

*Naegleria fowleri*로 면역된 어미에서 태어난 마우스의 방어면역 결여

延世大學校 醫科大學 寄生蟲學敎室

任 敬 一 · 李 根 泰

서 론

원충성 질환에 있어서 면역진단방법의 개발이나 이들 방법의 결점을 보완하기 위한 많은 연구가 진행되어 오고 있으나 이 질환들의 예방을 위한 연구는 아직 활발하지 못하다. Cohen(1979)은 혈액내 merozoites가 말라리아 vaccine으로써 가장 기대될 만한 것이라고 지적하였다. 어린 아이들에 있어서 모체로부터 받은 항체는 그 감염증에 대하여 방어할 수 있어서 poliomyelitis의 경우 예방접종에 의해 완전히 방어할 수 있다고 보고되고 있다(Perkins등, 1979). 그러나 Harte등(1982)은 면역시킨 마우스로부터 태어난 새끼 마우스에 다시 같은 *Plasmodium yoelii* 항원으로 면역시키면 말라리아가 예방되지 않았다고 하였다.

본 연구는 formaldehyde로 고정시킨 *Naegleria fowleri* 영양형을 마우스 복강내에 주입하여 면역시켰을 때 원발성 아메바성 뇌수막염의 발생이 방지될 수 있는지를 알아보고 또한 이렇게 면역시킨 어미 마우스로부터 태어난 새끼 마우스에 다시 면역시켰을 때 방어면역이 획득되는지 그 여부를 관찰하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. *Naegleria fowleri*

병원성이 강한 *N. fowleri*는 CGVS배지에서 무균적으로 36°C 항온기에서 배양하여 그 영양형을 얻었다.

2. 실험동물

사용된 BALB/c마우스는 통상적인 방법으로 실험실에서 사육한 20g 내외의 체중을 가진 것을 사용하였다.

3. 면역 방법

배양된 *N. fowleri* 영양형을 5% formaldehyde로 고정하고 생리식염수로 여러번 세척하여 이를 BALB/c마우스 복강내로 주입하여 면역시켰다.

고정된 *N. fowleri* 영양형 100×10^4 을 1회 량으로 하고 1주일 간격으로 3회 또는 6회 복강내로 주입하여 면역시켰으며, 이렇게 면역시킨 어미 마우스로부터 태어난 새끼 마우스에도 같은 방법으로 면역시켰다.

4. *N. fowleri* 감염방법

고정된 *N. fowleri* 영양형을 복강내로 마지막 주입하여 면역이 끝나고 4일후 배양된 *N. fowleri* 영양형 5×10^4 개가 함유된 부유액 3 μ l를 secobarbital로 마취된 BALB/c마우스 비강에 떨어뜨려 감염시켰다. 마취에 사용된 secobarbital의 양은 마우스 체중 g 당 0.05mg 이었고, 마우스 복강내로 주입하여 마취시켰다.

5. 혈청 채취

마우스의 retro-orbital venous plexus에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다.

6. Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

5% PAGE를 실시하여 면역시킨 마우스와 건강대조군의 마우스 혈청의 단백질 분획을 비교하였다. 전기영동시킨 gel은 0.1% amido black으로 염색하였으며 densitometer (Gelman, model ACD-18)를 사용하여 575nm에서 기록하였다.

7. 형광항체법

배양된 *N. fowleri* 영양형을 5% formaldehyde로 고정하여 항원으로 사용하였고 간접형광항체법의 실시는任등(1978)의 방법에 준하였다.

실험 성적

1. 면역시킨 마우스의 혈청내 형광항체가

5% formaldehyde로 고정시킨 *N. fowleri* 영양형 1×10^6 개씩을 일주일 간격으로 6회 복강내에 주입한 마우스로부터 얻은 혈청을 사용하여 간접형광항체법을 실시하였는데 그 형광항체는 1 : 2,048이었다(Table 1). 면역시킨 어미에서 태어난 새끼 마우스에 다시 *N. fowleri* 1×10^6 개씩 3회 면역시킨 후 채취한 혈청에서는 그 형광항체가 1 : 512이었다.

