

紫外線 照射處理에 의한 *Cryptococcus neoformans* 의
電子顯微鏡의 觀察

黃 東 薰·高 春 明·崔 泰 周·柳 駭

(延世大學校 醫科大學 微生物學教室)

Electron Microscopic Observations of the Irradiation of
Ultra-violet Ray on *Cryptococcus neoformans*

HWANG, Dong Hoon, Choon-Myung KOH, Tae-Joo CHOI, and Joon LEW

(Dept. of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University)

ABSTRACT

The present study is of ultra-fine structure of *Cryptococcus neoformans* by means of electron microscopy and reveals the following:

- 1) In contrast to the bacteria, the normal *Cryptococcus neoformans* contains nuclear enveloped with nuclear membrane, mitochondria, endoplasmic reticulum, distinct cell wall and cell membrane, vacuoles and storage granules as observed in the eucaryotic cells.
- 2) In apparent cell walls and cell membrane with the appearance of electron transparent area (ETA) and changes of cell morphology were observed in the ultra-violet ray irradiated cell.
- 3) Morphology changes and cytoplasmic element abnormality was increased with irradiated time.
- 4) Increase of electron transparent area was thought to be associated with degradation of cell.

緒 論

眞菌類의 細胞構造에 對하여는 오래전부터 光學顯微鏡을 利用하여 많은 연구가 발표된 바 있다. 그리고 또한 電子顯微鏡이 1940 年代부터 활발히 利用되게 되면서부터 많은分野에 걸쳐서 使用하게 이르렀으며 이를 利用하여 微生物의 微細構造에 관하여도 여러學者들에 依하여 계속 研究 發表되고 있다.

Cryptococcus neoformans 는 深在性 眞菌症을 일으키는 原因菌의 一種으로서 감염된 組織 및 人工培地에서 培養되었을 경우 卵形이며 出芽法에 依한 出芽로서 증식하고 細胞 주위에는 粘液質의 莢膜이 둘러 쌓여있으며 이는

高度의 抗原성과 病原성을 內包하고 있다.

Cryptococcus neoformans 의 電子顯微鏡의 觀察은 Tsukahara(1963)에 依하여 시도된 以來 Shadomy 및 Utz(1966), Edward 等(1967)은 正常細胞를 觀察하여 他種類의 眞菌類가 含有하고 있는 全般的인 細胞質內 物質을 含有하고 있다고 發表한 바 있다.

한편 酵母樣 眞菌의 電子顯微鏡의 觀察은 Conti 및 Naylor(1959)는 *Schizosaccharomyces octosporus*, Edward 等(1959, 1960)은 *Blastomyces brasiliensis* 및 *Histoplasma capsulatum* 의 酵母 生長相, Rabi 및 Salviu(1956)은 *Histoplasma capsulatum*, Casbonell 및 Pollak(1963)은 *Paracoccidioides brasiliensis*, Bakesspigel

(1964)는 *Candida albicans* 등으로 細胞의 微細構造를 觀察하여 發表하였으며, 一般 真菌類의 微細構造에 對하여는 여러 學者들에 依하여 觀察 報告된 바 있다. (O'Hesn 및 Henry, 1952; Hilda 등, 1957; Kitamura, 1965; Tokunaga 등, 1969; Lane 등, 1969; Garrison 등 1970; James 등, 1970; Moens, 1971)

藥劑處理나 光線照射 處理에 依한 研究 報告는 Gale(1963), Adams 등(1963) 그리고 李等(1969)은 *Candida albicans*에 各種 藥劑를 處理하여 細胞構造에 對한 變化를 觀察 報告하였고 Blank等(1960), 그리고 高等(1970)은 表在性 真菌에 對하여 藥劑處理의 變化를 研究 報告하고 微細構造의 變化를 發表하였다.

이에 著者들은 酵母樣 真菌의 一種인 *Cryptococcus neoformans*에 紫外線을 照射하여 細胞의 形態學的인 變化를 電子顯微鏡을 通하여 調查하였던 바 그 成績을 얻을 수 있었기에 여기 報告하는 바이다.

