0.37 , 1.07 ± 0.12 이었고 *A. culbertsoni* 영양형 1×10^5 개 접종시에는 각각 0.79 ± 0.08 , 0.99 ± 0.17 , 1.06 ± 0.17 이었다.

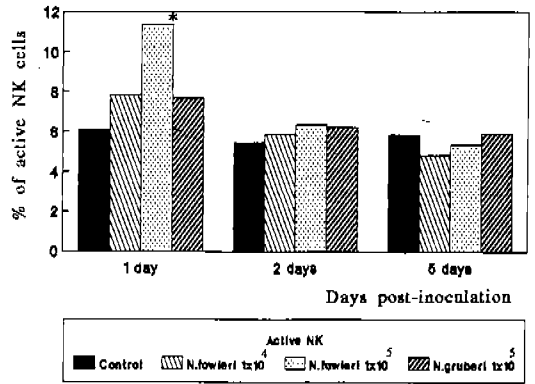


Fig. 5. Active NK cells by single cell cytotoxicity in mice infected with free-living amoeba. ** * $p < 0.05$ versus control

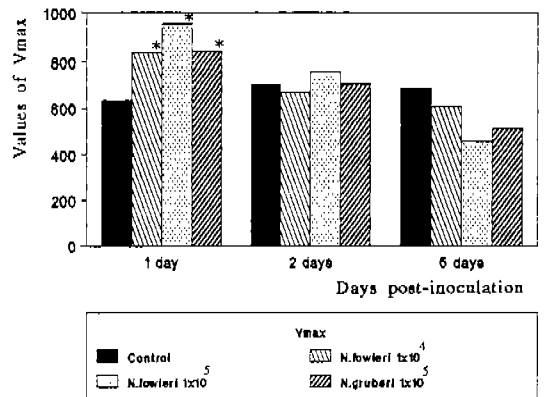


Fig. 6. Values of V_{max} of natural killer cell in mice infected with free-living amoeba. * $p < 0.05$ versus control

대조군에서는 생리식염수 접종후 1일, 2일, 5일 째에 각각 1.21 ± 0.15, 1.11 ± 0.18, 1.18 ± 0.35이었으며 실험군 모두에서 대조군과 비교하여 차이가 없었다(Fig. 7).

자연살세포 독성과 표적세포 결합능, 활성 자연살세포, 최대 독성능 및 재순환능간에 상관관계를 살펴본 결과, 자연살세포와 표적세포 결합능, 활성 자연살세포, 최대 독성능은 매우 높은 상관관계를 나타내었으며, 재순환능은 상관관계가 없었다 (Table 3).

고 찰

자유생활아메바에 의한 인체의 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)이 Derrick(1948)에 의해 처음 보고된 이래 자유생활아메바에 대한 병리학적 및 임상적인 연구가 활발히 이루어지고 있다.

자연살세포의 활성도가 원충류에서 여러 사람들에 의해 보고되고 있으며, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Babesia* 및 *Plasmodium* 감염에서 자연살세포의 세포독성의 활성도가 보고되었다

(Clark and Allison, 1974; Trischman et al., 1978; Hatcher and Kuhn, 1981 a,b).

Hatcher and Kuhn (1981, a,b., 1982) 및 Hatcher et al. (1981)은 *Trypanosoma cruzi*로 감염시킨 비장세포로 부터 얻은 자연살세포가 시험관내 실험에서 *T. cruzi*의 epimastigote와 혈액내에 존재하는 trypomastigote를 직접 파괴함을 보고하였다. 이러한 연구 결과에 따라 자연살세포의 세포독성의 변동이 병리 변화의 진행 과정과 서로 어떤 상관 관계가 있는가에 대한 질문이 야기되었고 이에 대한 연구도 많이 이루어졌다(Serdengecti et al., 1981; Hauser et al., 1982; Leung et al., 1982; Jensen et al., 1982).