2. PAGE에 의한 면역혈청의 분획

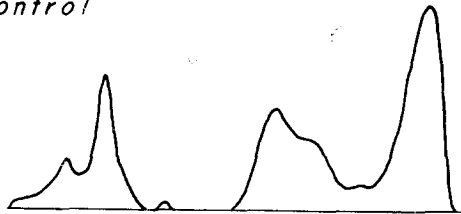
대조군 건강 마우스 혈청에서는 6개의 분획이 관찰되었으나 면역시킨 마우스 혈청에서는 8개의 분획이

* 이 연구의 일부는 1979년도 연세대학교 의과대학교수연구비에 의하여 이루어졌음.

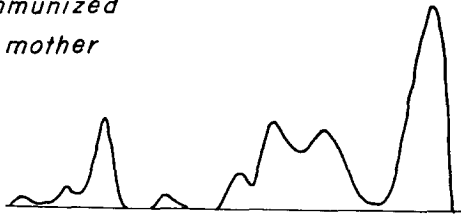
Table 1. Serum fluorescent antibody titer in mice immunized with *N. fowleri* by intraperitoneal injection

Group	Immunization		IFA titer (day 7 after immunization)
	mother	offspring	
Control	none	none	1 : 16
1	1×10^6 trophozoites, 6 times, I.P.	none	1 : 256
2	none	1×10^6 trophozoites, 3 times, I.P.	1 : 2,048
3	1×10^6 trophozoites, 6 times, I.P.	1×10^6 trophozoites, 3 times, I.P.	1 : 512

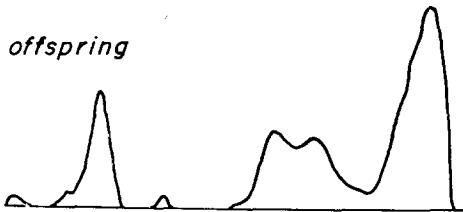
Control



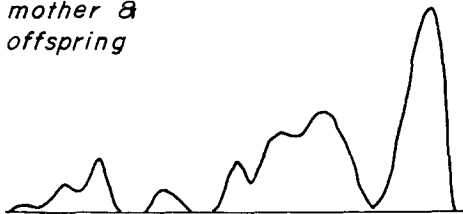
Immunized mother



offspring



mother & offspring



I II III IV V VI VII VIII

Fig. 1. The polyacrylamide gel electrophoresis patterns of mice serum recorded by the densitometer at 575nm.

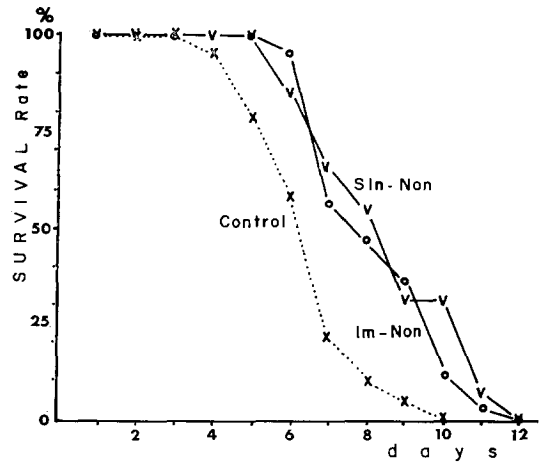


Fig. 2. Survival rates of mice infected with *Naegleria fowleri* in the groups of control, mice born to immune mothers (Im-Non) and mice born to infected mothers (Sin-Non).

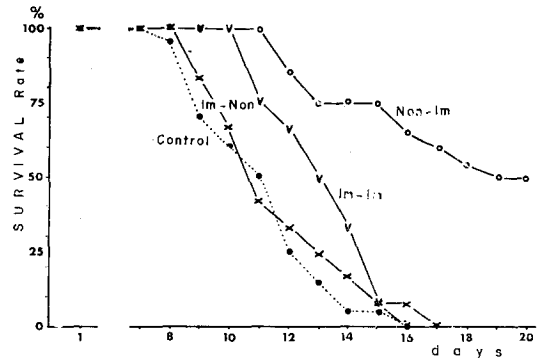


Fig. 3. Survival rates of mice infected with *Naegleria fowleri* in the groups of control, mice born to immune mothers (Im-Non), immune mice born to non-immune mothers (Non-Im), and immune mice born to immune mothers (Im-Im).

