

Naegleria fowleri 감염 마우스에 있어서 interleukin-2 생성 및 T 림프구 아형변동

유철주, 신주옥, 임경일*

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

국문초록: 원발성 아메바성 수막뇌염을 야기하는 *Naegleria fowleri*를 사망율에 따라 1×10^4 개 아메바 영양형 접종군과, 1×10^5 개 아메바 영양형 접종군으로 나누어 비장세포를 비특이 mitogen인 phytohemagglutinin(PHA)과 특이항원인 *N. fowleri* lysates로 자극하여 T 세포의 interleukin-2 생성정도를 측정하고 T 림프구의 아형 및 아세포화정도를 측정한 결과, *N. fowleri* 아메바 영양형 1×10^5 개 접종군에서의 마우스 사망율은 72.2%였으며 1×10^4 개 접종군에서의 마우스 사망율은 14.3%였다. 또한 IL-2 생성정도를 접종후 7, 14, 24일째 측정한 결과, 접종 후 14일째에는 두 실험군 모두에서 대조군과 비교하여 IL-2의 생성이 유의하게 감소하였으며 접종 후 24일째에는 두 실험군 모두에서 접종 후 14일째 보다는 증가하였으나 대조군과 비교하여 유의하게 억제되었다. 비장세포내 T 림프구 아형의 변동은 전체 비장 림프구에 대한 Thy-1.2⁺ T, L3T4⁺ T, Ly2⁺ T 세포는 *N. fowleri* 아메바 영양형 1×10^5 개 접종군에서 접종 후 7일째 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였고 접종 후 14일째와 24일째에는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다. 아메바 영양형 1×10^4 개를 접종시킨 실험군은 경과 일수에 관계없이 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다. 비장세포내 T 세포의 DNA의 분획을 관찰한 결과, 두 실험군 모두에서 접종 후 7일째에 S phase 분획이 가장 높이 증가하였으며 접종 후 14일과 24일째에도 대조군에 비하여는 유의하게 증가하여 있었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, *N. fowleri*를 사망율을 기준으로 접종량을 달리하여 아메바 영양형 1×10^4 개 접종군과 1×10^5 개 접종군으로 나누어 접종하였을 때, 접종 후 7일을 전후하여 IL-2를 매개로 활성화되는 세포매개성 면역이 *N. fowleri* 감염의 방어기작으로 작용하는 것으로 생각되며 아메바 접종 후 14일째에는 치명적인 수막뇌염으로 진행되어 비장세포의 IL-2의 생성능력이 매우 억제된 것으로 생각된다. 또한 IL-2 생성능력과 T 세포의 아세포화의 증가 및 T 세포 아형의 수의 변동과는 잘 일치되지 않는 것으로 나타났다.

서 론

원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis)의 인체 감염예가 Derrick (1948)에 의해 보고되었으며 자유생활아메바인 *Naegleria* 속과 *Acanthamoeba* 속이 수막뇌염의 원인 원충으로 알려졌다(Carter, 1968).

마우스 비장내로 *N. fowleri*를 감염시킬 경우 인체에서와 같은 원발성 아메바성 수막뇌염을 유발하는 것으로 밝혀진 후 아메바성 수막뇌염 발생시 발현되는 숙주의 체액성 면역반응(Ferrante and Thong, 1979; Curson et al., 1980; Rowan-Kelly

et al., 1980)과 세포매개성 면역반응에 대해서도 많은 연구가 진행되어 왔으며(Curson et al., 1980; Ferrante and Smith, 1984), 원충 총체의 분비물이 인체 또는 마우스 림프구를 활성화시킴이 여러 종류의 원충에서 알려졌다(Diamanstein et al., 1981; Selkirk et al., 1981; Hay et al., 1985).

Ferrante and Smith(1984)는 *N. fowleri* lysates가 T 세포 mitogen임을 보고하였으며 朴光敏(1987)도 *N. fowleri* 감염에 의한 세포매개성 면역반응에 관한 연구에서 T 세포 기능의 저하를 보고한 바 있다.

인체 Interleukin-2(IL-2)는 활성화된 T 림프구에서 생성되며 15,420 dalton의 당단백질로서 133개의 아미노산으로 구성되어 있다(Morgan et al., 1976). IL-2의 역할은 표적세포의 세포증식 뿐만 아니라 다른 lymphokine의 생성을 자극하는 역할

* 접수 1993년 7월 2일, 수정재접수 7월 31일

* 별책 요청 저자

도 하며 자연살해세포의 활성화 및 B세포의 분화, 증식에도 관여하며 또한 tumor necrosis factor (TNF) 및 interferon- γ 의 생성을 유발시키며 면역조절 작용에 관여한다(Farrar et al., 1982; Svedersky et al., 1984).

IL-2는 자유생활아메바 성장에 억제작용을 나타내나 lymphokine의 직접적인 작용보다는 lymphokine이 대식세포를 활성화시켜 아메바 성장 억제에 관여하리라고 하였다(Ferrante, 1991). 또한 Phytohaemagglutinin(PHA)로 자극된 인체의 단핵세포로부터 다량의 TNF- α 를 얻을수 있고 이것이 증성구를 자극하여 아메바를 죽이는 것을 관찰하여 *N. fowleri* 감염에서의 lymphokine의 중요성을 시사하였다(Ferrante, 1991). Suzuki et al.(1984)은 *Toxoplasma gondii*를 감염시킨 마우스에서 interferon- α 가 *T. gondii* 감염에 의한 뇌수막염 발생 억제에 관여한다고 하였다.