자연살세포의 세포독성이 병변의 상태에 따라 어떻게 발현되는가에 대해서는 자연살세포의 활성화로 virus 혹은 기생충에 감염된 세포를 직접 살해하여 만성감염으로 진행되는 것을 막고, 항 virus의 활성을 나타내는 α -interferon이나 interleukin-2와 같은 lymphokine을 분비하여 항원에 특이한 면역반응을 활성화하여 숙주의 방어기능에 일익을 담당할 수 있을 것으로 추측하였다(Herberman and Ortaldo, 1981; Matheson et al., 1981). 또한 자가면역 질환에서 보는 것처럼 그 방어 조절에 실패해서 만성적인 질환상으로 진행되는 경우도 있을것이다(Herberman and Ortaldo, 1981; Kato and Minagawa, 1981; Timonen et al., 1981). 이러한 예들이 비악성 종양 질환(non-malignant disease)시에도 많이 보고되었는데(Welsh, 1980; Pross et al., 1982) 이러한 자연살세포의 세포독성이 대부분의 경우 질환의 병적상태와는 잘 일치되지 않는것으로 보고되고 있으나, 자유생활아메바에 의한 급성질환의 경우 초기에는 자연살세포의 세포독성이 증가하고 시일이 지날수록 정상보다 낮은 수준으로 감소하여 가장 병변이 활발하게 진행되는 시기에는 자연살세포의 세포독성이 가장 낮은것으로 보고되고 있으며, 이외에도 *T. cruzi* 감염증의 급성기에 있어서도 초기에는 자연살세포의 활성도가 증가하였다가 수일 후 감소하는 것으로 보고된 바 있다(Hatcher et al., 1981). 자연살세포의 세포독성의 발현은 玄東根(1991)이 비교적 아급성 진행을 나타내는 *A. culbertsoni* 감염시

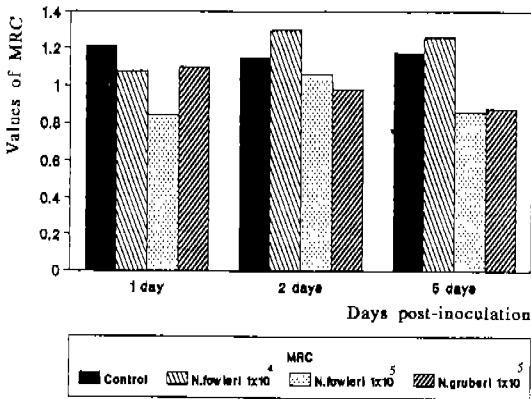


Fig. 7. Maximal recycling capacity of natural killer cells in mice infected with free-living amoeba.

Table 3. Correlation matrix between NK activity, TBC, Active NK cells, Vmax and MRC infected with *N. fowleri* 1 × 10⁵ trophozoites

	NK activity	TBC	Active NK cells	Vmax	MRC
NK activity	1.00				
TBC	0.63	1.00			
Active NK cells	0.91	0.89	1.00		
Vmax	0.99	0.57	0.88	1.00	
MRC	-0.03	-0.79	-0.44	-0.05	1.00

아메바 접종 후 10일까지 자연살세포의 세포독성을 측정하였으나 접종 후 1일에 자연살세포의 세포독성이 가장 높이 올라간 후 그 후 점차 감소하여 접종 후 5일 이후에는 대조군과 유의한 차이가 없는 것으로 보아 질환의 급성 혹은 만성 진행 과정과는 상관관계가 없이 병원체가 자연살세포를 활성화시킬 수 있는지의 여부만 다를것으로 생각된다 (Leung et al., 1982; Jensen et al., 1982). 초기에 자연살세포의 세포독성이 증가되는 것은 항원에 의해 γ -interferon과 같은 lymphokine의 분비의 증가 및 일시적인 면역기능의 활성화때문으로 생각되며, 질환이 만성으로 진행될수록 혈청내에 circulating immune complex가 생성되고 이들이 표적세포들에 결합하여 자연살세포가 결합할 수 있는 표적세포들을 감소시킴으로써 자연살세포의 세포독성을 감소시킬수 있을 것이다. 또한 단핵세포에서 생성된 prostaglandin E₂에 의해 T세포에서 interleukin-2의 분비를 감소시켜 간접적으로 자연살세포의 세포독성을 억제시킬수 있을 것으로 사료된다.

