주사전자현미경을 이용한 피부사상균의 형태학적 관찰

연세대학교 의과대학 피부과학교실

윤경한 · 정태석 · 신항계 · 방동식 · 이광훈

=Abstract=

Scanning Electron Microscopic Examination of Dermatophytes

Kyeong Han Yoon, Tae Suk Chung, Hang Kye Shin, Dongsik Bang and Kwang Hoon Lee

Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: It is important to understand the morphologic characteristics for the identification of a microorganism. Electron microscopy has contributed a great deal to the field of mycology. Scanning electron microscope (SEM) has become a useful tool to study three-dimensional images of fungi. Vacuum dessicator aqueous fixation is a useful sample preparation technique for SEM examination of fungal specimens without surface distortions.

Objective: This study was done to observe the three-dimensional structures of dermatophytes preserving their natural growth characteristics.

Methods: *Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes, Microsporum canis, M. gypseum,* and *Epidermophyton floccosum* were isolated and cultured on Sabouraud agar, corn meal agar, or rice agar plate. Vacuum dessicator aqueous fixation was utilized as a preparation technique for SEM examinations of the fungi.

Results: Vacuum dessicator aqueous fixation led us to examine the aerial mycelia including conidia of the dermatophytes under SEM. The five species of dermatophytes showed their own characteristic structures especially on microconidia and macroconidia.

Conclusion: The use of ultrastructural research has made it possible to identify the species of fungi and can be expanded and improved along with the development of SEM and specimen preparation techniques.

[Kor J Med Mycol 2(2): 153-160]

Key Words: Scanning electron microscopy, Vacuum dessicator aqueous fixation, Dermatophytes

서 론

미생물의 동정에는 형태학적 특성을 파악하는 것이 매우 중요하다. 전자현미경의 발달은 포자의 관찰, 진균과 숙주와의 병인관계, 세포내 소기관의 구조와 기능등 진균에 관한 연구에 많은 기여를 하였다[1]. 특히 주사전자현미경 검사는 진균의 3차원적 구조를 파악하는데 유용한 방법으로서 진균의 배양 특성 및 생체내에서 숙주에 침입하는 형태 및 기전, 그리고 약제의 효과등을 연구하는데 많이 이용되고 있다[2,3]. 그러나 진균의 기중균사는 대체적으로 소수성이기 때문에 수성 고정시에 변형이 일어나고, 분생자가 쉽게 엉클어지고 변형되므로 진균의 살아있는 모양을 그대로 유지한 상태로 관찰하기가 매우 어렵다[4].

†별책 요청 저자: 이광훈, 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 피부과학교실

최근에는 배양된 진균을 aqueous fixation과 아세톤을 이용하여 탈수시키고, critical point method[1]를 이용하여 건조시킴으로써, 진균의 포자 구조를 그대로 유지시키면서 주사전자현미경으로 관찰할 수 있게 되었다[2]. 본 연구에서는 aqueous fixation과 critical point drying method[1,5]를 이용한 주사 전자현미경 검사를 시행하여, 수종 피부사상균의 3차원적 구조를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

균 주: 연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원에 내원하여 피부진균증으로 진단받은 환자들로부터 분리 동정한 *Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes, Microsporum canis, M. gypseum, Epidermophyton floccosum* 각 2주씩을 사용하였다. 가검물을 chloramphenicol과 cycloheximide가 포함된 Sabouraud 한천배지에 접종하여 사용하였다. Microsporum을 대분생자의 관찰이 용이하도록 rice agar plate에 접종하였다.

배양한 균주의 전자현미경 관찰: 2~3 mm 두께의 Sabouraud dextrose agar, rice agar, corn meal agar 등의 평판배지에 균주를 접종하여 적절하게 포자형성이 이루어질 때까지 25℃ 배양기에서 배양하였다. 균대가 형성된 배지를 1 cm^2 이하의 크기로 잘라 절편을 만들어서 가능한 손상 없이 건조한 평판접시 뚜껑의 안쪽 면에 옮기고 평판접시 바닥 위에 거꾸로 뒤집어 놓았다. 평판접시 바닥에 실온의 1% aqueous osmium tetraoxide를 적당량 넣고, 그 증기에 15~20분간 노출 시켰다. 가검물이 붙어 있는 평판접시 뚜껑을 35~45℃의 증류수가 들어 있는 다른 평판접시 바닥 위로 옮기고 그 증기에 15~20분간 노출 시켰다. 평판접시 뚜껑을 다시 바로 놓고 증류수를 1 mm의 깊이로 채운 후, vacuum dessicator[6]의 구멍 뚫린 금속판 위에 놓고 큰 유리로 덮은 다음 그 위에 fresh indicator로 silica gel을 올려 놓았다. 금속판의 아래 공간에는 아세톤을 채워 넣고 뚜껑을 닫은 후 vacuum pump를 이용하여 음압을 가하였다. 아세톤이 가볍게 끓을 정도로 음압을 가한 후 24시간 동안 잠가두어 가검물이 잠기게 된 다음 음압을 서서히 제거한 후 가검물을 공기에 노출 시키지 않기 위해, 평판접시에 미리 담가두었던 aluminum foil cup (20×5 mm)을 똑바로 세우고 가검물을 넣었다. 아세톤을 피펫으로 제거하고 absolute aceton을 채워 넣은 후 다시 피펫으로 제거하였다. 이 과정을 3~4회 반복하여 물이 하나도 남지 않도록 하였다.