이와같이 원충 감염에서 세포매개성 면역반응과 밀접한 관계를 가지고 있는 lymphokine들에 대한 연구가 최근 활발히 이루어지고 있으나 주로 대식세포와 관계된 연구이며 T 림프구와 직접 관계된 IL-2에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *N. fowleri* 감염 마우스의 IL-2의 생성정도를 관찰하고 비장세포 T 림프구의 아세포화 정도 및 이에 관련되는 T 세포의 아형분석을 면역화학적 염색에 의한 방법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 6-8 주된 C3H/HeN 마우스를 한국 과학기술원 생물학 검정실에서 공급받아 통상적인 방법으로 사육하면서 암수 구별없이 실험에 사용하였다.

2. 자유생활아메바의 배양

Naegleria fowleri ITMAP 359를 37°C 5% CO₂ 항습항온기(NAPCO, Portland, Oregon) 내에서 CGVS배지(Willaert, 1975)를 사용하여 무균적으로 계대 배양하였다.

3. 자유생활아메바의 접종

마우스 체중 g당 secobarbital 0.06 mg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후 아메바 영양형을 5 μ l 생리식염수에 포함시켜 오른쪽 비강 내로 떨어뜨려 접종시켰다. 실험 대조군은 생리식염수를 비강내로 떨어뜨려 접종하였다. 아메바 접종후 20일까지 사망율과 생존기간을 관찰하였고, 마우스가 사망 또는 사망직전에 뇌조직의 일부를 떼어내어 배지에 넣어 배양하여 아메바 영양형의 생존여부 및 병리학적 조직변화를 관찰하였다. 접종량에 따라 마우스의 사망율이 20% 내외, 70%가 되도록 아메바 영양형의

접종수를 결정한 후, 각각 1 \times 10⁴개, 1 \times 10⁵개의 아메바 영양형을 접종시킨 군으로 나누었다. *N. fowleri* 접종에 의한 마우스의 활동성 및 병리조직 변화를 7일, 14일, 24일로 나누어 관찰하였다.

4. *Naegleria fowleri* lysate의 제조

배양된 아메바 영양형을 RPMI 1640 기본배지(이하 RPMI 불완전배지)로 2-3회 세척 후 초음파 분쇄기로 아메바 영양형을 파괴시키고 4°C, 20,000 g로 2시간 원심 침전한 후 상층액을 취하여 0.2 μ m pore size의 membrane filter로 여과하여 사용하였다. 단백질 함량은 Lowry et al.(1951)의 방법에 의하여 측정하였다.

5. 마우스 비장 림프구 분리

마우스를 접종후 7일, 14일, 24일에 희생시킨 후 비장을 무균적으로 저출하여 10% 우태아 혈청, L-glutamine(2 mM/ml), penicillin(100 unit/ml) 및 streptomycin(100 μ g/ml), 10 mM HEPES(N-[(2-Hydroxy ethyl piperazine-N)-(2-ethane sulfonic acid)])를 함유시킨 RPMI 1640 배지(RPMI 완전배지)로 비장세포 부유액을 만든다. 이 부유액을 Ficoll-Hypaque(Pharmacia Fine Chemicals Ltd., Piscataway, NJ) 용액에 중첩하여 500 g로 30분간 원심시켜 단핵세포를 취하여 spectra mesh(30 μ m)로 여과하여 다음 실험에 사용하였다.

6. Crude interleukin-2 생산

비장 림프구 부유액(1 \times 10⁶세포/ml)을 24 well plate(Nunc, Vangard, Neptune, NJ)에 100 μ l씩 분주후 PHA와 특이 항원인 *N. fowleri* lysate를 각각 20 μ g/ml, 10 μ g/ml의 농도로 첨가한 후 37°C 5% CO₂ 항습항온기에서 무균적으로 48시간 배양하였다. 배양후 상층액을 수거하여 원심한 뒤 0.2 μ m membrane filter(Gelman Science, MI)로 여과하여 IL-2 정량실험에 사용하였다.

7. Interleukin-2 정량

IL-2 정량은 Gillis et al.(1978)의 microassay 방법에 따라 측정하였다. 비장 림프구 배양상층액을 2배 희석법으로 희석하여 96 well U bottomed microtiter plate(Costar, U.S.A.)에 100 μ l씩 넣은 뒤 RPMI 완전배지에 5 \times 10⁴세포/ml로 CTLL-2 세포를 부유시켜 100 μ l씩을 넣어 37°C 5% CO₂ 항습항온기에서 배양하였다. CTLL-2 세포는 10 units/ml의 마우스 recombinant IL-2(rIL-2, Collaborative Research, U.S.A.)와 2-mercaptoethanol 10⁻⁵ M을 RPMI 완전배지에 첨가하여 배양 3일후에 RPMI 1640 불완전배지로 2회 세척하였다. 배양 24시간 후 0.1 mCi/ml의 ³H-

TdR(Amersham, England)을 10 μ l씩 각 well에 첨가하여 다시 6시간 동안 배양하였다. 그 후 세포 수확기(Titertek, U.S.A.)로 glass fiber filter(Flow Lab, U.S.A.)에 세포를 흡착시켜 실온에서 건조한 후 scintillation cocktail(xylene 1,000 ml, popop 0.1 g, ppo 5 g) 용액 2 ml에 용해시켜 liquid scintillation counter를 사용하여 방사능을 측정하였다. IL-2를 정량하기 위하여 마우스 rIL-2를 사용하였다.

