

紫外線 照射處理에 依한 *Cryptococcus neoformans* 의
電子顯微鏡的 觀察

黃 東 薰·高 春 明·崔 泰 周·柳 駿

(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 真菌症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 病原性を 內包하고 있다.

Cryptococcus neoformans 의 電子顯微鏡的 觀察은 Tsukahara(1963)에 依하여 시도된以來 Shadomy 및 Utz(1966), Edward 등(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 電子顯微鏡的 觀察은 Conti 및 Naylor(1959)는 *Schizosaccharomyces octosporus*, Edward 등(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 세포의 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 等, 1957; Kitamura, 1965; Tokunaga 等, 1969; Lane 等, 1969; Garrison 等 1970; James 等, 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 等(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 調査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하기전 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 간격으로 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 수급하여 實驗에 임하였다.

2. 電子顯微鏡의 實驗方法:

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

다음 0.1 mol phosphate buffer 液으로 調整된 pH 7.4 의 1% osmium tetroxide 로서 2時間 後 固定을 행하였다. 固定이 끝난 試料는 70% ethanol 로서 세척한 후 다시 500 rpm 으로 遠沈하고 상등액을 버린 후 Kellenberger, Ryter 및 Sechaud(1958) 方法에 依하여 鋳전부위에 1% 加溫 agar 를 첨가하고 agar 가 凝固된 후 이를 1 mm²의 크기로 細切하여 70% ethanol 로부터 上昇順으로 無水알콜 및 propylene oxide 等으로 脫水를 행한 후 Epon 812(Luft, 1961)로 包埋하여 glass knife 로서 Sorvall MT-2 porterblum ultramicrotome 을 使用하여 500 Å 두께의 超薄切片을 作成하여 飽和 uranyl acetate 와 lead citrate 로 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) 외층에 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 있는

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 5分인 경우에는 正常菌과의 별다른 차이점을 發見할 수 없었으나 10分이상 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 30分의 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. 真菌類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행되었으며 酵母를 利用한 微細構造에 對한 研究는 상당히 進행되었다고 할 수 있다.

*Cryptococcus neoformans*의 電子顯微鏡의 觀察은 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 Salviw(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 真菌類에서 볼 수 있는 一般의인 細胞構造 即 核, 仁, 核膜, mitochondria, endoplasmic reticulum 및 液胞等を 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等(1967)은 上記 記述한 構造以外에도 ribosomal particle 등의 관찰과 細胞膜의 함입등은 細菌에서의 mesosome과 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 判定할 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等(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 真菌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 변화를 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등은 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

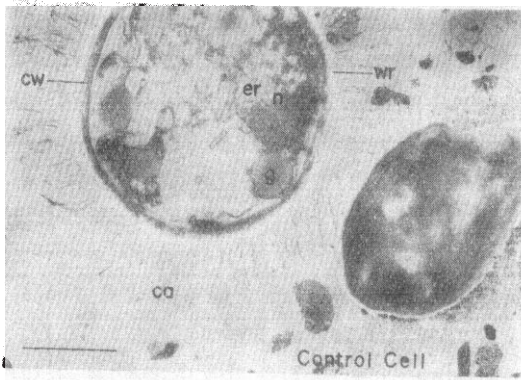


Fig. 1.

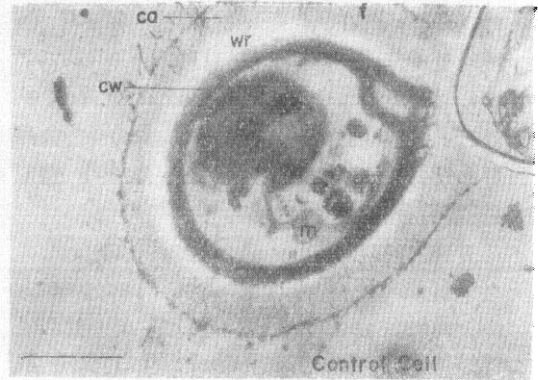


Fig. 2.

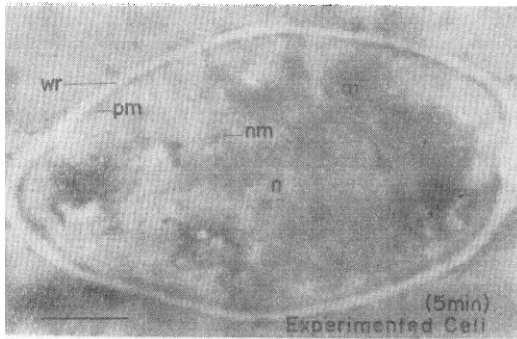


Fig. 3.

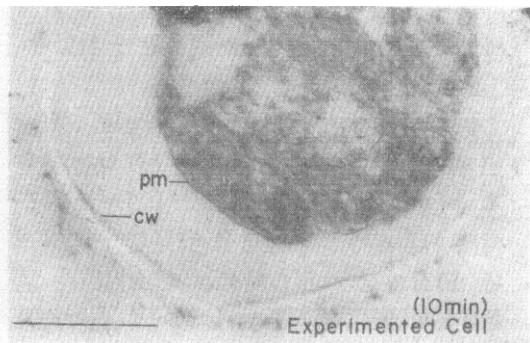


Fig. 4.

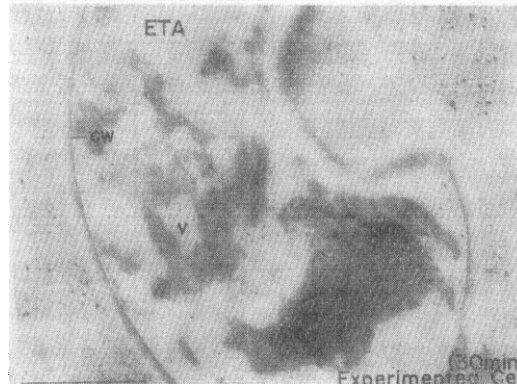


Fig. 5.

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. 5 분간 자외선 처리군으로서 정상세포와 별다른 차이를 볼 수 없다. $\times 35,000$

Fig. 4. 10 분간 자외선 처리군으로서 세포벽(cw)과 세포막(cm)의 분리현상을 관찰 할 수 없으며 아울러 세포내용물질의 명확한 구조를 보기 힘들다. $\times 56,000$.

Fig. 5. 30 분간 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 cell의 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 30분이 경과된 菌에서는 심한 形態學的 및 內容物質의 變化를 초래하였으며 이 群에서는 ETA의 심한 증가 현상을 나타내었다.
4. ETA의 증가현상은 菌體의 degradation process의 하나라고 思料된다.
5. 紫外線 處理에 의한 돌연변이 유발 여부에 대한 실험은 계속 추시할 점이라고 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. Ultra-structura 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.