

## *Acanthamoeba culbertsoni* 감염에 대한 silica 투여의 영향 — 대식세포의 역할을 중심으로 —

이홍수, 신호준, 라미숙, 임경일\*

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

**국문초록:** C3H/HeJ 마우스에 *Acanthamoeba culbertsoni* 영양형  $3 \times 10^5$ 개를 비강으로 접종하여 실험적 아메바성 수막뇌염을 일으킬 때 숙주의 방어기작에 대식세포가 미치는 영향을 알아 보았다. 대식세포 억제제인 silica를 마우스 복강 내로 투여한 경우의 사망율이 60.6%로 아메바만을 접종한 마우스의 사망율이 10.0%와 비하여 큰 차이를 보였으며, 열처리하여 죽인 *Toxoplasma gondii* tachyzoites의 *in vitro* 탐식능 관찰에서 기능을 억제시킨 대식세포의 탐식능이 3% 이하로써 아메바에 대한 복강대식세포의 기능의 저하로 인한 수막뇌염의 증가를 관찰하였다. *A. culbertsoni*에 대한 대식세포의 살해활동의 *in vitro* 실험에서 silica투여한 실험군의 복강대식세포의 뚜렷한 기능 저하를 관찰하였고, 효소표지 면역 검사법(ELISA)을 이용한 마우스 혈청 내의 interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ )의 흡광도는 아메바 접종군과 생리식염수 투여군보다 silica투여를 수반한 실험군이 현저하게 낮게 나타나 대식세포가 억제되었을 때 실험적 수막뇌염이 증가함을 알 수 있었다. 결과적으로 대식세포가 *A. culbertsoni* 감염에 대한 숙주의 방어작용에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

### 서 론

우리 나라에서 Ringsted *et al.*(1976)이 *Acanthamoeba* sp.에 의한 것으로 생각되는 원발성 아메바성 수막뇌염 1예를 보고하고 있으며, 세계 여러 곳에서 병원성 자유생활아메바에 의한 인체감염이 140예 정도 보고되었다(Lallinger *et al.*, 1987). 또한 우리 나라의 하천 및 저수지에서 *Acanthamoeba* spp.와 *Naegleria* spp.를 분리하여 마우스에 감염시켜 병원성이 있음을 밝힘으로써 인체 감염 가능성을 시사하였다(黃濤琦 외, 1976; 黃英南 외, 1980).

아메바성 수막뇌염 발생시 숙주의 면역반응에 대한 여러 연구 보고에 의하면 *Acanthamoeba* sp. 감염시 T 림프구에 의해 활성화된 B 림프구가 체액성 방어기능을 증진시키며(Cursons *et al.*, 1980), 살아 있는 아메바나 면역혈청을 마우스 복강 내로 주입하였을 경우 방어면역이 증가되고(Thong *et al.*,

1978). 이렇게 면역된 마우스에서 항체는 보체의 전형로(classical pathway)와 대항로(alternative pathway)를 활성화시킨다고 한다(Ferrante and Rowan-Kelly, 1983). 대식세포를 활성화시키는 물질은 여러가지가 있고(Kumazawa, 1989) BCG와 *Propionibacterium acnes*(Cleary and Marciano-Cabral, 1986)와 LPS, muramyl dipetide, 산화효소인 peroxidase(Lefkowitz *et al.*, 1986) 등을 일반적으로 사용하는데, Stern *et al.*(1984)은 이질아메바에 의한 간농양에 있어 silica를 전처리하면 대식세포에 의존하는 숙주의 방어기능이 저하됨을 보고하였다. 활성화된 대식세포는 염증반응의 중개역할을 하여 interleukin-1을 분비하는데(Le and Vilcek, 1987), BCG나 *P. acnes*에 의해 활성화된 복강 대식세포가 접촉 의존성 세포용해활성(contact dependent cytolytic activity)의 증가이나 항체 의존성 세포독성(antibody dependent cellular cytotoxicity)에 의해 면역반응을 일으킬 수 있으며, IL- $1\alpha$ , IL- $1\beta$ , TNF  $\alpha$ 를 준비하여 표적세포에 대하여 세포독성을 갖는다(Fischer-Stenger *et al.*, 1990 & 1992). 한편 *A. culbertsoni*에 대한 세포 매개성 면역에서 자연살세포(natural killer cell)의 역할에 대해서 몇몇의 연구자에 의해 연구된 바가 있으나(金基赫 외, 1992; 金明俊 외, 1989) 그 기전이

\* 접수 1994년 8월 24일 수정재접수 1994년 10월 11일

\* 본 연구의 일부는 연세대학교 의과대학 1994학년도 과별 Project 연구비에 의하여 이루어졌음.