관찰되었다(Fig. 1). 면역시킨 모든 실험군에서 분획 I 이 뚜렷하게 나타났고, 분획 VI와 VII이 둘로 나뉘어졌으며 어미와 새끼를 모두 면역시킨 실험군에서는 분획 VI보다 분획 VII이 보다 뚜렷하였다. 또한 어미와 새끼 모두 면역시킨 실험군에서 IV가 보다 뚜렷하게 나타났고, 분획 V는 어미를 면역시킨 실험군에서만 나타났다.

3. 원발성 아메바성 뇌수막염 발생에 의한 마우스 사망율과 그 생존기간

배양된 *N. fowleri* 영양형을 마우스 비강 점막으로 감염시켰을 때 사망율은 두차례의 실험에서 모두 100%였으며 감염에서 사망할 때까지의 생존기간은 평균 7.7

Table 2. Mortality and survival time of mice infected with *N. fowleri* in each control and experimental group

Group	Immunization		Offspring infected		Remark
	mother	offspring	Mortality (dead/total)	Survival time@ (day)	
Exp. 1 control	none	none	19/19	7.7±1.42	
	Immunized #1	none	25/25	9.5±1.65	p<0.001
	Infected #3	none	26/26	9.5±1.76	p<0.001
Exp. 2	Immunized	none	13/15	13.7±2.31	
	Immunized	Immunized #2	13/15	14.2±2.50	
Exp. 3 control	none	none	20/20	11.3±2.10	
	Immunized	none	12/12	11.8±2.48	
	none	Immunized	10/20	14.8±2.70	p<0.01
	Immunized	Immunized	12/12	13.3±1.77	p<0.01

Note: @ Duration of survival of mice with primary amoebic meningoencephalitis from infection to death.

#1 Immunized by intraperitoneal injection with *N. fowleri* trophozoites 1×10^6 six times at the interval of one week.

#2 Immunized by intraperitoneal injection with *N. fowleri* trophozoites 1×10^6 three times at the interval of one week.

#3 Infected with *N. fowleri* trophozoites 5×10^4 , but survived.

일과 11.3일이었다(Table 2).

면역 또는 감염시킨 어미에서 태어난 새끼 마우스에 *N. fowleri*를 감염시켰을 때 그 사망율은 모두 100%였으나 그 생존기간은 각각 평균 9.5일로써 대조군과의 생존기간의 차이는 유의하였다(Fig. 2).

면역시킨 어미에서 태어난 새끼 마우스에 면역시켰을 때와 면역시키지 않았을 때의 두 실험군에서 *N. fowleri* 감염에 의한 사망율도 모두 86.6%였고, 감염 후 사망까지의 생존기간도 차이가 없었다.

면역시키지 않은 어미 마우스에서 태어난 새끼마우스에 면역시킨 실험군에서는 그 사망율은 50%, 감염 후 사망까지의 생존기간은 14.8 일로써 대조군과 현저한 차이가 있었다(Fig. 3). 또한 면역시킨 마우스에서 태어난 새끼 마우스에 다시 면역시킨 실험군에서 *N. fowleri* 감염에 의한 사망율은 100%로써 대조군과 차이가 없었으나 생존기간은 대조군에 비해 연장되었음을 알 수 있었다.

면역시킨 마우스에서 태어난 새끼마우스와, 이 새끼마우스에 다시 면역시켰을 때 *N. fowleri* 감염에 의한 사망율은 대조군과 차이가 없었으나, 감염 후 사망할때까지의 생존기간은 연장되었음을 알 수 있었다(Fig. 2와 3). 즉 면역시킨 마우스로부터 태어난 새끼 마우스에 다시 면역시켰을 때 *N. fowleri* 감염에 대한 방어면역 효과가 없음을 알 수 있었다. 그러나 면역시키지 않은 어미 마우스에서 태어난 새끼 마우스에 면역시켰을 때 그 방어 면역효과는 현저하였다.