8. 비장 T세포의 아세포화 측정

Johnstone and Thorpe(1982)의 방법을 이용하여 T 림프구만을 분리하였다. Nylon fiber(3 denier, 1.5 inchi, type 200)를 0.2 N hydrochloric acid에 10분간 담근 후 증류수로 세척하고 건조하였다. 2 ml 주사기에 1.2 ml 눈금까지 되도록 nylon fiber 0.12 gm을 넣은 후 5% 우태 아혈청이 포함된 RPMI 1640 배지를 넣어 통과시켰다. 0.5 ml 비장세포 부유액을 주사기에 넣고 다시 배지 0.5 ml을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 그후 배지를 1분당 1 ml씩 3-4 ml를 주사기에 넣어 T 림프구를 분리하였다. Citrate buffer (250 mM sucrose, 40 mM trisodium citrate; pH 7.6) 200 μ l에 T 림프구를 부유하고 1.8 ml의 용액 A(Trypsin 15 mg, stock solution 500 ml)을 첨가하고 10분간 실온에서 혼합하였다. 1.5 ml의 용액 B(Trypsin inhibitor 250 mg, Ribonuclease A 50 mg, Stock solution 500 ml)을 첨가하고 다시 10분간 흔들면서, 마지막으로 1.5 ml의 용액 C(Perpidium iodide 208 mg, Spermine tetrahydrochloride 500 mg, Stock solution 500 ml)을 첨가하고 혼합하였다. Stock solution(pH 7.4)의 성분은 34 mM Trisodium citrate, 0.1% (v/v) Nonidet P40, 1.5 mM Spermine tetrahydrochloride, Tris 0.05 mM로 제조하였다. FACS(Fluorescent activated cell sorter: Beckton Dickinson, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 이용하여 DNA 합성기 분석을 측정하였다.

9. 면역화학적 염색에 의한 림프구 아형 관찰

마우스 비장 림프구를 인산 완충용액(pH 7.4)에 2 \times 10⁶/ml개로 단핵세포를 부유시킨 뒤, 림프구 부유액 50 μ l(1 \times 10⁵개의 세포)와 5 μ l FITC-conjugated monoclonal antibody(anti-mouse Thy-1.2, anti-mouse L3T4, anti-mouse Ly2, Serva Feinbiochemica, Germany)와 각각 혼합하였다. 일광 차단후 4°C에서 30분간 반응시켰으며 그후 동일 완충용액으로 2회 세척하여 1% (w/v) paraformaldehyde로 고정하여 4°C에서 보관하였다. 림프구 아형분석은 고정 후 24시간 이내에 FACS로 분석하였다.

림프구 중 단크론항체에 결합된 아군의 형광은 green filter(515-550 nm 파장, 투과성 75%)에 선택적으로 감지되었으며 consort 30 computer program(Becton-Dickinson Immunocytometry System, Sunnyvale, CA, U.S.A.)을 이용하여 histogram 상에서 전체 림프구에 대한 백분율로 계산하였다.

결 과

1. *N. fowleri* 접종에 의한 마우스의 사망률

N. fowleri 아메바 영양형 1 \times 10⁴개를 접종시킨 마우스 사망율은 감염 후 20일까지 14.3%였다. 한편 *N. fowleri* 아메바 영양형 1 \times 10⁵개를 접종시킨 마우스의 사망율은 접종후 20일까지 72.2%였으며 대조군의 마우스는 사망하지 않았다(Fig. 1).

2. *N. fowleri* 접종에 의한 마우스의 활동성 및 병리조직 변화 관찰

아메바 영양형 1 \times 10⁵개 접종군: 접종후 7일째의 마우스의 육안적 소견으로 대부분의 마우스의 후뇌에서 염증세포를 발견할 수 없었으나 조직의 병리변화는 일부 마우스의 뇌조직에서 급성 염증세포의 침윤을 볼 수 있었다. 뇌조직의 염증세포 일부를 떼어내어 CGVS 배지에 넣어 배양한 결과, 아메바 영양형을 관찰할 수 있었다. 접종 후 14일째 마우스 중 50% 이상이 비정상적인 활동성을 보였는데 자리에서 뱅뱅 돌거나 작은 충격에도 과민한 반응을 보였으며 평형감각을 상실하였다. 병리학적 변화는 급성 염증세포가 관찰되었고 염증세포 사이에서 많은 아메바 영양형이 관찰되었다. 접종한 후 24일째 되는 마우스는 대부분이 정상적인 활동성을 보였으나 대조군보다는 털이 서고 윤기가 없었다. 뇌조직

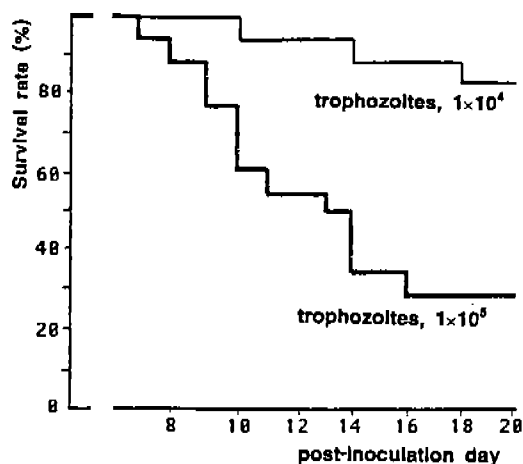


Fig. 1. Mortality of mice inoculated with *N. fowleri* trophozoites.

의 일부를 배양하였을 때 아메바 영양형은 검출되지 않았으며, 뇌조직의 병리표본에서도 염증세포는 관찰할 수 없었다.