材料 및 方法

A. 實驗材料

1. 實驗에 使用된 菌株 :

實驗에 使用된 菌株로서는 本教室에서 보관 계대하여 오는 *Cryptococcus neoformans* 1株를 使用하였으며 이는 實驗에 使用하기 전 mouse 腹腔內에 注射하여 一週日을 經過시킨 후 腹腔內에서 菌을 採取하여 Sabouraud's 糖 培地에 48時間 培養한 후 이 培地上에서 培養된 菌株를 使用하여 實驗하였다.

B. 實驗方法

1. 紫外線 照射方法 :

一定한 時間(48 hrs) 培養된 菌株를 Sabouraud's 糖 液體培地에 懸탁액을 만든 후 이에 1 ml를 採取하여 Sabouraud's 糖 固體培地上에 接種한 후, 紫外線燈(115V., 15W., 2537 Å 管型) 直下 30 cm 下에 놓아 10分, 20分, 30分 間격으로 紫外線을 조사하였으며 照射를 一定하게 하기 위하여 transformer를 使用하였다. 照射 후 37°C에서 培養하여 이를 수집하여 實驗에 임하였다.

2. 電子顯微鏡의 實驗方法 :

試料를 500 rpm으로 低速遠沈하여 그 상등액을 버린 다음 0.1 mol phosphate buffer 溶液으로 調整한 pH 7.4의 3% glutaraldehyde 溶液에 0~4°C에서 2時間 以上 先固定을 행한 후 pH 7.4의 10% sucrose를 包含한 0.1 mol phosphate buffer 液으로서 세척한 다음 上記 液內에서 0~4°C를 유지하면서 一夜 放置하였다.

다음 0.1 mol phosphate buffer 液으로 調整된 pH 7.4의 1% osmium tetroxide로서 2時間 後 固定을 행하였다. 固定이 끝난 試料는 70% ethanol로서 세척한 후 다시 500 rpm으로 遠沈하고 상등액을 버린 후 Kellenberger, Ryter 및 Sechaud(1958) 方法에 依하여 침전부위에 1% 加溫 agar를 첨가하고 agar가 凝固된 후 이를 1 mm²의 크기로 細切하여 70% ethanol로부터 上昇順으로 無水 알콜 및 propylene oxide 등으로 脫水를 行한 후 Epon 812(Luft, 1961)로 包埋하여 glass knife로서 Sorvall MT-2 porterblum ultramicrotome을 使用하여 500 Å 두께의 超薄切片을 作成하여 飽和 uranyl acetate와 lead citrate로 二重染色한 후 Hitachi製 HU-11E-1型 電子顯微鏡으로서 75 KV 下에서 觀察하였다.

結果 및 考察

A. 正常菌의 微細構造에 對한 觀察成績 :

1. 細胞壁(cell wall) : 細胞膜(plasma membrane: pm) 의층에 存在하는 高度의 電子 불투과성 성질을 나타내는 膜이며 두께에는 差異가 있다. 이 細胞壁과 莢膜 사이에는 電子 투과성 성질의 테두리(white rim: wr)가 있다.

2. 細胞膜(plasma membrane) : 두 層의 電子密集層(two layer of electron dense layer)로서 형성되어 있으며 一般 細胞의 細胞膜과 비슷하다.

3. 莢膜(capsule) : 莢膜의 두께 역시 差異를 나타내고 있으며 이는 가는 실과 같은 형태(thin and dense microfibril)를 갖고 있으

며 培養時間에 따라 차이를 나타내고 切斷面에 따라서도 差異를 보이는 것 같다. 또한 이 莢膜의 存在 및 두께는 細胞內物質의 保護역할에도 關與하는 것 같다.

4. 核(nucleus): 二層의 膜으로 둘러 쌓여 있으며, 核 內部에는 仁(nucleolus)을 含有하고있어 eucaryotic cell의 核 形態와 類似한 構造를 갖고 있다.

5. 細胞質(cytoplasm): eucaryotic cell에서 觀察되는 mitochondria, endoplasmic reticulum, vacuole 등을 관찰할 수 있으며 영양물질의 저장장소인 storage granule을 觀察할 수 있었는데 이는 電子密度로 보아 lipid를 含有하고 있는 것 같았으며 本 實驗에서는 Golgi apparatus를 觀察할 수 없었다.

