

폐포자충에 의한 폐렴의 실험적 모델

계명대학교 의과대학 병리학교실, 내과학교실*, 신경과학교실†, 안과학교실*

정혜라 · 김희경* · 신용억† · 심지훈# · 권건영

Experimental Model of Pneumonia Induced by *Pneumocystis carinii*

Hye Ra Jung, M.D., Hee Kyung Kim, M.D.*, Yong Euk Shin, M.D.†,
Jee Hoon Sim, M.D.#, Kun Young Kwon, M.D.

Departments of Pathology, Internal Medicine*, Neurology†, and Ophthalmology#,
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Abstract : *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) is an opportunistic pathogen which causes pneumonia in the lungs of immunocompromised patients. Since the organism has not been successfully propagated *in vitro*, many investigators have been restricted to *in vivo* models for studying the *P. carinii* organisms. This study was carried out to investigate more desirable animal model of *P. carinii* pneumonia and to observe morphologic characteristics in the animal model of rats. After six weeks of administration of 8% low protein diet, dexamethasone, tetracycline, and nystatin, the Sprague-Dawley rats were sacrificed to submit lungs and bronchoalveolar lavage for the study. We compared between the oral administration and intraperitoneal injection of dexamethasone to the experimental rats. The oral administration of dexamethasone was more effective than the intraperitoneal injection of dexamethasone for the survival rates and detection rates of *P. carinii* in the rats. The survival rates and detection rates of *P. carinii* were similar between the group of intratracheal injection of *P. carinii* plus oral dexamethasone administration and the group of only oral dexamethasone administration. These results indicated that the oral administration of dexamethasone in the experimental rats is more convenient and effective method to make a desirable *P. carinii* animal model and to observe morphologic characteristics of *P. carinii* pneumonia in rats.

Key Words : Animal model, Morphologic characteristics, *Pneumocystis carinii*

서 론

폐포자충(*P. carinii*)은 후천성 면역결핍증 환자와 장기이식 후 면역억제 치료를 받는 환자, 백혈병 및 악성종양의 말기환자 등에서 폐 합병증을 일으키는 원인균으로 알려져 있다[1-6]. 따라서 면역억제 상태에서 호발하는 폐포자충 폐렴의 발생원인과 기전에 대해서 임상 및 기초의학적 연구가 활발히 진행되어 왔다[1,2,4,5]. 폐포자충은 배양배지에서 잘 자라지 못하여 병원체의 성상과 발병기전을 연구하는데 필요한 실험재료를 얻기가 쉽지 않다[7]. 그러나 폐포자충 폐렴 환자에서 얻은 폐조직 소견이 실험동물에서 야기시킨 폐포자충 폐렴의 소견과 거의 일치하므로 폐포자충의 실험적 동물모델을 만들어서 병리조직학적 연구를 비롯하여 발병기전에 관한 각종 연구에 이용하고 있다.

폐포자충 폐렴의 실험모델에서 폐포자충을 확인하는 방법으로는 객담 검사, 경기관지 폐생검, 기관지폐포세척검사 등을 해서 가검물을 채취하여 H&E, Gomori methenamine silver(GMS), Diff-Quik염색 및 면역조직화학염색을 실시하여 폐포자충의 낭포(cysts)와 영양형(trophozoites)을 관찰한다[8-11]. 폐포자충 폐렴의 임상적 연구와 병리조직학적 검색에 관련된 연구는 문헌에 다소 보고된 바 있다[1-11]. 그러나 폐포자충 폐렴의 실험적 모델 제작방법에 대한 보고는 매우 드물다.

이 연구에서는 Sprague-Dawley종 흰쥐에 저단백식을 장기간 투여하면서 스테로이드를 투여하여 흰쥐의 면역상태를 억제시켜서 폐포자충 실험모델을 만들었다. 또한 기관내에 *P. carinii*를 추가로 투여하기도 하였다. 폐조직과 기관지 폐포세척액을 채취하여 H&E, GMS, Diff-Quik염색 및 전자현미경 검사를 하였다. 광학현미경과 전자현미경으로 폐포자충의 형태를 관찰하고, 폐포자충 폐렴의 가장 적절한 실험모델의 제작방법을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

체중 200-350 g의 Sprague-Dawley종 흰쥐 60마리를 폐포자충 폐렴 실험모델의 재료로 사용하였다.

2) 실험동물의 체중 측정

실험 시작 때에 미리 무게를 알고 있는 우리에 흰쥐를 넣은 후 접시저울을 사용하여 각 실험군 흰쥐의 체중을 측정하였다. 이후 매주 한번씩 흰쥐의 체중을 측정하였다. 실험 조건에 따른 체중 변화의 정도를 비교할 수 있도록 실험 시작 직전에 측정한 각 실험군의 평균 몸무게에 대한 백분율로 체중의 변동치를 나타내었다.

