

이질아메바 (*Entamoeba histolytica*) 와 치은아메바 (*Entamoeba gingivalis*) 의 Acid Phosphatase 활성에 관한 세포화학적 연구

趙基穆·車惠榮·蘇鎮璋
연세대학교 의과대학 기생충학교실

Ultrastructural Localization of Acid Phosphatase in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba gingivalis*

Kee-Mok CHO, Hai-Young CHA and Chin-Thack SOH

Department of Parasitology, College of Medicine, Yonsei University

ABSTRACT

A combined cytochemical and electron microscopic study was carried out for the demonstration of acid phosphatase activities in trophozoites of *E. histolytica* and *E. gingivalis*. *E. histolytica* (YS-27) strain was isolated from liver abscess of 72-year-old man in September 1969, and *E. gingivalis* (YS-215) strain was collected from gingival crevice of 41-year-old man in January 1972. The amoeba strains were maintained by subculture on diphasic medium, and used throughout the study.

The results are summarized as follows;

1. In *E. histolytica*, the reaction products were distributed evenly over the entire surface of plasma membrane, whereas *E. gingivalis* showed no activity of acid phosphatase on the plasma membrane, except in the portion of the uroid-like structure.
2. In the cytoplasm, various reaction precipitates were observed in vacuoles of both amoebae; vacuole limiting membrane, vacuole membrane and its contents and lysosome-like structure. Strong enzyme active contents but membrane reaction negative vacuoles were conspicuous in *E. gingivalis*. Endoplasmic reticulum showed a moderate activity.
3. Granule-like acid phosphatase reaction product was demonstrated in the nucleoplasm of *E. gingivalis*, but it was negative in *E. histolytica*.

I. 서 론

이질(痢疾) 아메바 (*Entamoeba histolytica*) 와 치은(齒齦) 아메바 (*Entamoeba gingivalis*) 는 같은 인체기생 Entamoeba 속에 속하는 원충들이나 전자(前者) 는 주로 장관내에 기생하며 때로는 간, 폐, 피부등 제 장기에 전이(轉移) 하여 병변을 일으키고 후자(後者) 는 주로 구강내에 기생하는 비병원성으로 알려진 원충(原虫) 이다. 그러나 형태학적으로는 양자간에 매우 유사한 점이 많다 (Belding, 1965).

최근에 Eaton et al. (1969), El-Hashimi and Pittman (1970), Lowe and Maegraith (1970 a, b, c), Cho et al. (1972), Proctor and Gregory (1972), Westphal

et al. (1972), Diamond et al. (1972) 및 Mattern et al. (1972) 등은 전자현미경을 사용하여 이질아메바의 미세구조(微細構造) 를 관찰하고 종래에 광학현미경적으로는 밝혀지지 않았던 새로운 제구조를 관찰하였다고 보고하였다. 또한 Keller et al. (1967) 과 Yang and Cho (1972) 등은 치은아메바의 미세구조를 관찰하고 이질아메바와는 다소 양상을 달리한 제구조와 uroid 양소기관등의 새로운 구조물도 관찰하였다고 보고한 바 있다.

그러나 상기한 제보고는 대부분 순 형태학적인 연구에 속하며 본원충류의 세포질내 미세구조물을 그 생리적의의(生理的意義) 와 결부하여 관찰한 보고

는 매우 적다.

본 연구는 이질아메바와 치은아메바의 새로운 제구조물의 기능을 해명해 나가는 기초조사로서 본 원충들의 세포질내 acid phosphatase 활성능의 분포상태를 전자현미경으로서 조사하고 본 원충들이 포식한 식포내용물질(噬胞内容物質)의 소화기전을 추구하고 아울러 동일한 *Entamoeba* 속에 속하나 생리적조건을 달리하는 양 아메바간의 차이점을 규명해 보고저 하는 목적으로 시도된 것이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 이질아메바와 치은아메바의 주(株) 및 배양(培養)

이질아메바는 YS-27주를 사용하였다. YS-27주는 1969년 9월에 세브란스병원에서 아메바성 간농양환자인 72세 남자의 간농즙중에서 분리하여, 趙(1968)가 보고한 방법에 의하여 자우혈청(仔牛血清)과 케니시린 G를 첨가한 이상배지(二相培地)를 사용하여 장내세균혼재 조건하에 소량의 멸균된 쌀가루를 첨가하여 배양하고 격일(隔日) 계대배양(繼代培養)한 주이다.

치은아메바는 YG-215주를 사용하였다. YG-215주는 1972년 1월에 연세대학교 치과대학부속병원에서 치주염(齒周炎) 환자인 41세 여자의 치주낭(齒周囊)에서 채취하여 Yang and Cho(1972)가 보고한 방법에 의하여 상기 이질아메바 배양배지의 사면에 난황액체 배지(egg-yolk fluid medium)를 중첩하여 구강내세균 혼재조건하에 이질아메바와 동일한 방법으로 계대배양한 것이다.

2. 광학현미경 표본 작성

48시간 배양한 수개 배지의 칩사부를 멸균, 원심관에 채취하여 광학현미경으로서 배지내에 활발히 움직이는 아메바를 확인한 후 저속원심분리(500 rpm)하고 그 상청액을 버렸다. 그 칩사부를 Ohashi(1971)가 보고한 방법에 의하여 난백(卵白) glycerin을 바른 slide에 도말한 후 완전히 마르기 전에 냉각 acetone 내에서 30초간 고정하였다. 이를 증류수로 세척한 다음 0.1 M citrate buffer (pH 4.7)내에 30분간 방치후 다시 증류수로 세척하고, Gomori medium(Eränkö et al., 1952)내에 침적하여 37°C 부란기 내에서 45분 내지 90분간 반응을 진행시켰다.

Gomori medium(Eränkö et al., 1952)의 처방:

2% sodium glycerophosphate	6 ml
0.1M acetate buffer (pH 4.7)	10 ml
5% lead nitrate	4 ml
증류수	80 ml

위 반응을 진행시킨 것을 증류수로 5분간격으로 5~6회 세척하고 건조시킨 후 0.25% ammonium sulfide 내에 2분간 침적하였다. 이것을 증류수로 철저히 세척한 후 Canada balsam으로 봉입하여 검정하였다. 대조군은 반응진행과정에서 2% sodium glycerophosphate를 제거한 Gomori medium 내에 침적했으며 그 타의 조작과정은 실험군과 동일하였다.

3. 전자현미경 표본 작성

광학현미경 표본작성법과 동일한 방법으로 배지내의 아메바를 원심 분리하였다. 그 칩사부에 Choy and Cravioto(1968)가 보고한 방법에 의하여 3% glutaraldehyde 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) 2 ml를 가하고 4°C에서 2~4시간 고정하였다.

그리고 저속원심침전(500 rpm)한 후 상청액을 버리고 그 칩사부에 1% agar(45°C)를 첨가하여 실온에 방치하여 agar가 응고된 후 이를 잘라 1mm 입방체의 절편을 만들었다. 이것을 7.5% sucrose 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2)로 세척한 후 4°C에서 1야 방치하였다. 그 뒤에 Gomori medium(Eränkö et al., 1952)내에 침적하여 37°C 부란기 내에서 45분 내지 90분간 반응을 진행시켰다. 다음에 7.5% sucrose 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2)로 세척한 후 1% osmium tetroxide 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)로 4°C에서 30분간 후 고정하였다. 그 뒤에 ethanol을 사용하여 60%부터 시작하여 70%, 80%, 90%, 그리고 무수 알콜 순으로 탈수한 후 prophyllene oxide를 사용하여 완전 탈수하고 Epon 812로 포매하였다(Luft, 1961).

Sorvall Porter Blum MT2 ultramicrotome을 사용하여 유리칼로 1 μ 두께의 세편(細片)을 만들어 basic fuchsin으로 염색한 후에 광학현미경 상에서 본 원충을 확인하였다. 아메바가 확인된 부위를 선정하여 500 Å 두께로 계속 자른 후 이를 150 mesh copper grid에 옮기고 Hitachi HU-11 E-1형 전자현미경으로 관찰하였다. 대조군은 Carrera and Changus(1948)가 보고한 방법에 의하여 2% sodium glycerophosphate를 제거하거나 또는 acid phosphatase 억제인자(抑制因子)로 알려진 sodium fluoride (M/300)를 첨가한 Gomori medium내에 침적하였으며 그 타의 과정은 실험군과 동일하였다.

III. 관 찰

1. 이질아메바(*E. histolytica*)의 acid phosphatase 활성분포

광학현미경을 사용하여 acid phosphatase 반응부위를 대조배지 침적군과 비교한바 세포막내에서는

일반적으로 약한 반응이 나타났으며, 세포질내의 vacuole로 사료되는 구조물과 그 인접부위에서 가장 강한 침착상이 관찰되었다. 이들 구조물과 타 구조와의 관계는 명백히 구별되지 않았다.