아메바 영양형 1×10^4 개 접종군: 접종 후 7일째는 대부분이 정상적인 활동성을 보였으며 뇌의 육안적 소견 및 병리조직도 대조군과 동일하였다. 접종후 14일째는 일부 마우스가 아메바 영양형 1×10^5 개 접종군과 비슷한 양상을 보였으며 일부 마우스에서 육안으로 염증세포가 관찰되었으며 조직표본에서 급성 염증세포 사이로 아메바 영양형이 침범한 모습을 관찰할 수 있었다. 접종후 24일째의 마우스는 대조군과 동일하였으며 조직배양시 아메바 영양형을 관찰할 수 없었고 육안 및 조직표본에서도 염증세포는 관찰할 수 없었다. 두 실험군에서 아메바 접종 후 7일째에는 실험대상 마우스 선정시 무작위로 추출하였고, 아메바 접종 후 14일째에는 비정상적인 활동성을 나타내는 마우스만 그리고 접종 후 24일째에는 살아남은 마우스중 무작위로 선정하였다.

3. 비장세포의 interleukin-2 생성능력

Crude IL-2의 제조에서 비특이항원인 PHA의 적정농도는 $20 \mu\text{g/ml}$ 이었으며 특이항원인 *N. fowleri* lysates의 적정농도는 $10 \mu\text{g/ml}$ 이었다. IL-2 생성은 마우스 rIL-2의 standard curve에 준하여 본 실험에서 제조한 IL-2의 희석되지 않은 상층액의 cpm값에 해당되는 rIL-2의 unit로 환산하여 정량하였다. 대조군 비장세포에 PHA로 자극한 IL-2의 생성량은 $118.24 \pm 23.70 \text{ unit/ml}$ 이었으며 특이항원으로 자극한 IL-2의 생성량은 $95.84 \pm 20.65 \text{ unit/ml}$ 이었다.

아메바 영양형 1×10^5 개 및 1×10^4 개 접종군에서 7일째 PHA와 *N. fowleri* lysates로 자극하였을 때 비장의 IL-2 생성량은 대조군과 유의한 차이가 없었다.

접종 후 14일째 PHA와 *N. fowleri* lysates로 자극한 IL-2 양은 두 실험군 모두에서 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

접종 후 24일째에는 PHA로 자극한 1×10^5 개 접종군 및 1×10^4 개 접종군에서 비장세포의 IL-2 생성량은 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였으며 *N. fowleri* lysates로 자극한 1×10^5 개 접종군 및 1×10^4 개 접종군에서의 IL-2 생성량은 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였으며 두 실험군간에 유의한 차이는 발견할 수 없었다($p < 0.05$) (Table 1).

4. 비장세포내 T 세포 아형의 변동

Thy-1.2⁺ T 세포수의 비율: *N. fowleri*의 영양형을 마우스에 접종시킨 후 7일, 14일, 24일째에 Thy-1.2⁺ T세포의 전체 비장 림프구에 대한 비율을 측정하였다(Fig. 2). 접종 후 7일째, 대조군의 Thy-1.2⁺ T세포의 비율은 $32.95 \pm 1.13\%$ 였으며 1×10^5 개 접종군에서 비율은 $40.40 \pm 1.07\%$ 였고 1×10^4 개 접종군의 비율은 $36.72 \pm 2.24\%$ 로 1×10^5 개 접종군에서 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 접종후 14일째의 대조군의 비율은 $33.71 \pm 2.33\%$ 였으며 1×10^5 개 접종군에서는 $29.83 \pm 1.81\%$ 였으며 1×10^4 개 접종군에서는 $30.08 \pm 2.24\%$ 로 대조군의 $33.71 \pm 2.33\%$ 와 비교하여 차이가 없었다. 접종후 24일째의 대조군의 비율은 $30.94 \pm 2.45\%$ 였으며 1×10^5 개 접종군의 비율은 $33.48 \pm 2.25\%$ 였으며 1×10^4 개 접종군은 $33.76 \pm 1.72\%$ 로 대조군과 비교하여 역시 유의한 차이가 없었다.

L3T4⁺ T 세포수의 비율: 접종후 7일째의 대조군의 L3T4⁺ T세포의 비율은 $22.18 \pm 2.27\%$ 였고 1×10^5 개 접종군에서 비율은 $27.90 \pm 1.30\%$ 였으며 1×10^4 개 접종군의 비율은 $23.56 \pm 1.23\%$ 로, 1×10^5 개 접종군에서 대조군과 비교하여 유

Table 1. IL-2 production of spleen cells treated with PHA, *N. fowleri* lysates in mice inoculated with *N. fowleri* trophozoites

Mitogen	Exp. group	No. of Exp. animal	IL-2 (unit/ml)		
			7 days	14 days	24 days
PHA	1×10^5	30	163.06 ± 31.78	$33.57 \pm 8.53^*$	$63.66 \pm 9.57^*$
	1×10^4	30	91.78 ± 14.80	$30.44 \pm 10.52^*$	$60.75 \pm 8.96^*$
	Control	30	118.24 ± 23.70		
<i>N. fowleri</i> lysates	1×10^5	30	86.88 ± 14.86	$25.57 \pm 6.28^*$	$27.58 \pm 5.95^*$
	1×10^4	30	59.55 ± 11.32	$19.95 \pm 2.48^*$	$46.78 \pm 6.79^*$
	Control	30	95.84 ± 20.65		

Mean \pm S.E. *P < 0.05 versus control

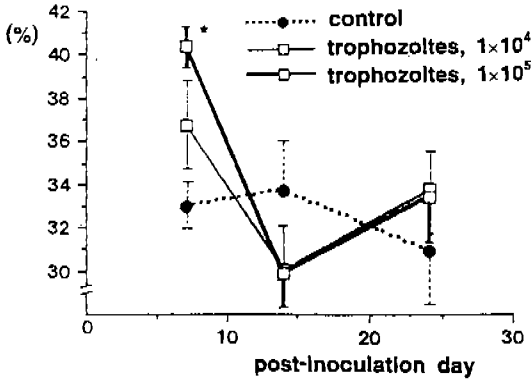


Fig. 2. The ratio of Thy 1.2+ T cells to spleen lymphocytes in mice inoculated with *N. fowleri* trophozoites.