Aluminum foil cup을 critical point drying apparatus에 옮겨서 액체 CO_2로 얼렸다가 20℃에서 20분, 37℃에서 5분간 방치하여 건조 시켰다. Gold로 sputter coating을 하여 주사 전자현미경 (Hitachi S-450 scanning electron microscope, Japan)으로 15~20 KeV에서 관찰하였다.

모발관통시험 (hair penetration test): 평판접시에 1 cm 정도 길이의 정상 모발을 몇가닥 놓고 autoclave로 멸균하였다. 멸균된 25 ml의 증류수를 첨가한 후 배양된 진균을 가하고 실온에서 배양하였다[7]. 가검물을 air drying 방법으로 준비하고 gold coating을 하여 주사현미경으로 관찰하였다.

결 과

*T. rubrum*은 원통형의 가늘고 긴 균사가 나무가지 모양으로 배열되어 있었으며, 균사의 중간 중간에 고리 모양으로 관찰되는 격막을 갖고 있었다 (Fig. 1a). 서양배 모양의 소분생자는 양쪽 측면을 따라서 나무 잎사귀 처럼 매달려 있는 양상을 보였다 (Fig. 1b).

*T. mentagrophytes*는 가는 원통형의 균사가 나무가지 처럼 분지되고, 포도송이 모양의 소분생자가 균사의 끝 부분에 무리를 지어 매달려 있었는데 각각의 분생자는 구형의 구조로 관찰되었다 (Fig. 2a, 2b). 강화배지에서 배양한 경우에는 오이 모양의 길쭉한 대분생자도 관찰되었다 (Fig. 3). 균사들은 불규칙적으로 배열되어 소용돌이 처럼 엉클어져 있었다 (Fig. 4). 때로 후막포자가 균사의 측면에서 불룩한 주머니 모양의 구조로 발달한 모습이 관찰되었다 (Fig. 5). 모발관통시험의 주사전자현미경 소견상 *T. mentagrophytes*는 모발을 뚫고 들어가는 양상을 관찰할 수 있었으나 (Fig 6a), *T. rubrum*은 모발을 뚫고 들어가지 않고 겉에서만 자라는 양상을 보였다 (Fig. 6b).

*M. gypseum*은 특징적인 다수의 방추형의 대분생자를 보였는데, 그 원위부 끝이 둥글고 매끄러웠으나 전 표면은 가시 모양의 작은 수지상돌기로 덮혀있었고 미세한 과립들이 관찰되었으며, 소수포들이 표면에서 관찰되기도 하였다 (Fig. 7a, 7b).