전자현미경에 의한 관찰성적 :

세포막상에 있어서는 전체적으로 acid phosphatase의 약한 반응이 균등하게 나타났으며, 세포질 내부에 있어서는 vacuole의 한계막(限界膜) 및 그 내용물질과 형질내망등에서 본 효소의 강한 침착물이 관찰되었다(부도 1). 대조군에 있어서는 세포질내부에 다소 다양한 다수의 공포와 세균 및 쌀가루등을 포식한 식포등이 관찰되었으나 양성반응은 나타나지 않았다(부도 8). 특히 세포막부위에 있어서는 Cho et al. (1972)이 보고한 세포막 소돌기에 해당하는 기관이 타부위에 비해 강한 양성반응의 침착물이 관찰되었다(부도 2).

세포질 내부에 있어서는 vacuole의 acid phosphatase 반응은 전연 반응이 나타나지 않은 vacuole로부터 vacuole의 한계막과 그 내용물이 구별되지 않은 강한 양성반응을 보이는 구조에 이르기까지 각종 단계의 양성반응이 관찰되었다(부도 3). 즉 vacuole은 acid phosphatase 양성반응 침착상에 따라 다음 5군으로 구분되었다.

- a) 전체가 강한 양성반응을 나타내며 내용물과 한계막이 구별되지 않고 균등성인 것.
- b) 한계막과 내용물의 양성반응이 뚜렷이 구별되는 것.
- c) 한계막에만 양성반응을 보이며 그 내용물은 반응이 극히 약하거나 또는 음성인 것.
- d) Vacuole의 내용물은 있으나 acid phosphatase 활성반응은 음성인 것.
- e) 내용물도 없고 반응도 음성인 vacuole 등이다. 그 중에는 a군에 속하는 구조가 b 및 c군에 속하는 vacuole과 인접되어 있거나 또는 부착되어 있는 상태로 관찰되었다(부도 4, 5).

어떤 부위에 있어서는 형질내망으로 사료되는 구조에 본 효소의 강한 침착이 관찰되었으며, 이 구조가 b, c군에 속하는 vacuole과 인접되어 있는 것도 관찰되었다(부도 6). e군의 vacuole은 주로 세포의 번두리에서 많이 관찰되었고 vacuole 한계막의 일단이 총체외부로 개방되어 있는 것도 있었으며, 이는 본 효소의 양성반응 침착정도로서 세포막과 구별할 수 있었다(부도 7).

핵에 있어서는 acid phosphatase 활성은 대조군과 비교하여 각별한 차이가 없었으며 음성인 것으로 관찰되었다(부도 1).

2. 치은아메바(*E. gingivalis*)의 acid phosphatase 활성분포

광학현미경으로서 관찰한바 세포질 내부에 있어서는 이질아메바와 거의 동일한 acid phosphatase 반응양상을 보였다. 즉 vacuole로 사료되는 구조와 그 인접부위에 강한 침착상이 나타났으며 타 구조와의 관계는 명확히 식별되지 않았다. 세포막에 있어서는 대조군과 비교하여 각별한 차이가 없었다.

전자현미경에 의한 관찰성적 :

세포막부위에 있어서는 일반적으로 acid phosphatase 양성 침착물은 거의 관찰되지 않았다(부도 9). 그러나 어떤 아메바에 있어서는 세포막일부의 국한된 부분에서 본 효소의 반응이 양성으로 나타난 것도 있었다(부도 10). 이는 Yang and Cho (1972)가 보고한 uroid양 소기관에 해당하는 구조인 것으로 간주되었다.

세포질내부에 있어서는 대체로 이질아메바와 유사한 침착상이 관찰되었다(부도 11). 즉 이질아메바에 있어서는 a, b, c, d 및 e군에 해당하는 vacuole이 모두 관찰되었다. 그러나 어떤 vacuole에 있어서는 혼재 배양세균이 포식되기 전과 같은 완전한 형태대로 남아있는 것이 있었다(부도 9). 이러한 vacuole에 있어서는 포식된 세균내에서 나타난 acid phosphatase 반응 침착물은 강한 양성을 보였으나 vacuole 한계막의 본 효소 반응은 음성 또는 약한 양성이었다. 또한 일부 vacuole에 있어서는 그 막보다 그 내용물에 있어서 acid phosphatase의 강한 양성침착물이 관찰되는 것도 있었다(부도 12).

그 외에 핵부근의 세포질내에서는 본 효소 양성인 직경 0.2 μ 의 작은 입자가 관찰되었다. 핵에 있어서는 핵질내부에 직경 0.05~0.1 μ 정도의 강한 acid phosphatase 반응을 나타낸 과립이 산재하여 있거나 또는 수개씩 모여 있는 것이 관찰되었다(부도 13).

대조군에 있어서는 acid phosphatase의 침착물이 전연 관찰되지 않았다(부도 14).

이상 기술한 이질아메바와 치은아메바에 있어서의 acid phosphatase 활성반응에 대한 관찰성적을 요약하면 다음과 같다. 즉 세포막부위에 있어서는 acid phosphatase 반응은 이질아메바에 있어서는 약한 양성반응이 전체적으로 균등하게 나타났으며 치은아메바에 있어서는 uroid양 소기관에 해당하는 부위를 제외하고는 본 효소 양성침착물이 거의 관찰되지 않았다. 세포질내부에 있어서는 양 아메바에서 모두 lysosome양 구조물과 형질내망을 위시

하여 vacuole의 한계막과 그 내용물 중에서 각종 단계의 본 효소 침착물이 관찰되었으며, 그 외에 치은아메바내의 vacuole에 있어서는 포식된 혼재배양세균에만 acid phosphatase 반응이 양성이었다고 그 한계막은 음성인 것도 있었다.

핵내의 acid phosphatase 반응은 이질아메바에 있어서는 전반적으로 음성이었으며, 치은아메바에 있어서는 핵질내부에 본 효소의 강한 양성과립이 산재 또는 수개씩 집합되어 있는 것이 관찰되었다.

IV. 고찰

원충류가 여러 종류의 가수분해효소를 가지고 있다는 것은 잘 알려진 사실이며 (Müller, 1969), 이와 관련한 원충류의 세포질내부에 있는 많은 vacuole의 본태에 관한 연구는 과거에도 상당히 주목을 끌어 왔다 (Kitching, 1956).

Acid phosphatase는 가수분해효소의 일종이며, 그 활성의 최적치가 pH 7.0이하 즉 3.6~6인 phosphomonoesterase이다 (Roche and Thoai, 1950). 본 효소는 각종 미생물, 식물조직 및 동물세포등에서 널리 검출되며 때로는 세포의 어떤 생활 단계에서 나타나는 수도 있다 (Walker et al., 1954). 원충류의 acid phosphatase에 관한 세포화학적 연구는 자유생활원충류에 있어서는 종래에 다수 보고된 바가 있다 (Elliott and Hunter, 1951; Allen, 1958; Hunter, 1959 & 1961; Birns, 1960; Seaman, 1961; Müller, 1962; Müller and Törö, 1962; Rosenbaum and Wittner, 1962; Sergejeva, 1964). 이 보고들은 원충류의 세포막 또는 세포질내에서 강한 acid phosphatase 반응이 나타났음을 광학현미경으로서 관찰하고 본 효소와 세포와의 관련성을 시사하였다. 이에 관한 연구는 Holt and Hicks (1961)가 보고한 전자현미경을 사용한 세포화학적 방법에 힘입어 최근에 많은 진전을 가져 왔다. 즉 Dembitzer (1968)는 *Blepharisma*를, Elliott and Clemmons (1966) 및 Levy and Elliott (1968)은 *Tetrahymena pyriformis*를, Goldfischer et al. (1963)는 *Campanella umbellaria*를, Esteve (1970)는 *Paramecium*을, Rudzinska (1972)는 *Tokophrya infusionum*을 이 방법으로서 관찰한 바 acid phosphatase 활성은 전자밀도가 높은 효소반응산물, 즉 lead phosphate의 침착물로서 관찰되었으며, 그 관찰결과로서 acid phosphatase를 주효소들과 vacuole의 내용물질과의 상관관계를 밝히고 원충류의 소화기전을 해명하고자 시도하였다.

Brandt and Pappas (1962)는 *Chaos carolinensis*의 세포막을 관찰한 바, 세포막의 외면에 무형층

(amorphous layer)으로 된 mucous coat가 있어 포식물을 탐식할 때에 이를 부착하고 세포질내로 끌어들이는 후에 이에 해당하는 세포막은 endocytic vacuole의 한계막을 형성하게 된다고 하였으며, Chapman-Andresen (1972)는 담수산(淡水産) 아메바를 관찰한 바 상기 vacuole내의 포식물의 소화 흡수가 완료된 이후에는 그 잔사물을 외부로 배출하게 되는데, 이 때에는 vacuole membrane이 다시 세포막으로 환원되는 과정, 즉 membrane cycle(세포막-세포막-세포막)이 이루어진다고 보고하였다.

