

조직내 *Cryptococcus neoformans* 의 전자현미경적 관찰

서영훈, 권배정, 김정숙
(연세 의대 전자현미경실)

Ultrastructure of *Cryptococcus neoformans* in the Skin Tissue

Young Hoon Seo, Tae Jung Kwon, M. D. Chung Sook Kim, M. D.

Electron Microscopy Lab., College of Med., Yonsei Univ.

Abstracts

A case of systemic cryptococcosis developed in 4 year old boy was described and illustrated by light and electron microscope. Light microscopically, the upper dermis of the skin showed chronic nonspecific inflammation with numerous spherical spores surrounded by a clear halo created by the wide gelatinous capsule. Ultrastructurally, the *C. neoformans* showed the wide capsule containing microfibrils that appeared to radiate from the cell wall and to coil and intertwine in various directions. The cell was uninucleate with a single nucleolus. Along the inner nuclear envelope, numerous small vesicles were present. In addition, *C. neoformans* presented membranous organelles derived from the plasma membrane and comparable to bacterial mesosomes.

- 서 론 -

Cryptococcosis는 진균인 *Cryptococcus neoformans*에 의해 야기되는 질병으로서 보통 면역기능이 약화된 경우나 백혈병, 임파종, Hodgkin씨병등 악성 임파망상계 질환이 있는 환자에서 기회 감염(Opportunity infection)으로 발생한다.

*Cryptococcus*는 호흡기를 통해 감염되어 먼저 폐에 들어간 후 혈행(blood stream)을 통해 중추신경계, 피부 간, 골, 부신등으로 전파되어 전신적인 감염증을 일으키는 것으로 알려져 있다. (Robbins & Cotran, 1979)

*Cryptococcus neoformans*는 유성생식을 할때 filamentous phase를 형성(Shadomy등, 1966)하기도 하지만 숙주의 조직내에서나 일반적인 배양에서는 4~20 μ m의 원형 또는 난원형의 yeast형태로 존재하며 budding에 의해 증식하고 매우 두꺼운 gelatinous capsule을 가지고 있어서 광학현미경상에서 진균체 주위

에 특징적인 clear halo를 형성한다.

*Cryptococcus neoformans*의 광학현미경적 형태의 특징은 이미 잘 알려져 있고 그 미세구조에 대해서도 Tsukahara(1963), Edwards(1967), Lurie등(1971) Stoetzner와 Kemmer(1971), Paradimitriou 등(1978) 등의 산발적인 보고가 있었고 우리나라에서도 황등(1972), 이등(1982)이 관찰한 것이 보고되고 있다.

그러나 과거의 대부분의 연구가 배양에 의거한 것으로서 조직내 감염시 균체의 미세구조적 특징 및 조직내 반응이 정립되어 있지 못한 실정에 있다.

따라서 본인들은 최근 전신적인 Cryptococcosis로 본원에 내원한 환자를 대상으로 *Cryptococcus neoformans*를 전자현미경적으로 관찰하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료: 환자는 4세된 남아로서 입원 약 3개월전부

터 미열, 기침, 오심등의 증세가 있었으나 별 치료 없이 지내다가 약 2개월전부터 안면부 특히 코끝과 뺨에 종기가 생겨 점점 자라기 시작하였고 약10일전 부터는 발열과 호흡곤란이 심해져 본 병원에 입원하였다.

이학적 소견상 간비종대 (hepatosplenomegaly)가 있었고, 경부, 액와, 서혜부등의 임파절이 촉진되었으 며 안면부이외에 연구개에서도 종괴가 발견되었다.

흉부 X-선 검사상 폐 전체에 속립성 반상 (miliary mottling)이 관찰되었으며 혈액검사에서는 백혈구가 증가되어 있으면서 ($8350 \sim 19700/\text{mm}^3$), 특히 호산구가 19~30%로 증가되어 있었다.

환자는 피부, 간, 서혜부 임파절 및 골수의 생검을 시행한 후 퇴원하였고 5-Flucytosine과 Amphotericin B로 치료 받았으나 그후 4차에 걸쳐 재입원하였고 마지막 입원시에는 뇌수종, 의식불명, 경련, 기억감퇴등 뇌이상이 발견되었다.