*M. canis*는 *M. gypseum* 보다는 매끄러운 다수

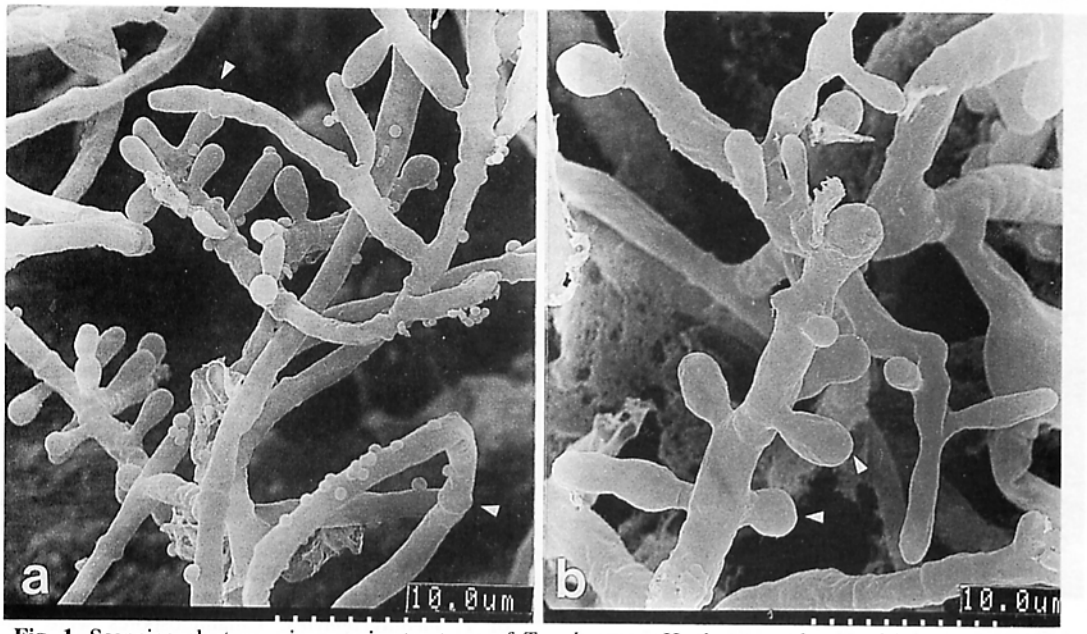

Fig. 1. Scanning electron microscopic structures of *T. rubrum*. **a.** Hyphae were long and branched. Multiple septa were found on the hyphae (▲); **b.** Smooth surfaced microconidia were arranged as leaves on the sides of the hyphae (▲).

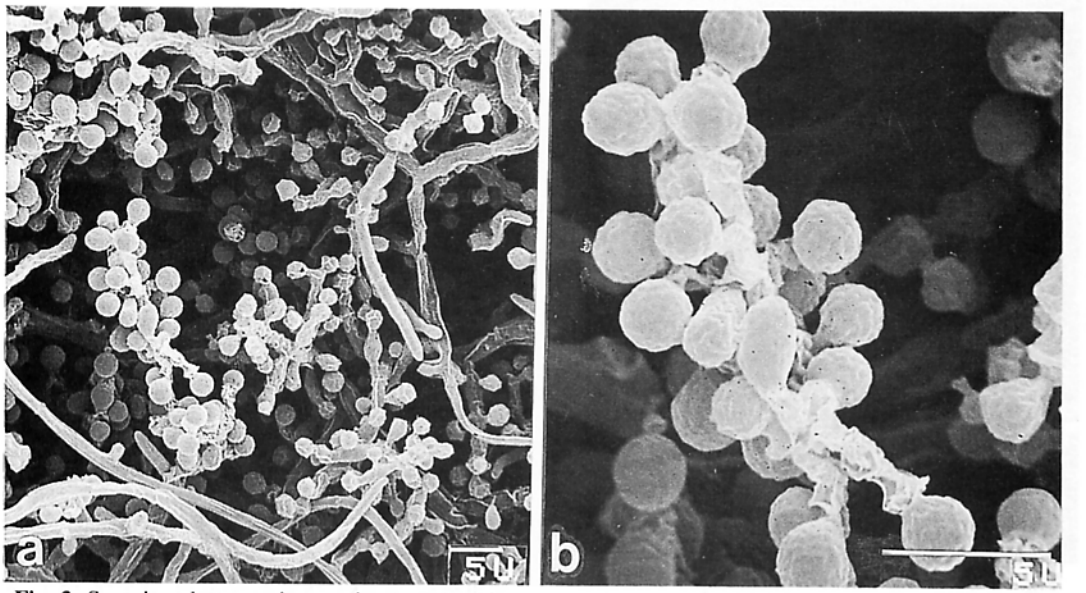

Fig. 2. Scanning electron microscopic structures of *T. mentagrophytes*. **a.** Microconidia were observed on the distal ends of the hyphae like a bunch of grapes; **b.** In magnification, the microconidia showed their smooth surfaces.

의 긴 원통형의 균사를 갖고 있었으며 일정하게 격막이 관찰되었고 서로 분지하는 양상을 보였다. 또한 다수의 대분생자가 관찰되었는데 대분생자의 표면에는 미세한 과립이 관찰되었다 (Fig. 8a). 대분생자는 수가 많고 크며 *M. gypseum*과 유사한 방추형 구조로서 표면에 많은 가시 모양의 구조를 보였지만, 원위부 끝이 둥글게 끝나지 않고 갈고리 모양으로 살짝 튀어나와 구부러진 특징이 있었다 (Fig. 8b).

*E. floccosum*은 격막이 있는 가는 균사와 다수

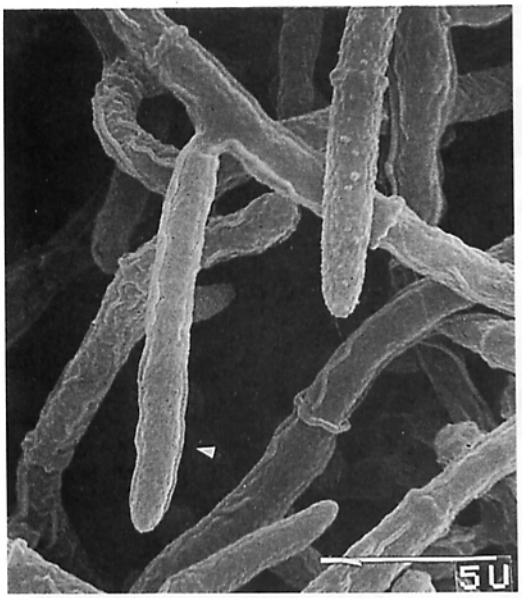

Fig. 3. Scanning electron microscopic structures of *T. mentagrophytes*. Macroconidia were observed on the sides of the hyphae like cucumbers (▲).

