

***Coccidioides immitis*의 Mycelial phase와 Tissue phase에 있어서의
電子顯微鏡的 觀察**

高 春 明 · 崔 泰 周 · * 滕 永 健 · 柳 駿

(延世大學校 醫科大學 微生物學教室 · 電子顯微鏡室*)

**Electron microscopic observations of the Mycelial and Tissue phase of
*Coccidioides immitis***

KOH, Choon-Myung, Tae-Joo CHOI, Young-Kun DEUNG,*
and Joon LEW

(Dept. of Microbiology and Electron Microscope Laboratory, College of Medicine, Yonsei University)

ABSTRACT

Ultrastructural observations of mycelial and tissue phase with dimorphic fungal pathogen *Coccidioides immitis* were studied by electron microscopy of thin sections.

1. In mycelial phase of *C. immitis* contains normal cell components such as nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, intracytoplasmic membrane system, cell wall and cell membrane as observed in the other eucaryotic cells.
2. In tissue phase of *C. immitis* was larger than mycelial phase in cell size and observed much more vacuoles than mycelial phase.
3. In the contrast of mycelial phase of *C. immitis*, the tissue phase of cells were observed fibril form of capsular layer.

緒 論

*Coccidioides immitis*는 成長相의 二形態의 成長形態를 나타내는 真菌(dimorphic fungi)으로서 深在性 真菌症(deep mycoses)을 일으키는 真菌으로 알려져 있다. 또한 이의 成長相 역시 Gilardi(1965)는 營養學的인 面과 生物物理學的인 여러 條件들에 依하여 變化를 가져온다고 發表된 바 있다.

이들 真菌들에 對한 電子顯微鏡的 研究는 여러 學者들에 依하여 行하여져 있으며 Lane 및 Garrison(1970), Garrison等(1971)과 O' Hern 및 Henry(1956) 등은 *Sporotrichum schenckii* 및 *Coccidioides immitis*의 微細構造와 成長相의 差異點에 따르는 여러가지 變化를 觀察報告하고 他 真菌들과 別다른 差異點을 볼 수 없다고 主張하였다.

또한, Carbonell(1969), Kanetsuna等(19

69), Carbonell 및 Pollak(1963) 등은 *Paracoccidioides brasiliensis*, Domer(1967), Edwards等(1959), Garrison等(1970), Rabi 및 Salviu(1956)은 *Histoplasma capsulatum*, Bakerspigel(1964), Tokunaga等(1969)과 Janson 및 Nickerson(1970) 등은 *Candida albicans*를 使用하여 各種 菌株들의 微細構造 및 成長에 따른 變化를 觀察 報告한 바 있다.

그러나 現在까지의 연구결과로 보면 二形態의 成長相의 電子顯微鏡的 構造와 成長相의 變化에 따르는 細胞 內容物의 變化에 關한 연구발표는 그리 많다고 볼 수 없다.

이에 本 研究者들은 深在性 原因菌의 一種이며 二形態 成長相을 지니고 있는 *Coccidioides immitis*를 [使用하여 tissue phase와 mycelial phase에 있어서의 微細 構造를 觀察할 目的으로 本 實驗에 着手하였던 바 그 結果를 얻을 수 있었기에 여기 報告하는 바

이다.

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 계대 보관하여 오는 *Coccidioides immitis* ATCC 10268을 使用하였다.

B. 實驗方法

1. Mycelial phase 및 tissue phase의 菌株 採取 方法

(a) Mycelial phase: Mycelial phase의 菌株를 採取하기 위하여서는 Sabouraud's glucose 糖液體培地에 接種하여 28°C 培養器에서 一週日間 培養한 후 이를 實驗에 使用하였다.

(b) Tissue phase: Tissue phase 菌株를 採取하기 위하여서는 mycelial phase로 培養된 菌株를 mortar 과 pestle 로서 研마한 후 이의 一定量을 마우스의 腹腔內에 接種하여 1週日이 經過된 후 이를 屠殺하여 感染된 臟器를 직접 실험에 使用하였다.