\* 별책 요청 저자

명확히 알려진 것은 아니며 특히 대식세포의 역할을 밝히기 위한 연구는 거의 없다.

이에 본 연구는 마우스에 실험적으로 *A. culbertsoni*를 감염시켜 직접적, 간접적인 방법으로 대식세포의 역할을 알아 보고자 한다. 마우스에 *A. culbertsoni*를 접종시킬 때 대식세포에 영향을 미치는 silica를 투여하여 아메바성 수막뇌염 발생으로 인한 마우스의 사망률 변동을 비교 관찰하고, 여러 실험군에서 대식세포 기능의 변화 정도를 *Toxoplasma gondii*에 대한 대식세포의 탐식능 및 혈청내의 IL-1 $\beta$  농도 등을 측정하여 비교하고 배양기 내에서 *A. culbertsoni*에 대한 대식세포의 살해능을 관찰함으로써 *A. culbertsoni*에 의한 실험적 수막뇌염 발생시 대식세포의 역할을 알아 보고자 한다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. *Acanthamoeba culbertsoni* 배양 및 실험 동물

Prince Leopold열대의학연구소(Belgium)로부터 분양받은 병원성이 있는 *A. culbertsoni*를 37°C 항습 항온기(NAPCO)에서 CGV 배지(Wilaert, 1975)를 사용하여 무균적으로 계대 배양하였고 생후 약 6주된 체중 18 gm 내외의 수컷, C3H/HeJ 마우스를 서울 중앙병원 동물실에서 구입하여 통상적인 방법으로 사육하여 사용하였다.

### 2. *A. culbertsoni*의 접종 및 수막뇌염의 발생 확인

마우스 체중 gm당 secobarbital 0.05 mg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후, 배양된 *A. culbertsoni* 영양형 3  $\times$  10<sup>5</sup>개를 5  $\mu$ l 생리식염수에 함유시켜 마우스의 우측 비강 내로 접종시켰고 대조군은 실험군과 같은 방법으로 마취시키고 동량의 생리식염수만을 비강 내로 주입하였다. 아메바 접종 후 마우스가 사망하기까지 행동 장애 등을 관찰하면서 사망시 마우스의 뇌조직을 CGV 배지에서 배양하여 아메바 영양형의 존재여부를 확인하고, Hematoxylin-eosin 염색을 하여 조직의 병리학적 변화를 관찰하였다. 접종 후 20일이 경과하기까지 각 실험군과 대조군의 사망률과 평균 생존기간 등을 관찰하였다.

### 3. 실험군의 설정

실험군은 *A. culbertsoni*를 접종한 군, 아메바 접종 후 silica 투여한 군, 생리식염수를 주입한 대조군으로 설정하였다. Silica 투여는 Hilgers et al. (1985)의 방법을 참고하여 직경이 0.5  $\mu$ m인 silica (Sigma) 0.5 mg/0.5 ml, 0.25 mg/0.5 ml를 각각 서로 다른 실험군의 마우스 복강내로 투여하였다. Silica의 작용 지속기간의 검증 및 확인을 위해 *A. culbertsoni*를 접종시키기 3일 전에 복강 내로

silica 0.5 mg/0.5 ml를 투여한 군을 보조 실험군으로 설정하였다.

### 4. 대식세포의 배양 및 *Toxoplasma gondii*에 대한 탐식능 관찰

마우스 복강 내에서 대식세포의 삼출 및 배양은 Clearly and Marciano-Cabral(1986)의 방법을 참고하였다. 각 실험군의 마우스 복강 내에 Hanks balanced salt solution(HBSS) 5 ml를 주사하여 채취한 복수는 원침 세척하여 원침한 복강 삼출물(peritoneal exudate)을 10% 우태아 혈청(fetal calf serum; GIBCO)이 첨가된 RPMI 1640(JRH BIOSCIENCES)으로 조직배양 petri dish(Corning)에서 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온 항습 배양기에서 2 시간 동안 배양시켰다. 2시간 배양 후 따뜻한 HBSS로 petri dish를 씻어 비부착성 세포를 제거하고 동일 배지를 24시간마다 교환하면서 밀면에 단일 대식세포층이 생길 때까지 약 3일간 배양하였다. Hematoxylin-eosin으로 염색했을 때의 형태와 비특이적 에스테라제 염색에 의하여 대식세포의 순수도(> 95%)와 단일 세포층을 확인하였다.

