

Candida albicans를 貪食한 多核白血球의 電子顯微鏡的 觀察*

滕永健·崔春根·高春明**

延世大學校 醫科大學 電子顯微鏡室 微生物學教室**

Phagocytosis of *Candida albicans* by human polymorpho- nuclear leukocytes: An ultrastructural study

Young-Kun Deung, Choon-Keun Choi and Choon-Myung Koh**

Electron Microscopy Laboratory and Dept. of Microbiology**

Yonsei University, College of Medicine

Seoul, Korea

Abstract

These studies were carried out the observation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis of *Candida albicans* in vitro and also detected to the cytoplasmic changes of polymorphonuclear leukocyte during phagocytosis by the method of electron microscopy.

The results were summarized as follows:

1. In normal polymorphonuclear leukocyte, nuclear lobes showed a preponderance of dense, granular chromatin located peripherally. The cytoplasm of polymorphonuclear leukocyte was not extensive; the cytoplasmic matrix was moderate dense and of a granular appearance. Golgi complex and rough endoplasmic reticulum system was poorly developed. But a various type of granules were seen abundantly.
2. After 30 minutes of incubation, *Candida albicans* was completely engulfed. These had come to lie in the vacuole which was limited by the membrane.
3. After 90 minutes of incubation, the phagocytic vacuoles were larger, and many granules devoid of membranes were seen within them. Though the granules has lost their membrane after entering the vacuoles.
4. After 2 hours of incubation, the cytoplasmic components of polymorphonuclear leukocytes were changed their original morphology.

I. 序 論

多核白血球의 重要作用中の 한가지가 異物質이 침입하였을 경우 이를 吞食하고 消化作用을 일으키는 것이며 이와같은 細胞들은 Host-Parasite Relationship에 依하여 炎症反應과 關係를 갖는 다고 할 수 있다.

이와같은 吞食작용과 소화작용 및 소화된 物質의 排出作用은 原則적으로 이들 細胞의 nutritional mechanism에 依하는 것으로 알려져 있으나(Suter, 1956), 근래에 와서는 이와같은 吞食작용은 吞食작용이 일어나는 過程에서 吞食細胞의 細胞質內에 存在하고 있는 細胞質內 顆粒들에 依하여 일어난

다고 보고하고, Cohn 및 Hirsch(1960)는 家兎의 腹腔內 多核白血球를 利用하여 이들 細胞 中에서 細胞質內 顆粒을 分離하고 아울러 生化學的 性質을 研究한 바 있으며 이를 光學顯微鏡을 통하여 觀察하였다. 이 以外の 여러학자들(Horn等, 1964; Dannenberg等, 1963; Wetzel等, 1963; Horn 및 Spicer, 1964; Cohn 및 Hirsch, 1960)도 역시 多核白血球의 細胞質內 顆粒에 對하여 실험 그 結果를 發表한 바 있다. 한편 Stossel等(1971)은 細胞質內의 phagocytic vesicle을 分離하고 이에 對한 몇가지 生化學的 實驗을 實施한 바 있기도 하다.

電子顯微鏡的 實驗으로서는 Wetzel等(1963), Horn 및 Spicer(1964), Lockwood 및 Allison(1963) Zucker-Franklin 및 Hirsch(1964), Sabatini等(1963)에 依하여 역시 多核白血球의 酵素에 대한 實

* 本研究은 1974年度 延世大學校 醫科大學 教授研究費로 進行된 것임.

驗을 실시하고 탐식작용이 일어난 세포의 空胞内에서는 몇 種類의 酵素作用이 일어난다고 發表하였다. 한편 多核白血球가 아닌 거식세포를 이용한 경우 Fox(1973), Collet(1970) 등은 탐식작용이 일어난 후 結晶樣 顆粒의 限界膜과 phagocytic vacuole의 膜사이에 직접적인 連關이 있으며 탐식작용이 많이 일어난 細胞에서는 分解소체의 減少現像이 일어나며 큰 空胞가 出現한다고 發表하였다. 또한 Stanley 및 Hurley(1967)는 마우스의 上皮細胞를 培養하여 數種의 *Candida*株를 注入하여 배양하고 이속에서의 成長狀態를 調査한 바 있기도 하다. Lehrer 및 Cline(1971)는 암 患者의 白血球를 使用하여 Candidacidal activity를 調査하고 그 結果 전반적으로 殺菌能力이 減少하며 이는 이 細胞内에서 酵素能의 全般의인 減少에 依한다고 主張하였다.

이에 著者들은 正常 多核白血球에 酵母樣 眞菌의 一種이며 opportunist인 *Candida albicans*를 處理하여 多核白血球의 탐식능과 이의 處理時間에 따른 多核白血球의 變化樣相을 電子顯微鏡을 통하여 觀察하였던 바 그 結果를 얻을 수 있었기에 여기 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

A. 實驗材料

1. 實驗에 使用된 多核白血球

本實驗에 使用된 多核白血球는 正常人的 前腕部 혈관에서 혈액을 항응고제 (heparin)로 처리된 주사기를 使用하여 無菌的으로 採取하여 원침을 實施하고 (3500 R.P.M.) 上層의 혈장부분과 혈구부분을 區分한후 이중 白血球層을 선택적으로 채취하여 細胞數가 4×10^4 cell/ml 되게 稀釋으로 희석실험에 使用하였다.