본 실험성적에 있어 이질아메바의 세포막은 전반적으로 약한 acid phosphatase 활성반응이 나타난데 반하여 치은아메바의 세포막은 대체로 본 효소반응이 음성이었다(부도 2, 9). 인체 기생아메바에 있어서도 membrane cycle이 이루어진다고 가정한다면 본 관찰결과에 비추어 이질아메바는 식물을 탐식하기 전에 이미 세포막으로부터 소화효소의 소화작용을 받는다고 할 수 있고, 치은아메바에 있어서는 탐식전에는 소화효소의 작용을 받는 일이 없다고 할 수 있다. Cho et al. (1972) 및 Yang and Cho (1972)도 각각 이질아메바와 치은아메바의 세포내용물질을 관찰한 결과 전자에 있어서는 거의가 파괴된 물질이었고 후자에서는 파괴되지 않은 혼재배양세균이 있었음을 보고하였다. 본 실험에 있어서도 치은아메바에서 포식전과 거의 구조상 차이가 없는 혼재세균이 세포내에서 관찰(부도 9) 되었음을 상기할 때 양아메바간의 소화기전상에 본질적인 차이가 있음을 추정할 수가 있다.

이질아메바의 세포막에 있어서의 acid phosphatase 활성에 관하여는 Eaton et al. (1970)이 세포막상에 형성된 tubular trigger organism에서 본 효소활성침착물을 검출한 바 있고, Proctor and Gregory (1972)는 이를 추인한 바 있다. 이에 관하여는 앞으로 아메바를 배양시간별 또는 Gomori medium내의 침적시간별로 관찰하면 더욱 분명히 해명되리라고 믿는 바이다.

본 관찰결과에 있어 이질아메바의 소돌기에 해당하는 세포막부위에서는 타부위에 비하여 강한 acid phosphatase의 침착상이 관찰되었다(부도 2). 이 소돌기가 위족(pseudopodia)의 형성과 관계있는 기관인지, 식물포식과정과 관련한 세포막의 형태 변화인지는 앞으로 형광색소 또는 basic dye 등을 사용하는 방향으로 더 추구해야 할 문제이나 이 소돌기가 아메바의 생리적 필요성으로 인하여 야기된 세포막의 특수한 형태임에는 틀림없는 것 같다.

치은아메바의 세포막에 있어 uroid 양 소기관에 관하여는 여러가지로 논의되어 오는 바가 많다. Chapman-Andresen (1972)는 총괄적으로 자유생활 아메바의 생리적 endocytosis는 운동정지시와 운동시가 서로 다르며, uroid는 운동시에 membrane intake를 하는 부위라고 하였다. 이와 관련하여 본 관찰결과에 있어서 uroid 양 소기관에 해당하는 세포막의 부위에만 강한 acid phosphatase의 침착물이 관찰되었음은 매우 흥미있는 결과라고 하겠다.

Weissman (1965)은 세포내 소기관중에서 단층(單層)의 막으로 둘러져 있고, Gomori 법(1941)으로서 검출되는 acid phosphatase 활성양성인 구조는 lysosome 군에 속하는 것으로 간과할 수 있다고 보고하였다. 또한 lysosome 내에는 acid phosphatase 이외에 17종의 제효소가 함유되며, 그 외에 phagocytin, cationic inflammatory protein, mucopolysaccharide & glycoproteins, plasminogen activator, permeability inducing protease, hemolysin, unidentified basic proteins 등 제물질이 검출된다고 하였다.

De Duve and Wattiaux (1966)는 세포의 소화계통을 이론적으로 설명함에 있어 lysosome이 이 계통의 주요기능요소가 되며, 또한 제일 많은 부분을 차지하는 고로 lysosome으로서 설명될 수 있다고 하였으며 이를 다음과 같이 분류하여 설명하였다. 즉 primary lysosome은 과거나 현재에 있어서 소화기능을 발휘하지 않는 단계이며, prelysosome은 phagosome이라고도 호칭되는데 이는 아직 소화효소의 작용을 받지 않은 물질이 vacuole속에 들어 있는 단계이다. 이 물질들이 heterophagy에 유래하였을 때는 heterophagosome이라고 하며 autophagy에 유래한 것은 autophagosome이라고 하는데, 이들이 primary lysosome과 융합되어 소화가 진행되는 단계를 secondary lysosome 또는 각각 heterolysosome, autolysosome이라 불리운다. 소화가 완료된 단계를 telolysosome이라 하는데 나중에는 residual body가 되며, 이 상태에 있는 lysosome은 세포막으로부터 배출되게 마련인데 이를 postlysosome이라고 할 수 있다고 하였다.

본 실험성적에서는 이질아메바의 세포질 내에서 5군으로 구별되는 acid phosphatase의 침착상이 관찰되었다(부도 3). 이를 전술한 de Duve and Wattiaux (1966)의 lysosome 분류방식에 비추어 보건데 a군(L)은 primary lysosome에 해당되며 b군(V_1)은 secondary lysosome (heterolysosome 또는 autolysosome), c군(V_2)은 telolysosome, d군은 phagosome (또는 prelysosome), e군은 pinocytic vesicle인 것으로 해석된다. 또한 부도8에서의

관찰결과는 telolysosome (V_2)이 세포막외로 배출되어 postlysosome을 이루고, endocytic vacuole membrane이 plasma membrane으로 환원되는 소위 Chapman-Andresen (1972)이 제창한 membrane cycle의 마지막 과정인 것으로 간주된다.

Lysosome의 크기에 관하여는 보고된 바가 구구하다. Novikoff (1961)는 분획원심분리법(differential centrifugation technique)으로서 백서의 간세포를 연구한 결과 그 침전특성으로 보아 lysosome의 크기는 직경 약 0.4μ 이라고 보고하였고, Hansson and Sourander (1968)은 metazoan cell에 있어서는 약 1μ 인 것으로 되어 있으며, *Toxoplasma gondii*에서 관찰된 바로는 $0.11\mu \sim 0.62\mu$ 이었다고 보고하였다. de Duve and Wattiaux (1966)는 보통 세포내에서 관찰되는 것은 오히려 lysosome의 이차적인 종류에 속하며, 일차적과립(primary granule)이 만일 존재한다고 가정한다면 너무 작은 것이므로 보통 세포화학적 방법으로는 검출이 거의 힘들 것이라고 하였다. 본 실험성적의 이질아메바에서 관찰된 바로서는(부도 4, 5, 6) $0.4\mu \sim 1\mu$ 이었다. 이에 관하여는 앞으로 본 아메바에 있어서의 lysosome의 생성과정에 관한 연구방향으로 추구해야 할 문제로 사료된다. 따라서 본 논문에서는 우선 lysosome 양 구조물로 규정지었다.

De Duve and Wattiaux (1966)는 acid hydrolase의 생산과정은 protein의 그것과 같으며 그 차이는 protein은 세포외로 분비되는데 반하여 이 효소들은 세포내로 분비되어 pocket를 이룬다고 하였다. 그 경로는 벤틀이 있는데 Golgi saccules을 경유하여 Golgi vesicles로, Golgi saccules을 통하여 Golgi vacuoles로, 직접 endoplasmic reticulum을 통하여 dense body로, 또는 endoplasmic reticulum을 통하여 autophagic vacuole로 분비된다고 하였다. 이를 GERL(Golgi-endoplasmic reticulum lysosomes) theory라고 하였으며, Esteve (1970)는 *Paramecium caudatum*에서 GERL 경로를 관찰할 수 있었다고 보고하였다. 본 실험에 있어서는 전형적인 Golgi complex를 관찰하지는 못하였으나 endoplasmic reticulum에 있어서 강한 acid phosphatase의 양성침착물을 관찰하였고(부도 6), 그 부근에 본 효소의 강한 양성을 나타내는 vacuole과 lysosome 양 구조물들이 산재하여 있는 것이 관찰되었다. 이 결과로 미루어 이질아메바에 있어서는 Golgi complex와 유사한 기능을 가진 어떤 종류의 endoplasmic reticulum이 있어 본 효소를 생성하고 저장하고 운반하는 경로가 있을 것도 한번 고려해 볼 가치가 있는 문제로 사료된다.

Aikawa and Thompson (1971)은 *Plasmodium gal-*

linaceum 과 *P. berghei*에서 이와 유사한 관찰보고를 하였고, Ohashi (1972)는 *Trichomonas vaginalis*에서 역시 같은 보고를 하였다. Weissmann (1965)은 phagolysosome 이 형성되는 과정은 pre-existent lysosome 의 막이 phagosome 의 막과 융합됨으로서 이루어질 것이라고 하였다. 본 실험결과(부도 4, 5)에 관찰된 lysosome 양 구조물과 식포가 융합되는 과정은 이 이론을 충분히 뒷받침하는 관찰이었다고 사료된다.