대식세포의 탐식능 관찰은 단세포층이 배양되고 있는 각 배양기에 56°C에서 15분간 열처리하여 죽인 2  $\times$  10<sup>7</sup>개의 *Toxoplasma gondii* tachyzoites를 첨가하고, 1시간 후에 동일 배양액으로 대식세포 주위에 남아 있는 *Toxoplasma* 총체를 세척한 후, 100% methanol로 고정 후 Giemsa 염색을 하여 대식세포 내의 *Toxoplasma* 총체를 광학현미경하에서 관찰하고, 대식세포의 탐식능은 아래의 phagocytic index(%)로 산출하였다(Makioka and Kobayashi, 1983).

$$\text{phagocytic index(\%)} = \frac{\text{No. of macrophage infected} \times 100}{\text{No. of macrophage observed}}$$

### 5. 배양기 내에서 *A. culbertsoni*에 대한 대식세포의 살해능 관찰

대식세포와 아메바의 배양기내 실험을 위해 하루 전에 마우스 복강에 silica를 주사한 실험군과 생리식염수를 주입한 대조군으로부터 복강대식세포를 분리하여 well plate(Corning)에 배양하였는데 각각의 한쪽은 silica를 0.5 mg/0.5 ml를 처치하였고 다른 한쪽은 silica를 넣지 않고 단일 세포층으로 자라도록 배양하였다. 모든 well plate의 배지를 교환한 다음, 60  $\times$  10<sup>4</sup>개의 *A. culbertsoni* 영양형을 넣어 2시간 동안 혼합 배양한 다음 부유액을 버리고 부착되어 있는 세포들을 100% methanol로 고정하고 Giemsa 염색하여 대식세포와 *A. culbertsoni* 영양형 수를 광학현미경으로 측정하였다.

### 6. 마우스 혈청내 interleukin-1/β의 측정

날짜별로 마우스 심장으로부터 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 -20°C에 냉동 보관하였다. 혈청 내 IL-1β의 측정은 Voller *et al.*(1976)의 방법을 참조하여 효소표지 면역 검사법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA)으로 측정하였다. 혈청은 0.05 M carbonate-bicarbonate 완충액으로 1:320, 1:640의 비율로 희석하여 ELISA microtiter plate well(Costar)에 부착시켰다. 항체로는 goat anti-murine IL-1β(R & D system)와 rabbit anti-goat IgG(Biodesign)를 0.01 M PBS 희석완충액으로 희석하여 차례로 반응시키고 희석 완충액으로 희석한 goat anti-rabbit IgG/horse-radish peroxidase(Bio Genex)로 반응시킨 후 기질인 OPD(O-phenylene diamine)로 발색시켰다. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣어 반응을 정지시킨 후에 ELISA 판독기(Dynatech)로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 두차례 결과의 평균값을 구하여 각 군을 비교하였다.

### 7. 통계처리

사망률의 검정에는 Students t-test를 사용하였고, 대식세포의 탐식능과 살해능 검정을 위해서는

$\chi^2$  test를 사용하여 통계학적 유의성을 검정하였다.

### 결 과

#### 1. *Acanthamoeba culbertsoni* 접종 마우스에서 silica 투여에 의한 사망률의 변동

마우스에서 실험적 수막뇌염이 발생할 때 silica의 작용시간에 대해 알아 보고자 *A. culbertsoni*의 접종 전후로 silica를 복강 내로 투여한 뒤 수막뇌염에 의한 마우스의 사망여부를 관찰하였다. *A. culbertsoni*를 마우스에 접종시키기 3일 전에 silica 0.5 mg을 복강 내로 투여한 실험군과 *A. culbertsoni*만 접종시킨 실험군의 마우스 사망률은 각각 5.0% 및 10.0%로 유사한 결과를 보였다(표 1). *A. culbertsoni*를 접종시킨 실험군의 사망률 10.0%와는 통계학적으로 유의있는 차이가 관찰되었다( $p < 0.05$ )(표 2). Silica의 복강대식세포에 영향을 미치는 최소한의 양을 알기 위해 silica를 1/2로 줄여서 즉 마우스 당 0.25 mg을 투여한 후 아메바 접종했을 때도 마우스의 사망률이 66.7%로 관찰되어 *A. culbertsoni*만 접종시킨 실험군의 사망률 26.7%와는 통계학적으로 유의있는 차이가 관찰되었다( $p < 0.05$ , 표 3).