본 연구에 사용한 재료는 치료를 시작하기 전에 생검된 조직을 사용하였다.

방법: 생검된 피부, 간, 임파절 및 골수조직은 10% 중성 formaline에 고정한 후 paraffin에 포매하여 박절한 다음 hematoxylin-eosin 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

전자현미경적 검사는 피부 조직에서만 시행되었는데 생검된 조직 일부를 세절하여 3% glutaraldehyde (pH7.4)로 전고정한 후 1% osmium tetroxide (pH 7.4)로 후고정하였고 통상적 방법에 의한 ethanol 탈수 및 epon 포매를 거쳐 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 Hitachi H-500형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

관찰 소견

1. 광학현미경 소견

피부, 간 및 임파절 생검 조직 소견상 각종 만성 염증세포의 침윤과 함께 다수의 구형 organism이 관찰되었는데 이들 organism들은 하나씩 또는 몇개씩 소집단을 이루어 존재하면서 gelatinous capsule에 해당되는 clear halo에 의하여 둘러싸여 있었다. (Fig. 1, 2)

골수의 조직 소견에서는 특이한 사항이 없었다.

2. 전자현미경 소견

C. neoformans 균체는 일반적으로 난원형으로 capsule을 제외한 크기는 약 $2 \sim 8 \mu\text{m}$ 였고 지금까지

보고된 다른 종들의 yeast cell과 비슷한 미세구조를 보였다. (Agar 등, 1957; Conti 등, 1959; Edwards 등, 1960; Mcclary 등, 1967; Robinow 등, 1966; Vitals 등, 1961)

Capsule은 균체 하나하나를 싸고 있거나 또는 여러개의 균체가 커다란 하나의 공동 capsule을 소유하고있으며 capsule의 두께는 strain이나 age에 따라 차이가 있어서 때로는 세포 자체보다도 더 큰 경우도 있었다. (Fig. 5)

Capsular material은 보통은 균체로부터 방사되는 양상의 microfibrils로 구성되어 있었는데 이 microfibrils들은 길고 서로 얽혀져 있었으며 fine dot로 나타나는 경우도 있었다. 균체 여러개를 포함하고있는 공동 capsule에서는 microfibril의 형태를 관찰할 수 없었다. (Fig. 4, 5, 6)

균체의 세포막은 전자 밀도가 높은 여러겹의 분명한 층으로 구성되어 있었으며 (Fig. 8) 세포막과 capsule 사이에서는 light zone 또는 white rim이라 불리는 부분도 관찰되었다. (Fig. 4, 6, 8)

세포질은 다른 진균세포와 마찬가지로 단위막으로 된 plasma membrane으로 둘러 싸여있었다.

세포질내에는 비교적 풍부한 ribosome이 세포질전반에 걸쳐 분포되어 있었으며 여러가지 모양과 크기의 mitochondria와 지질로 생각되는 storage granule이 관찰되었으나 기타 Golgi체, 소포체등의 organelle은 볼 수 없었다. (Fig. 4, 5, 6)

*C. neoformans*의 세포는 한쪽으로 치우쳐 위치하는 한개의 핵을 가지고 있었으며 핵내에서는 뚜렷한 과립성 핵인을 볼 수 있었다. 또한 핵막을 따라 산재해 있는 작은 vesicle도 관찰되었다. (Fig. 4, 6, 7)

*C. neoformans*의 번식방법인 budding 하는 모습도 자주 관찰되었다. (Fig. 4)

Macrophage의 cytoplasm 내에서는 비교적 두꺼운 막의 vesicle을 관찰할 수 있었다. (Fig. 4, 7) Epidermis 내에서 발견된 균체에서는 capsular material은 조금 밖에 관찰되지 않았다. (Fig. 3)

일부의 균체에서 mesosome-like한 구조가 관찰되었다. (Fig. 8)

고찰

본 증례에서 관찰된 *C. neoformans* 세포에서는 pro-caryotic cell과 eucaryotic cell의 특징이 모두 관찰되었다.