의하게 증가하였음을 알 수 있었다($p < 0.05$). 아메바 접종 후 14일째의 대조군의 비율은 $21.57 \pm 2.18\%$ 였으며 1×10^5 개 감염군에서 $21.20 \pm 2.08\%$ 였으며 1×10^4 감염군에서는 $20.63 \pm 1.36\%$ 로 대조군의 값인 $21.57 \pm 2.18\%$ 와 비교하여 유의한 차이가 없었다. 접종 후 24일째의 대조군의 비율은 $20.72 \pm 0.86\%$ 였으며 1×10^5 개 접종군에서는 $21.58 \pm 1.31\%$, 1×10^4 접종군은 $23.48 \pm 1.10\%$ 로 대조군과 비교하여 역시 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

Ly2+ T 세포수의 비율변동: 접종 후 7일째 대조군의 Ly2+ T세포의 비율은 $14.11 \pm 1.21\%$ 였으며 1×10^5 개 접종군에서 비율은 $18.92 \pm 0.59\%$ 였으며 1×10^4 개 접종군의 비율은 $15.88 \pm 1.06\%$ 로 1×10^5 개 접종군에서 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 접종 후 14일째 대조군에서의 비율은 $13.49 \pm 0.83\%$ 였으며

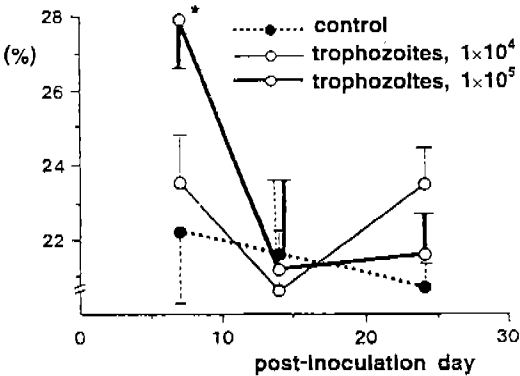


Fig. 3. The ratio of L3T4+ T cells to spleen lymphocytes in mice inoculated with *N. fowleri* trophozoites.

며 1×10^5 개 접종군에서는 $11.75 \pm 1.95\%$, 1×10^4 개 접종군에서는 $12.07 \pm 0.77\%$ 로 대조군과 비교하여 차이가 없었다. 접종 후 24일째의 대조군의 비율은 $12.68 \pm 0.68\%$ 였으며 1×10^5 개 접종군에서 $12.27 \pm 0.95\%$, 1×10^4 개 접종군은 $13.83 \pm 0.96\%$ 로 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

L3T4+ T/Ly2+ T 세포수의 비율: 접종 후 7일째, 대조군의 L3T4+ T세포/Ly2+ T세포의 비율은 1.57이었으며, 1×10^5 개 접종군은 1.48, 1×10^4 개 접종군에서의 비율은 1.48로 대조군에 비해 Ly2+ T세포의 증가가 L3T4+ T세포의 증가보다 큰 것을 알 수 있었다. 접종 후 14일째, 대조군의 비율은 1.59였으며, 1×10^5 개 접종군에서는 1.80, 1×10^4 개 접종군에서는 1.71이었다. 아메바 접종 후 24일째의 대조군의 비율은 1.63이었으며, 1×10^5 개 접종군에서의 비율은 1.76, 1×10^4 개 접종군에서의 비율은 1.70으로 나타났다(Fig. 5).

5. 비장내 T 세포의 아세포화 비율

Table 2에서 보는 바와 같이 1×10^5 개 접종군의 S 분획은 접종후 7일째 $10.41 \pm 1.42\%$ 였으며 접종 후 14일째의 S 분획은 $6.20 \pm 0.77\%$ 였고 접종 후 24일째의 값은 $4.89 \pm 0.45\%$ 로 접종 후 7일째와 14일째 대조군의 S 분획값인 $3.42 \pm 0.24\%$, $3.02 \pm 0.26\%$ 와 비교하여 유의하게 차이가 있음을 알 수 있었다. 1×10^4 개 접종군에서 접종 후 7일째의 S 분획값은 $6.91 \pm 0.89\%$ 였으며 접종 후 14일째는 $5.31 \pm 0.44\%$, 접종 후 24일째는 $4.22 \pm 0.24\%$ 로 나타났다. 접종 후 24일째의 대조군의 S 분획 값은 $2.82 \pm 0.21\%$ 로 1×10^5 개 접종군과 1×10^4 개 접종군 모두에서 접종 후 7일, 14일, 24일째에 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

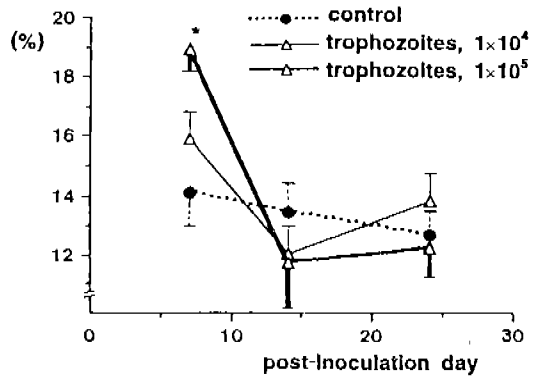


Fig. 4. The ratio of Ly2+ T cells to spleen lymphocytes in mice inoculated with *N. fowleri* trophozoites.