고 찰

면역시키는 방법에 대하여는 면역시키는 병원체의

상태나 양, 주입하는 경로, 주입회수나 간격, 또는 숙주조건에 따라 다양하며 면역 효과도 다를 수 있다. 본 실험에서 실시한 면역방법은 좋은 것으로 나타나 있다. 즉 간접형광항체법에 의해 검출된 마우스 혈청내 형광항체가 높았다. 또한 면역시킨 어미 마우스에서 태어난 새끼 마우스의 혈청, 새끼마우스에 면역시킨 후의 혈청, 그리고 면역시킨 마우스에서 태어난 새끼에 다시 면역시켰을 때의 혈청을 PAGE로 관찰하였을 때 각각 그 분획이 특징적으로 모두 다름을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서 시행된 면역방법은 좋은 것으로 생각되었다. 면역은 마우스의 연령에 따라 달라서 10주째 보다는 6~8주째 시행하는 것이 *Plasmodium yoelii* 감염에 대한 방어면역 효과가 좋다고 보고한 바 있다(Harte등, 1982).

*N. fowleri*의 병원성이 매우 강하여 비강으로 감염시킨 모든 마우스가 뇌수막염을 일으켜 사망하였으며, 감염시킨 후 사망까지의 생존기간은 8~13일이었다. 감염시킬 때 실험조건에 따라 차이가 있을 것으로 생각되나 본 실험에서 실시된 감염방법으로 *N. fowleri*의 병원성이 강함을 확인하였다.

면역시킨 마우스에 *N. fowleri*를 감염시키면 뇌수막염 발생율이 저하되어 사망율도 격감되었을 뿐 아니라 감염되어 사망한 마우스의 생존기간도 연장되었다(Fig. 3). 본 실험에서 시행된 면역방법으로 *N. fowleri*에 대한 능동 방어 면역효과가 큼을 알 수 있었다. 그러나 면역시킨 어미에서 태어난 새끼마우스에 *N. fowleri*를 감염시켰을 때 뇌수막염 발생율은 대조군과 차이가 없고 생존기간만 연장되었다. 어미로부터 IgG 항체가 새끼에 전달되어 이것때문에 감염된 마우스의 생존기간만을 연장시킬 수 있었다고 생각할 수 있으며,

또한 우유를 통하여 어미로부터 새끼 마우스로 항체가 이행되어 피동면역이 생길 수도 있다. Andrew 등 (1981)은 우유에 의해 전달된 항체는 *Giardia muris* 감염을 방어할 수 있다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 *N. fowleri*에 감염된 마우스의 생존기간을 연장시킬 정도의 피동면역이 있었으나, 뇌수막염의 발생을 억제하여 사망율을 저하시킬 만한 강한 면역은 생기지 못했다. 면역시킨 어미에서 태어난 새끼에 다시 면역시킨 후 *N. fowleri*를 감염시켰더니 뇌수막염 발생에 의한 사망율은 면역시키지 않은 대조군과 차이가 없었고 생존기간만 2일 정도 연장시켰을 뿐이다(Fig. 3). 면역시킨 어미 마우스로부터 태어난 새끼 마우스에 다시 면역시키면 세포성 면역기전에 이상을 가져올 가능성은 있다. Harte 등 (1982)은 *Plasmodium yoelii*로 면역시킨 마우스에서 IgG가 새끼에 전달되어 이것이 다시 면역시키는 항원에 의한 면역반응을 억제하거나 또는 IgG 생성에 관여하는 T helper cell의 생성을 억제하게 됨으로 이러한 면역된 새끼에서 *P. yoelii* 감염에 대한 방어면역의 결여를 가져왔다고 설명하고 있다.

*N. fowleri*에 감염된 어미 마우스로부터 태어난 새끼 마우스에 다시 감염시키면 마우스 모두 사망하였으며, 감염에서 사망하기까지의 생존기간은 대조군에 비해 연장되었음을 알 수 있었다(Fig. 2). Palmer (1978)도 *Plasmodium berghei*를 감염시킨 쥐에서 우유를 통해 방어항체가 새끼에 전달되고, 말라리아항원이 태반을 통해 어미에 감작된다고 하였다.