3) 폐포자충 폐렴 모델제작

일차 실험에서 사용한 흰쥐 30마리 중 15마리에는 마시는 물 1리터 당 덱사메타손(dexamethasone) 2 mg을 투여하였고(Group A), 나머지 15마리에는 덱사메타손 1 mg을 매일 복강내에 주사하였다(Group B). 이차 실험의 15마리에는 일차 실험에서 얻은 기관지폐포세척액을 재료로 Diff-Quik염색 상에서 폐포자충의 존재를 확인한 흰쥐의 분쇄한 액을 0.5 mL씩 기관 내에 주입하였다. 그리고 Group A와 같이 물 1L 당 덱사메타손 2 mg을 혼합한 용액을 경구투여 하였다(Group D). 나머지 15마리는 일차 실험에서 결과가 불량했던 Group B에 대해서 덱사메타손 1 mg를 격일로 복강내 투여하는 방법으로 재 실험을 하였다(Group C) (Table 1).

4) 실험동물 식이

흰쥐의 면역 상태를 약화시키기 위해서 모든 실험군에서 8% 저단백식을 제공하였다. 세균 및 진균 감염을 방지하기 위해서 테트라사이클린(tetracycline) 0.75 g과 니스타틴(nystatin)

Table 1. Comparison of administered conditions in the experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia

Conditions	Experimental group			
	A	B	C	D
Intratracheal injection of <i>P. carinii</i>	ND	ND	ND	D
Administration of dexamethasone	Oral (ED) 2 mg/L	IP (ED) 1 mg	IP (EOD) 1 mg	Oral (ED) 2 mg/L

A: no intratracheal injection of *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) but oral administration of dexamethasone every day; B: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every day; C: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every other day; D: intratracheal injection of *P. carinii* and oral administration of 2 mg/L dexamethasone every day; ED: every day; EOD: every other day; D: done; ND: not done.

200,000 단위를 마시는 물 1 L에 혼합하여 각각 투여하였다. 8% 저단백식은 분말 사료에 옥수수 전분을 1:1로 혼합하여 단백질 함량을 줄였다 (Table 2).

2. 폐포자충 확인 및 관찰

이 실험에서는 텍사메타손과 8% 저단백식을 투여한 후 4주가 경과하여 사망한 흰쥐에 대해서 부검을 실시하였다. 폐장 조직을 적출하여 광학현

미경 관찰을 위한 표본을 얻었으며, 실험 시작 후 6주가 경과하여 살아 있는 흰쥐들에서는 기관지 폐포세척액을 얻거나 희생시켜서 광학현미경과 전자현미경 관찰을 위한 폐조직을 채취하였다.

1) 기관지폐포세척액 및 폐조직 채취

흰쥐를 페노바르비탈(phenobarbital)로 마취 하고 흉부를 여는 즉시 혈액응고 방지제인 헤파린을 좌심실에 주사하였다. 하대정맥에 카테터(18 G, polyethylene tube)를 삽입한 후 하행대동

Table 2. Chemical components of powdered food for the experimental rats

Components	Content (%)
Protein	14.5
Fat	2.5
Fiber	6.0
Mineral	14.5
Calcium	3.0
Phosphate	0.3
Methionine + cysteine	0.5
Carbohydrate	58.7
Total	100

맥을 자른 뒤 생리식염수를 카테터에 관류하여 폐장 내의 혈액을 제거하였다. 실험 흰쥐 중에서 폐포자충이 있을 것으로 예상되는 흰쥐를 선택해서 기관을 통하여 생리식염수 약 5 mL를 주입한 후 흡입시켜서 얻은 기관지폐포세척액을 원심분리를 하여 GMS 및 Diff-Quik 염색을 하였다. 0.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)와 0.5% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 혼합한 고정액으로 카테터를 통해서 폐장을 관류하여 폐조직을 고정한 후 광학현미경 및 전자현미경용 폐조직을 채취하였다.

2) 광학현미경 관찰

적출한 폐조직을 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후 계열 에탄올로 탈수하였다. 파라핀 침투와 포매 과정을 거쳐서 파라핀 조직 블록을 만들었으며, 4 μ m 두께로 세절하여 H&E 및 GMS 염색을 실시하였다.

3) 투과전자현미경 관찰

채취한 폐조직을 2.5% 글루타르알데히드 용액을 사용하여 0-4°C에서 전고정시킨 후 0.1 M 인산염 완충용액으로 세척하였다. 그 후 1% OsO₄ 용액으로 2시간 후 고정을 실시하였고, 다시 인산염 완충용액으로 세척하고 계열 에탄올로 탈수하였다. Propylene oxide로 치환한 다음, Luft 방법[12]에 의한 epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 방치하여 열 중합을 시켰다. 그 후 조직을 1 μ m 두께로 박절편을 만들어 toluidine blue로 염색하여 광학현미경상에서 관찰 부위를 결정하였다. Sorvall MT5000형 초박절기에서 40-60 nm의 회백색의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어 grid에 부착하여 Watson[13]과 Reynolds[14] 방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 실시하여 투과전자현미경(H-7100, Hitachi사, 일본)으로 관찰하였다.