2. 實驗에 使用된 菌株

本實驗에 使用된 菌株인 *Candida albicans* 는 *Candida albicans* ATCC Duke 7491株로서 本敎室에서 繼代保管하는 菌株이었으며 實驗에 使用하기 전 Sabouraud's glucose 액체배지에 37°C에서 2日間 배양한 후 이를 멸균된 Saline으로서 5×10^8 cell/ml 되게 희석하여 實驗에 使用하였다.

B. 實驗方法

1. 培養方法

위의 方法에 依하여 一定하게 희석된 多核白血球의 희석액 4.5ml와 *Candida albicans* 희석액 0.5 ml의 비율로 섞은후 37°C 항온수조에서 배양하면서 15分, 30分, 60分, 90分 및 2時間의 간격으로 可

檢物을 採取하여 電子顯微鏡의 實驗을 實施하였다.

2. 電子顯微鏡의 實驗方法

위와같이 各 採取한 可檢物을 0~4°C에서 3500 RPM.으로 20時間 원침한 후 상층액을 버리고 침사부위에 2.5% glutaraldehyde를 2ml 加하고 이를 0~4°C에서 4시간 이상 放置한 후 集塊를 형성한 것을 1mm³으로 細切하여 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)로 세척하였다. 1% O₂O₄로 2시간 固定하여 Ethanol 濃度上昇順으로 脫水를 行하고 propylene oxide에 2回 거친후 Epon 812 (Luft, 1961)로 포매하였다. 超薄切片은 Sorvall porter-blum MT-2B型 ultramicrotome으로 glass knife를 사용하여 600A 두께로 만들어 uranyl acetate와 lead citrate (Reynolds, 1963)로 染色하여 Hitachi HU-11E-1型 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

III. 結 果

A. 正常 多核白血球의 微細構造

正常 多核白血球의 微細構造를 살펴보면 細胞内에 2~數個의 核이 觀察되었으며 核의 内膜에 따라서 染色質이 많이 퍼져 있다. 細胞質에서는 Golgi體 및 짧은 粗面小胞體들이 있었으며 glycogen顆粒이 細胞質 全体를 통하여 散在하여 있었다. 形質膜의 內緣部를 除外한 部位에서 觀察할 수 있는 顆粒들은 그 모양이 円形, 타원형 또는 桿狀등 多樣하고 單一膜으로 둘러싸여 있었으며 그크기도 여러가지로 범위는 200m μ ~400m μ 정도로서 그 内部는 電子密度가 높은 것에서 부터 비교적 낮은 것까지 여러가지 形態를 볼 수 있었다.

多數의 空胞를 觀察할 수 있었으며 形質膜의 外緣에 따라 電子密度가 있는 物質이 부착되어 있는 것처럼 보였으며 드물게 세포질 外部로 돌기를 내어 허족으로 보이는 구조를 볼 수 있었다(부도 1).

B. *Candida albicans* 株로서 處理된 多核白血球의 所見

1. 15分 經過群

15分 經過후 採取 標本에서의 形態를 보면 세포들의 構造는 正常群과 유사하였으며 다만 많은 細胞들이 허족을 내어 *Candida albicans*를 탐식하는 현상을 볼 수 있었고 이 허족의 部位에는 glycogen 粒子로 생각되는 전자밀도가 均一한 物質이 散在하여 있었으며 드물게 小空胞의 構造를 볼 수 있었다. 특히 大部分의 경우 뚜렷한 形質膜을 가진 두 細胞가 허족을 내어 *Candida albicans*를 사이에 두고 붙어 있는 모양을 볼 수 있었다(부도 2).

2. 30分 經過群

30分 經過후의 群에서는 이미 *Candida albicans* 가 탐식되어 세포내에 存在하는 것을 觀察할 수 있었으며 탐식된 *Candida albicans*는 單一膜으로 형성된 phagocytic vacuole 內에 있었으며 이들의 거리는 약 0.1μ 内外이었다. 細胞質에는 2중막이며 電子密度가 있는 物質로 차있는 構造를 볼 수 있었고 細胞質內의 顆粒은 正常細胞보다는 양적으로 비교적 적어져 있었으며 가끔 지방적의 출현을 볼 수 있었다(부도 3).