핵막, 핵인, mitochondria, lipid bodies 등은 모두 pathogenic yeast-like organism (Edwards 등, 1959, 1960) 과 다른 진균류 (Hawker, 1965) 에서 관찰된 것과 일치하였으며 Edwards 등 (1967) 과 Noble 등 (1972) 의 보고와 일치 하였다.

Bacteria와 같은 procaryotic cell에 존재하여 DNA 복제, 세포분열 및 secretion에 관여 하는 것으로 알려진 mesosome-like structure (Davis 등, 1980) 도 자주 관찰되었으나 *C. neoformans*에서 이들의 기능이나 중요성 등은 아직 밝혀지지 않고 있다.

Hashimoto와 Yoshida (1966)는 bacteria의 mesosome과 비슷한 구조가 glycogen 함성에 관여한다고 보고 하였으나 본 *C. neoformans* 균체에서는 glycogen particle을 관찰할 수 없었다.

Mesosome-like organelles이나 plasmalemmosome (Edwards 등, 1963) 등은 진균에서 보통 관찰될 수 있는 것으로 이들은 *C. neoformans* 와 같이 원형질막으로 부터 유래된 것이라 생각된다.

핵질에서 발견된 vesicle들에 대해서도 아직 언급된 바 없으나 Edwards 등 (1967) 이 보고한 핵막의 pore와 관련이 있는 것으로 추측된다. 즉 핵막의 불연속성의 결과 분리된 핵막의 particle들이 membrane의 단백질 성분의 영향으로 작은 vesicle을 형성한 것이 아닌가 생각된다.

Capsule의 크기나 균체 자체 크기에 큰 차이가 있는 것은 절단된 부위와 방향 또는 균체 자체의 age 등에 관계가 있는 것으로 생각된다. Marcophage의 세포질에서 관찰된 비교적 두꺼운 membrane의 vesicle은 Noble 등 (1970)의 보고와 같이 capsular material의 파편이라 생각된다.

Capsule과 세포막 사이에 존재하는 white rim 은 capsular polysaccharide를 합성하는 곳이라는 보고도 있으나 아직 확인 되어 있지 않고 본 실험에서도 이와 같은 증거는 찾아 볼 수 없었다.

요 약

진신성 Cryptococcosis로 판명된 4세 남아의 피부 생검조직에서 발견된 *C. neoformans*의 미세구조를 광학현미경 관찰과 함께 보고 하였다.

광학현미경 관찰에서는 각종 만성 염증 세포의 침윤과 함께 다수의 구형의 organism을 관찰할 수 있었다.

전자현미경적으로도 난원형의 세포가 gelatinous

또는 filamentous한 capsular material에 둘러 싸여 단 세포 혹은 여러개의 세포가 모여 있는 상태로 관찰되었으며 budding중인 상태의 것도 관찰되었다.

세포막은 고전사 밀도의 여티층으로 구성되어 있었으며 한개의 핵과 핵인이 관찰되었고 세포질내에는 mitochondria, ribosome, lipid bodies, vacuole 등과 함께 plasma membrane의 infolding으로 형성된 mesosome-like structure도 관찰되었다.