4) 주사전자현미경 관찰

폐조직을 1×1×4 mm 정도로 세절하여 0.5% 글루타르알데히드와 0.5% 파라포름알데히드의 혼합 고정액으로 1일간 더 고정시켰다. 이후 1% OsO₄ 용액으로 2시간 후고정시키고, 0.1 M 인산염 완충용액으로 세척한 후 25% dimethyl sulfoxide(DMSO)에 30분, 50% DMSO에 30분간 작용시킨 후 액체질소로 동결 후 조직을 할단하였다. 폐조직을 50% DMSO에 녹여서 수세 후 2% tannic acid에 침투시킨 다음 1% OsO₄ 용액으로 전도염색을 한 후 계열 에탄올로 탈수하고, isoamyl acetate로 반응시켰다. 임계점 건조를 실시하고, 이온 증착기(IB-3, Eiko사, 일본)를 사용하여 Pt-Pb로 증착한 후 주사전자현미경(S-4200, Hitachi사, 일본)으로 관찰하였다.

5) 병리조직학적 평가

실험군 60마리 중 30마리에서 폐조직을 채취하여 슬라이드를 제작하였으며, 폐포자충의 폐장 감염 유무와 기타 병리 소견을 광학현미경상에서 관찰하였다. 폐조직에서 분명한 세균집락이 관찰되고, 호중구의 수가 증가한 경우는 세균감염으로 판독하였다. H&E 염색 상에서 응고성 괴사가 관찰되면서 GMS 염색 상에 아스페르길루스(*Aspergillus*)의 균사 구조가 관찰될 때는 아스페르길루스에 의한 진균감염으로 분류하였다. H&E 염색에서 폐포 내에 호산성의 비누거품 같은 무정형의 덩어리 형태를 보이면서 GMS 염색에서 4-6 μ m의 둥근 포낭을 보이는 경우에 폐포자충에 의한 감염으로 분류하였다.

6) 폐포자충의 감염 정도 평가

폐포자충의 감염 정도를 평가하기 위해서 각 실험군을 5 단계로 분류하였다(Table 3). GMS 염색을 실시한 슬라이드를 광학현미경고배율상에서 관찰하였을 때 폐포자충의 병원체를 확인할 수 없었던 것을 음성으로 하였다. 100배 시야에서 폐포자충이 폐실질에 흩어져 관찰되며, 400배 시야에서 폐포자충을 확인할 수 있었던 것을 I 이

라 하였다. 100배 시야에서 폐포벽을 따라 폐포자충의 포낭형이 잘 관찰되며, 400배 시야에서 폐포자충을 확인할 수 있었던 것을 II로 하였다. 100배 시야에서 폐포와 세기관지강에 폐포자충이 군집을 이루며 관찰되고, 400배 시야에서 폐포자충을 확인할 수 있었던 것을 III으로 하였다. 100배 시야에서 폐실질에 부분적이지만 여러개의 폐포강에 걸쳐서 폐포자충의 군집을 관찰할 수 있었고, 400배 시야에서 폐포강 내 폐포자충을 쉽게 확인할 수 있었던 것을 IV로 하였다.

성 적

1. 실험동물의 체중 변화

실험군 흰쥐에 8% 저단백식을 제공하고 일주일 마다 체중을 측정하면서 40일간 경과하였을 때, 육안적으로 실험군의 모든 흰쥐에서 털이 거칠어지고, 빛깔이 누렇게 되면서 윤기가 없어지고 전체적으로 체중이 감소하는 양상을 보였다. 모든 실험군에서 체중이 감소하는 양상을 보였는데, 8% 저단백식으로 사육한 초기에는 체중이 급격히 감소하다가 약 3주 후부터는 체중 감소의 속도가 느려지는 양상을 보였다. 각 실험군에서 처음 측정한 체중 평균치와 비교하여 마지막에 측정한

체중의 백분율은 A군 62%, B군 53%, C군 70% 및 D군 60%였다(Table 3).