치은아메바의 세포질내에서 관찰된 vacuole 중에 vacuole 한계막에서는 acid phosphatase 활성반응이 거의 나타나지 않았고, 포식된 혼재배양 세균내에서만 본 효소의 강한 침착물이 관찰된 결과는(부도 9) vacuole 내의 효소반입경로에 있어서 이질아메바와는 다른 양상이 있음을 추정케 하였다.

최근에 Rudzinska (1972)는 Suctororia 에 속하는 *Tokophrya infusionum* 이 *Tetrahymena* 를 포식하는 과정을 관찰하고, *Tokophrya* 세포질내의 acid phosphatase 의 형성경로는 본 원충자체내에서 형성되는 경로와 *Tetrahymena* 의 세포질내에서 형성된 acid phosphatase 가 포식과 더불어 *Tokophrya* 의 식포내로 반입되어 이 속에서 *Tetrahymena* 가 분해, 흡수된 연후에 식물 잔사속에 남은 acid phosphatase 가 농축되어 vesicle 을 형성하고, 이것이 다른 식포와 융합하여 그 내용물을 소화하는 기전, 즉 외래성반입경로가 있음을 관찰하였다고 보고하였다. 이에 비추어 본 실험결과에서 나타난 치은아메바의 세포질내의 acid phosphatase 의 분포상태를 분석하면, vacuole 내용물은 acid phosphatase 활성이 강한 양성인데 반하여 vacuole 막은 음성이거나 또는 극히 약한 양성인 것, vacuole 막과 그 내용물이 다 같이 양성인 것, vacuole 막은 양성이나 그 내용물은 음성인 것, 또는 전체가 강한 양성인 다양한 모양을 한 파립등이 있음을 알 수 있다(부도 9, 11, 12). 즉 vacuole 내의 acid phosphatase 는 주로 혼재세균에 의하여 반입된 외래성인 것이고 vacuole 막의 것은 주로 본 원충자체내에서 형성된 acid phosphatase 이며, vacuole 막과 그 내용물 전체가 양성인 것은 내용물에서 이행된 것과 본 원충자체내에서 형성된 acid phosphatase 양성물질이 있을 것이며, 이들이 lysosome 양 구조물로 되어있는 것으로 추정된다. 이에 관하여는 앞으로 본 원충의 순수배양법(axenic cultivation), 단일세균 혼재배양법(monoxenic cultivation)등을 개발하여 식물섭취시간별, Gomori medium 침적시간별 등으로 관찰하여 더 자세히 밝혀야 할 문제인 것으로 사료된다.

Love et al.(1969) 및 Soriano and Love (1971)

는 Hela cell 의 nucleoli 와 nucleoplasm 에서 acid phosphatase 활성 양성파립을 각각 광학현미경과 전자현미경으로서 관찰하고 본 효소가 세포질내에서 핵내로 들어갈 수 있는지 또는 핵내에서 세포질내로 나올 수 있는지에 관하여는 확실히 알 수 없으나 본 효소의 핵내에 있어서의 기능만을 짐작할 수 있다고 보고하였다. 즉 핵소체내에는 상당량의 orthophosphate 가 함유되어 있고(Tandler and Solari, 1968) 핵내에는 새로 합성된 다량의 RNA 분획이 분해되어 있는 것으로(Soeiro et al., 1968) 미루어 RNA 는 nucleolar ribonuclease 에 의하여 2' 또는 3' nucleotides 로 분해되는고로 nuclear RNA 는 이를 분해하는 효소를 활성화하는 다량의 orthophosphate 의 작용으로 acid phosphatase 에 의하여 가수분해될 수도 있다는 것이다.

Feria-Velasco and Trevino (1972)는 이질아메바의 핵내에서 acid phosphatase 활성침착물을 관찰하고 이는 "Button-like" intranuclear body 에 일치되는 구조라고 보고하였다. 본 실험결과에 있어서는 이질아메바의 핵내에서는 본 효소의 양성침착물을 발견치 못하였으나(부도 1) 치은아메바의 핵내에서는 직경 0.05 μ ~0.1 μ 의 강한 acid phosphatase 양성파립들이 핵질내에 산재 또는 수개씩 모여 있는 것이 관찰되었다(부도 13). 이들은 분명히 artifactual lead staining 으로는 간주되지 않으며 또한 그 크기와 형태로 보아 세포질내에 있는 acid phosphatase 양성인 lysosome 입자가 핵질내로 전입된 것으로도 간주되지 않는다. 이에 관하여는 아메바의 핵내에 있어서의 acid phosphatase 함유체의 기능, 이 물질과 세포분열 및 아메바의 종별특징과의 관계, 이와 핵소체와의 관련성 등 여러가지면에 있어서 더 추구하고 해명해야 할 문제로 사료된다.

V. 요약

이질아메바와 치은아메바의 Gomori 법에 의한 acid phosphatase 활성의 분포상태를 조사하기 위하여 광학현미경과 전자현미경으로서 비교 관찰한 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) Acid phosphatase 활성부위를 광학 현미경으로서 관찰한 바 이질아메바와 치은아메바간에 각별한 차이가 없으며, 세포막에서는 약한 양성반응을 보였고 세포질 내부의 구조물에서는 강한 반응을 나타냈다.

2) 전자현미경 소견으로는 이질아메바의 세포막 상에는 전반적으로 약한 양성반응이 나타났으며 세포막 소돌기에 해당하는 부위에 강한 양성반응이 관찰되었다. 치은아메바에 있어서는 세포막은 대

체로 음성이었으나 세포막의 국한된 부분에서 강한 반응을 나타내는 것도 있었다.

3) 세포질내부의 acid phosphatase 활성분포는 이질아메바에 있어서는 lysosome 양 구조물, 형질내망, 식포등에 강한 양성반응이 나타났으며 식포에서는 각종 단계의 반응이 관찰되었다.

치은아메바에 있어서도 이질아메바에서 관찰된 반응이 거의 나타났으며 특히 식포내용물은 강한 양성반응이나 그 막은 음성인 것이 현저하게 관찰되었다.

4) 핵내의 acid phosphatase 활성은 이질아메바는 대조군에 비해 차이가 없었으나 치은아메바에서는 핵질내에서 과립상 양성 침착물이 관찰되었다.

본 실험진행에 있어서 아낌없이 협조하여 주신 滕永健강사, 張在景기사 및 黃慶姬양에게 진심으로 감사사를 드립니다.

REFERENCES

- Aikawa, M., and Thompson, P. E. (1971): Localization of acid phosphatase activity in *Plasmodium berghei* and *P. gallinaceum*: an electron microscopic observation. *J. Parasit.*, 57 (3): 603-610.
- Allen, S. L. (1958): Cytochemical localization of enzymes in sexual strains of the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Anat. Rec.*, 131: 526-527.
- Belding, D. L. (1965): Text book of Parasitology, Appleton-Century-Crofts, New York. 3rd Ed., 34-95, 98-99.
- Birns, M. (1960): The localization of acid phosphatase activity in the amoeba *Chaos chaos*. *Exp. Cell Res.*, 20: 202-205.
- Brandt, P. W., and Pappas, G. D. (1962): An electron microscopic study of pinocytosis in amoeba. II. The cytoplasmic uptake phase. *J. Cell Biol.*, 15: 55-71.
- Carrera, G. M., and Changus, G. W. (1948): Demonstration of acid phosphatase in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 68: 610-611.
- Chapman-Andresen, C. (1972): Membrane activity in freshwater amoebae. *J. Protozool.*, 19 (2): 225-231.
- 趙基穆 (1968): 痢疾아메바 (*Entamoeba histolytica*) 의 培養에 關한 實驗的研究. *現代醫學*, 8(1): 57-76.
- Cho, K. M., Kim, C. W., and Soh, C. T. (1972): Electron microscopy of *Entamoeba histolytica* in culture and in intestinal mucosa. *Yonsei Rep. Trop. Med.*, 3 (1): 37-59.
- Choy, A. E., and Cravioto, H. (1968): A study of aryl sulfatase and acid phosphatase in the developing nervous system of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 16(19): 582-589.
- De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966): Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.*, 28: 435-492.
- Dembitzer, H. M. (1968): Digestion and the distribution of acid phosphatase in *Blepharisma*. *J. Cell Biol.*, 37: 329-344.
- Diamond, L. S., Mattern, C. F. T., and Bartgis, I. L. (1972): Viruses of *Entamoeba histolytica* I. Identification of transmissible viruslike agents. *J. Virol.*, 9(2): 326-341.
- Eaton, R. D. P., Meerovitch, E., and Costerton, J. W. (1969): A surface-active lysosome in *Entamoeba histolytica*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63: 678-680.
- Eaton, R. D. P., Meerovitch, E., and Costerton, J. W. (1970): The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 64 (3): 299-304.
- El-Hashimi, W., and Pittman, F. (1970): Ultrastructure of *Entamoeba histolytica* trophozoites obtained from the colon and from in vitro cultures. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 19: 215-226.
- Elliott, A. M., and Hunter, R. L. (1951): Phosphatase activity in *Tetrahymena*. *Biol. Bull.*, 100: 165-172.
- Elliott, A. M., and Clemmons, G. L. (1966): An ultrastructural study of ingestion and digestion in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, 13: 311-323.
- Eranko, O., Niemi, M., and Merenmies, E. (1952): On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat with special reference to acid phosphatase. *Acta. Anat. Suppl.*, 17: 1-60.
- Esteve, J. C.: Distribution of acid phosphatase in *Paramecium caudatum*. (1970): Its relations with the process of digestion. *J. Protozool.*, 17: 24-35.
- Feria-Velasco, A. and Trevino, N. (1972): The ultrastructure of trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to spherical arrangements of osmiophilic cylindrical bo-