면역된 마우스에서 태어난 새끼에서 관찰되는 방어 면역기전이 단순히 어미로부터 받은 피동면역이 태반을 통해 전달된 IgG 항체에 의한 것인지 또는 우유를 통해 전달된 IgA항체에 의한 것인지는 이 실험에서 해답을 주지 못하고 있다. 또한 면역시킨 마우스에서 태어난 새끼에 다시 면역시켰을 때 나타난 방어면역의 부전이 현저하였는데 체액성 면역이 아닌 세포성 면역 특히 T림파구와의 관련성에 관하여도 앞으로 추구하고야 할 과제로 남아 있다.

요 약

CGVS 배지에서 무균 배양한 *Naegleria fowleri* 영양형을 5% formaldehyde로 고정시켜 1×10^6 개씩 일주일 간격으로 3회 또는 6회 BALB/c 마우스 복강내에

주입시켜 면역시켰다.

면역이 끝나고 7일후 배양된 *N. fowleri* 영양형 5×10^4 개를 secobarbital로 마취된 마우스 비강에 떨어뜨려 감염시켰다.

어미 마우스에만 또는 어미와 그 새끼 마우스에 모두 면역시켰을 때, *N. fowleri* 감염에 의한 사망율에 있어 대조군과 차이가 없었으나 그 생존기간은 연장됨을 알 수 있었다. 그러나 새끼마우스에만 면역시켰을 때 사망율이 현저히 감소하였고 생존기간도 훨씬 연장되었다.

새끼 마우스에만 면역시켰을 때 방어면역 효과가 현저하였으나, 어미 마우스에만 또는 면역시킨 어미로부터 태어난 새끼 마우스에 면역시켰을 때는 방어면역이 나타나지 않음을 알 수 있었다.

<이 실험을 위하여 처음부터 끝까지 도와준 한양대 의과대학 기생충학교실 辛皓俊 선생과 尹松老 선생에게 감사합니다.>

참 고 문 헌

- Andrew, Jr., J.S. and Hewlett, E.L. (1981) Protection against Infection with *Giardia muris* by Milk containing Antibody to *Giardia*. *J. Inf. Dis.*, **143**:242.
- Cohen, S. (1979) Immunity to malaria. *Proc. R. Soc. Lon.*, **203**:323.
- Harte, P.G., Desouza, J.B. and Playfair, J.H.L. (1982) Failure of malaria vaccination in mice born to immune mothers. *Clin. Exp. Immunol.*, **49**:509.
- 任敬一・蘇鎮璋 (1978) 自由生活 아메바 抗血清에 의한 免疫反應 II. 自由生活 아메바 家兔抗血清의 螢光抗體價變動에 關한 實驗的 研究. *기생충학잡지*, **16**:134.
- Palmer, T.T. (1978) *Plasmodium berghei* infection in pregnant rats: Effects on antibody response and course of infection in offspring. *J. Parasitol.*, **64**:493.
- Perkins, F.T., Yetts, R. and Gaisford, W. (1979) Response of infants given a third dose of poliomyelitis vaccine ten to twelve months after primary immunization. *Br. Med. J.*, **1**:680.

=Abstract=

**Failure of immunization with *Naegleria fowleri* in
mice born to immune mothers**

Kyung-Il Im and Keun-Tae Lee

Department of Parasitology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120, Korea

Female BALB/c mice weighing 18~20 g were immunized by three injections of 1×10^6 *Naegleria fowleri* trophozoites intraperitoneally at the interval of one week 6 times for the pregnant mice and 3 times for the offspring mice. One week after immunization the mice were challenged intranasally with *N. fowleri* trophozoites 5×10^4 under secobarbital anesthesia.

Experimental primary amoebic meningoencephalitis developed between day 7 and 16 after infection. All mice were dead due to amoebic meningoencephalitis in all experimental groups except in the offspring born to non-immune mothers. Mean of survival time, which is the duration of survival of mice from infection to death, was delayed in the groups of mice born to immune mothers, immune mice born to immune mothers.

Active or passive protective immunity against *N. fowleri* infection was demonstrated in the immunized mice and mice born to immune mothers. But the effectiveness of immunization was greatly impaired in terms of mortality in the immune mice born to immune mothers when *N. fowleri* was infected intranasally.