2. 실험동물의 생존율 변화

실험동물의 생존기간은 A 및 B군은 44일, C 및 D군은 41일이었다. 7일을 한 단위로 하여 각 실험군 별로 생존율을 구해서 폐포자충이 현미경상에서 분명히 확인되는 40일 경에 서로 비교해본 결과 경구로 덱사메타손을 투여한 실험군에서 복강내에 덱사메타손을 주사한 군과 약간의 차이가 있었다. 전체적으로 볼 때 복강내 주사한 군은 실험시작 2주 경부터 생존율이 감소하였으나, 경구로 투여한 군에서는 3주 경부터 생존율이 감소하였으며 5주 중반까지도 80% 이상의 높은 생존율을 보였다. 한편 실험군의 대부분이 실험 초기에 사망한 B군을 제외하고는 나머지 실험 군에서 28일 내지 40일 사이에 생존율이 크게 감소하는 경향을 볼 수 있었다(Table 4, Fig. 1).

3. 실험동물의 사망 원인 및 부검 소견

실험 기간 중 사망한 흰쥐를 부검하여 폐조직을 광학현미경으로 관찰하였을 때 사망한 흰쥐 모두에서 폐간질에 림프구, 형질세포, 호중구 등의 염증세포 침윤을 보였다. 미세 농양을 포함한 세

Table 3. Percentile change of mean body weight in experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia

Group	Duration (days)					
	1	7	14	21	28	35
A	100	84	69	66	62	
B	100	84	69	58	53	
C	100	87	74	70	70	70
D	100	91	78	72	67	60

A: no intratracheal injection of *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) but oral administration of dexamethasone every day; B: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every day; C: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every other day; D: intratracheal injection of *P. carinii* and oral administration of 2 mg/L dexamethasone every

균감염 소견을 보인 경우는 11마리, 진균 감염을 가진 경우는 4마리였으며 이들은 모두 아스페르길루스의 감염을 보였다. 또한 세균감염, 진균감염 및 폐포자충감염이 모두 합병된 경우가 12마리였으며, 폐포자충의 감염만 보인 경우가 14마리였다.

4. 폐포자충의 감염 정도 평가

4주 이후 사망한 흰쥐를 부검하거나 6주 이상 경과시킨 후 희생시킨 실험 동물 중 평가가 가능하였던 29마리에 대해서 H&E 및 GMS염색을 실시하여 폐포자충의 감염 정도를 평가하였다. 그 결과 A군의 총 7건에서 GMS염색 상 음성이 0건, I 이 3건, II가 2건, III이 2건, IV가 0건이었다. B군에서는 총 3건의 GMS염색 슬라이드 중에서 음성이 0건, I 이 2건, II가 1건, III이 0건, IV가 0건이었다. C군에서는 총 8건의 GMS염색 슬라이드 중에서 음성이 2건, I 이 3건, II가 3건, III이 0건, IV가 0건이었다. D군에서는 총 11건의 GMS염색 슬라이드 중에서 음성이 2건, I 이 5건, II가 2건, III이 1건, IV가 1건인 결과를 얻었다(Table 5, Fig. 2).

5. 폐포자충 폐렴의 육안 소견

폐포자충 폐렴에 이환된 흰쥐 폐장에서 육안 소견상 세균감염으로 인한 경결화 및 농양 등은 보이지 않았다. 폐표면은 매끈하고 부드러우며, 옅은 분홍색을 띠고 있었고 염증성 경화를 보였다.

6. 폐포자충 폐렴의 광학현미경 소견

폐포자충 폐렴을 가지는 폐조직에서 폐포 내에 호산성의 무정형 포말상 물질이 덩어리 형태를 이루면서 관찰되었다(Fig. 3A). 폐포 중격에는 간혹 림프구 및 형질세포를 포함한 단핵구들이 침윤되어 있으며, 이들 염증세포의 침윤 정도는 다양하게 관찰되었다. GMS염색에서는 포낭의 피막이 잘 관찰되었다., 포낭은 둥근 형태, 반월상, 바나나 형태 등 다양한 모양을 보이며, 한 두 개씩 흩어져 관찰되었고, 그 표면에는 피막점을 볼 수 있었다(Fig. 3B).

7. 투과전자현미경 소견

폐포자충의 포낭 및 영양형이 폐포 내에서 서로 모여서 덩어리를 만들거나 개별적으로 산재되

Table 4. Comparison of percentile survival rate in experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia

Group	Duration (day)						
	1	7	14	21	28	35	40
A	100	100	100	93	93	60	40
B	100	100	87	27	13	6	0
C	100	93	73	60	53	53	27
D	100	100	100	100	80	73	47

A: no intratracheal injection of *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) but oral administration of dexamethasone; B: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every day; C: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every other day; D: intratracheal injection of *P. carinii* and oral administration of 2 mg/L dexamethasone every day.

