

우리나라 환자로부터 분리된 *Cryptococcus neoformans*의 균학적 특성과 혈청학적 진단용 항원 및 항체생산에 관한 연구

대한결핵협회 결핵연구원 · 연세대학교 의과대학 임상병리과¹ · 서울대학병원 임상병리과²

김상재 · 김신옥 · 이승호 · 정윤섭¹ · 석종성²

=Abstract=

A Study on the Mating Types and Serotypes of Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* and Production of Serodiagnostic Antigen and Antiserum for Cryptococcosis

Sang-Jae Kim, Sin-Ok Kim, Seung-Ho Lee, Yunsop Chong¹ and Jong-Sung Suk²

Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

Department of Clinical Pathology, Yonsei University¹ and

Department of Clinical Pathology Seoul National University Hospital,² Seoul, Korea.

The mating types and serotypes of 10 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* have been investigated.

Seven isolates were serotype A and three were serotype D and thus they fell in *C. neoformans* var. *neoformans*.

Mating types of six isolates were found α and two were *a* but another two isolates were untypable.

Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) using rabbit hyper-immune serum to cryptococcal polysaccharides was well adapted to the analysis of capsular polysaccharides in sera of the patients with cryptococcal meningitis.

서 론

*Cryptococcus neoformans*는 비둘기 배설물이나 비둘기 배설물로 오염된 토양에서 흔히 발견되는 호모양진균으로서 사람에게 흡입감염되어 경우에 따라서는 사람에게 치명적 진균증을 일으키는 진균이다¹⁻³. 1975년에 이 진균의 유성생식세대가 발견되므로서 완전세대 종명을 *Filobasidiella neoformans*로 명명하게 되었다⁴. 이 균은 또 네가지 서로 다른 혈청형 (A, B, C, D형)을 가지고 있음이 밝혀진바 있으며 이들의 creatinine 대사가 혈청형 A, D와 B, C가 서로 다름이 알려지므로서 *C. neoformans*를 두 변종으로 나누어 혈청형 A, D를 *C. neoformans* var. *neoformans* 그리고 혈청형 B, C를 *C. neoformans* var. *guttii*로 각각 명명하였다⁵⁻⁷.

우리나라에서도 cryptococcosis가 보고된 바 많지만 그러한 환자로부터 분리된 *C. neoformans*의 균학적 특성 즉 혈청형, 교배형 (mating types) 및 creatinine 대사등이 전혀 밝혀지지 않았다.

이에 저자들은 우리나라 환자의 임상가검물로 부터 분리된 *C. neoformans*의 균학적 특성 특히 그들의 교배형을 관찰하고 아울러 균의 협막다당류를 체액에서 검출하여 진단 및 예후관찰에 이용할 수 있는 항원 및 항체생산을 시도한바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 임상적 분리균의 교배형 결정 시험

사용균주: 임상적 분리균은 연세대학교 의과대학 부속병원과 서울대학교 부속병원에서 cryptococcal

meningitis를 앓고 있는 환자의 뇌척수액으로부터 분리 배양하여 보관하고 있는 균주 10주를 분양받았다. 그리고 교배실험에 사용될 참고균주는 미국 국립보건연구원 (National Institutes of Health)의 진균과로부터 분양받았다. 분양받은 참고균주는 *C. neoformans* var. *neoformans* 혈청형 A 교배형 α(381), 혈청형 D 교배형 α(B-3501), 혈청형 D 교배형 α(430)과 *C. neoformans* var. *gattii* 혈청형 B 교배형 α(444)와 혈청형 C 교배형 α(191) 등이다.

교배실험: Malt extract agar에 25°C에서 3일간 배양한 균을 평판배지상에서 교배하여 25°C에서 4주간 배양하면서 담자포자형성 여부를 관찰하였다.