3. 60分 經過群

60分 經過후 *Candida albicans*를 탐식한 細胞의 構造를 보면 核은 正常細胞와 類似하였으나 細胞質에서는 Golgi 體, 粗面小胞體等 細胞小器官 들은 볼 수 없었다. 細胞質內의 顆粒은 顯著한 量的 減少 양상을 나타내며 공포내에서는 세포질 내의 顆粒과 電子密度가 같고 크기도 유사하나 한계막이 없는 구조물을多數觀察할 수 있었다. *Candida albicans*가 있는 phagocytic vacuole은 이 兩者의 거리는 넓어져 $0.2\sim 0.6\mu$ 程度이었으며 그 사이에는 前記한 바와 같은 構造物을 볼 수 있었고 특히 *Candida albicans*의 外緣에는 電子密度가 있는 물질이 부착되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(부도 4).

4. 90分 經過群

90分 經過후에서의 微細構造를 보면 核은 2~數個가 관찰되었으며 그 構造는 正常細胞와 유사하였고 細胞質內의 顆粒은 시간이 경과함에 따라 계속 감소하는 양상을 나타내었으며 phagocytic vacuole은 현저히 커져 있어 그 직경은 $2\sim 4\mu$ 이었으며 공포의 內面과 *Candida albicans*의 外緣에는 細胞質內 顆粒과 電子密度가 같은 物質이 存在하여 있었다(부도 5).

5. 2시간 經過群

2時間 經過후에 탐식한 細胞는 核에서는 變化를 볼 수 없었으나 세포質은 空胞과 數個의 顆粒 外에는 특별한 구조를 관찰할 수 없었으며 특히 顆粒은 현저하게 감소되어 한 세포 내에서는 몇개만이 관찰되었고 다만 거대한 phagocytic vacuole이 存在하며 이의 구조는 제 4군과 유사하나 *Candida albicans*는 이 공포의 중심 또는 한 쪽에 치우쳐 존재하며 드물게 이 공포의 막이 파괴된 부위를 관찰할 수 있었다(부도 6).

IV. 考 察

正常人 말초혈액 中에서의 多核白血球는 全体白

血球의 50~60%의 比率를 차지하고 있으며 이들 多核白血球의 構造를 보면 細胞의 表面에는 數個의 villi가 있고 核은 3~5葉으로서 染色質로 構成된 좁은 strand에 依하여 連結되며 이 染色質은 核膜에 응축되어 있다. 大部分의 細胞小器官은 減少되어 있으며 glycogen顆粒은 많으나 Golgi 體는 잘 發達되지 않은 狀態로 核周圍에 存在하고 細胞質에는 多量의 顆粒이 散在하여 있으며 이中的 80~90%는 特殊顆粒으로서 크기는 $300\sim 500m\mu$ 이며 比較的 낮은 電子密度를 갖고 있고 나머지 10~20%는 azurophil顆粒으로서 크기는 $600\sim 800m\mu$ 이며 높은 電子密度를 가지고 있다고 Lentz(1971)가 서술한 바 있다.

한편 Hirsch와 Fedorko(1968)는 glutaraldehyde와 O_2O_4 및 uranyl acetate의 同時固定 標本에서 多核白血球에 對한 觀察結果를 보면 核의 各葉들은 진하며 과립상의 염색질이 그 周圍에 있으며 核小體는 觀察할 수 없었으나 中心體는 잘 發達되어 있으며 이 中心體 周圍에는 여러가지 構造를 가지는 몇개의 小空胞가 나타난다고 하였다. 또한 이들 細胞의 特徵은 다른 細胞에서 볼 수 있는 formed element의 결핍 혹은 없는 狀態라고 하고 Golgi 體는 아주 적거나 없으며 絲粒體는 작고 小胞體는 完全히 없거나 혹은 조금 散在하여 있을뿐이며 가장 많은 細胞質의 構造는 여러가지 크기, 모양 및 전자밀도를 가지는 顆粒들로서 이러한 多樣性中 特히 크기는 細切된 面에 따라서 差異가 있을 수 있다고 하였다. 本實驗에서의 多核白血球는 上記한 바의 所見과 類似하여 數個의 核과 細胞質에서는 여러形態의 顆粒, 空胞, Golgi 體 및 粗面小胞體等이 觀察되었으나 中心體는 觀察되지 않았다.

또한 고양이의 alveolar macrophage를 利用, 赤血球를 탐식하는 실험에서 Collet(1970)은 탐식작용이 일어난후 結晶樣 顆粒의 限界膜과 phagocytic vacuole의 膜사이에는 直接的인 연관關係를 볼 수 있으며 RBC를 많이 탐식한 macrophage는 分解小體는 상당히 減少되나 結晶樣 顆粒은 比較的 많이 남아 있으며 2日 經過後에는 두가지 다 뚜렷하게 減少하였으나 그대신 dense debris를 含有한 巨大한 空胞가 細胞質에 차 있으며 脂肪滴이 가끔 細胞質에 나타난다고 하였다.