2. 電子顯微鏡의 觀察方法

試料을 500 r.p.m.으로 低速遠沈한후 상층액을 버리고 0.1mol phosphate buffer로서 調整한 pH 7.4의 3% glutaraldehyde 溶液에 2時間以上 0~4°C에서 先固定한 뒤 10% sucrose를 含有한 pH 7.4의 0.1mol phosphate buffer로서 세척, 이 溶液에서 一夜 放置하였다. 다음 1% osmium tetroxide로서 2時間後 固定하였다. 固定이 끝난 試料을 70% ethanol로서 세척한 후 遠沈하여 상층액을 제거하고 Kellenberger等(1958) 方法에 依하여 침전 부위에 1% 加温寒天을 첨가, 寒天이 응고된 후 이를 1mm³의 크기로 細切하여 이를 70% ethanol로부터 上昇順으로 無水 alcohol 및 prophylyene oxide 등으로 脫水를 行한 후 Epon 812(Luft, 1961)으로 包埋하여 glass knife를 使用하여 Sorvall MT-2 Porterblum Ultramicrotome으로 500Å 두께의 超薄切片을 作成하여 飽和 uranyl

acetate와 lead citrate로 二重 染色한 다음 Hitachi製 HU-11, E-1型 電子顯微鏡으로서 75KV下에서 觀察하였다.

結果 및 考察

*Coccidioides immitis*의 實驗成績

1. Mycelial phase의 實驗成績

Mycelial phase의 細胞크기는 3~5 μ 程度의 크기를 나타내었으며, 0.5~1.5 μ 의 核(n)을 含有하고 있었다. 또한 많은 數의 mitochondria(m)를 볼 수 있었으나 mycelial phase에서는 長形 혹은 필라멘트形(Filamentous or elongate)을 많이 觀察할 수 있었다.

또한, 核에 부착되어 있는 tube形의 inclusion material(in)를 볼 수 있었으며, 細胞質內 膜狀系(intracytoplasmic membrane system(icms)의 觀察이 可能하였고, 明確한 細胞膜(cm), 細胞壁(cw) 및 細胞壁에서 돌출된 tubular structure(wall club, wc)을 觀察할 수 있었다. 그러나 隔壁(sw)근처의 Woronin body의 觀察은 不可能하였다.

2. Tissue phase의 實驗成績

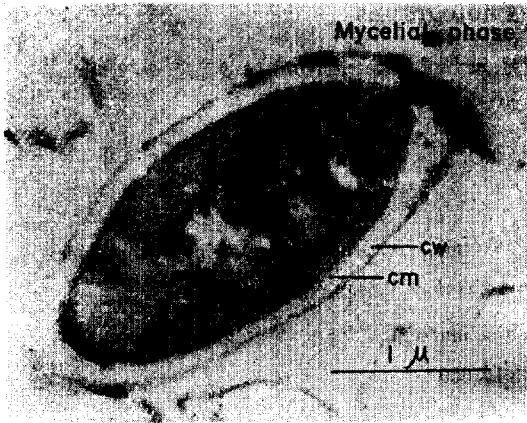
Tissue phase 細胞의 크기는 mycelial phase 細胞의 크기보다는 크게 觀察되어 7~12 μ 程度이었으며, 大部分이 타원형의 形態를 갖고 있었다.

核 역시 球形의 二重膜과 仁을 含有한 eucaryotic cell의 形態와 비슷하였다.

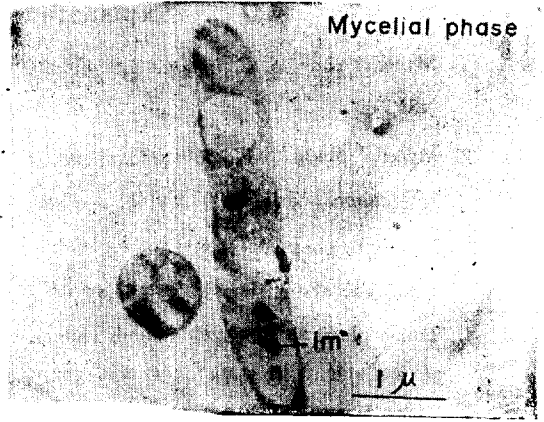
또한 tissue phase에서는 mycelial phase의 細胞에서 보다 vacuole(v)을 많이 觀察할 수 있었으며 球形의 mitochondria, endoplasmic reticulum(er) 萊膜層 및 smooth endoplasmic reticulum(ser)等을 觀察할 수 있었다. 이 이외에도 electron dense granule(g) 등의 觀察이 可能하였다.

또한 明確한 細胞膜과 細胞壁을 觀察할 수 있었는데 tissue phase의 細胞에서는 fibril形의 萊膜層을 觀察할 수 있었다.