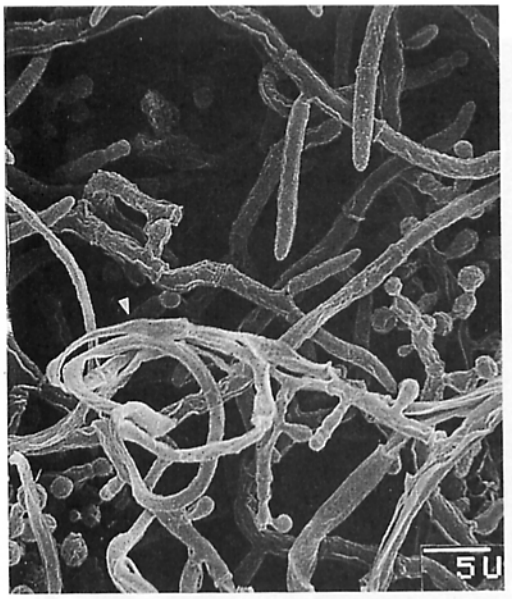

Fig. 4. Scanning electron microscopic structures of *T. mentagrophytes*. The coiled hyphae were observed (▲).

의 대분생자로 구성되어 있었다 (Fig. 9a). 대분생자는 단독 또는 집단으로 배열되어있으며 표면이 매끄러우며, 원위부 끝이 둥글고 균사와 붙어있는 근위부 밑둥이 좁은 특징을 보였다 (Fig. 9b).

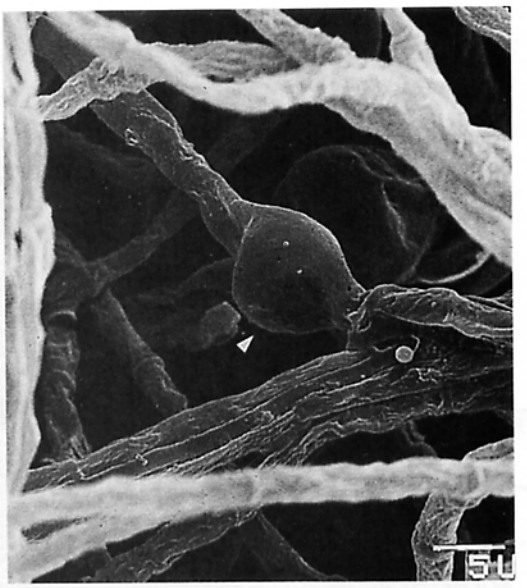

Fig. 5. Scanning electron microscopic structures of *T. mentagrophytes*. Chlamidospores were observed on the sides of the hyphae as bulging structures (▲).

고 찰

피부사상균은 임상적으로는 서로 유사한 병변을 야기시키지만 배양해 보면 서로 다른 다양한 특성과 모양을 보인다. 진균을 동정하기 위해서는 배지에서의 집락의 모양, 성상, 색, 그리고 냄새 등을 확인하고, 광학현미경으로 균체의 모양을 관찰하며, 또한 각종 생화학적 검사 등이 이용된다. 본 연구에서는 주사전자현미경을 이용하여 배양된 피부사상균의 전반적인 형태와 세밀한 구조를 관찰하였다.

전자현미경의 발달은 진균에 관한 연구에 많은 기여를 하였는데, 특히 주사 전자현미경 검사는 진균의 3차원적 구조를 파악하여 각종 진균의 배양 특성등을 연구하는데 많이 이용되고 있다[1,8~10]. 전자현미경의 발달과 더불어 가검물을 준비하는 방법의 개발도 진균의 연구에 매우 중요한 요소이다. 주사전자현미경이 진균의 관찰에 처음 이용되었던 1960년대 중반 당시에는 air-dry method로 가검물을 준비하였기 때문에 조직이 많이 와해되는 양상을 보였고, 고체배지나 슬라이드 배양시에 잘 관찰될 수 있는 진균의 기중균사와 분생자가 고정하는 과정에서 변형되고 쉽게 엉클어지므로 진균이 살아있는 모양을 그