Horn等(1964)는 토끼의 腹腔內 heterophil leukocyte를 利用 *Staphylococcus albus*의 탐식작용 실험에서 탐식작용이 일어난 2分후에는 顆粒들이 그대로 存在하지만 어떤 顆粒은 空胞에 가까이 위치하며 1時間 後에는 顆粒의 量은 減少로 因하여 消失한다고 報告하였다. 本實驗에서 觀察된 成績

을 보면 탐식후에 곧 顆粒의 減少現像을 나타내었으며 이는 Collet(1970)가 報告한 바와의 差異點이며 그 理由는 多核白血球에는 alveolar macrophage와 달라 典型的의 分解小體가 없기 때문이 아닌가 생각되며 時間이 經過함에 따라 顆粒의 消失이 현저하여 지며 탐식된 후 과립이 많이 消失된 細胞일수록 phagocytic vacuole이 큰 것으로 보아 이들 空胞는 탐식한 직후 *Candida albicans*와 가까이 있지만 時間이 經過함에 따라 차차 넓어지며 따라서 이 空胞는 차차 커지는 것으로 思料된다.

Hirsch 및 Cohn(1960)은 光顯을 利用, 多核白血球의 顆粒減少 現像을 觀察報告하였는데 本實驗에서 利用한 電子顯微鏡下에서도 이에 附合하는 結果를 얻었으며 Stossel等(1971)은 多核白血球에서 phagocytic vacuole를 分離하여 이에 對한 일련의 實驗을 實施하여, granule associated enzyme, acid phosphatase, alkaline phosphatase, β -glucuronidase와 peroxidase 등이 이들 内部에 存在하며 이는 顆粒으로부터 由來한다고 하였다. 本實驗에서 90分 및 2시간 經過群에서 관찰할 수 있었던 phagocytic vacuole 內緣에 存在하는 電子密度가 높은 物質은 時間經過에 따라 細胞質內의 顆粒樣 物質이 減少하는 것으로 보아 細胞質內 顆粒이 空胞內로 침투된 것으로 생각되며 이는 時間의 經過에 따라 점차 消失되는 것으로 사료되며 이는 특수한 性質을 가진 효소들일 것으로 추측된다.

以上の 實驗結果를 綜合하여 볼때 多核白血球의 異物質 탐식작용은 時間적으로 異物質이 침입된후 빠른 時間內에 일어나기 始作한다고 생각되며 이들 時間의 오랜 經過에 依한 白血球 및 細胞質內의 phagocytic vacuole의 變化過程과 電子顯微鏡을 통한 탐식작용에 關여하는 여러가지 효소의 조직 化學적연구 및 작용기전들은 추후 더 연구되어야 할 課題라고 思料된다.

V. 結 論

Candida albicans ATCC Duke 7491株를 利用, 多核白血球의 탐식작용을 試驗管內 實驗을 통하여 實施하고 이를 電子顯微鏡을 통하여 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 正常多核白血球는 2~數個의 核을 가지고 있으며 細胞質에는 Golgi 體, 粗面小胞體, 空胞 및 glycogen이 있으며 多數의 細胞質內 顆粒이 觀察되었다.

2. *Candida albicans*를 탐식한 多核白血球는 初期에 正常 多核白血球의 構造와 類似하나 時間의 經過에 따라 *Candida albicans*는 단일막의 구조를 가진 phagocytic vacuole 內에 존재하며 이 空

胞는 점차 커지는 것으로 觀察되었다.