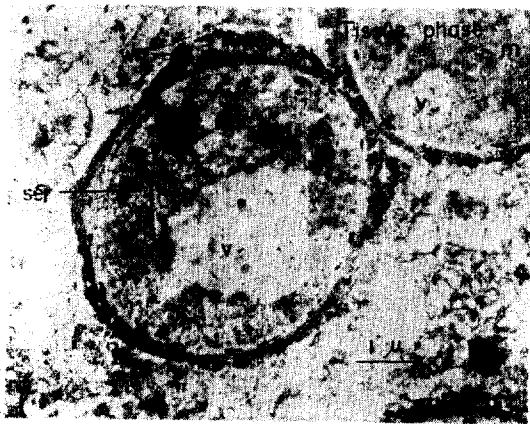
*Coccidioides immitis*는 二形態(dimorphic)의 成長形態를 나타내는 真菌의 一種으로서 深在性 真菌症을 일으키는 真菌의 一種이다.



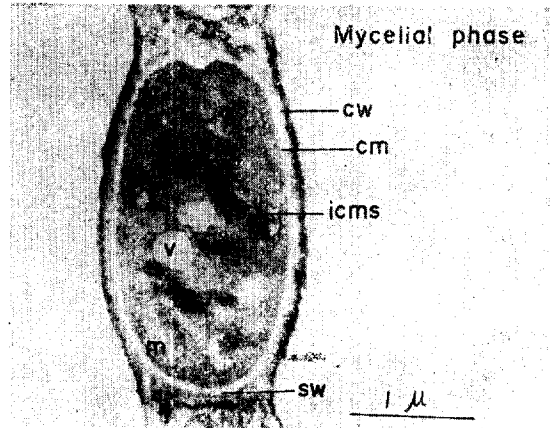
① × 31,500



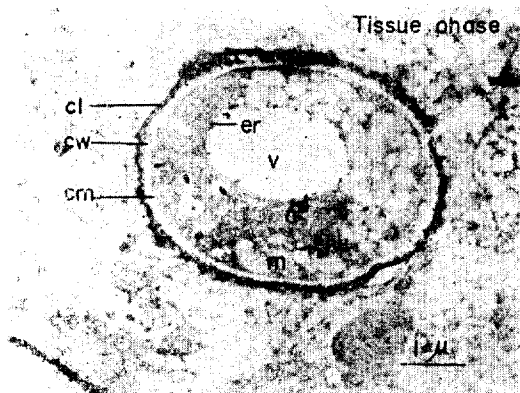
② × 56,000



③ × 43,000



④ × 15,000



⑤ × 22,400



⑥ × 22,400

Explanation of Photographs

1. Mycelial phase 의 *C. immitis* 로서 核(n)에 부착된 inclusion material(im)을 관찰할 수 있다.
×31,500
2. Mycelial phase 의 菌으로서 세포벽(cw), 세포막(cm), electron dense granule(g) 및 필라멘트
形의 mitochondria(m)가 보인다. ×56,000
3. Mycelial phase 의 菌으로서 세포벽(cw), 세포막(cm), mitochondria(m), intracytoplasmic
membrane system(icms) 및 격벽(sw)의 관찰이 가능하다. ×43,000
4. Tissue phase 의 菌으로서 smooth endoplasmic reticulum(ser) 및 많은 수의 液胞(v)가 관찰되
며 타원형의 菌體 외부에 험막층이 보인다. ×15,000
5. Tissue phase 의 菌으로서 核(n), 仁(nu), 타원형의 mitochondria(m), 세포막(cm), 세포벽(cw)
및 험막층(cl)이 관찰되며 아울러 endoplasmic reticulum(er) 및 液胞(v)를 볼 수 있다. ×22,400
6. Tissue phase 의 菌으로서 wall club(wc; tubular structure)를 볼 수 있다. ×22,400

이들 眞菌에 對한 電子顯微鏡의 研究는 많은 學者들에 依하여 行하여졌으며, O'Hern 및 Henry(1956)는 *Coccidioides immitis*, Lane 및 Garrison(1970), Garrison 等(1971)은 *Sporotrichum schenckii* 를 利用하여 微細構造와 成長相의 差異에 對하여 觀察 報告한 바 있다.