2. 혈청학적 시험용 항원 생산

Sabouraud 한천배지에 접종하여 37°C에서 3일간 배양한 균(*C. neoformans* var. *neoformans*, A, α)을 Sabouraud 액체배지에 대량접종하여 37°C에서 3일간 배양하여 증균시킨 다음 5,000 rpm에서 원심분리하여 효모세포를 제거한 상층액을 sodium acetate를 10% 띄게 용해한 다음 빙초산으로 pH 7.0이하로 제한 후 ethanol을 68%이하로 가하여 헤파다당류 항원을 침전시켰다. Chloroform과 n-butanol로 처리해 단백질 성분을 제거한 다음 위의 과정을 2회 반복한 후 toluene을 가한 증류수에 투석한 후 냉동 건조하여 각종 혈청학적 검사에 이용하였다.

3. *C. neoformans* 헤파다당류 항원에 대한 항혈청 생산

체중 4kg되는 백색 가토에 formaldehyde로 처리해 사멸한 후 세사와 함께 진탕하여 헤파다당

제거한 *C. neoformans* var. *neoformans*, A, α 효모세포를 정액에 23,000,000개씩 매일 접종하여 10일간 계속한 다음 1주후부터 매주 혈청을 채취하여 면역확산법으로 항체유무를 관찰하였다.

4. 면역 확산법

Noble agar를 용해하여 1mm 두께로 precoated glass slides에 분주후 응고시킨 다음 직경 1.5 mm well을 3mm 간격으로 만들어 헤파다당류항원 3mg/ml 용액과 항혈청을 가하고 실온에서 3일간 반응시킨후 친강대 형성여부를 관찰하였다. 반응이 끝난 slide는 5% sodium citrate로 처리한 후 단백질 성분을 용출시킨 다음 건조하여 Coomassie blue로 염색하였다.

5. 효소결합 면역 분석법

먼저 *C. neoformans* 헤파다당류항원에 대한 항혈청을 1:100으로 희석한 용액을 이용하여 polystyrene plate에 흡착시킬 최적항원농도를 관찰한 결과 100 mcg/ml이 가장 적합한 농도임이 밝혀졌다. 따라서 헤파다당류항원 100 mcg/ml을 plate에 흡착시키고 잔여 흡착장소는 우혈청 albumin으로 제거했다. 그다음 정상인 혈청 25%가 함유된 용액과 생리식염수에 항원을 각각 0.2, 0.6, 1.8, 5.4 및 16.2 mcg/ml되게 가하고 가토항혈청을 1:200되게 첨가한 다음 37°C에서 2시간 반응시켜 헤파다당류에 대한 가토 IgG 항체가 결합하도록 해 준 다음 그 혼합용액을 plate에 옮겨 다시 1.5시간 반응시키므로써 헤파다당류 항원과 결합하지 않은 항체를 plate에 흡착된 항원에 결합시켰다. Plate는 다시 pe-

Table 1. Mating types and Sero types of Clinical isolates (*Cryptococcus neoformans*)

Reference strains / Test strains	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>				<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>		Mating types	Sero types
	Sero t.	A		D	B	C		
	Mating t.	α	α	a	α	a		
CR 1001		N	N	Y	N	N	α	A
CR 1002		N	N	Y	N	N	α	A
CR 1003		N	N	Y	N	N	α	A
CR 1004		N	N	Y	N	N	α	A
CR 1005		N	N	Y	N	Y	α	D
CR 1906		N	N	N	N	N	?	A
CR 1007		N	N	Y	N	N	α	A
CR 1008		Y	Y	N	Y	N	a	D
CR 1009		Y	Y	N	Y	N	a	D
CR 10010		N	N	N	N	N	?	A

Y=mated, N=not mated

oxidase conjugated goat anti-rabbit IgG로 반응시키고 그다음 peroxidase 기질용액을 가하여 효소반응을 시킨 다음 흡광도를 측정하였다. Cryptococcosis로 확진된 두 환자 혈청도 4배 희석한 다음같은 방법으로 처리해 흡광도를 측정하고 이를 앞서 설명한 표준용액의 흡광도와 비교하여 혈청내의 헵막다당류항원 함량을 계산하였다.

성 적

1. 교배형 및 혈청형

임상적 분리균 10주의 교배형 결정 실험의 결과

를 보면 Table 1에서 나타난 바와 같이 α type이 6주, a type이 2주였고 나머지 2주는 교배가 이루어지지 않았다. 또한 α type 6주 가운데 1주만이 *C. neoformans* var. *gattii* (Serotype C, mating type *a*) 교배되었다. 혈청형은 A. type이 7주, D type이 3주였고 본 실험에 사용된 분리균 중에서 혈청형 B, C type은 볼 수 없었다.