**Table 1.** Mortality of *Acanthamoeba culbertsoni*-infected mice, which were injected with silica 0.5 mg intraperitoneally on day 3 before infection

Group	No of mice	Cumulative number of dead mice in each postinfection day										Mortality (%)
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Amoeba infection	20					1				2		10.0
Silica administration & amoeba infection	20						1					5.0
Control	20											0.0

**Table 2.** Mortality of mice infected with *Acanthamoeba culbertsoni* and injected with silica 0.5 mg at the same time

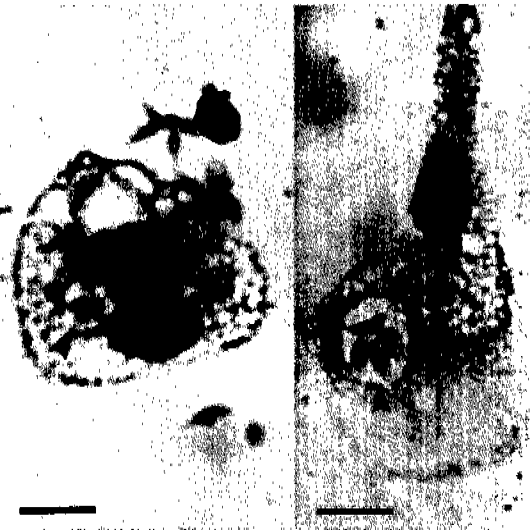
Group	No of mice	Cumulative number of dead mice in each postinfection day												Mortality (%)
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Amoeba infection	20								1				2	10.0
Silica administration & amoeba infection	20		1	3	4		6	7	8			12		60.0 <sup>a)</sup>
Control	20													0.0

<sup>a)</sup> $p < 0.05$

**Table 3.** Mortality of mice infected with *Acanthamoeba culbertsoni* and injected with silica 0.25 mg at the same time

Group	No of mice	Cumulative number of dead mice in each postinfection day												Mortality (%)
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Amoeba infection	15							1	4					26.7
Amoeba infection & silica administration	15				2		4	7	8	8	9	10		66.7 <sup>a)</sup>
Control	15													0.0

<sup>a)</sup>P < 0.05



**Fig. 1.** *Toxoplasma gondii* tachyzoites (arrowhead) are observed in the cytoplasm of mouse peritoneal macrophages (Scale: 10  $\mu$ m, Giemsa stain).

2. 복강대식세포의 탐식능

날짜에 따라 각 실험군은 마우스 3마리씩을 사용하여, 대조군 복강대식세포, *A. culbertsoni*만 접종시킨 마우스의 복강대식세포 및 *A. culbertsoni*를 접종시킨 후 silica를 투여한 실험군의 복강대식세포에 대한 죽은 *T. gondii* tachyzoites에 대한 경과일별 탐식능 정도를 관찰하였다(그림 1). 대조군 마우스의 복강대식세포는 *T. gondii*에 대해 38.0%~53.0%의 탐식능을 보인 반면, *A. culbertsoni*를 접종시킨 마우스의 복강대식세포는 28.6% 이하의 탐식능을 보이며 경과일에 따른 미비한 증가추이가 관찰되었다. 아메바 접종 후 silica를 투여한 군에서의 탐식능은 3일째까지 3% 이하로 대식세포의 탐식이 억

**Table 4.** Phagocytic index of mouse peritoneal macrophages on each observation day after *Acanthamoeba culbertsoni* infection

Group	Average of phagocytic index (%)			
	1 day	2 day	3 day	4 day
Amoeba infection	10.0	28.6	18.0	25.2
Amoeba infection & silica administration	1.0	3.0	2.0	24.7
Control	53.0	43.9	38.0	42.7

제되었다가 5일째 24.7%로 증가하여 경과일에 따라 탐식능의 증가를 관찰하였다(표 4). 복강대식세포의 *T. gondii*의 탐식 수는 대조군에서 각 세포당 평균 3.8개이고 *A. culbertsoni*를 접종시킨 군의 대식세포는 평균 2.45개인데 비해, 아메바 접종 후 silica를 투여한 실험군의 대식세포는 1.5개로 관찰되어 대식세포의 기능의 저하를 볼 수 있다. 또한 여기에서도 아메바와 silica를 처리한 군에서 점차 세포당 탐식된 *T. gondii* 총체 수가 증가하여 대식세포의 기능의 변화를 관찰하였다.