아메바 감염후 5일째에 자연살세포의 활성도가 가장 낮게 나타난 것은 수막뇌염이 가장 활발히 진행되는 시기로 자연살세포 기능이 손상을 입어 자연살세포의 수 혹은 표적세포에 부착할 수 있는 능력이 감소되거나 살해 능력에 이상이 왔기 때문으로 생각된다.

급성진행을 보이는 *N. fowleri*와 비교적 만성진행 과정을 보이는 것으로 알려진 *A. culbertsoni* 감염군 간에 사망율 및 생존기간의 차이가 뚜렷하게 나타나지 않은 것은 실험실내에서의 오랫동안 유지된 계대배양으로 *N. fowleri*의 병원성의 정도가 많이 약해졌기 때문으로 생각되며, 병원성 자유생활아메바인 *N. fowleri*와 *A. culbertsoni*를 감염량을 달리하였을 때 자연살세포의 활성도의 차이는 아메바 감염량간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었으며, 비병원성 자유생활아메바인 *N. gruberi*와 병원성 자유생활아메바인 *N. fowleri*간에는 자연살세포의 활성도가 통계학적으로 유의하게 병원성 자유생활아메바 감염군에서 증가하였다.

단세포 독성검사에서 표적세포 결합능은 자연살세포의 세포독성이 높아짐에 따라 15%-40% 사이에서 증가하였음을 알 수 있었으며 활성 자연살세포는 표적세포와 결합한 세포들 중에 5%-14% 정도를 차지하였고, 최대 독성능인 Vmax도 전체 자연살세포의 세포독성 결과와 서로 잘 일치되었다. 최대 재순환능은 감염 경과시간에 따라 대조군과 비교하여 비슷한 수준을 보였으며 최대 재순환능이 대조군과 비교하여 차이를 보이지 않았다는 것으로 미루어보아 자유생활아메바 감염에 의해 자연살세포의 운동성과 재순환능에 필요한 생리적 기능에는 손상이 없었음을 추측할 수 있었다.

또한 아메바의 감염량을 달리하여 병원성 정도의 차이를 유발시키고, 또한 감염시 급성과 아급성, 비병원성의 진행을 보이는 다른종의 아메바를 감염시켜 병원성의 차이를 유발시켜 그에 따른 자연살세포의 활성도를 측정할 결과, 비교적 급성을 나타내는 *N. fowleri* 감염군과 아급성 진행을 보이는 *A. culbertsoni* 감염군 모두 자연살세포가 아메바 접종 후 1일째에 활성화되었고 단세포 독성검사를 통한 표적세포결합능, 활성 자연살세포 및 최대 재순환능의 활성도의 차이도 뚜렷하지 않았다. 아메바의 감염량을 달리했을 때에도 자연살세포의 활성도에는 차이를 보이지 않았다. 따라서 병원성 자유생활아메바의 접종으로 인한 자연살세포의 활성도는 자연살세포를 활성화시킬 수 있는 최소량의 아메바 일정수 이상이면 자연살세포의 세포독성 정도에는 차이가 없는 것으로 생각된다(all or none). 따라서 앞으로 병원성에 따른 자유생활아메바 감염군의 면역기전의 차이를 밝히기 위한 좀더 체계적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

金明俊, 慎珠玉, 任敬一 (1989) *Acanthamoeba culbertsoni* 감염에 있어 세포 매개성 면역. 기생충학잡지 **28**(3): 143-154.

李圭來, 慎珠玉, 任敬一 (1990) *Naegleria fowleri*가 자연살세포의 활성화에 미치는 영향. 기생충학잡지 **29**(3): 267-277.

玄東根, 慎珠玉, 任敬一 (1991) *Acanthamoeba culbertsoni* 감염에 있어 자연살세포의 활성화. 기생충학잡지 **30**(2): 101-112.

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

Cikes M, Friberg S, 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 IA, Allison AC (1974) *Babesia microti* and *Plasmodium berghei yoelii* infections in nude mice. *Nature* **252**: 318-325.

Derrick EH (1948) A fatal case of generalized amebiasis due to a protozoan closely resembling, if not identical with, *Iodamoeba butschlii*. *Trans Roy Soc Med Hyg* **42**: 191-198.

Duke RC, Chervenak R, Cohen JJ (1983) Endogenous endonuclease induced DNA fragmentation; an early event in cell mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 6361-6364.