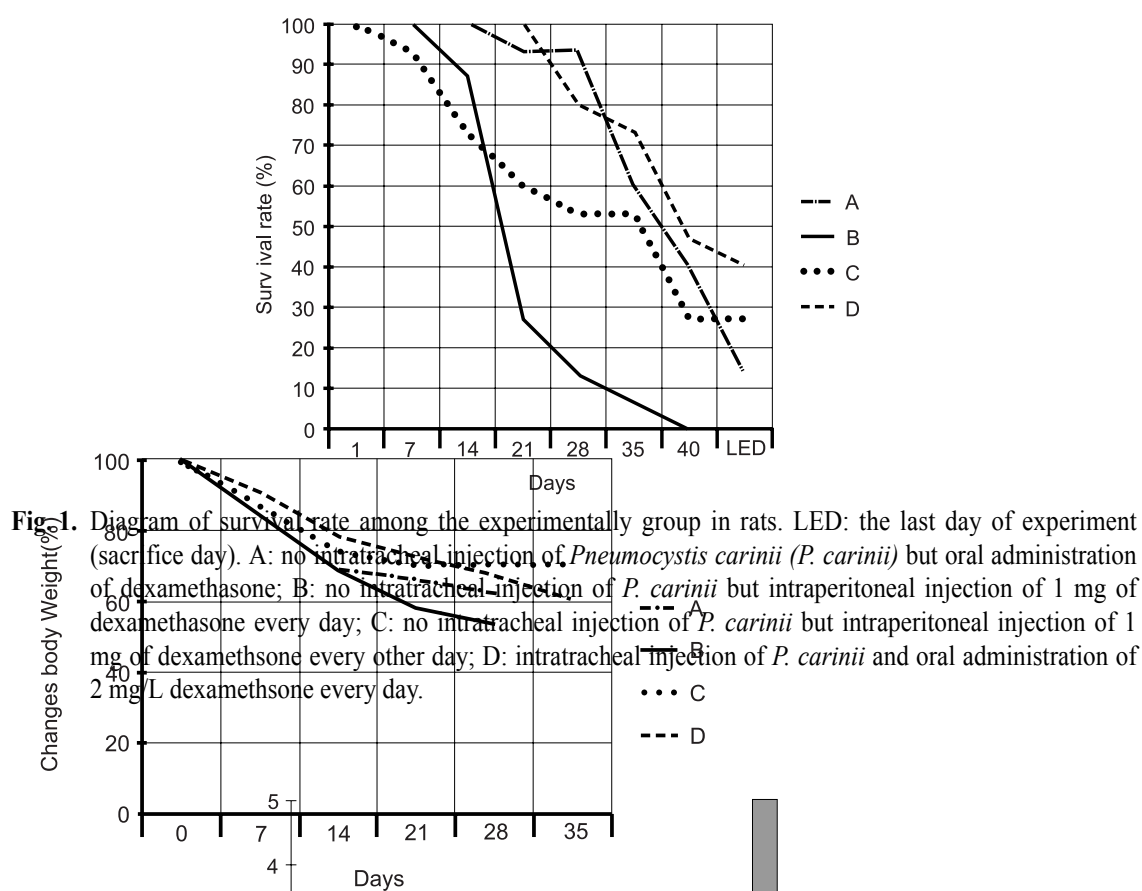


fig. 1. Diagram of the rate of body weight change in the rats experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia. A: no intratracheal injection of *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) but oral administration of dexamethasone; B: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every day; C: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every other day; D: intratracheal injection of *P. carinii* and oral administration of 2 mg/L dexamethasone every day.

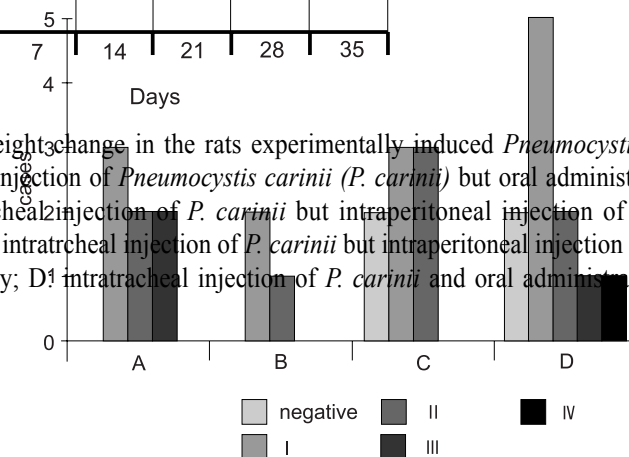


Fig. 2. Comparison of the level of *Pneumocystis carinii* infection among the groups of experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia. A: no intratracheal injection of *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) but oral administration of dexamethasone; B: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every day; C: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every other day; D: intratracheal injection of *P. carinii* and oral administration of 2 mg/L dexamethasone every day; I: scanty on low power field ($\times 100$) and scattered seen the *P. carinii* on high power field; II: *P. carinii* cysts along the alveolar epithelial surface on low power field and well seen on high power field ($\times 400$); III: clusters of *P. carinii* cysts in the alveolar lumen on low power field. and well seen on high power field; IV: many clusters of diffusely filling the several alveolar spaces on the low power field and well seen the *P. carinii* on high power field.