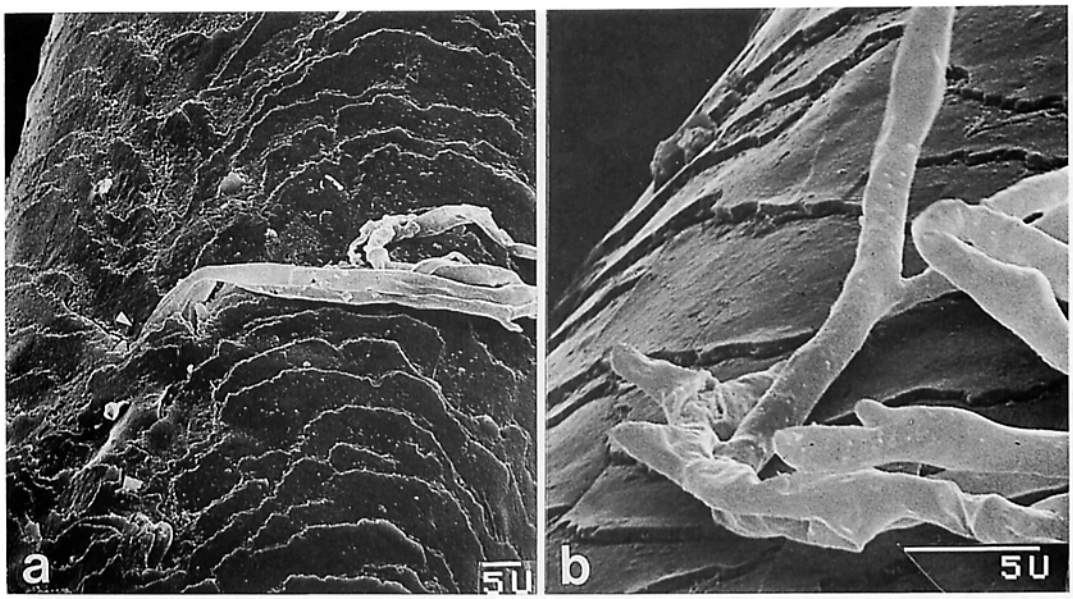

Fig. 6. Scanning electron microscopic findings of hair penetration test. **a.** *T. mentagrophytes* penetrated the hair (▲); **b.** *T. rubrum* did not penetrate the hair.

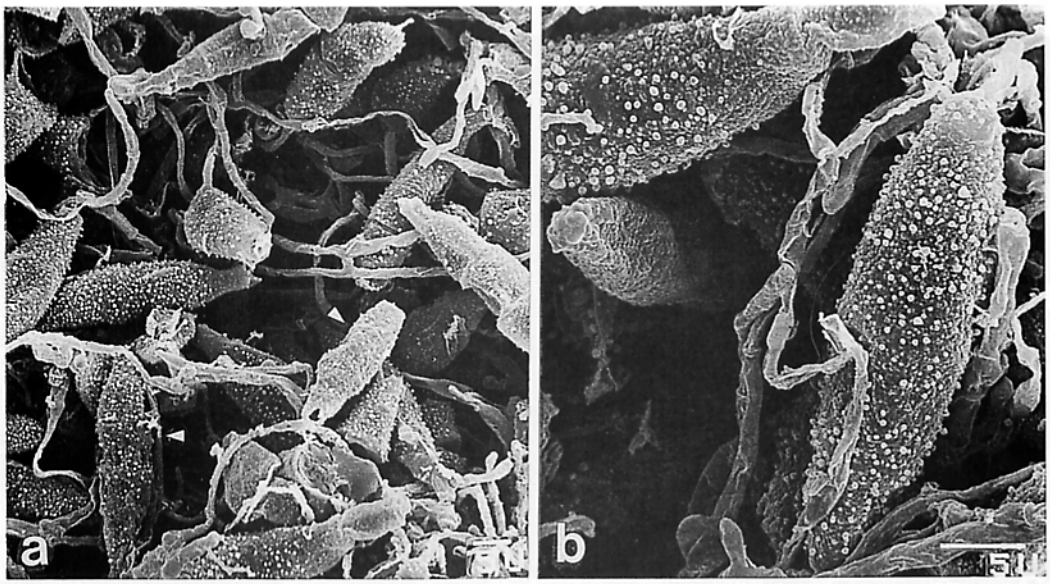

Fig. 7. Scanning electron microscopic structures of *M. gypseum.* **a.** Spindle shaped macroconidia were observed (▲). The distal ends were smooth and round; **b.** In magnification, here were numerous projections and granules on the surfaces of macroconidia.