Grimm EA, 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.
- Hatcher FM, Kuhn RE (1981a) Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science* **218**: 295-296.
- Hatcher FM, Kuhn RE (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 FM, Kuhn RE, Cerrone MC, Burton RC (1981) Increased natural killer cell activity in experimental american trypanosomiasis. *J Immunol* **127**: 1126-1130.
- Hauser WE, Sharma SD, Remington JS (1982) Natural killer cells induced by acute and chronic *Toxoplasma* infection. *Cell Immunol* **69**: 330-334.
- Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH (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 RB, Ortaldo JR (1981) Natural killer cells: Their role in defenses against disease. *Science* **214**: 24-30.
- Jensen J, Thestrup-Pedersen K, From E (1982) Natural killer cell activity in syphilis. *Arch Derm Res* **272**: 163-167.
- Kato T, Minagawa, T (1981) Enhancement of cytotoxicity of human peripheral blood lymphocytes by interferon. *Microbiol Immunol* **25**: 837-842.
- Kiessling R, Klein E, 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.
- Leung DYM, Siegel RL, Grady S, Krensky A, Meade R, Reinherz EL, Geha RS (1982) Immunoregulatory abnormalities in mucocutaneous lymph node syndrome. *Immunopathology* **23**: 100-105.
- Martinez AJ, Duma RJ, Nelson EC, Morreta PL (1973) Experimental *Naegleria* meningo-encephalitis 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.
- Pross HF, Pater J, Dwosh I, Giles A, Galliner LA, Rubin P, Corbett WEN, Galbraith P, Baines MG (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.
- Roder JC, Kiessling R, Biberfeld P, 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.
- Serdengeci S, Jones DB, Holdstock G, Wright R (1981) Natural killer activity in patients with biopsy-proven liver disease. *Clin Exp Immunol* **45**: 361-367.
- Timonen T, Ortaldo JR, Herberman RB (1981) Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* **153**: 569-573.
- Ulberg M, Jondal M (1981) Recycling and target binding capacity of human natural killer cells. *J Exp Med* **153**: 615-628.
- Welsh RM (1980) Natural killer cells in virus infections. In current topics in microbiology and immunology. Hällér O Ed Springer-Verlag Berlin 739-748.
- Willaert E (1975) Recherches immunotaxonomiques comparees sur les amibes du groupe "Limax". Acad R Sc Outre-Mer Mem Class Sc Nat Med.

= Abstract =

Natural killer cell activity in mice infected with free-living amoeba
with reference to their pathogenicity

Kee-Hyuck Kim, Chu-Og Shin and Kyung-il Im*

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

The purpose of this observation was to investigate the natural killer cell activities in mice infected with pathogenic free-living amoeba, *Naegleria fowleri* and *Acanthamoeba culbertsoni* according to the infection doses, and infected with non-pathogenic free-living amoeba, *Naegleria gruberi*. The natural killer cell activity was examined by means of target binding capacity, active NK cell and maximum recycling capacity of the mice after inoculating free-living amoebae with low and high doses.

The mice infected with 1 10³, 1 10⁵ *A. culbertsoni* trophozoites showed mortality rates of 6.9% and 65.5%, respectively. The mice infected with 1 10⁴, 1 10⁵ *N. fowleri* trophozoites showed mortality rates of 5.9% and 72.2%, respectively. The NK cell activities in all experimental groups increased significantly on day 1 after infection as compared with control group, and then remarkably declined thereafter, there was no difference of the cytotoxic activity of the NK cells in mice among inoculation doses of pathogenic free-living amoebae. The target binding capacities of NK cells and percentages of activated NK cells in mice infected with pathogenic free-living amoebae were significantly increased a day after infection, as compared with control group. There was no difference of the maximal recycling capacities of NK cells in all experimental groups as compared with control group. There was significant difference in the cytotoxic activity and single cell cytotoxicity of NK cells between the experimental groups infected with pathogenic free-living amoebae and that infected with non-pathogenic free-living amoebae.

Key words: Free-living amoebae, pathogenicity, natural killer cell activity, single cell cytotoxicity

[Korean J Parasit., 31(3): 239-248, September 1993]

* Corresponding author