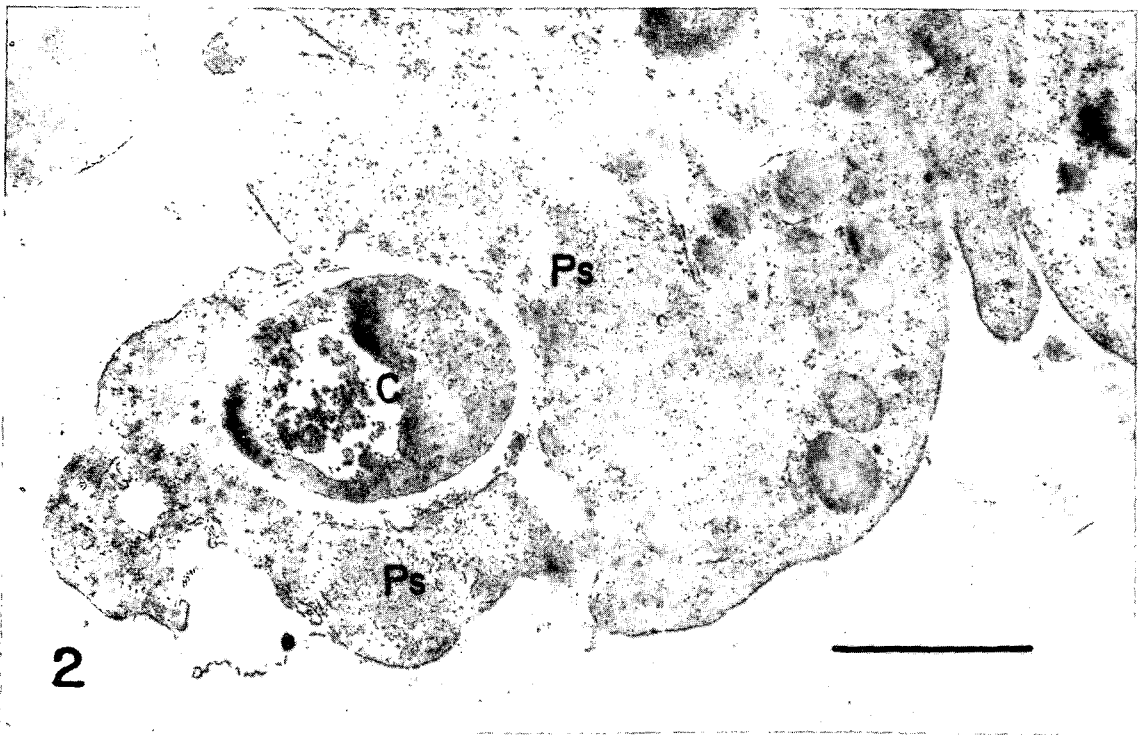
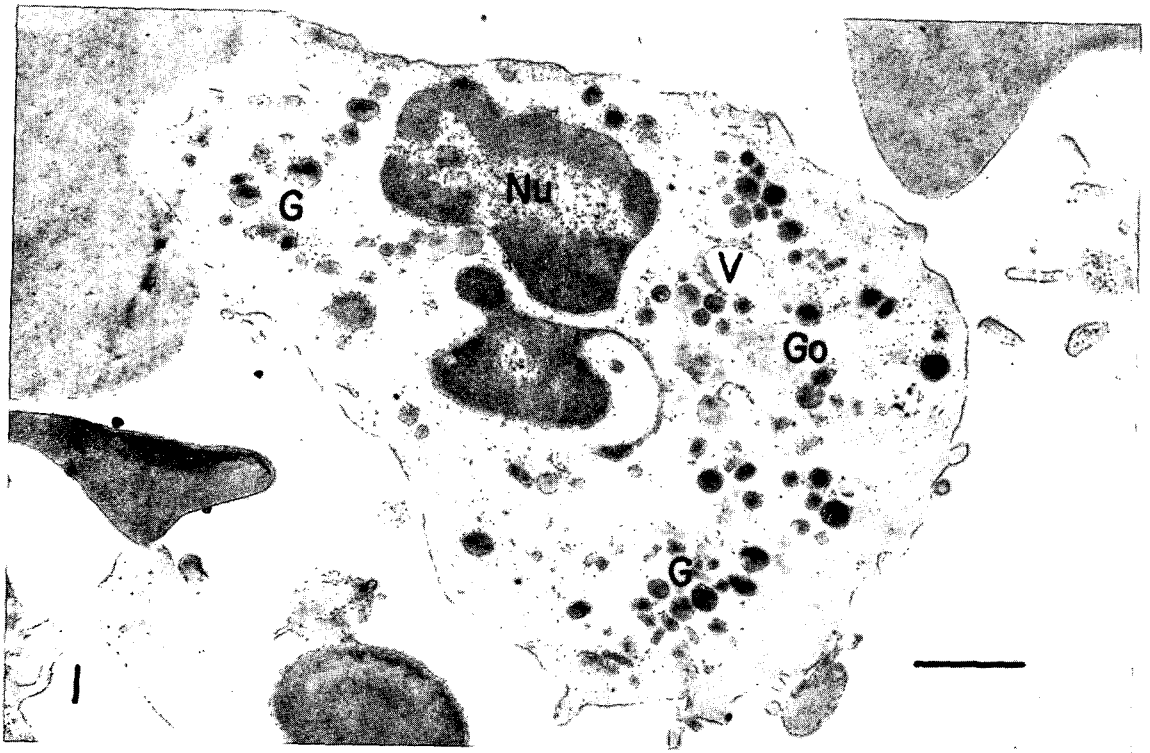
3. 탐식직후, 細胞質內 顆粒은 phagocytic vacuole 周圍에서 많이 관찰되나 時間의 經過에 따라 phagocytic vacuole 內에서 관찰되며 細胞質內에서 의 顆粒은 次次 감소하는 現像을 나타내었다.

4. 탐식후 2時間 經過된 細胞는 部分的으로 phagocytic vacuole의 膜이 파괴되었으며 세포질 構造는 많은 變化를 나타내었다.

REFERENCES.