References

- Agar, H.D. and Douglas, H.C. 1957. Studies on the cytological structure of yeast: electron microscopy of thin sections. *J. Bact.* 73:365.
- Conti, S.F. and Naylor, H.B. 1959. Electron microscopy of ultrathin sections of *Schizosaccharomyces octosporus*. I. Cell division. *J. Bact.* 78:868.
- Davis, B.D., Rento, D., Herman, N.E. and Harold, S.G. 1980. Microbiology. 3th ed. Harper & Row Publishers.
- Edwards, M.R., Gordon, M.A., Lapa, E.W. and Ghiorse, W.C. 1967. Micromorphology of *Cryptococcus neoformans*. *J. Bact.* 94:766.
- 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.
- Edwards, G.A. and Edwards, M.R. 1960. The intracellular membranes of the yeast-like cells of *Blastomyces dermatitidis*. *Am. J. Botany.* 47:622.
- Edwards, M.R. and Stevens, R.W. 1963. Fine structure of *Listeria monocytogenes*. *J. Bact.* 86:414.
- Hashimoto, T. and Yoshida, N. 1966. Unique membrane system associated with glycogen synthesis in an imperfect fungus, *Geotrichum candidum*. Proc. Intern. Congr. Electron Microscopy 6th Kyoto, Japan. Vol. 2:305.
- Hawker L.E. 1965. Fine structure of fungi as revealed by electron microscopy. *Biol. Rew.* 40:52.
- Hwang, D.H., Koh, C.M., Choi, T.J. and Lew, J. 1972. Electron Microscopic Observations of the Irradition of Ultra-violet Ray on *Cryptococcus neoformans*. *Kor. J. Microbiol.* 10:29.
- Lee, B.K., Choi, Y.H. and Kim, J.D. 1982. Antifungal effect of clotrimazole and 5-fluorocytosine in *Cryptococcus neoformans* in Vitro. *Kor. Cen. J.*

- Med. 42(3): 165.
- Lurie, H.J., Shadomy, H.J. and Still, W.J.S. 1971. An electron microscopic study of *Cryptococcus neoformans* (Coward strain). *Sabouraudia*. 9:15.
- McClany, D.O. and Bowers, W.D. 1967. Structural differentiation of obligately aerobic and facultatively anaerobic yeasts. *J. cell Biol.* 32:519.
- Noble, R.C. and Fajardo, L.F. 1972. Primary Cutaneous Cryptococcosis. Review and morphologic study. *Am. J. Clin. Path.* 57:13.
- Papadimitriou, J.M., Robertson, T.A., Kletter, Y., Aronson, M. Walter, M. 1978. An ultrastructural examination of the interaction between macrophages and *Cryptococcus neoformans*. *J. Path.* 124:103.
- Robbins, S.L., Cotran, R.S. 1979. Pathologic basis of disease. 2nd ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, London, Tokyo.
- Robinow, C.F. and Marak, J. 1966. A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell. *J. Cell Biol.* 29:129.
- Shadomy, H. J. and Utz, J.P. 1966. Preliminary studies on a hypha-forming mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. 58-383.
- Stoetzner, H., Kemmer, C. 1971. The morphology of *Cryptococcus neoformans* in human cryptococcosis a light, phase-contrast and electron microscopic study. *Mycopath. Mycol. Appl.* 45:327.
- Tsukahara, T. 1963. Cytological structure of *Cryptococcus neoformans*. *Japan J. Microbiol.* 7:53.
- Vitals, E., North, R.J. and Linnane, A.W. 1961. Studies on the oxidative metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* 1. Observation on the fine structure of the yeast cell *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:689.

Figure Legends

- Fig. 1.** Upper dermis of the skin showing numerous spherical spores surrounded by a clear halo created by the wide gelatinous capsule. H&E stain x450.
- Fig. 2.** Same as the Fig. 1. Thinsection Toluidine blue stain x450.
- Fig. 3.** *Cryptococcus neoformans* in epidermis. Note the lack of capsular material. x12,500.
- Fig. 4.** Budding yeast cell within a histiocyte. Several vesicular structures with a similar thick membrane are seen in the cytoplasm of histiocyte. These vesicles contain remnants of capsular material. x15,000
- Fig. 5.** A cell with thin cell wall (cw), thick white rim (wr) and wide capsule. Cellular organelles, nucleus (Nu), mitochondria (m), vesicle (v) and ribosomal particles (r) are seen. x25,000
- Fig. 6.** A tangential section of budding projection appears at 4 o'clock. Capsule consists of radiated fine micro fibrils, forming a dense network. x20,000
- Fig. 7.** The nucleus shows a prominent nucleoli and several small vesicles (arrow) along the inner nuclear membrane. The cell wall consists of multilamellated structure. x20,000.
- Fig. 8.** A portion of peripheral cytoplasm showing ingrowth (mesosome) from the plasma membrane (arrow). Note the multilamellated cell wall (cw) and white rim (wr) are seen. x37,500