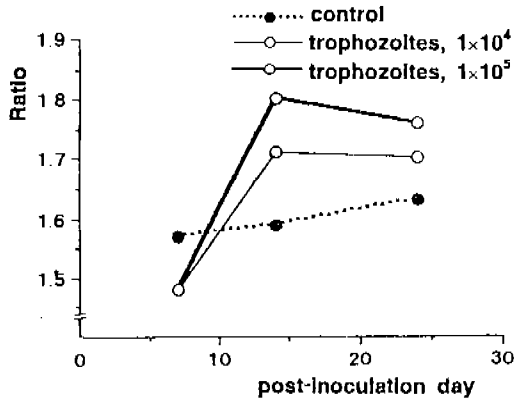


Fig. 5. The ratio of L3T4⁺ T/Ly2⁺ T cells to spleen lymphocytes in mice inoculated with *N. fowleri* trophozoites.

고찰

본 연구에서는 과거에 얻은 결과를 바탕으로 *N. fowleri*를 사망율이 20% 되도록 아메바 영양형 1 × 10⁴개 접종군과 사망율 70% 내외가 되도록 아메바 영양형 1 × 10⁵개 접종군으로 나누어 접종 후 7일, 14일, 24일째로 나누어 두 실험군 모두에서 접종 후 7일째를 아메바 감염에 의해 수막뇌염이 진행중인 시기로, 접종 후 14일째를 수막뇌염의 치명적인 상태, 접종 후 24일째를 감염후 회복기 상태로 구별하였다. 경과 시간별로 IL-2의 생성 정도와 이에 관여되는 T 림프구의 아형을 관찰하고, 또한 S phase T 세포의 분획의 비율을 측정함으로써 *N. fowleri* 감염에 의한 비장세포의 T 세포의 아세포화 정도를 측정하여 세포면역에 관여하는 주요 세포들 중 T 세포의 IL-2 생성능력 과 이에 관여하는 세포의 수적인 변화를 관찰하였다.

접종량을 달리한 두 실험군의 실험결과에서 시간별로 IL-2 생성 및 T 세포의 아세포화 측정과 T 세포의 아형분석이 비슷한 경향으로 증가 또는 감소하였다. *N. fowleri*의 감염경로는 비장을 통해 후점막과 사상관을 뚫고 후신경을 타고 중추신경계를

침범하여 괴사성 출혈성 수막뇌염을 일으키는 것으로 알려져 있는데(Martinez et al., 1973), 병원성이 약한 자유생활아메바인 *Acanthamoeba castellanii*의 경우는 비장을 통하여 감염시켰을 때 후점막을 뚫고 뇌의 피질층까지는 도달하나 그 이상은 진행이 되지 않는 것으로 알려져 있다. 그러나 뇌에 직접 영양형을 주사하였을 때에는 그 이상으로 병이 진행하게 된다. 따라서 *N. fowleri* 접종 후 24일째의 살아 남은 마우스는 *A. castellanii*를 감염시켰을 때와 같은 경로를 거칠 것으로 생각되며, 영양형이 후점막을 뚫고 뇌의 피질층까지 도달하였으나 감염초기에 숙주의 방어작용으로 인해 더 이상의 치명적인 감염은 진행되지 않고 회복되어 접종후 24일까지 생존한 것으로 생각된다.

T 세포는 살해 T 세포를 제외하고는 B 세포나 비림프구 세포를 통해 간접적으로 면역작용을 나타내며 lymphokine이 작용을 매개하는 것으로 알려져 있다. 특히 IL-2는 항원의 자극과 IL-1이라는 lymphocyte-activating factor(LAF)가 존재하면 Th1 세포에서 분비되며 항원의 자극 후에 IL-2가 생성되면 CD8⁺ 세포의 증식 및 활성화가 일어나며 CD4⁺ 세포의 경우도 autocrine mechanism에 의해 증식되는 것으로 알려져 있다. 이외에도 IL-2를 매개로 증식 또는 활성화되는 주요세포들로는 비특이적 자연살세포 활성을 나타내는 large granular lymphocyte(LGL)가 있으며 이들은 IL-2에 의해 자극이 되면 증식, 활성화되어 다른 lymphokine을 분비하는 것으로 알려져 있다(Oppenheim et al., 1987). 특히 CD4⁺/CD8⁺ 세포의 비율이 과다하게 불균형되면 IL-2의 생성이 억제되는 것으로 알려져 있는데(Oppenheim et al., 1987), 원충류에 속하는 *Trypanosoma cruzi*와 같이 감염 급성기를 보이는 경우에 IL-2 생성이 억제되는 것으로 보고되었다(Tarleton, 1991). 또한 본 실험에서 아메바 접종 후 마우스의 비장세포에서 IL-2의 생성에 관여하는 L3T4⁺ T 세포의 감소없이 IL-2의 생성이 감소되었는데 이러한 결과는 대식세포가 용해성인자를 분비하여 T 림프구의 면역기능이 저하되면 이때 IL-2 생성세포의 활성이 억제되어진 결과라고 생각된다. IL-2 생성정도가 감염시 중요한 이유에 대해 Reed

Table 2. S phase fraction of splenic T cells in mice inoculated with *N. fowleri* trophozoites

Exp. group	No. of Exp. animal	S fraction of T cells (%)		
		7 days	14 days	24 days
1 × 10 ⁵	34	10.41 ± 1.42*	6.20 ± 0.77*	4.89 ± 0.45*
1 × 10 ⁴	34	6.91 ± 0.89*	5.31 ± 0.44*	4.22 ± 0.24*
Control	34	3.42 ± 0.24	3.02 ± 0.26	2.82 ± 0.21

Mean ± S.E. *P < 0.05 versus control

et al.(1984)은 *T. cruzi* 감염시 IL-2 생성이 억제된 감염마우스에 외부에서 IL-2를 투여한 결과 면역적인 회복이 일어남을 보고하여, 이러한 결과는 IL-2 생성의 억제로 인하여 방어면역이 손상을 입을것을 알 수 있었다.