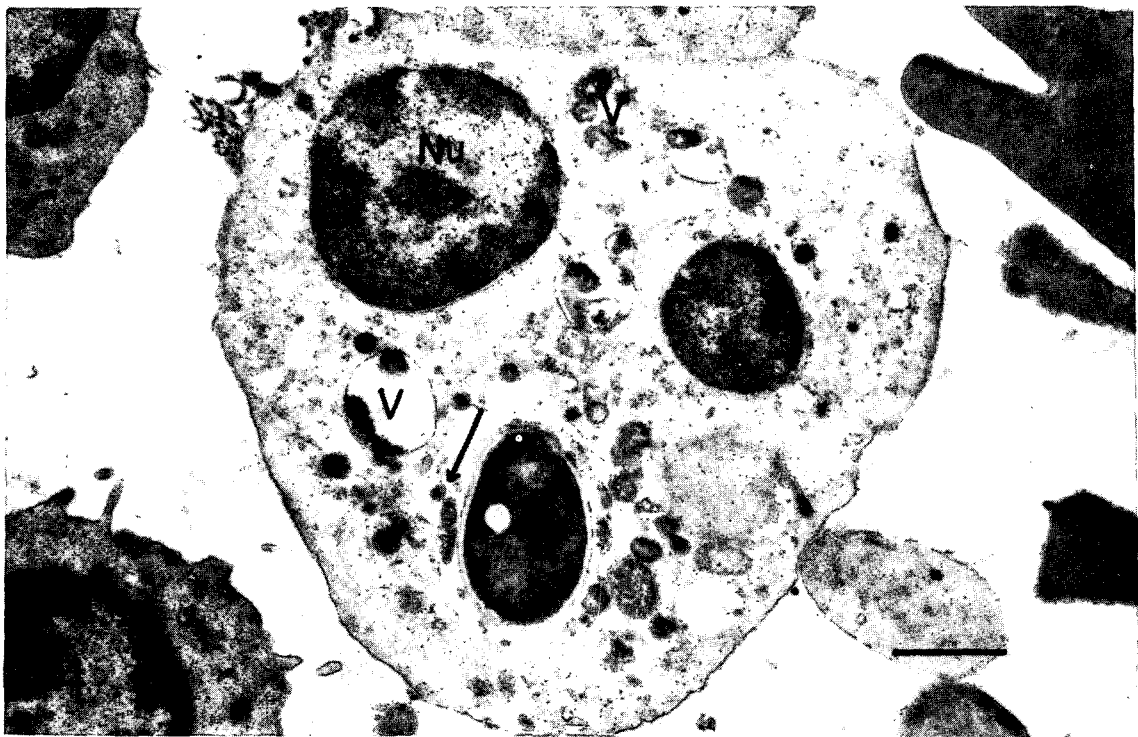
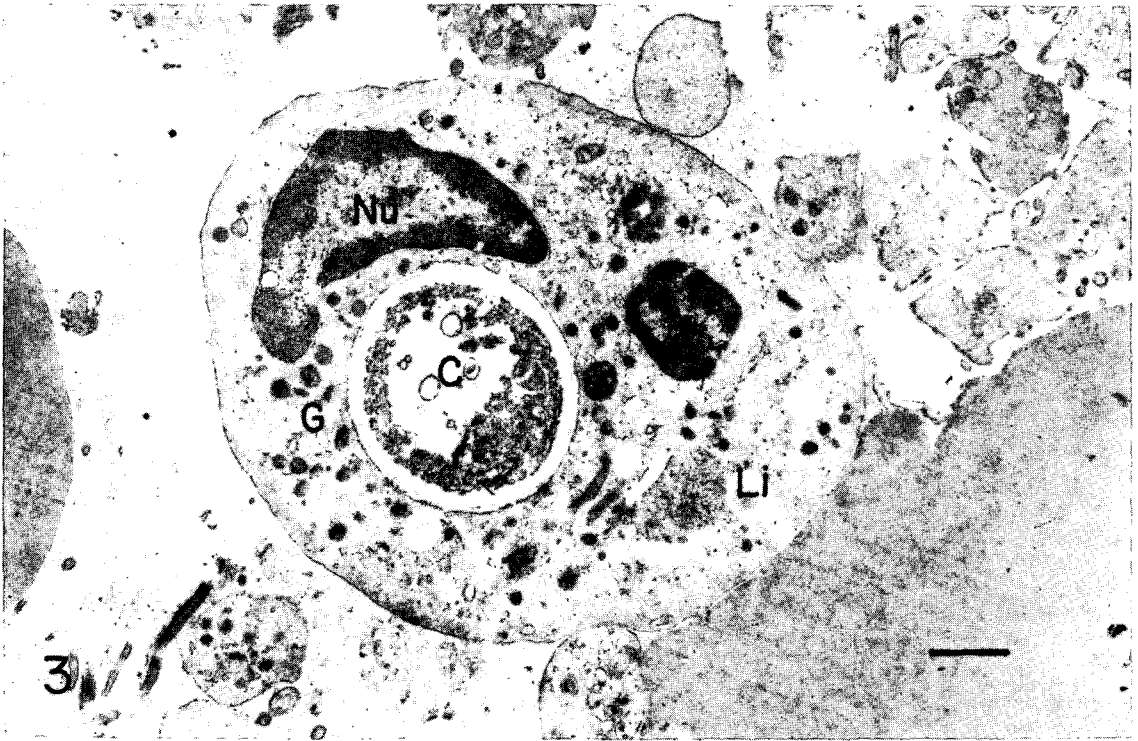
- Cohn, Z. A. and Hirsch, J. G. (1960): The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leukocytes, *J. Exp. Med.*, 112 : 983.
- Collet, A. J. (1970): Fine structure of the alveolar macrophage of the cat and modifications of its cytoplasmic components during phagocytosis, *Anat. Rec.*, 167 : 277.
- Dannenberg, A. M., Walter, P. C. and Kapral, F. A. (1963): A histochemical study of phagocytic and enzymatic functions of rabbit mononuclear and polymorphonuclear exudate cells and alveolar macrophages, *J. Immunol.*, 90 : 448.
- Fox, M. L. (1973): The bovine alveolar macrophage I. Isolation, in vitro cultivation, ultrastructure and phagocytosis, *Canad. J. Microbiol.*, 19 : 1207
- Hirsch, J. G. and Cohn, Z. A. (1960): Degranulation of polymorphonuclear leukocytes following phagocytosis in microorganisms, *J. Exp. Med.*, 112 : 1005.
- Hirsch, J. G. and Fedorka, M. E. (1968): Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and "postfixation" in uranyl acetate, *J. Cell Biol.*, 38 : 615.
- Horn, R. G. and Spicer, S. S. (1964): Sulfated mucopolysaccharide and basic protein in certain granules of circulating heterophils of rabbit during endotoxin-induced leukocytosis, *Am. J. Path.*, 44 : 905.
- Horn, R. G., Spicer, S. S. and Wetzel, B. K. (1964): Phagocytosis of bacteria by heterophil leukocytes, *Am. J. Path.*, 45 : 327.
- Lehrer, R. I. and Cline, M. J. (1971): Leukocyte candidacidal activity and resistance to systemic candidiasis in patient with cancer, *Cancer*, 27 : 1211.