B. 紫外線 處理菌의 實驗成績

紫外線 處理菌에 對한 成績을 보면 紫外線 照射時間에 따라 심한 變化를 초래하는 것을 볼 수 있었으며 照射時間 5분인 경우에는 正常菌과의 별다른 차이점을 發見할 수 없었으나 10분이상 照射菌에서는 細胞自體의 形態學的인 變化를 초래함과 同時에 內容物質의 변화도 나타내기 시작하였으며 30분의 照射菌株에서는 內容物質의 심한 변화와 아울러 electron transparent area의 많은 증가를 나타내어 細胞가 파괴되어 가는 形상을 발견할 수 있었다. 또한 正確한 細胞質의 形態를 觀察하기 힘들었다. 眞菌類의 細胞構造에 對한 研究는 光學顯微鏡을 利用하여 많은 發表가 된 바 있다. 그러나 電子顯微鏡이 1940年代부터 실제로 利用하게 되면서 점차 이를 使用한 微細構造에 對한 연구가 進行되었으며 酵母를 利用한 微細構造에 對한 研究는 상당히 進行되었다고 할 수 있다.

*Cryptococcus neoformans*의 電子顯微鏡의 觀察는 Tsukahara(1963)에 依하여 시도된 후 Shadomy 및 Utz(1966)는 *Cryptococcus*에서 때로는 爲菌絲(pseudo hyphae)를 形成한다고 報告하였으며 Conti 및 Nylor(1959)는 *Schizosaccharomyces octosporus*, Edward 등

(1959, 1960)은 *Blastomyces brasiliensis*의 酵母生長相, Rabi 및 Salvi(1956)은 *Histoplasma capsulatum*, Carbonell 및 Pollak(1963)은 *Paracoccidioides brasiliensis*, Bakerspigel(1964)는 *Candida albicans* 등을 使用하여 酵母類에서 觀察可能하며 酵母樣 病原性 眞菌類에서 볼 수 있는 一般의인 細胞構造 即 核, 仁, 核膜, mitochondria, endoplasmic reticulum 및 液胞 등을 관찰할 수 있었다고 發表한 바 있는데 本 實驗 結果에서도 이와 같은 構造의 觀察이 可能하였다.

Edwards 등(1967)은 上記 記述한 構造以外에도 ribosomal particle 등의 관찰과 細胞膜의 함입 등은 細菌에서의 mesosome 과 비교할 수 있는 구조라 하고 mitochondria의 環狀構造를 觀察할 수 있었다고 報告하였으나 著者들은 이와 같은 構造의 관찰은 힘들었다. 또한 storage granule은 lipid particle 혹은 glycogen particle로 관찰할 수 있었으며 液胞膜 역시 單層膜으로 구성된 點은 일치하는 점이라 하겠다.

한편 藥劑處理에 依한 細胞의 變化과정에서는 Gale(1963), Adams 등(1963) 그리고 李等(1969)은 *Candida*에 對하여 各種藥劑를 處理하여 Blank(1960) 및 高等(1970)은 表在性 眞菌에 對하여 실험하여 大部分의 菌株가 細胞壁의 肥厚, 細胞質의 變化 ETA의 증가 현상을 발표하였는데 本 實驗結果, 藥劑 대신 紫外線으로 處理하였을 경우 紫外線 處理時間이 짧은 경우에는 별다른 變化를 발견할 수 없었으나 處理時間이 증가할수록 形態學的 變化를 수반하며 아울러 細胞內容物質의 심한 變化를 일으켰으며 이러한 경우 ETA의 증가현상을 관찰할 수 있었는데 이는 藥劑處理에 依한 變化와 비슷한 結果이었다.

本 實驗을 종합하여 볼 때 紫外線 處理가 菌株의 돌연변이를 유발시키는지의 여부, 細胞의 固定時의 환경요인의 變化에 따르는 問題點들은 좀더 앞으로 연구 검토되어야 할 것으로 생각되며 이 외에 各種 藥劑에 依한 *Cryptococcus neoformans*의 變化有無도 同時에 研究되어야 할 것으로 믿는다.