3. *Acanthamoeba culbertsoni*에 대한 대식세포의 살해능

마우스의 복강 내로 silica를 투여한 후 대식세포를 분리하여 배양기 내에서 *A. culbertsoni* 영양형과 2시간 동안 혼합 배양함으로써 대식세포의 *A. culbertsoni*에 대한 살해정도를 관찰하였다(표 5, 그림 2). Silica를 *in vivo* 투여한 후 복강대식세포를 분리 배양하고 또 다시 배양기 내에 silica를 처리한 실험군에서 대식세포수가 아메바와 혼합 배양하기 전  $266 \times 10^4$ 개에서 배양 후  $227 \times 10^4$ 개

로 감소한 반면, 아메바 수는 배양 전  $60 \times 10^4$ 개에서 배양 후  $54 \times 10^4$ 개로 큰 차이가 없었다. Silica를 처리하지 않은 대조군에서는 대식세포가 배양 전  $210 \times 10^4$ 개에서 배양 후  $176 \times 10^4$ 개로 감소하였으며 아메바 수도  $60 \times 10^4$ 개에서  $48 \times 10^4$ 개로 감소하였다. 또한 silica를 *in vivo* 투여하지 않은 대조군 마우스에서 분리한 대식세포를 배양기 내에서 silica 처리하고 아메바와 2시간 동안 혼합 배양한 전후의 대식세포 수는  $130 \times 10^4$ 개에서  $38 \times 10^4$ 개로 크게 감소하였으나 아메바수는  $60 \times 10^4$ 개로 배양 전후의 뚜렷한 차이가 없었다. Silica를 전혀 처리하지 않은 대조군의 대식세포는 배양 전후의 차이가 없었으나 *A. culbertsoni* 영양형 수는 배양 전  $60 \times 10^4$ 개에서 배양 후  $40 \times 10^4$ 개로 크게 감소하였다( $p < 0.01$ )(표 5).

4. 혈청내 interleukin- $1\beta$ 의 흡광도의 변동  
각 실험군의 IL- $1\beta$ 의 흡광도(optical density)를 두번에 걸쳐 측정하여 평균값을 비교하였는데, 혈청 희석비율 1:320과 1:640에서 감염 1일째와 2일째 모두 아메바만의 접종군과 대조군에 비하여 *A. culbertsoni* 접종 후 silica 투여한 실험군에서 IL- $1\beta$ 의 흡광도가 현저하게 낮은 것이 관찰되었다(표 6).

## 고 찰

자유생활아메바에 의한 수막뇌염(amoebic meningoencephalitis)이나 각막염(keratitis)은 오염된 물이나 공기에 기인하며(Martinez, 1991), 최



**Fig. 2.** Mouse peritoneal macrophages and *Acanthamoeba culbertsoni* trophozoites were cocultured for 2 hours in RPMI 1640 medium (Scale: 10  $\mu$ m, Giemsa stain). A: *A. culbertsoni* trophozoites M: peritoneal macrophages.

**Table 5.** Amoebicidal activity of mouse peritoneal macrophages against *Acanthamoeba culbertsoni* trophozoites. These two kinds of cells were cocultured for 2 days

Collection of mouse peritoneal macrophages	Culture treated with	No. of macrophages ( $\times 10^4$ )		No. of <i>A. culbertsoni</i> trophozoites ( $\times 10^4$ )	
		before culture	after culture	before culture	after culture
after silica administration	silica	266	227	60	54
	control	210	176	60	48 <sup>a)</sup>
control	silica	130	38	60	60
	control	88	78	60	40 <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> $p < 0.01$

**Table 6.** Interleukin-1 $\beta$  level in serum of mice infected with *Acanthamoeba culbertsoni* and administered with silica

Group	Average of optical density in each post infection			
	1 day		2 day	
	1:320	1:640	1:320	1:640
Amoeba infection	0.665	0.750	0.541	0.634
Amoeba infection & silica administration	0.095	0.136	0.139	0.160
Control	0.567	0.676	0.381	0.449