- Lentz, T. L.(1971) : Cell fine structure. An atlas of drawing of whole-cell structure, Saunder Co. Philadelphia.
- Lockwood, W. R. and Allison, F.(1963) :Electromicrographic study of phagocytic cells, Brit. J. Exp. Path., 44 : 593.
- Luft, J. H.(1961) : Improvement in epoxy resin embedding method, J. Biophys. Biochem. Cytol., 9 : 409.
- Reynolds, E. S.(1963) : The use of lead citrate at high pH as electron-opaque stain in electron microscopy, J. Cell Biol., 17 : 208 .
- Sabatini, D. D., Bensch, K. G. and Barnett, R. S. (1963) : Cytochemistry and electron microscopy, J. Cell Biol., 17 : 19.
- Stanley, V. C. and Hurley, R.(1967) : Growth of *Candida* species in cultures of mouse epithelial cells, J. Path. Bact., 94 : 301.
- Stossel, T. P., Pollard, T. D., Mason, R. J. and Vaughan, M.(1971) : Isolation and properties of phagocytic vesicles from polymorphonuclear leukocytes, J. Clin. Invest., 50 : 1745.
- Suter, E.(1956) : Interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms, Bact. Rev., 20 : 94.
- Wetzel, B. K., Horn, R. G. and Spicer, S. S.(1963) Cytochemical localization of nonspecific phosphatase activity in rabbit myeloid elements, J. Histochem. Cytochem., 11 : 812.
- Zucker-Franklin, D. and Hirsch, J. G.(1964) : Electron microscopic studies on the degranulation of rabbit peritoneal leukocytes during phagocytosis, J. Exp. Med., 120 : 569.