- dies. *J. Protozool.*, 19(1) : 200-211.
- Goldfischer, S., Carasso, N., and Favard, P. (1963): The demonstration of acid phosphatase activity by electron microscopy in the ergastoplasm of the ciliate *Campanella umbellaria*. *J. Microbiol.*, 2 : 621-628.
- Gomori, G. (1941): Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathological conditions. *Arch. Path.*, 32 : 189-199.
- Hansson, H. A., and Sourander, P. (1968): Ultrastructural demonstration of lysosomes in *Toxoplasma gondii*. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 74 : 431-444.
- Holt, S. J., and Hicks, R. M. (1961): The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11 : 47-66.
- Hunter, N. W. (1959): Enzyme systems of *Styloynchia pustulata*. II. Miscellaneous system (hydrolases, hydrolases and dehydrogenases). *J. Protozool.*, 6 : 100-104.
- Hunter, N. W. (1961): Enzyme systems of *Colpoda cucullus*. II, Intracellular activity of some enzymes as determined by histochemistry. *Trans. Amer. Microbiol. Soc.*, 80 : 38-43.
- Keller, O., Orland, F. J., and Baird, G. (1967): Ultrastructure of *Entamoeba gingivalis*. *J. Dent. Res.*, 46 : 1010-1018.
- Kiuching, J. A. (1956): Food vacuoles *Protozoologia*, III. (3b) : 1-54.
- Levy, M. R., and Elliott, A. M. (1968): Biochemical and ultrastructural changes in *Tetrahymena pyriformis* during starvation. *J. Protozool.*, 15 : 208-222.
- Love, R., Studzinski, G. P., and Walsh, R. J. (1969): Nuclear, Nucleolar and cytoplasmic acid phosphatases in cultured mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 58 : 62-72.
- Lowe, C. Y., and Maegraith, B. G. (1970-a) Electron microscopy of *Entamoeba histolytica* in culture. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 64 : 283-291.
- Lowe, C. Y., and Maegraith, B. G. (1970-b): Electron microscopy of an axenic strain of *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 64 : 469-473.
- Lowe, C. Y., and Maegraith, B. G. (1970-c): Electron microscopy of *Entamoeba histolytica* in host tissue. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 64 : 469-473.
- Luft, J. H. (1961): Improvements in epoxyresin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9 : 409-414.
- Mattern, C. F. T., Diamond, L. S., and Daniel, W. A. (1972): Viruses of *Entamoeba histolytica* II. Morphogenesis of the polyhedral particle (ABRM2→HK-9)→HB-301 and the filamentous agent (ABRM) 2→HK-9. *J. Virol.*, 9(2) : 342-358.
- Müller, M. (1969): Lysosomal hydrolases in *Acanthamoeba* sp. *J. protozool.*, 16 : 428-431.
- Müller, M. (1962): Demonstration of hydrolases in *Paramecium multimicronucleatum* by histochemical methods. *J. Protozool.*, 9 (Suppl.): 26-27.
- Müller, M., and Törö, I. (1962): Studies on feeding and digestion in protozoa. III. Acid phosphatase activity in food vacuoles of *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Protozool.*, 9 : 98-102.
- Novikoff, A. B. (1961): Lysosomes and related particles. *The Cell*. Academic Press, New York, Vol. 2 : 423-488.
- Ohashi, O. (1971): Studies on acid phosphatase in Trichomonads. I. Cytochemical demonstration of the enzyme activity in *Trichomonas tenax* and *T. vaginalis*. *Jap. J. Parasitol.*, 20(5) : 399-405.
- Ohashi, O. (1972): Studies on acid phosphatase in Trichomonads. II. Electron microscopical demonstration of the activity. *Jap. J. Parasitol.*, 21(1) : 16-27.
- Proctor, E. M., and Gregory, M. A. (1972): The observation of a surface active lysosome in the trophozoites of *Entamoeba histolytica* from human colon. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 66(3) : 339-341.
- Rabinovitch, M., and Junqueira, L. C. U. (1948): Cytochemical demonstration of acid phosphatase in bone marrow smears. *Science*, 107 : 322-323.
- Roche, J., and Thoai, N. V. (1950): Phosphatase alkaline. *Advances Enzym.*, 10 : 83-122.
- Rosenbaum, R. M., and Wittner, M. L. (1962): The activity of intracytoplasmic enzymes associated with feeding and digestion in *Paramecium caudatum*. The possible relationship to neutral red granules. *Arch. Protistenk.*, 106 : 223-240.
- Rudzinska, M. A. (1972): Ultrastructural localiza-

- tion of acid phosphatase in feeding *Tokophrya infusionum*. J. Protozool., 19(4) : 618-629.
- Seaman, G. R. (1961): Acid phosphatase activity associated with phagotrophy in the ciliate *Tetrahymena*. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9 : 243-245.
- Sergejeva, G. I. (1964): Activity of acid phosphatase at different stages of the life cycle of *Nyctotherus cordiformis*. Acta. Protozool., 2 : 163-171.
- Soeiro, R., Vaughan, M. H., and Darnell, J. E. (1968): The effect of puromycin on intranuclear steps in ribosome biosynthesis. J. Cell Biol., 36 : 91-101.
- Soriano, R. Z., and Love, R. (1971): Electron microscopic demonstration of acid phosphatase in nucleoli and nucleoplasm. Exp. Cell Res., 65 : 467-470.
- Tandler, C. J., and Solari, A. J. (1968): Nucleolar orthophosphate ions. Electron microscope and diffraction studies. J. Cell Biol., 39 : 134a.
- Walker, B. S., Lemon, H. M., Davison, M. M., and Schwartz, M. K. (1954): Acid phosphatase. Amer. J. Clin. Path., 24 : 807-837.
- Weissmann, G. (1965): Lysosomes. New Eng. J. Med., 11 : 1084-1092.
- Westphal, A., Michel, R., and Muhlfordt. (1972): Electron-enmikroskopische Befunde beider Phagozytose von *Crithidia* sp. durch *Entamoeba histolytica*. Z. Tropenmed. Parasit., 23 : 117-127.
- Yang, J. K., and Cho, K. M. (1972): Fine structure of *Entamoeba gingivalis* in culture and in oral cavity. Yonsei Rep. Trop. Med., 3(1) : 60-72.

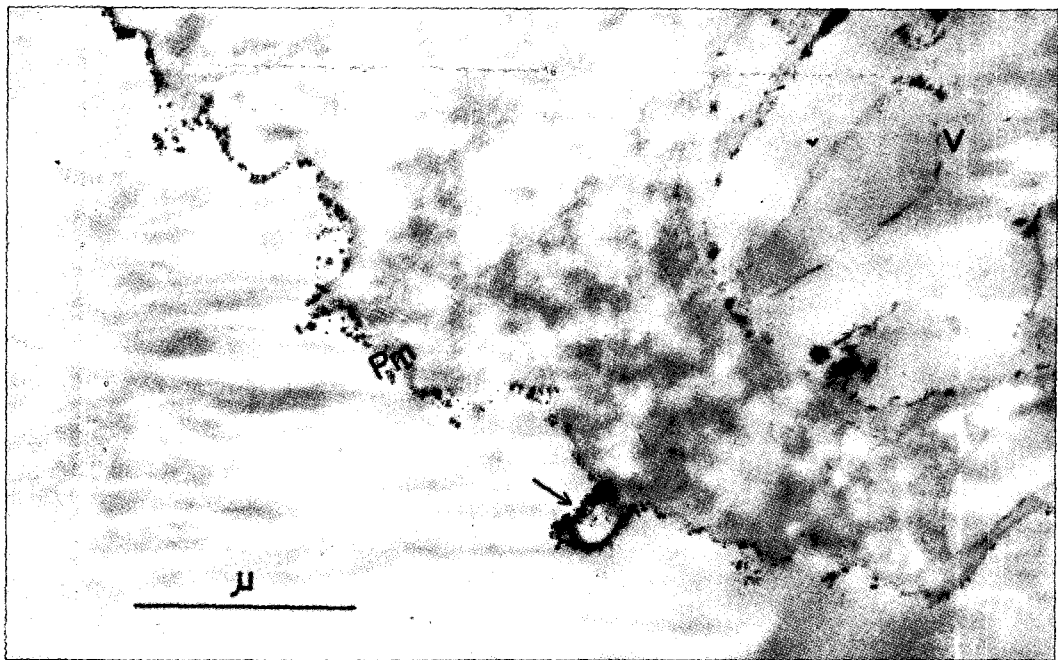


Fig. 1. Acid phosphatase activity of *Entamoeba histolytica* observed under electron-microscope. B:concomitant bacteria, Pm:plasma membrane, V:vacuole, N:nucleus.