대로 관찰하기가 매우 어려웠다[1,4]. 1970년대 초반에 들어서면서 진균을 vacuum dessicator aqueous fixation과 critical point drying method를 이용하여 가검물에서 표면의 와해를 일으키지 않고 진균의 기중균사 및 포자 구조를 그대로 유지한 상태로 주사전자현미경 검사를 할 수 있게 되었다[1,4,5]. 이 방법이 진균의 구조에 손상을 덜 주는 이유는 혐수성의 수성고정액에 담그지 않고 자연적으로 증발되는 증기를 이용하여 고정을 시키며, vacuum dessicator device를 이용하여 서서

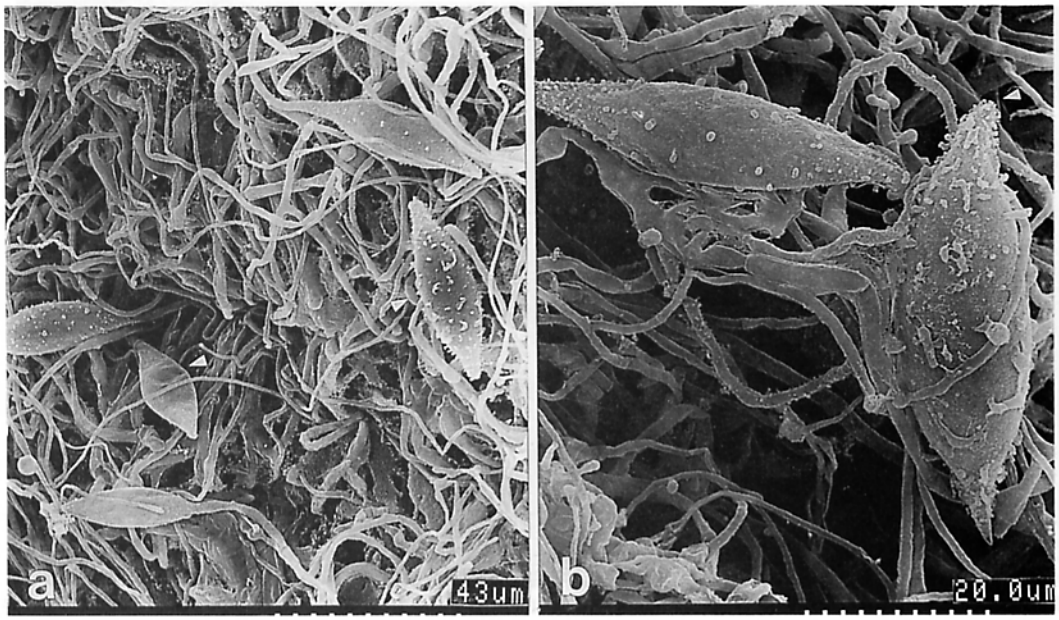

Fig. 8. Scanning electron microscopic structures of *M. canis*. **a.** Spindle shaped macroconidia were characteristic impression (▲); **b.** The distal ends of macroconidia were hook shaped (▲), and numerous projections were found on the surfaces.

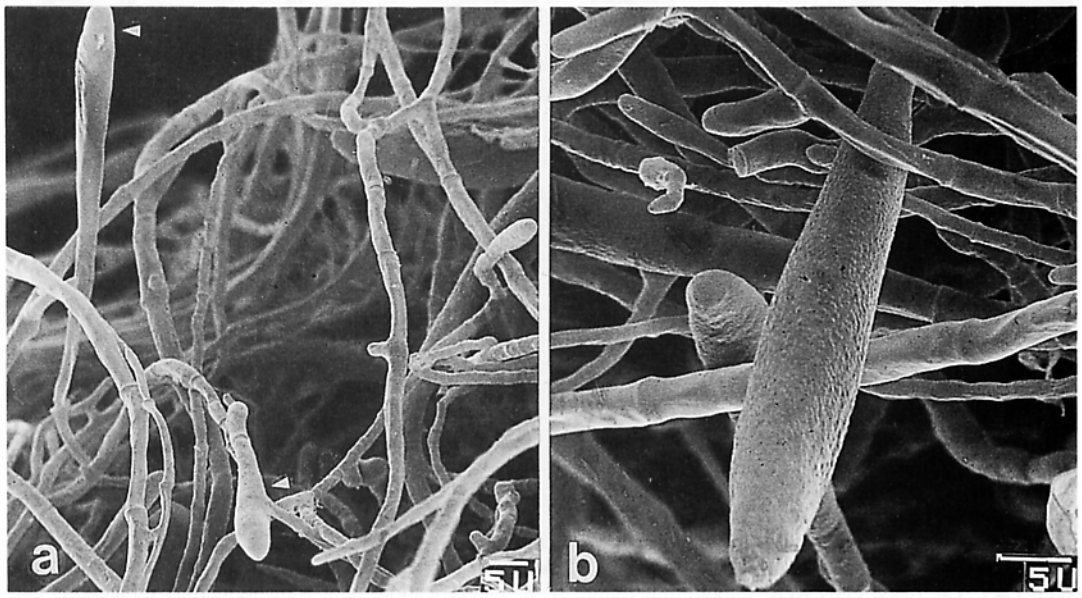

Fig. 9. Scanning electron microscopic structures of *E. floccosum*. **a.** Thin hyphae were septated (▲); **b.** The surface of macroconidia was smooth and round, and attached portion to hyphae was narrow.