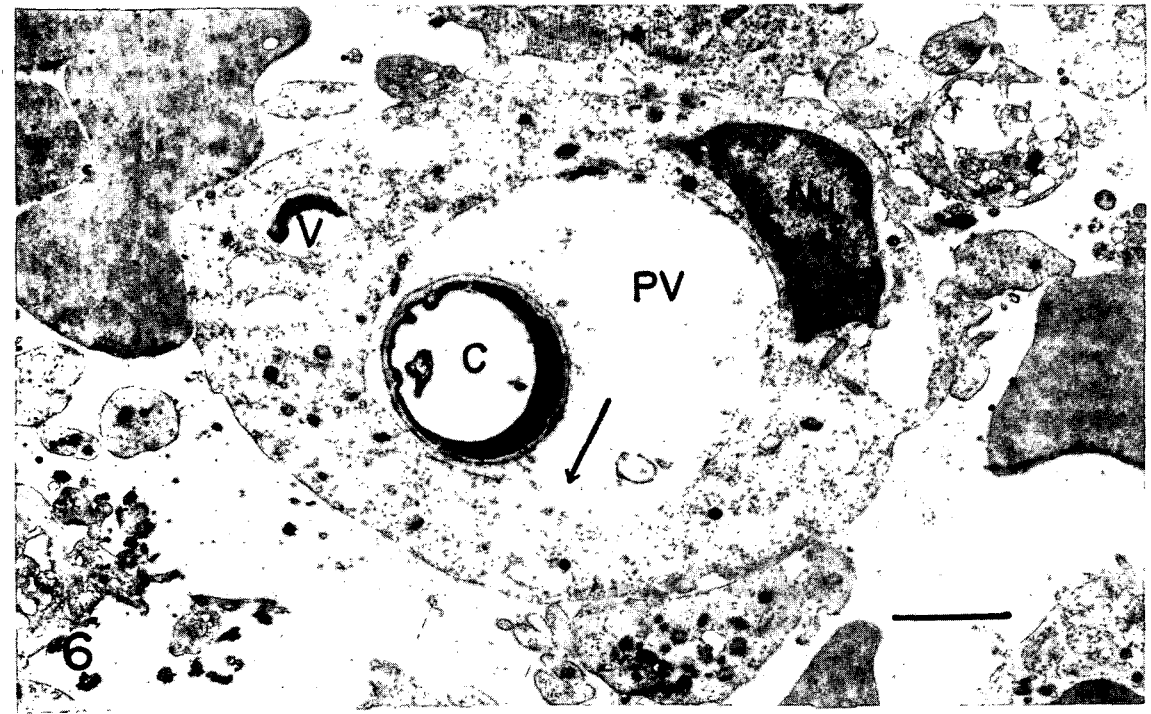
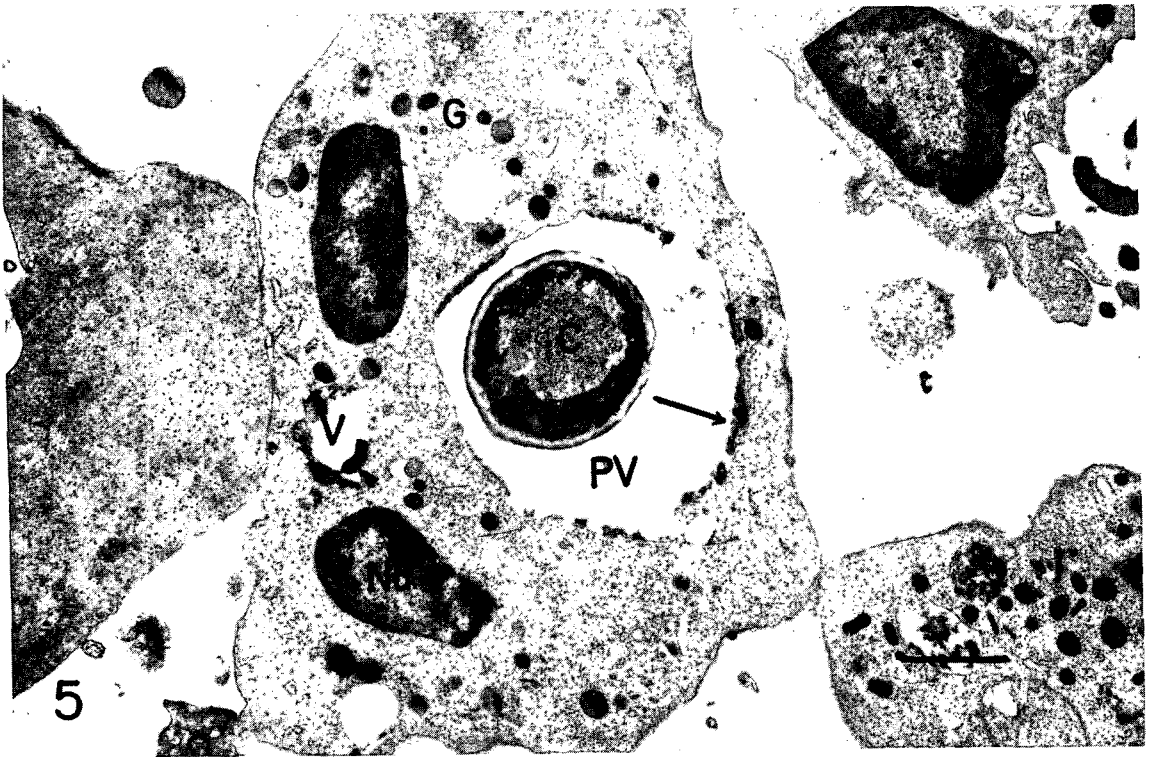
부도 1. 正常多核白血球, 2個의核(Nu)과細胞質에Golgi體(Go), 空胞(V) 및形態가多様한顆粒(G)들이散在하여 있다.

부도 2. 15分經過群, *Candida albicans*(C)를 사이에 두고 두細胞가허족(Ps)를 내어 둘러싸고 있다.



부도 3. 30分 經過群. 多核白血球內에 呑食된 *Candida albicans* (C)가 있으며 그 周圍에 細胞質內 顆粒(G)들이 散在하여 있다.

부도 4. 60分 經過群. *Candida albicans* (C)가 있는 phagocytic vacuole內에 細胞質內 顆粒과 同様の 物質(↑)



부도 5. 90分 經過群. 多核白血球內에 顯著한 顆粒(G)의 減少現像을 나타내며 *Candida albicans*(C)가 있는 phagocytic vacuole(PV)膜의 內緣에 電子密度가 높은 物質(↑)이 있다.

부도 6. 2時間 經過群. 巨大한 phagocytic vacuole(PV)의 膜의 一部가 破壞되어 腔을 볼수 있다.