근 후천성면역결핍증(AIDS)이 세계적으로 증가 추세에 있으며, 이와 관련하여 과거에는 별로 문제되지 않았던 비병원성 세균이나 원충성 기생충 등의 기회감염에 의한 많은 임상 발병이 보고되고 있어 *A. culbertsoni* 뿐만 아니라 다른 원충류의 인체감염의 경로, 발병기전, 진단, 치료 등에 대한 보다 깊은 연구가 필요하다. 본 실험은 실험적 아메바성 수막뇌염 발생시 일차 면역반응에 비특이적 작용을 하는 대식세포의 역할을 연구하려고 대식세포를 인위적으로 억제시켜 그 기능의 변화를 관찰하였다. *A. culbertsoni*에 의한 아메바성 수막뇌염은 중추신경계에서 주로 발생하는데(Martinez, 1991). 본 실험에서 복강의 대식세포를 silica로써 인위적으로 억제하였을 경우에 마우스의 수막뇌염에 의한 사망율은 타 실험군보다 높았고 *in vitro* 실험군에서 대식세포의 기능이 저하되었기에 대식세포는 아메바 감염시 숙주의 방어 기전에 중요한 역할을 한다고 생각한다.

일반적으로 염증반응에 있어서 IL-1의 생산의 유도물질로 알려진 silica 입자에 대하여 Gery *et al.* (1981)은 silica 100  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도는 아치사량으로써 대식세포의 기능에 영향을 미친다고 하였으며, Stern *et al.* (1984)은 silica 5 mg/0.5 ml 이하의 농도는 정맥내 주사시 치사량 미만으로 대식세포 기능을 억제할 수 있다고 보고하였고, 최근 Park and Osmond(1991), Papaccio *et al.* (1991), Zidek *et al.* (1933)의 실험에서도 silica에 의한 대식세포 기능 억제가 관찰 보고되었다. 본 실험에서는 silica가 대식세포 기능을 저하시키며, 생활력(viability)에는 영향을 미치지 않는 방법을 간구하였는데 Hilgers *et al.* (1985)의 방법을 참고하여, Stern의 정맥내 주사량의 1/10의 양인 silica 0.5 mg/0.5 ml를 마우스 복강 내로 투여하여 대식세포를 억제하였으며 또한 silica 자체의 독성으로 인한 마우스 폐사를 배제하기 위해 silica 투여량을 0.25 mg/0.5 ml로 줄여 주사한 경우에도 비슷한 사망율의 결과를 보여 silica의 독성에 의한 마우스 폐사는 없었고 silica 단독 투여군을 설정하지 아니한 점을 보완할 수 있다고 생각한다. Stern *et al.* (1984)은

silica의 정맥내 주사는 수시간 내에 세망내피계(reticuloendothelial system)을 파괴하며, 복강대식세포의 경우는 약 10일 동안 회복이 어렵다고 기술하였는데, 본 실험에서는 아메바를 감염시키기 3일 전에 silica 0.5 mg/0.5 ml를 복강내 투여는 마우스 사망에 크게 영향을 미치지 않은 것으로 보아 복강 대식세포의 아메바 방어 면역에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 관찰하였다. 상기의 내용과 silica 처리한 대식세포의 *T. gondii*의 탐식능이 3일까지 저하되었다가 그 이후에는 점차 증가한 점으로 미루어 볼 때 본 실험에서의 0.5 mg/0.5 ml의 투여량은 약 72시간 이상 지속되지 않고 대식세포의 기능이 회복될 수 있는 양임을 추측할 수 있다.

柳在淑 외(1990)이 실시한 질트리고모나스에 대한 복강 대식세포의 살해능 관찰 실험에서 복강 대식세포와 원충의 비율이 10:1이고 24시간 동안 반응시켰을 때 가장 높은 세포독성을 보인다고 하였고, Cleary and Marciano-Cabral(1986)의 실험에서 주효세포와 표적세포의 비율을 5:1, 10:1, 20:1로 하고 각각을 12, 24, 36시간 배양하여 두 세포간의 비율 및 혼합 배양 시간이 세포독성에 미치는 영향에 대한 적정치를 실험하였다. 본 실험에서는 복강 대식세포를 삼출하는 과정에서 복강 내 silica를 투여한 군은 대조군보다 다량의 세포가 분리되었고 배양하는 과정에서 well plate에 단일세포층이 형성되는 시간과 양상의 차이가 있어서 대식세포와 *A. culbertsoni* 영양형을 일정 비율로 혼합 배양하지 못하였다. 실험상 마우스 복강내로 silica를 투여하고 대식세포를 분리한 군의 세포 수가 대조군에서 전처리 없이 분리한 세포 수보다 2.5배 이상 많음에도 불구하고 대식세포 감소비율이 아메바의 감소 비율보다 큰 결과를 보인 것은 silica 투여한 세포의 기능이 대조군 세포보다 훨씬 저하되었음을 알 수 있었다. 그러나 *in vivo*와 *in vitro* 모두 silica를 처리하지 않은 대조군에서 볼 때 정상 기능을 갖는 대식세포는 수적 변화가 없고 아메바 수는 크게 감소하였는데 이것이 두종류 세포들의 기능의 차이에 의한 것인지 아닌지는 확실치 않다.