어 관찰되었다. 폐포자충은 주로 I형 폐포상피세포에 부착되어 있었으며, 폐포상피와 부착된 영양형은 다양한 형태를 보였다(Fig. 4A). 포낭은 대부분 둥글거나 타원형을 보였으며, 그 내부에는 2-8개의 포낭내체가 포함되어 있었다(Fig. 4B). 허탈된 포낭은 대부분 반달 모양 혹은 바나나 모양을 보였으며, 내부에는 약간의 세포질이 남아 있었다. 폐포 내에는 섬유질 덩어리, 세포 잔해물 및 막성 표면활성물질이 관찰되었으며, 폐포대식세포는 흔히 폐포자충의 영양형 또는 포낭과 인접하여 있으면서 이들을 포식하였다.

8. 주사전자현미경 소견

폐실질의 폐포 내와 세기관지강 일부에서 모양과 크기가 다양한 영양형이 관찰되었다. 영양형은 표면에 다수의 관상연장을 가지면서 I형 폐포상피세포에 부착함을 볼 수 있었다(Fig. 5A). 포낭은 비교적 둥글고 영양형에 비해 표면이 매끄러웠으며 관상연장의 수가 적었다(Fig. 5B). 이들 포낭

의 주위에는 폐포대식세포가 있었으며 할단면에서 폐포자충 병원체를 포식하였다.

고 찰

1909년 Chagas가 기니픽에서 폐포자충을 처음 관찰한 이후 이 병원체에 관한 연구가 본격적으로 시작되었다. 파스퇴르 연구소에서 폐포자충을 다른 미생물로부터 최초로 분리하였다[7]. 전자현미경이 의생물학 연구에 이용되면서 폐포자충의 생물학적 성상 및 형태에 관한 연구가 활발히 진행되었고, 폐포자충의 생활사에 관련된 연구가 많이 보고되었다[15,16].

폐포자충은 그 생활사의 특징이나 pentamidine, bactrim(trimethoprim-sulfamethoxazole) 등 항생제 치료에 대한 반응이 있음을 볼 때 원충류의 특성을 가지고 있다. 그러나 *P. carinii*의 포낭벽이 진균류 진단에 사용하는 GMS염색에 높은 친화력을 가지고 있고, 분자생물학적 연구에서 폐

Table 5. Evaluation of *Pneumocystis carinii* infection in experimental groups

Group	Criteria					Total
	Negative	I	II	III	IV	
A	0	3	2	2	0	7
B	0	2	1	0	0	3
C	2	3	3	0	0	8
D	2	5	2	1	1	11
Total	4	13	8	3	1	29

A: no intratracheal injection of *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) but oral administration of dexamethasone every day; B: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every day; C: no intratracheal injection of *P. carinii* but intraperitoneal injection of 1 mg of dexamethasone every other day; D: intratracheal injection of *P. carinii* and oral administration of 2 mg/L dexamethasone every day. Negative: no *P. carinii* on high power field ($\times 400$); I: scanty on low power field ($\times 100$) and scattered seen the *P. carinii* on high power field; II: *P. carinii* cysts along the alveolar epithelial surface on low power field, and more well seen the organisms on high power field; III: clusters of *P. carinii* cysts in the alveolar lumen on low power field, and more well seen the organisms on high power field; IV: many clusters of *P. carinii* filling the several alveolar spaces on the low power field, and more well seen the organisms on high power field.

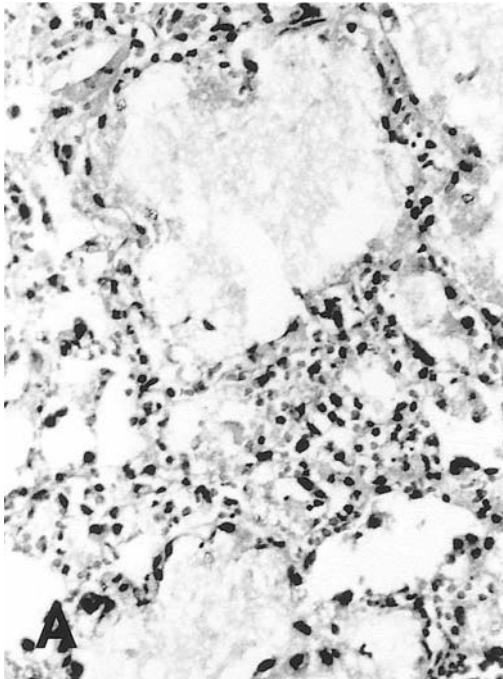


Fig. 3A. Light micrograph of the experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats shows foamy exudate including alveolar macrophages in the alveolar spaces (H&E x 200).