2. 생산된 antisera의 침강항체가

혈막을 어느정도 제거한 사균으로 10일간 감작시킨 다음 면역확산법으로 침강항체를 관찰한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같으며 마지막 감작 1주후

Fig. 1. Precipitating antibody response of rabbits to *C. neoformans* capsular polysaccharides.

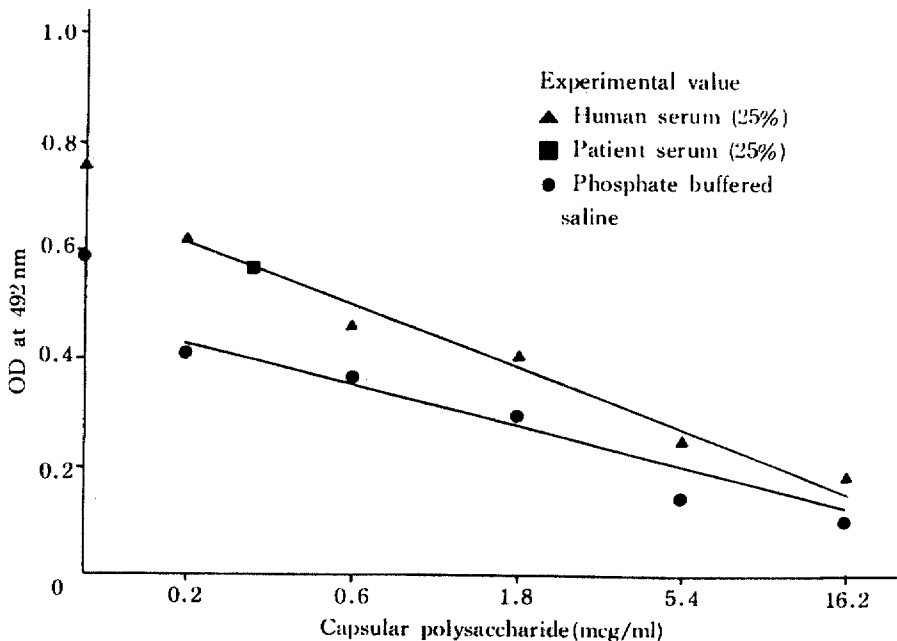


Fig. 2. Enzyme linked immunosorbent assay of cryptococcal polysaccharides in human serum.

에 이미 미약하게나마 침강항체를 검출할 수 있었고 booster injection 1 주후에 채취한 혈청에서 가장 강한 침강대를 형성하고 있음을 볼 수 있었다.

3. 혈청내 협막다당류 농도 측정

먼저 *C. neoformans* 협막다당류항원에 대한 항혈청을 1:100으로 희석한 용액을 이용하여 polytyrene plate에 흡착시킬 최적항원농도를 결정할 결과 100mcg/ml이 가장 적합한 농도임이 밝혀졌다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 25%의 혈청내 함유된 0.3mcg/ml이내의 소량도 검출할 수 있었고, 환자 1의 혈청에서는 항원이 검출되지 않았으나 환자 2의 혈청에서는 적어도 0.31mcg/ml의 협막다당류가 혈청내에 함유되어 있는 것으로 나타났다.

고 찰

우리나라 환자의 임상가검물로부터 분리된 *C. neoformans*의 교배형은 실험에 사용된 10균주 중에서 6주가 교배형 α type으로 밝혀졌는데, 미국의 경우를 보면 α type이 월등히 많아 임상분리균에서는 40:1, 자연환경에서는 30:1의 비율로 α type보다 더 많이 분리되며, 또한 혈청형도 임상분리균에서는 75%, 자연환경에서 분리된 균에서는 96%로 α type이 월등히 많이 분리되는 것으로 보고된 바 있다. 따라서 우리나라에서 분리된 균들도 비록 본 실험에 사용된 시험균주수가 적기는 해도 혈청형과 교배형의 분리빈도가 그러한 보고들과 일치한다고 볼 수 있다.