Explanation of Photographs

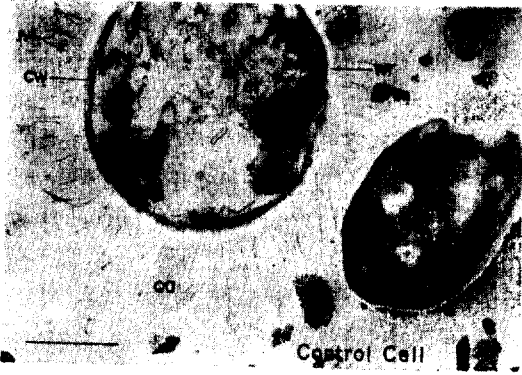


Fig. 1.

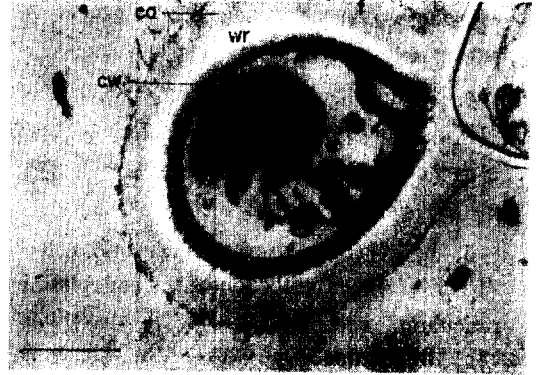


Fig. 2.



Fig. 3.

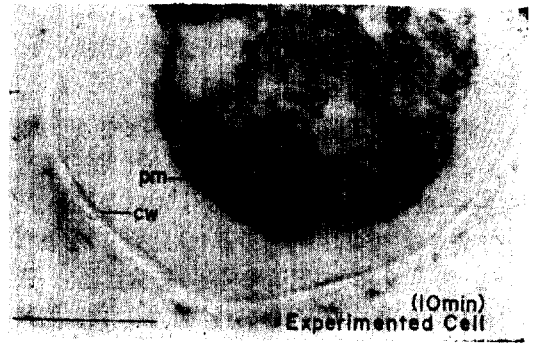


Fig. 4.



Fig. 5.

- Fig. 1.** 정상 *Cryptococcus neoformans*로서 核(n), electron dense granule(g), endoplasmic reticulum(er), 세포벽(cw), white rim(wr) 및 fibril 形의 capsule 층(ca)이 관찰된다. $\times 37,000$.
- Fig. 2.** 확실한 fibril 形의 협막층(ca)와 원형의 mitochondria(m)를 볼 수 있다. $\times 37,000$.
- Fig. 3.** 5분간 자외선 처리군으로서 정상세포와 별다른 차이를 볼 수 없다. $\times 35,000$
- Fig. 4.** 10분간 자외선 처리군으로서 세포벽(cw)과 세포막(cm)의 분리현상을 관찰할 수 없으며 아울러 세포내용물질의 명확한 구조를 보기 힘들다. $\times 56,000$.
- Fig. 5.** 30분간 자외선 처리군으로서 형태학적인 많은 변화와 아울러 electron transparent area(ETA)의 증가현상을 볼 수 있다. $\times 50,000$.

摘 要

本教室에서 保存 繼代하여 오던 酵母樣 眞菌類의 一種인 *Cryptococcus neoformans* 를 紫外線 照射處理를 하여 細胞의 構造變化를 電子顯微鏡을 通하여 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 正常 *Cryptococcus neoformans* 는 一般 眞菌類가 含有하고 있는 細胞 內容物質들을 갖고 있었으며, 이는 eucaryotic cell 의 形態와 비슷하였다.

2. 紫外線으로 處理한 菌에서는 照射時間에 따라 形態學的인 變化가 심하였으며 形態學的인 變化 및 內容物質의 變化는 10 分以上 照射處理된 菌에서부터 觀察할 수 있었다.

3. 紫外線 處理時間이 30 분이 경과된 菌에서는 심한 形態學的 및 內容物質의 變化를 초래하였으며 이 群에서는 ETA 의 심한 증가 현상을 나타내었다.

4. ETA 의 증가현상은 菌體의 degradation process 의 하나라고 思料된다.

5. 紫外線 處理에 依한 돌연변이 유발 여부에 대한 실험은 계속 추시할 點이라고 생각된다.