히 고정시키고 건조 시킴으로서 급격한 물리적인 자극을 피할 수 있기 때문으로 생각된다[4]. 또한 고정에 소요되는 시간이 짧고 건조 시키는 동안 계속 지켜볼 필요가 없기 때문에 시간을 절약할 수 있다는 장점도 있다. 다만, 수성고정을 하는 경우에 비하여 osmium tetraoxide가 가검물의 표면에 적게 부착되기 때문에 전기적으로 전도율이 낮을 수 있다는 우려가 있다[11]. 그러나 실제의 경우 10~15 KeV의 범위에서 전자현미경 검사에서 좋은 화상을 얻는 데에 아무런 문제가 없

는 것으로 밝혀졌다.

주사전자현미경과 투사전자현미경을 이용하여 진균의 구조나 약물에 대한 형태적 반응 등을 연구한 보고들이 많이 있었지만 수종의 피부사상균의 형태를 비교 관찰한 연구는 아직까지 없었다. 여러 연구들에 따르면 피부사상균은 몇가지의 중요한 특징을 보인다. 즉, *T. rubrum*은 비교적 길고 격막이 있는 매끄러운 균사와 나무잎 양상의 소생분자가 관찰된다[12]. *T. mentagrophytes*는 *T. rubrum*과 달리 균사의 일부가 용수철 모양으로 꼬여 있는 부위가 있으며, 잘 성장된 경우에는 균사의 표면이 사마귀 모양의 돌기들로 둘러싸일 수 있다[13,14]. 포도송이 모양으로 집락을 이루는 소분생자와 담배 모양의 대분생자가 관찰되고, 생체내에서나 각질세포에서 배양하면 균사의 측면으로부터 germ tube가 발달하여 분절포자를 형성하기도 한다[15]. 모발관통시험에서 진균이 모발내로 침투해 들어가는 양상을 보임으로서 *T. rubrum*과 구별할 수 있다. *M. gypseum*은 수많은 돌기가 덮혀있는 방추형의 대분생자가 특징적으로 관찰된다. *M. canis*는 전반적으로 *M. gypseum*과 유사한 양상을 보이지만, 대분생자의 끝부분이 갈고리 모양으로 구부러져 있는 모습이 관찰되는 차이로 쉽게 구별할 수 있었다[16~18].

*E. floccosum*은 대분생자의 표면이 매끄럽고 양쪽 끝이 둥글궁글한 모습을 보여 Microsporum의 대분생자와 구별할 수 있다. 또한 배지에서 오래 배양하면 다수의 후막포자를 관찰할 수 있다. 이러한 특징들은 본 연구에서 관찰한 결과들과 거의 일치한다. 따라서 이상과 같은 주사전자현미경 검사상의 형태학적 차이로 진균의 동정을 보다 확실하고 쉽게 할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 살펴본 바와 같이 vacuum dessicator aqueous fixation을 이용하여 가검물을 준비하고 주사전자현미경 검사를 시행하는 것이 진균에 관한 연구에 있어서 좋은 방법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 예를 들어서 포자형태를 관찰하고 그 형성과정을 파악하는 것은 분생자의 발달 기전 연구와 진균의 분류에 있어서 중요한 분야인데, 주사전자현미경 검사와 투사전자현미경 검사를 함께 이용하는 것이 최선의 방법으로 보고되고 있다[1,19]. 즉, 주사전자현미경 검사로 분생자와 발아흔적 (conidial scar)등을 관찰하고, 투사전자현미경 검사로 격막형성과 세포내 소기관의 변화를 관찰하여 분생자 형성시의 형태적 변화와 함께 이와 관련된 생리적 변화를 유추하고 해석함으로서 그 기전을 파악하는데 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 숙주와 진균의 부착면에 대한 관찰, 진균이 숙주내에 축적되는 양상 및 균사가 숙주 내로 침투하는 양상등을 관찰함으로서 숙주와 진균의 상호작용을 파악하는데에도 이용될 수 있으며[20], 진균이 약물에 반응하는 양상을 관찰함으로서 항진균제의 연구에도 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 수종의 피부사상균을 환자의 병변으로 부터 분리 배양하여 vacuum dessicator를 이용한 aqueous fixation과 critical point method를 이용하여 배양된 진균을 살아 있는 모양 그대로 관찰할 수 있는 재료로 만들어 주사전자현미경을 이용하여 다음과 같이 피부사상균의 균사 및 분생자의 세밀한 구조를 파악할 수 있었다.