침강항체가 관찰한 결과 사균으로 10일간 잠작시킨 다음 5주후 약 5×10^7 개의 균으로 booster injection을 한 1주후에 가장 강한 반응을 나타내었으므로 이때의 혈청을 대량으로 채취하여 각종 혈청학적 검사에 이용하였으며 앞의 재료 및 방법에서 보듯이 효소결합면역분석법을 이용하여 정상인 혈청 25%가 함유된 용액과 생리식염수에 항원을 가토항혈청과 반응시킨후 흡광도를 비교해 보면 정상인 혈청이 함유된 용액의 흡광도가 생리식염수보다 높게 나타나는 것은 혈청단백에 의한 비특이 반응 때문이라고 보지만, 그렇다고 항원분석에 영향이 없는 것은 아니다. 왜냐하면 항원농도에 따른 흡광도 감소경향이 혈청함유 용액에서 더 크게 나타나기 때문이다. 그리고 그와같은 비특이반응은 enzyme conjugate와 가토항혈청을 미리 정상인 혈청과 반응시키므로써 감소시킬 수 있었다.

*Cryptococcosis*의 진단과 예후관찰에 균의 협막다당류를 채액으로부터 검출하는 방법은 이미 널리 이

용되고 있으며 주로 latex 입자응집반응을 이용하여 협막다당류를 검출하고 있으나 본 실험결과에서 본 바와 같이 ELISA에 의한 방법도 아주 소량의 협막다당류도 검출할 수 있는 민감한 방법이므로 앞으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 본다.

결 론

우리나라 환자로부터 분리된 *C. neoformans* 10주의 교배형을 관찰한 결과 10주 모두 혈청형 A, D인데 A가 7주, D가 3주였으며, 따라서 10주 모두 *C. neoformans* var *neoformans*이며, 또한 그중 6주는 " α "교배형이었고 2주는 " α " 교배형으로 밝혀졌다. 그러나 2주의 교배형은 결정할 수 없었다. 균의 협막다당류를 분리 정제하고 그리고 이 항원에 대한 항혈청을 생산하여 효소결합면역분석법에 따라 환자 채액내 균의 협막다당류항원을 분석한 결과 0.3mcg/ml 이내의 소량도 검출할 수 있음을 알 수 있었다. 시험된 두 환자 가운데서 1명의 혈청내에서 0.31mcg/ml의 균체성분(협막다당류)이 검출되었다.

참 고 문 헌

- 1) Emmons CW, Binford CH, Utz JP and Kwon-Chung KJ: Medical mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, 1977.
- 2) Emmons CW: Saprophytic Sources of *Cryptococcus neoformans* associated the pigeon (*Columba livia*). *Amer. J. Hyg.*, 62: 227-232, 1955.
- 3) Emmons CW: Natural occurrence of opportunistic fungi. *Lab. Invest.* 11: 1026-1032, 1962.
- 4) Kwon-Chung KJ: A new genus *Filobasidiella*. The perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 67: 1199-1200, 1975.
- 5) Walter JE and Coffee EG: Distribution and epidemiologic significance of the serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Amer. J. Epidemiol.* 87: 167-172, 1968.
- 6) Kwon-Chung KJ, Polacheck, I and Bennett JE: Improved diagnostic medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *J. Clin. Microbiol* 15: 535-537, 1982.
- 7) Kwon-Chung KJ and Bennett JE: Epidemiologic differences between the two variants of

- Cryptococcus neoformans*. *Amer. J. Epidemiol.*, 120: 123-130, 1984.
- 8) Kwon-Chung KJ and Bennett JE: Distribution of α and *a* mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Amer. J. Epidemiol.*, 108: 337-340, 1978.
- 9) Bennett JE, Kwon-Chung KJ and Howard D H: Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Amer. J. Epidemiol.* 105: 582-586, 1977.
- 10) Diamond RD and Bennett JE: Prognostic factors in cryptococcal meningitis. A study in 111 cases. *Annals Inter. Med.*, 80: 176-181, 1974.
- 11) Wilson DE, Bennett JE and Baily JW: Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127: 820-823, 1968.