본 연구의 결과에서 접종 후 7일째의 IL-2의 생성능력은 비특이항원인 PHA와 특이항원인 *N. fowleri lysates*로 자극하였을 때 대조군에 비해 유의한 차이가 없었으며 T 세포의 아형의 수가 전체적으로 증가하는 것으로 보아 수막뇌염이 진행되는 감염초기에 세포매개성 면역이 활성화되어 항 기생충 작용에 역할을 담당할 것으로 생각된다. 또한 이 시기에 아메바 영양형 1×10^5 개 접종군에서 $L3T4^+$ T 세포와 $Ly2^+$ T 세포가 증가되었는데 이것은 항원의 자극에 의한 T 세포의 아세포화의 증가에 기인한 결과로 생각된다. 접종 후 14일째의 IL-2 생성은 대조군에 비하여 유의하게 억제되었는데, 이 시기에는 T 세포 뿐만 아니라 IL-2를 매개로 하는 여러 주요세포들의 기능이 억제되었을 것으로 생각된다. 따라서 이 시기는 수막뇌염에 의해 모든 면역 기능이 치명적인 손상을 입은 상태로 생각되나 T 세포 아형은 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았으므로 면역기능을 나타내는 세포들의 증식여부와 기능적인 면은 비특이적인 것으로 생각된다. 또한 접종 후 24일째 마우스의 IL-2 생성 능력은 접종 후 14일째보다 증가하였으나 T 세포의 아형은 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었으며 아세포화 정도는 대조군에 비하여 유의하게 증가한 것으로 보아 T 세포의 기능은 대조군에 비하여 여전히 억제되어 있는 것으로 생각된다.

원충류에 속하는 *Leishmania* 속과 *Toxoplasma* 속에 감염된 마우스나 인체에서도 감염초기, 즉 급성 감염기에 아세포화 정도가 억제되어 있음이 보고되었다(Britten and Hudson, 1986; Schurr et al., 1986). 또한 *Toxoplasma gondii*와 *Trypanosoma cruzi*에 감염된 마우스 비장세포에서 감염초기에 대조군에 비해 아세포화 정도가 감소하였다가 만성기에 점차 증가하는 것이 알려졌다(Hay et al., 1985; Britten and Hudson, 1986).

본 연구에서의 S phase 분획의 관찰조건은 아메바 영양형 1×10^4 접종군과 아메바 영양형 1×10^5 개 접종군 모두에서 감염 후 대조군에 비하여 아세포화 정도가 유의하게 증가하였는데 ($p < 0.05$). 본 실험의 결과로는 비장내 아세포화는 증가되었으나 각각의 림프구 아형들의 기능적인 면은 알 수 없었다. 이러한 원충감염시 림프구의 기능이 억제되는 것에 대해서 비장에 있는 T 림프구가 mitogen에 반응하지 않는 대식세포같은 세포로 회색되었거나 T 림프구가 이미 말초혈액으로 이동하여 blastoid세포로 변화되어 더 이상 mitogen에 반응하지 못하거나 T 림프구의 기능을 억제하는 비특

이적 억제세포, 또는 활성화된 대식세포에 의하여 면역 억제 현상이 일어난다고 하였다(Kierszenbaum, 1982; Suzuki and Kobayashi, 1984).

따라서 이상의 결과를 종합하여 볼때, *N. fowleri*를 사망율을 기준으로 아메바 영양형 1×10^4 개 및 1×10^5 개를 접종하였을 때, IL-2의 생성능력은 접종 후 7일째에는 대조군에 비해 유의한 차이가 없었으나 접종 후 14일째에는 치명적인 수막뇌염으로 진행되어 비장세포의 IL-2의 생성능력이 억제된 것으로 생각된다. 또한 IL-2 생성능력과 T 세포의 아세포화의 증가 및 T 세포 아형의 수의 변동과는 서로 상관관계를 관찰할 수 없었다. 따라서 *N. fowleri* 접종 7일 이후에 나타나는 면역억제 현상에 대해서 그 정확한 기전을 밝히는 것이 과제로 남아 있다고 하겠다.

참고문헌

金基赫, 신주옥, 임정일 (1993) 자유생활아메바의 감염량에 따른 자연살세포의 활성화도, 기생충학잡지 **31**(3): 239-248.

金明俊, 慎珠玉, 任敬一 (1990) *Acanthamoeba culbertsoni* 감염에 있어 세포 매개성 면역에 관한 연구, 기생충학잡지 **28**(3): 143-154.

朴光敏, 柳在淑, 任敬一 (1987) 실험적 뇌수막염에 있어 *Naegleria fowleri*의 항원성, 기생충학잡지 **25**(1): 1-6.

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

黃勳琦, 尹德鎮, 任敬一, 蘇鎮璋 (1976) 자유생활아메바의 병원성에 관한 실험적 연구, 연세의대논문집 **9**: 182-194.

Britten V, Hudson L (1986) Immune suppression to *Trypanosoma* immunization. *Trop Med Parasit* **37**: 97-100.