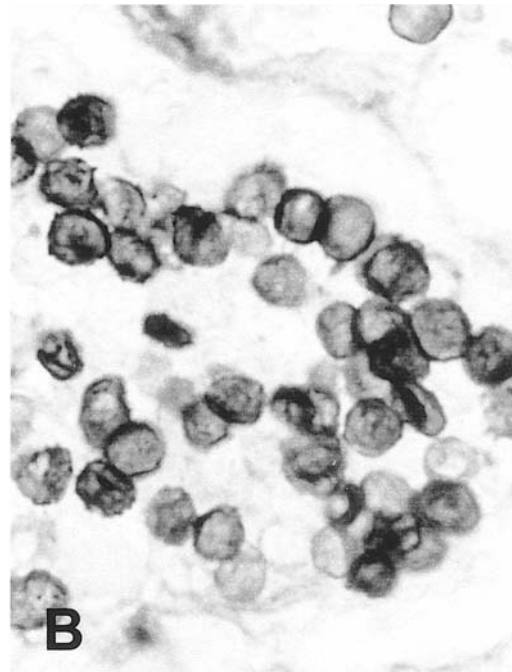


Fig. 3B. Gomori's methenamine silver stain shows round to oval cysts with occasional intracystic dots (x 400).

포자충의 16S ribosomal RNA가 진균류와 비슷한 유전자 배열을 보이는 점 등으로 폐포자충을 진균류로 분류하는 보고가 많아졌다[17,18].

임상적으로 폐포자충은 1942년 유아와 성인의 폐장 조직에서 처음으로 관찰되었고, 1950년대 중반에 미국에서 면역력이 억제된 소아와 성인에서 미만성 폐포손상을 보이는 폐포자충 폐렴이 많이 보고되었다[19]. 그 후 폐포자충에 대한 다방면의 연구가 있었으나, 배양배지에서 폐포자충이 잘 자라지 못하는 점 때문에 이 병원체에 대한 연구수행이 어려웠다[7]. 다행히도 폐포자충 폐렴 환자에서 얻은 폐조직 소견은 실험동물에서 야기시킨 폐포자충 폐렴의 소견과 거의 일치한다. 따라서 폐포자충 폐렴에 관한 각종 연구재료로서 폐포자충의 실험 모델을 만들어 사용하고 있다[15,21]. 그러나 폐포자충의 실험모델 제작에 관

한 구체적인 기술이 문헌상에 별로 보고되어있지 않으며, 실험실에 따라 폐포자충 폐렴의 실험모델을 만드는 방법이 모두 상이하어, 최적의 실험모델을 얻기 위한 연구가 필요하여 이 실험을 수행하였다.

폐포자충 폐렴은 주로 면역저하 상태에서 초래되며[19,22], 후천성 면역결핍증의 증례가 많이 보고되기 이전에는 주로 백혈병을 가진 어린이나 암 환자 또는 장기 이식술을 받은 성인에서 폐 합병증으로 가끔 볼 수 있는 질환으로 알려져 왔다[7]. 따라서 이 실험에서는 폐포자충 폐렴이 면역력이 약한 환자에서 일어난다는 점을 근거로 하여 실험 동물에 면역 억제 상태를 만들기 위해 8% 저단백식과 덱사메타손을 투여하고, 이 때 흔히 동반되는 세균 및 진균감염을 억제하기 위해 테트라사이클린 및 니스타틴을 매일 마시는 물에 혼합

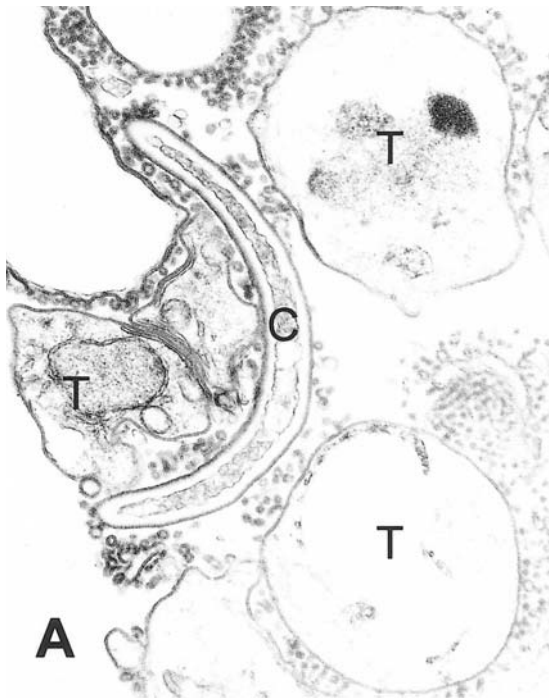


Fig. 4A. Transmission electron micrograph shows trophozoites (T) and a collapsed cyst (C) of *Pneumocystis carinii* (x 12,000).