IL-1 $\beta$ 의 ELISA에 의한 측정은 타 방법에 준하는

감응성이 있으며 다소 빠르고 간편하다는 잇점이 있는데(Newton *et al.*, 1993). 본 실험을 진행할 당시에 마우스의 보편화된 ELISA 방법에 대한 보고와 문헌이 미비하였기에 각 실험군 간의 IL-1 $\beta$ 의 양적 차이를 흡광도의 고저만을 비교하였기에 ELISA 결과 해석상에 난점이 있고 차후에 정확한 정량적 측정이 필요하나, silica 투여한 마우스의 IL-1 $\beta$ 의 흡광도가 비교 실험 마우스보다 매우 낮은 것으로 보아 상대적으로 silica 투여한 마우스 혈청 내의 IL-1 $\beta$ 의 양이 적으며 대식세포의 기능의 저하를 추정할 수 있다.

이상의 결과를 종합하여, C3H/HeJ 마우스를 이용한 실험적 *A. culbertsoni* 감염시 복강 대식세포 기능 억제제의 투여가 *A. culbertsoni*에 의한 수막뇌염의 발생을 증가시키는 것으로 보아 대식세포가 실험적 수막뇌염의 면역기능에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었으나 그 정확한 기전을 밝히기에는 불충분하였고, 다른 세포매개성 면역이나 림포카인등과 같은 매개인자들과의 상호 작용이 있는 것으로 추측되며, 이러한 기전에 대한 보다 종합적이고 구체적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

#### 참고문헌

金明俊, 慎珠沃, 任敬一 (1989) *Acanthamoeba culbertsoni*의 감염에 있어 세포 매개성 면역에 관한 연구. *기생충학잡지* **28**(3): 143-154.

金其赫, 申珠玉, 任敬一 (1992) 자유생활 아메바의 감염량에 따른 자연살세포의 활성화도. *기생충학잡지* **31**(3): 239-248.

柳在淑, 安明姬, 閔得映 (1990) 질트리코모나스 (*Trichomonas vaginalis*)에 대한 마우스 복강 대식세포의 세포독성. *기생충학잡지* **28**(2): 85-89.

黃英南, 閔得映, 蘇鎮璋 (1980) 자유생활아메바 (*Acanthamoeba* species)의 숙주에 대한 면역학적 반응. *연세의대논문집* **13**: 393-407.

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

Cleary SF, Marciano-Cabral F (1986) Activated macrophages demonstrate direct cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and enhanced binding of *Naegleria fowleri* amoebae. *Cell Immunol* **98**: 125-136.

Curosos 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.

Ferrante A, Rowan-Kelly B (1983) Activation of the alternative pathway of complement by *Acanthamoeba culbertsoni*. *Clin Exp Immunol* **54**: 477-485.

Fischer-Stenger K, Cabral AG, Francine MC (1992) Separation of soluble amoebicidal and tumoricidal activity macrophages. *J Protozool* **39**(1): 235-241.

Fischer-Stenger K, Cabral GA, Francine MC (1990) The Interaction of *Naegleria fowleri* amoeba with murine macrophage cell lines. *J Protozool* **37**(3): 168-173.

Gery I, Davies P, Derr J, Krett N, Barranger JA (1981) Relationship between production and release of lymphocyte-activating factor (interleukin-1) by murine macrophages. *Cell Immunol* **64**: 293.

Hilgers LA, Snippe H, Jansze M, Willers JMN (1985) Effect of *in vivo* administration of different adjuvants on the *in vitro* candidacidal activity of mouse peritoneal cells. *Cell Immunol* **90**: 14-23.