Fig. 2. Positive reaction of acid phosphatase revealed at plasma membrane (Pm) and cytoplasmic projection (arrow) of *E. histolytica*.

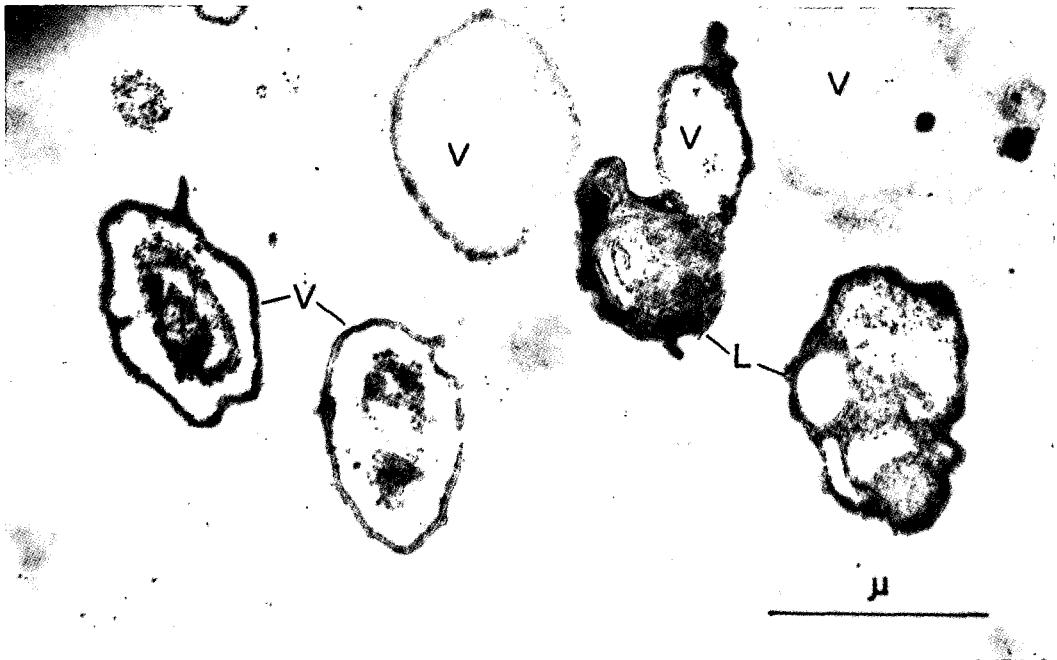
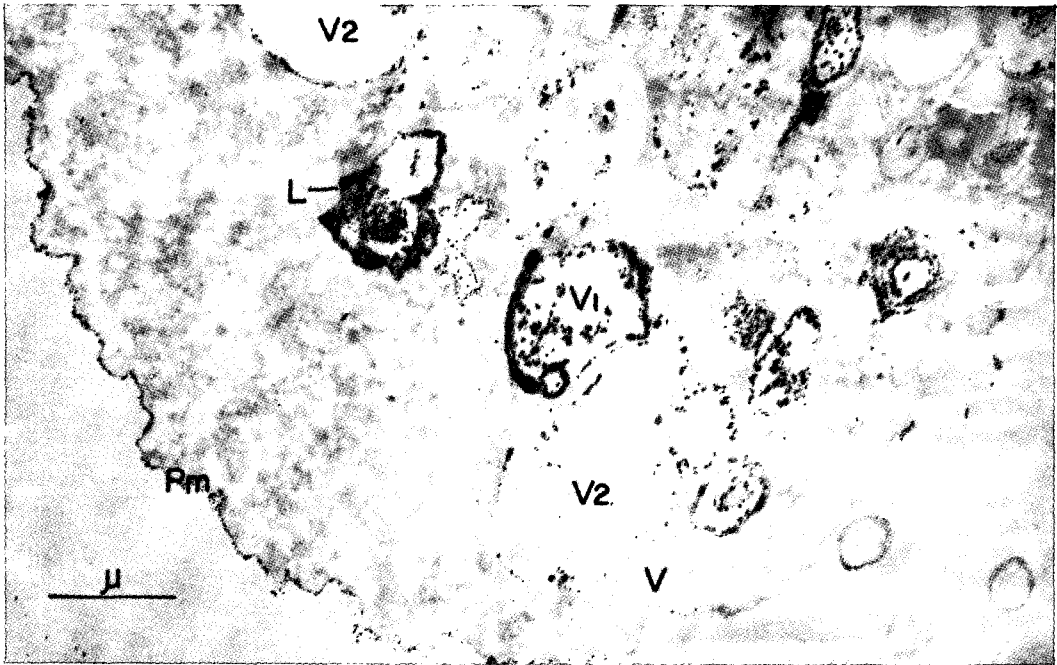


Fig. 3. Positive reaction of acid phosphatase in lysosome-like organelle(L) and vacuoles (V1, V2) of *E. histolytica*. Some vacuoles (V) revealed negative reaction.

Fig. 4. High power observation of lysosome-like structures and vacuoles revealed positive reaction in the cytoplasm of *E. histolytica*.

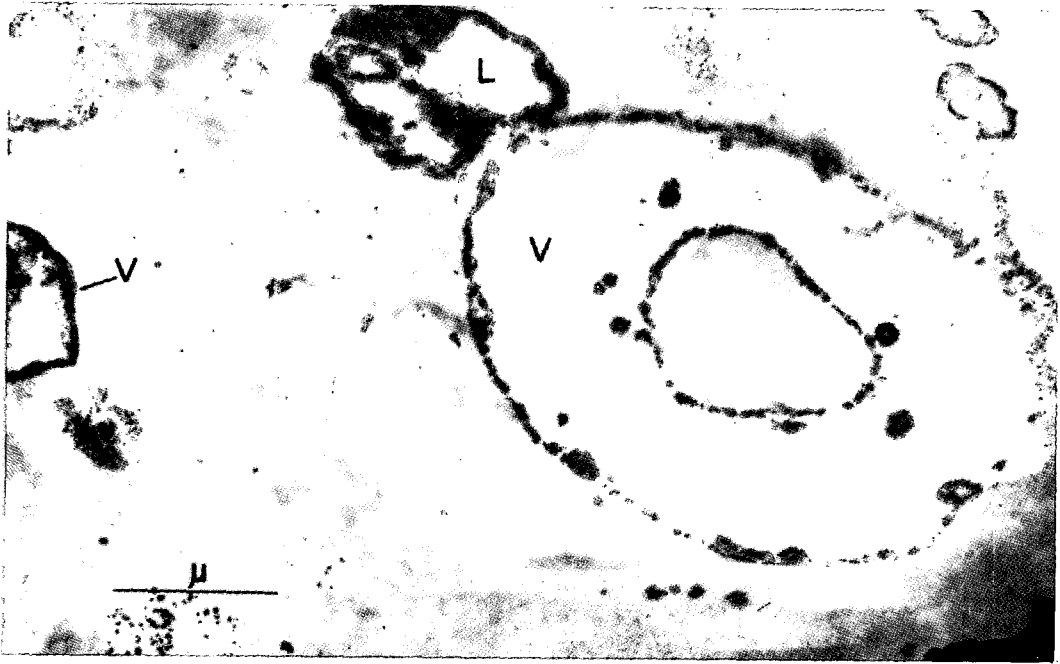


Fig. 5. Positive reaction of the enzyme at the connected portion of lysosome-like structure (L) and vacuole (V) in the cytoplasm of *E. histolytica*.

Fig. 6. Strong positive reaction of the enzyme revealed at endoplasmic reticulum (ER), the circumference of ER (arrow), vacuole and lysosome in cytoplasm of *E. histolytica*.