1. *T. rubrum*은 가늘고 긴 균사에 소분생자가 나무 잎사귀 처럼 매달려 있었고, 모발관통시험에서 모발의 겉에서만 관찰되었다.

2. *T. mentagrophytes*는 균사가 나무가지 처럼 분지하고 그 끝에 포도송이 모양의 소분생자가 관찰되었고 후막포자도 관찰되었다. 모발관통시험에서 모발을 뚫고 들어가는 양상이 관찰되었다.

3. *M. gypseum*은 미세한 과립들로 덮혀 있는 방추형의 대분생자가 관찰되었다.

4. *M. canis*는 *M. gypseum*에서와 유사하지만 원위부 끝이 구부러진 형태의 대분생자가 관찰되었다.

5. *E. floccosum*는 길쭉하고 표면은 매끄럽고 원위부 끝은 둥글며 균사쪽의 밑둥이 좁은 형태의 대분생자가 관찰되었다.

이상의 결과로 볼 때 vacuum dessicator aqueous fixation으로 재료를 준비하고 주사전자현미경 관찰을 함으로서 피부사상균의 정상적인 구조를 확실하게 파악하여 동정할 수 있으며, 향후 진균의 연구에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Klomparens KL. The development and ap-

plication of ultrastructural research in mycology. Mycopathologia 1990; 109: 139-148
2. Cole GT. Contribution of electron microscopy to fungal classification. Am Zool 1979; 19: 589
3. Hutton RD, Kerbs S, Yee K. Scanning electron microscopy of experimental *Trichophyton mentagrophytes* in guinea pig skin. Infect Immun 1978; 21: 247
4. King EJ, Brown MF. A technique for preserving aerial fungal structures for scanning electron microscopy. Can J Microbiol 1983; 29: 653-658
5. Anderson TF. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans NY Acad Sci Ser II 1951; 13: 130-134
6. Sitte P. Einfaches Verfahren zur stufenlosen Gewebe-Entwasserung fur die elektronenmikroscopishe Praparation. Natarwissenschaften 1962; 17: 402-403
7. Ajello L, Georg LK. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. Mycopath et Mycol Appl 1957; 8: 3-17
8. Hospenthal DR, Rogers AL, Mills GL. Development of amphotericin B liposomes bearing antibody specific to *Candida albicans*. Mycopathologia 1988; 101: 37-45
9. Reiss E, White EH, Chernjak R, Dix IE. Ultrastructure of acapsular mutant *Cryptococcus neoformans* cap 67 and monosaccharide composition of cell extracts. Mycopathologia 1986; 93: 45-54
10. Findlay GH, Vismer HF. Studies in sporotrichosis: fungal morphogenesis and pathogenecity in differing environments. Mycopathologia 1972; 87: 269-284
11. Kelley RO, Dekker RAF, Bluemaink JG. Ligand mediated osmium binding: its application in coating biological specimens for scanning electron microscopy. J Ultrastruct Res 1973; 45: 254-258
12. Jacob Z, Srivastava OP. Scanning electron microscopic study of the effects of tolciclate and clotrimazole on *Trichophyton rubrum*. Indian J Med Res 1983; 78: 518-523
13. Osumi M, Yamada N, Okada J, Yamaguchi H, Hiratani T, Plempel M. The effect of bifonazole on the structure of Trichophyton. Drug Res 1983; 33: 1484-1491
14. Osumi M, Yamada N, Yamada Y, Yamaguchi H. The effect of bifonazole on the structure of *Trichophyton mentagrophytes*. Dermatologica 1984; 169: 19-32
15. Aljabre SHM, Richardson MD, Scott EM, Shankland GS. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum in vitro. J Med Veternary Mycol 1992; 50: 145-152
16. Butty P, Gorenflot A, Mallie M, Bastide JM. Low voltage scanning electron microscopy study of naftifine activity on *Microsporum canis*. Mycoses 1992; 35: 335-342
17. Werner HJ, Jolly HW, Spurlock BO. Electron microscope observations of the fine structure of *Microsporum canis*. J Invest Dermatol 1966; 46: 130-134
18. Mazabrey D, Nadal J, Seguela JP, Linas MD. Scanning and transmission electron microscopy: study of effects of econazole on *Microsporum canis*. Mycologica 1985; 91: 151-157
19. Cole GT. Models of cell differentiation in conidial fungi. Microbiol Rev 1986; 50: 95-132
20. Wood LA, Heath MC. Light and electron microscopy of the interaction between the sunflower rust fungus and leaves of the nonhost plant, French bean. Can J Bot 1986; 64: 2476-2486