引 用 文 獻

1. Adams, J.N., Painter, B.G. and Payne, W.J. 1963. Effects of sodium capulate on *Candida albicans*, I. Influence on concentration ultrastructure, *J. Bact.*, **86**: 548,
2. Bakerspigel, A. 1964. Some observations on the cytology of *Candida albicans*, *J. Bact.*, **73**: 365,
3. Blank, H., Taplin, D. and Rothe, F.J. 1960. Electron microscopic observations of the effects of griseofulvin on dermatophytes, *Arch. Dermat.*, **81**: 667,
4. Carbonell, L.M. and Pollak, L. 1963. Ultrastructura del *Paracoccidioides brasiliensis* en cultivos de la fase levaduriforme, *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **19**: 184.
5. Conti, S.F. and Naylor, H.B. 1959. Electron microscopy of ultrathin sections of *Schizosaccharomyces octosporus*, I. Cell division, *J. Bact.*, **78**: 868.
6. Edwards, M.R. 1966. Internal and external fine structure of the yeast *Cryptococcus neoformans*, Congr. Electron Microscopy, 6th, Kyoto, Japan, vol. 2, p. 783,
7. Edwards, G.A. and Edwards, M.R. 1960 The intracellular membranes of the yeast-like cells of *Blastomyces dermatitidis*, *Am. J. Botany*, **47**: 622.
8. Edwards, M.R., Hazen, E.L. and Edwards, G.A. 1959. The fine structure of the yeast-like cells of *Histoplasma* in culture, *J. Gen. Microbiol.*, **20**: 496.
9. Gale, G.R. 1963. Cytology of *Candida albicans* as influenced by drugs acting on the cytoplasmic membrane, *J. Bact.*, **86**: 151.
10. Garrison, G.R., Lane, J.W. and Field, M.F. 1970. Ultrastructural changes during the yeast-like to mycelial phase conversion of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*, *J. Bact.*, **101**: 628.
11. Hilda, D.A. and Douglas, H.C. 1957. Studies on the cytological structure of yeast: Electron microscopy of thin section, *J. Bact.*, **73**: 365.
12. Kitamura, K. 1965. Fine structure of *Sporotrichum schenckii*, Japan. *J. Dermat.*, **75**: 285.
13. Kellenberger, E., Ryter, A. and Sechaud, J. 1967. Cited from "Techniques for Electron Microscopy", F.A. Davis Co.,
14. Koh, C.M., Kim, T.W. and Lew, J. 1970. Electron microscopic observations of the effects of thiocarbanilide(L-1) on dermatophytes, *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **5**: 9.
15. Lane, J.W., Garrison, R.G. and Field, M.F. 1969. Ultrastructural studies on the yeast like and mycelial phases of *Sporotrichum schenckii*, *J. Bact.*, **100**: 1010.

16. Lane, J.W. and Garrison, R.G. 1970. Electron microscopy of the yeast to mycelial phase conversion of *Sporotrichum schenckii*, *Canad. J. Microbiol.*, 16: 747.
17. Lee, J.B., Choi, T.K. and Lew, J. 1969. Mycological studies of *Candida* species isolated from vagina, *Yonse J. Med. Sci.*, 2: 53.
18. Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 409.
19. Moens, P.S. 1971. Fine structure of ascospore development in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Canad. J. Microbiol.*, 17: 507.
20. O'Hern, E.M. and Henry, B.S. 1952. A cytological study of *Coccidioides immitis* by electron microscopy, *J. Bact.*, 72: 632.
21. Rabi, E. and Salvin, S.B. 1956. Antigens from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*, *Exptl. Cell Res.*, 10: 394.
22. Shadomy, H.J. and Utz, J.P. 1966. Preliminary studies on a hypha-forming mutant of *Cryptococcus neoformans*, *Mycologia*, 58: 383.
23. Tokunaga, J., Tokunaga, M., Egashira, T. and Harada, K. 1969. Electron microscopical studies on growing fungal cells, *Japan. J. Bacteriol.*, 24: 673.
24. Tuskahara, T. 1963. Cytological structure of *Cryptococcus neoformans*, *Japan. J. Microbiol.*, 7: 53.
25. Votols, E., North, R.J. and Linnane, A.W. 1961. Studies on the oxidative metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, I. Observations on the fine structure of the yeast cell, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 689.