이 이외에 Carbonell(1969), Carbonell 및 Pollak(1963), 그리고 Kanetsuna 等(1969)은 *Paracoccidioides brasiliensis*, Domer 等(1967), Garrison 等(1970)은 *Histoplasma capsulatum*, Janson 및 Nickerson(1970)은 *Candida albicans* 等을 利用하여 各種 菌株들의 微細構造 및 細胞內容物質의 成長에 따르는 變化를 報告하였다.

이들 여러 研究者들의 報告를 보면 正常細胞에서는 他 眞菌들과 같이 正常眞菌細胞에서 觀察될 수 있는 細胞의 內容物質을 볼 수 있었으며, 이는 eucaryotic cell의 세포구조와 비슷하다고 主張하였는데 本 實驗 結

果에서도 上記 實驗과 一致하는 成績을 얻을 수 있었다. 그러나 mycelial phase에서 他 研究者들은 Woronin body를 觀察할 수 있었다고 하였으나 本 實驗에서는 이의 觀察이 不可能하였는데 이는 手技의 잘못이 있었던 것으로 思料된다.

한편 tissue phase에서는 mycelial phase에서 보다 細胞의 크기가 비교적 큰 것을 볼 수 있었으며 fibril form의 莢膜層도 아울러 관찰이 可能하였고 mycelial phase에 比하여 vacuole을 많이 觀察할 수 있었다.

現在까지의 實驗結果로 보아 細胞의 微細構造의 關係를 特異한 代謝關係의 變化에 따르는 變化라고 말하기는 힘들 것 같으나 *Coccidioides immitis*와 다른 二形態의 成長相을 含有하고 있는 眞菌들의 微細構造의 聯關性으로 미루어 보아 서로 비슷한 生理學的인 규제기전(physiologic regulatory mechanism)에 依하여 좌우되는 것 같이 생각된다

摘 要

*Coccidioides immitis*의 mycelial phase와 tissue phase에 있어서 微細構造를 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Mycelial phase의 세포구조에서는 正常的인 眞菌이 含有하고 있는 細胞의 內容物質을 觀察할 수 있었으며 이는 다른 eucaryotic cell의 構造와 같았다.
2. Tissue phase에서는 mycelial phase의 세포의 크기보다 比較的 크기가 컸으며 mycelial phase에서 보다 많은 數의 vacuole이 觀察되었다.
3. Tissue phase에서는 fibril form의 莢膜層을 볼 수 있었다.

引 用 文 獻

1. Bakerspige, A. 1964. Some observation on the cytology of *Candida albicans*, *J. Bacteriol.*, **73**, 365.
2. Carbonell, L.M. 1969. Intrayeast hyphae in *Paracoccidioides brasiliensis*, *J. Bacteriol.*, **98**, 1395.
3. Carbonell, L.M. 1969. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*, *J. Bacteriol.*, **100**, 1076.
3. Domer, J.E., Hamilton, J.G. and Harkin, J.C. 1967, Comparative study of the cell walls of the yeast like and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*, *J. Bacteriol.*, **94**, 466.
5. 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.
6. Garrison, R.G., Lane, J.W. and Johnson, D. R. 1971. Electron microscopy of the transitional conversion cell of *Histoplasma capsulatum*, *Mycopath. Mycol. Appl.*, **44**, 121.
7. Kanestuna, F., Carbonell, L.M., Moreno, R. E. and Rodroguéz, J. 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of

- Paracoccidioides brasiliensis*, *J. Bacteriol.*, **97**, 1036.
8. Kellenberger, E., Ryter, A. and Sechaud, J. 1967. "Techniques for electron microscopy", F.A. Davis Co.,
 9. Lane, J.W. and Garrison, R.G. 1970. Electron microscopy of the yeast to mycelial phase conversion of *Sporotrichum schenkii*, *Canad. J. Microbiol.*, **16**, 747.
 10. Lane, J.W., Garrison, R.G. and Field, M.F. 1969. Ultrastructural studies on the yeast like and mycelial phases of *Sporotrichum schenkii*, *J. Bacteriol.*, **100**, 1010.
 11. Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409.
 12. O'Hern, E.M. and Henry, B.S. 1956. A cytological study of *Coccidioides immitis* by electron microscopy, *J. Bacteriol.*, **72**, 632.
 13. Tokunaga, J., Tokunaga, M., Egashira, T. and Harada, K. 1969. Electron microscopical studies on growing fungal cells, *Japan. J. Bacteriol.*, **24**, 673.