Carter RF (1968) Primary amoebic meningo-encephalitis: Clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J Path Bacteriol* **96**: 1-25.

Cursons RTM, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D (1980) Immunity to pathogenic free-living amoebae: Role of cell-mediated immunity. *Infect Immun* **29**: 408-410.

Diamanstein T, Klos M, gold D, Hahan M (1981) Interaction between *E. histolytica* and the immune system. *J Immunol* **126**: 2084-2086.

Farrar JJ, Benjamin WR, Hulfiker ML, Howard M, Farrar WL, Farrar JF (1982) The biochemistry, biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol Rev* **63**: 129-166.

Ferrante A (1991) Free-living amoebae: Pathogenicity

- and immunity. *Parasite Immunol* **13**: 31-47.
- Ferrante A, Smith C (1984) Mitogenicity of *Naegleria fowleri* extracts for murine T lymphocytes. *Immunology* **51**: 461-468.
- Ferrante A, Thong YH (1979) Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Int J Parasitol* **9**: 599-601.
- Gillis S, Ferm ME, Ou W, Smith KA (1978) T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* **120**: 2027-2032.
- Hay J, Dutton GN, Hair DM (1985) Blastogenic responses of splenic lymphocytes to toxoplasmal and retinal antigens and T and B cell mitogens in mice with congenital ocular toxoplasmosis. *Ann Trop Med Parasit* **79**(1): 113-115.
- Johnstone A, Thorpe R (1982) Immunochimistry in practice. Blackwell Sci Publ 84-92.
- Kierszenbaum F (1982) Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi* infection): Role of non-adherent, nonspecific, esterase-positive splenic cells. *J Immunol* **129**: 2202-2205.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- 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.
- Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC (1976) Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrow. *Science* **193**: 1007-1012.
- Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek CR (1987) Interleukins and interferon. In Basic and Clinical Immunology. Stites Stobo Wells, Appelton and Langer, pp 82-94.
- Reed SG, Inverso JA, Roters S (1984) Heterologous antibody responses in mice with chronic *T. cruzi* infection: depressed T helper function restored with supernatants containing interleukin 2. *J Immunol* **133**: 1558-1569.
- Rowan-Kelly B, Ferrante A, Thong YH (1980) Activation of complement by *Naegleria*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* **74**: 333-356.
- Schurr E, Kidane K, Yemaneberhan T, Wunderlich F (1986) Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia: I. Lymphocyte transformation and antibody titre. *Trop Med Parasit* **37**: 403-408.
- Schwartz RS (1971) In "Progress in Immunology" (Amos B, Ed). Academic press New York, pp 1081-1092.
- Selkirk ME, Ogilvie BM, Plattis-Mills TAE (1981) Activation of human peripheral blood lymphocytes by a trypanosome-derived mitogen. *Clin Exp Immunol* **45**: 615-620.
- Suzuki Y, Kobayashi A (1984) Macrophage-mediated suppression of immune responses in *Toxoplasma* infected mice. *Cell Immunol* **85**: 417-427.
- Svedersky LP, Shepard HM, Spencer SA, Shalaby MR, Palladino MA (1984) Augmentation of human natural cell-mediated cytotoxicity by recombinant human interleukin 2. *J Immunol* **133**: 714-718.
- Tarleton RL (1991) Minireview. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol* **73**: 106-109.
- Willaert E (1975) Recherches immuno-taxonomiques comparees sur les amibes du groupe "Limax". Acad R Sc Outre-Mer Mem Class Sc Nat Med.

=Abstract=**Interleukin-2 production and alteration of T cell subsets in mice
infected with *Naegleria fowleri***

Chuhl-Joo Lyu, Chu-Og Shin and Kyung-il Im*

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

Naegleria fowleri is the cause of primary amoebic meningoencephalitis in man. IL-2 levels after stimulation of T lymphocytes by PHA or *N. fowleri* lysates, the amounts of T lymphocyte subsets and the blastogenic responses of T lymphocytes in mice after infected with pathogenic *N. fowleri* were studied comparing between two study groups, one 1×10^4 trophozoites inoculated mice and the other 1×10^5 trophozoites inoculated mice. All experimental samples were obtained on the day 7, 14 and 24 after inoculation. The mice inoculated with 1×10^4 trophozoites showed a 14.3% mortality rate, and 72.2% in the mice inoculated with 1×10^5 trophozoites. The IL-2 levels on day 14 of two experimental groups were significantly decreased as compared with the control group. Thy 1.2⁺ T cells in the total spleen lymphocytes of 1×10^5 trophozoites inoculated group on day 7 were significantly increased compared with the control group. There was no significant difference between 1×10^4 trophozoites inoculated group and the control group. L3T4⁺ T cells and Ly2⁺ T cells in the total spleen lymphocytes of 1×10^5 trophozoites inoculated group on day 7 were significantly increased compared with the control group. The DNA S fraction of T cells in the spleen of 1×10^5 trophozoites inoculated group was significantly increased on day 7. The amount of S fractions of DNA were sequentially decreased on day 14 and 24, but they were also significantly increased compared with the control group. The results obtained in the experiments indicates that cell mediated immunity after *N. fowleri* infection acts on very important host's protection immunity around the 7th day after infection. IL-2 level was much suppressed on day 14 which resulted from the exhaustion of host immune response. It was observed that the level of IL-2 production ability and the amounts of T lymphocytes subsets and the blastogenic responses of T lymphocytes were not well correlated during the observation period.

Key words: *Naegleria fowleri*, interleukin-2, T cell subset, T cell blastogenesis

[Korean J. Parasit., 31(3): 215-220, September 1993]

* Corresponding author