Kumazawa Y, Takimoto H, Nishimura C, Kawakita & Nomoto K (1989) Activation of murine peritoneal macrophages by Saikosaponin A, Saikosaponin D and Saikogenin D. *Int J Immunopharmac* **11**: 21-28.

Lallinger GJ, Reiner SL, Cooke DW, et al. (1987) Efficacy of immune therapy in early experimental *Naegleria fowleri* meningitis infection. *Immunology* **55**: 1289-1293.

Le J, Vilcek J (1987) Tumor necrosis factor and interleukin-1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* **56**: 234.

Lefkowitz DL, Stanley SL, Ru-Qi W, Jonannes E (1986) Activation of macrophages with oxidative enzymes. *Methods in Enzymology* **32**: 537-542.

Makioka A, Kobayashi A (1983) Activation of macrophages by *Tetrahymena pyriformis*: Killing of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Jpn J Parasitol* **32**(3): 203-210.

Martinez AJ (1991) Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev Inf Dis* **13**(suppl 5): S399-402.

Newton RC, Dowling R, Daulerio AJ, Culp S (1993) An ELISA assay for murine interleukin-1 $\beta$ . *J Immunol Methods* **161**: 257-264.

Papaccio G, Frascore S, Esposito V, Pisanti FA (1991) Early macrophage infiltration in mice treated with low dose streptozotocin decreases islet superoxide dismutase levels: Prevention by silica. *Acta Anatom* **142**(2): 141-146.

Park YH, Osmond DG (1991) Regulation of early precursor B cell proliferation in mouse bone marrow: Stimulation by exogenous agents

- mediated by macrophages in the spleen. *Cell Immunol* **135**(1): 168-183.
- Ringsted J, Targer BV, Suk DS, Visvesvara GS (1976) Probable *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a Korean child. *Am J Clin Path* **66**: 723-730.
- Stern JJ, Graybill JR, Drutz DJ (1984) Murine amoebiasis: The role of the macrophage in host defense. *Am J Trop Med Hyg* **33**: 372-380.
- Thong YH, Ferrante A, Shepherd C, Rowan-Kelly B (1978) Resistance of mice to *Naegleria* meningoencephalitis transferred by immune serum. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* **72**: 650-652.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull WHO* **53**: 55-65.
- Willaert E (1975) Recherches immunotoxonomiques comparees sur les amibes du groupe "Limax". Acad R Sc Outre-Mer Mem Class Se Nat Med.
- Zidek Z, Frankova D, Masek K (1993) Some cellular and pathophysiological correlates of inflammatory effects of synthetic immunomodulatory agent, muramyl dipeptide (MDP). *Agent & Actions* **38**(1-2): 106-115.

= Abstract =

The effect of silica on the development of experimental *Acanthamoeba* meningoencephalitis with reference to the macrophage role in mice

Hong-Soo Lee, Ho-Joon Shin, Mi-Sook La, Kyung-il Im\*

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

The role of macrophages was observed in intranasally infected C3H/HeJ mice with trophozoites ( $3 \times 10^5$ ) of *Acanthamoeba culbertsoni* which was a kind of free-living amoebae inducing meningoencephalitis in human and experimental animals. The mortality was 60% in the group of intraperitoneally injected mice with silica (0.5 mg/0.5 ml). It was much higher than that of 10% in the group of amoeba infected mice without silica administration. The phagocytic index of peritoneal macrophages co-cultured with *Toxoplasma gondii* was estimated daily. In contrast to the control and amoeba infected group which didn't show significant fluctuation of the phagocytic indices, the silica administrated group revealed under 3% until day 3, and gradual increase up to 24.7% in day 5 which was same level of amoeba infected group without silica administration. The level of interleukin-1b (IL-1b) measured by ELISA was the highest in the amoeba infected group without silica injection and the lowest in the amoeba infected group with silica administration. In the test of the amoebicidal activity of mice peritoneal macrophages *in vitro*, silica administration revealed reducing effect on amoebicidal activity of macrophages. In conclusion, macrophages were proven to play a significant role in defense mechanism against the development of experimentally induced *Acanthamoeba* meningoencephalitis.

**Key words:** Free-living amoeba, *Acanthamoeba culbertsoni*, macrophage, meningoencephalitis, phagocytic index, interleukin-1b

[Korean J. Parasit., 32(4): 259-266, December 1994]

\* Corresponding author