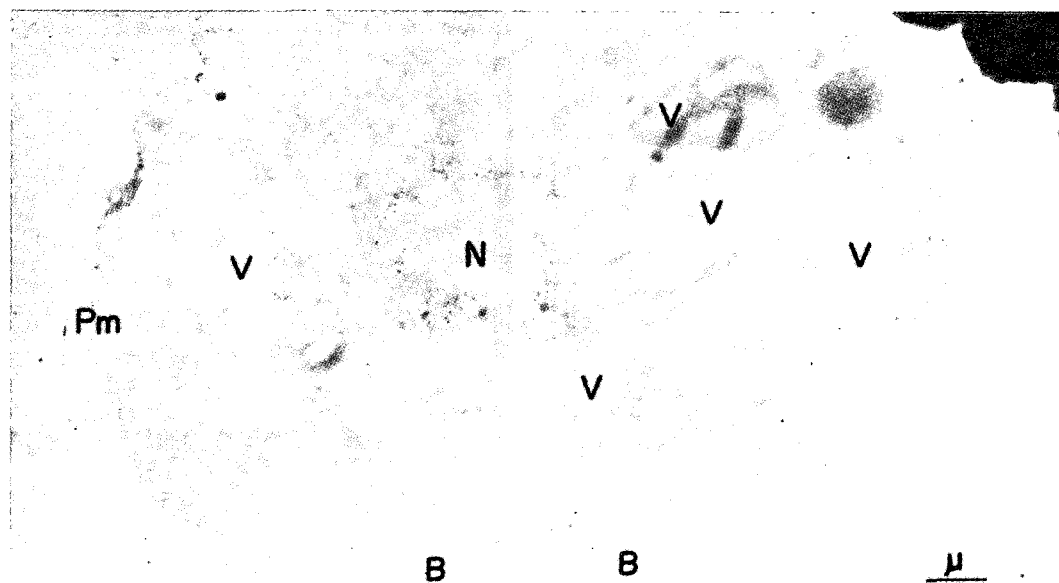
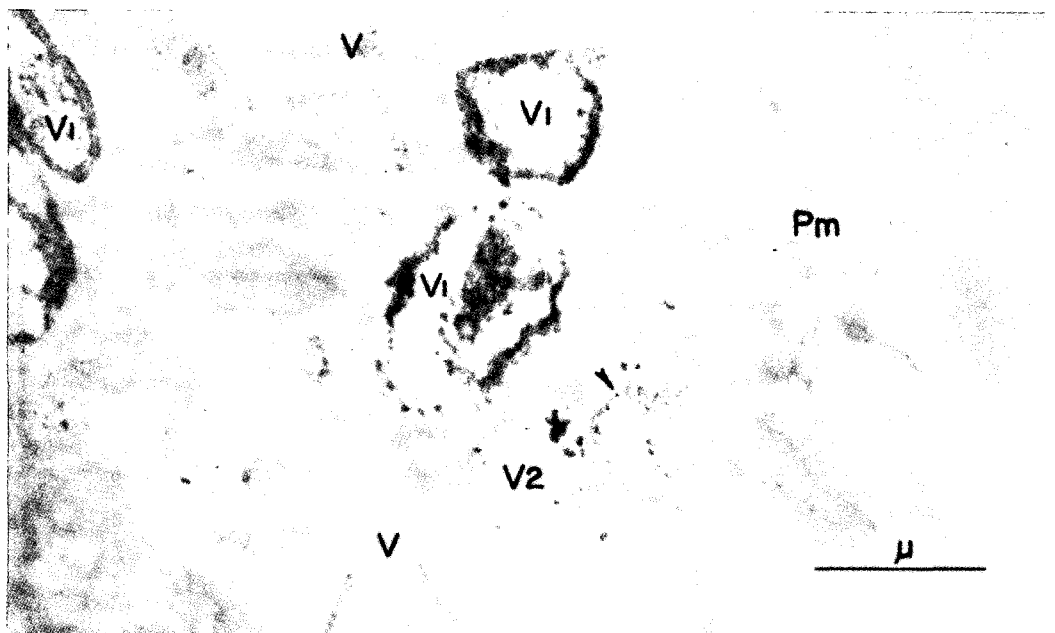


Fig. 7. Positive reaction of acid phosphatase in vacuoles around the plasma membrane of *E. histolytica*. Vacuole in strong positive reaction (V1), vacuole with weak positive reaction only at the membrane (V2), vacuole with negative reaction (V), and positive reaction in invaginated plasma membrane (head of arrow) were observed.

Fig. 8. Electron-microscopic comparison of acid phosphatase activity at plasma membrane (Pm), vacuoles (V), nucleus (N) and concomitant bacteria (B) of *E. histolytica*.

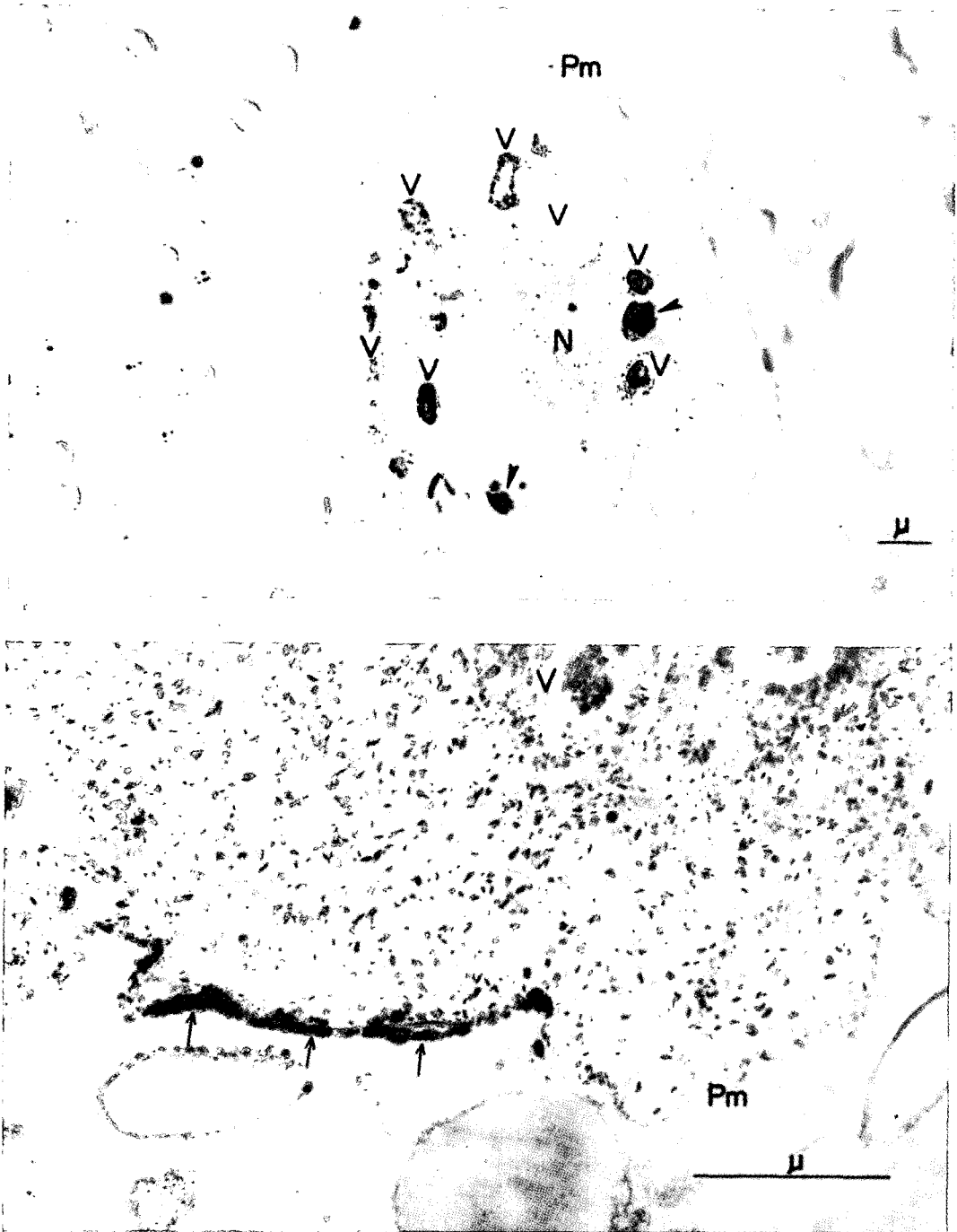


Fig. 9. Acid phosphatase activity of *Entamoeba gingivalis* observed under electron-microscope. Pm:plasma membrane, V:vacuoles, N:nucleus.

Fig. 10. The restricted portion(arrow) of plasma membrane of *E. gingivalis* revealed positive reaction of acid phosphatase.

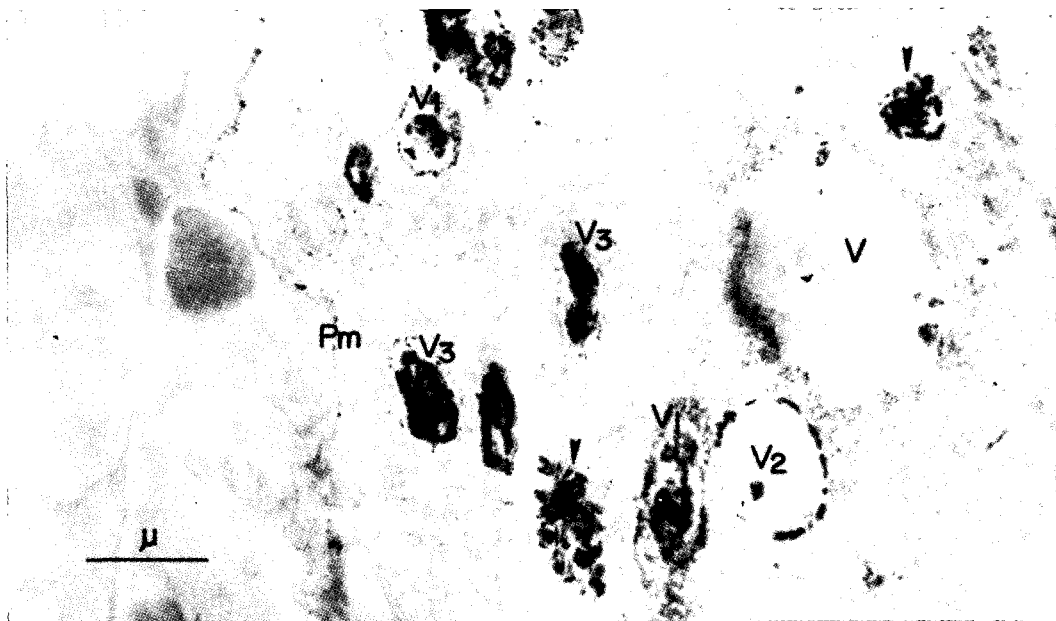
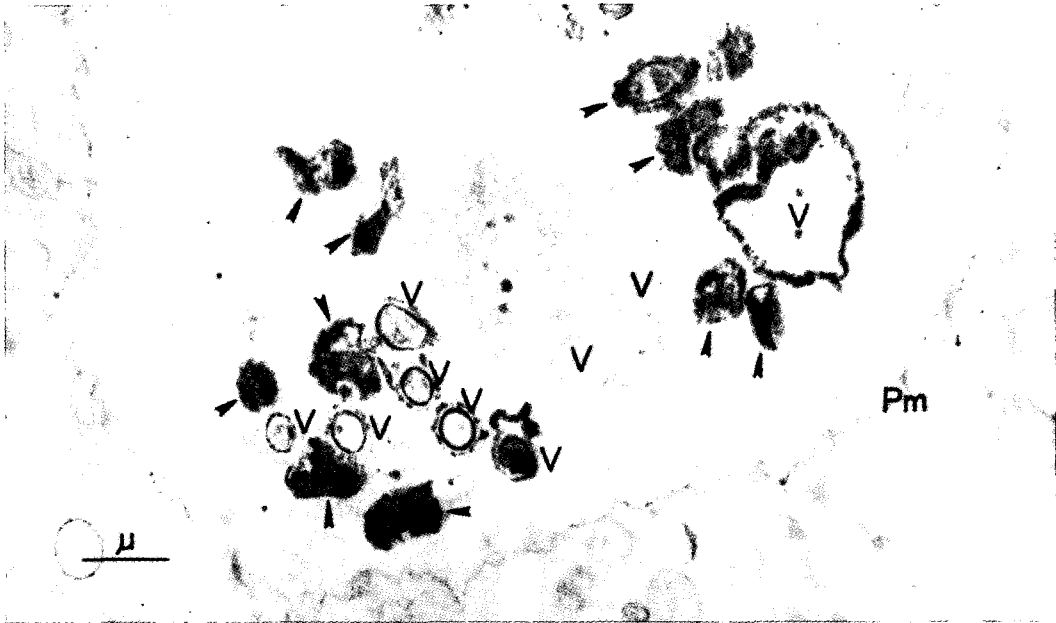


Fig. 11. The membrane of vacuoles(V) and lysosome-like structure(head of arrow) in *E. gingivalis* revealed with strong positive reaction.

Fig. 12. Various vacuoles in *E. gingivalis* revealed with positive reaction. V1:strong positive reaction in both membrane and contents of vacuole, V2:positive reaction only at the membrane of vacuole, V3:contents with strong positive and membrane with weak positive reaction,arrow head:strong positive reaction in the contents of vacuole and negative at the membrane.

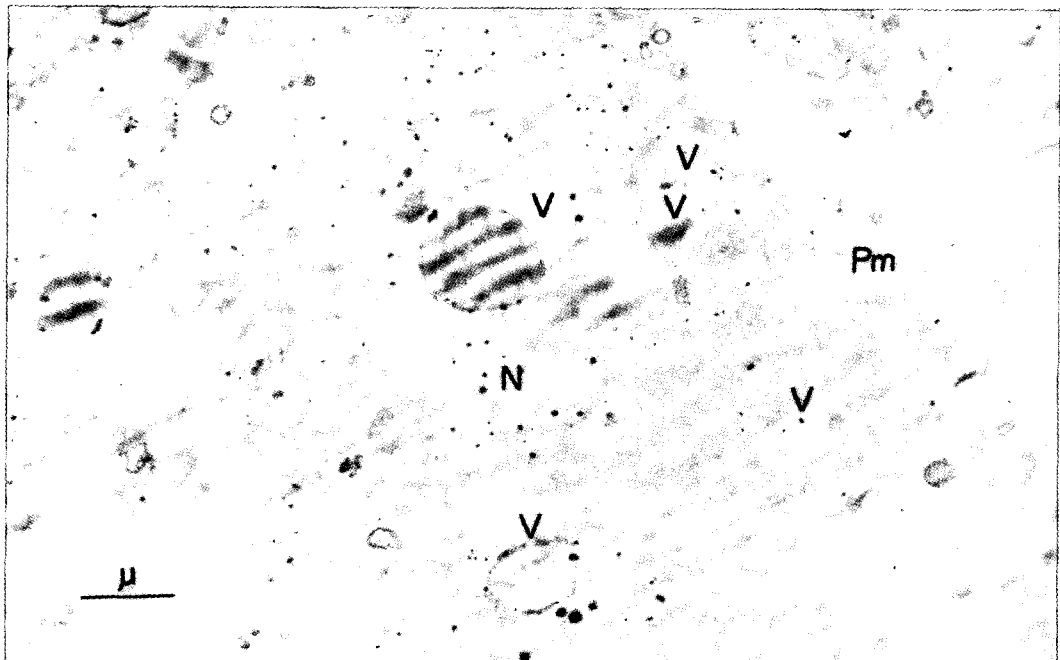
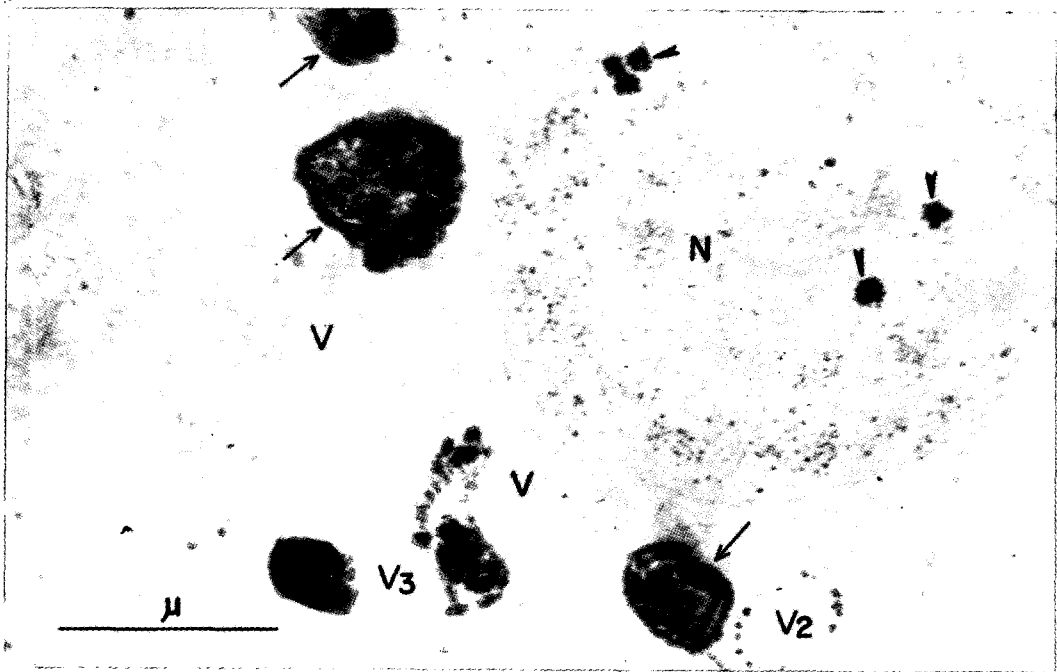


Fig. 13. Various vacuoles (V, V2, V3), lysosome-like structures (arrow) and nuclear granules (head of arrow) in *E. gingivalis* revealed with positive reaction of acid phosphatase.

Fig. 14. Electron-microscopic comparison of acid phosphatase activity in plasma membrane (Pm), vacuoles (V) and nucleus (N) of *E. gingivalis*.