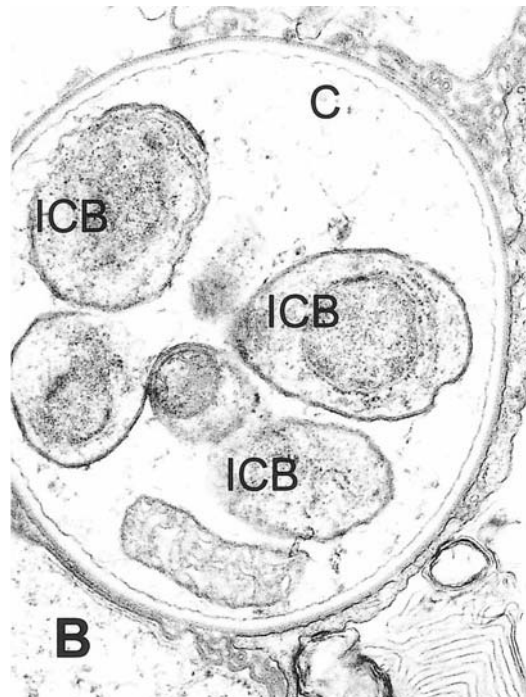


Fig. 4B. Transmission electron micrograph shows a round cyst (C) including several intracystic bodies (ICB) (x 28,900).

하여 주는 방법을 택하였다.

이 실험에서 8% 저단백식과 텍사메타손을 투여한 흰쥐들은 시간이 지날수록 털의 윤기가 없어지고 빛깔이 누렇게 바래며 체중이 점차로 감소하는 양상을 보였다. 서로 비교하기 좋도록 매주마다 측정된 각 군의 체중 평균치를 처음 측정한 체중에 대한 퍼센트로 나타내어 비교하였을 때, B군에서 가장 체중감소가 심하였고, A, D, C군 순으로 체중 감소가 덜 하였다. 체중의 감소율은 텍사메타손 투여방법과 8% 저단백식에 의해 영향을 받을 수 있는데, 8% 저단백식은 모든 실험군에서 동일 조건이므로, 체중 저하 정도는 텍사메타손의 투여방법에 따라서 차이가 날 것으로 생각되었다. 이 실험에서는 경구 투여법과 복강내 주사법을 선택하여 흰쥐에서 텍사메타손을 투여하면서 체중변화를 측정하였다. B군에서 체중 감소가 가장 심하였던 이유로서는 텍사메타손을 복

강내에 주사함으로써 경구 투여에 비해서 텍사메타손이 정확히 투여되어 흰쥐의 체중 감소를 심화시켰을 것으로 생각된다. 또한 B군에서는 실험시작 후 40일 이전에 모든 흰쥐가 사망하여, C군의 실험을 다시 하였고 B군을 결과 비교에서 제외시켰다. 이 실험에서는 경구 투여한 A 및 D군이 주사한 C군보다 체중이 더 많이 저하되는 결과를 얻었다. 폐포자충의 감염정도를 비교해 보았을 때 D, A, C군의 순으로 폐포자충의 병원체가 많이 발견되어 텍사메타손을 경구 투여한 군(A, D군)에서 텍사메타손을 복강내 주사한 군(C군)보다 폐포자충 병원체 발견율이 더욱 높음을 보였다.

폐포자충은 건강한 상태에서는 감염을 잘 일으키지 않고, 보통 잠재감염 상태로 있다가 숙주 면역능력이 저하되면 폐렴을 일으킬 수 있다. 통상적으로 폐포자충 폐렴의 실험모델을 만드는 데는 6주 이상의 면역저하 기간이 필요하다. 이 실험

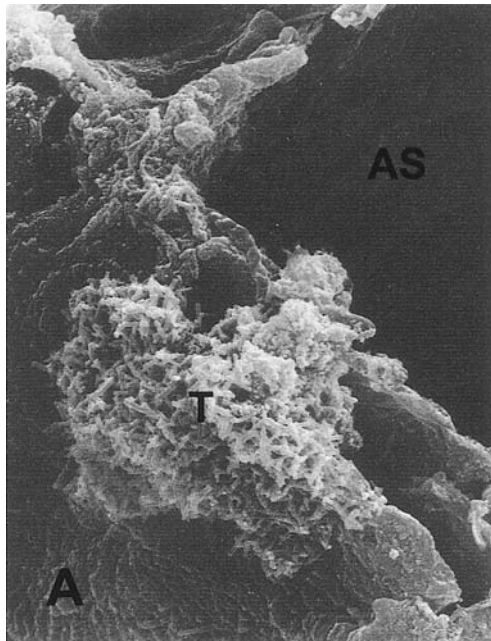


Fig. 5A. Scanning electron micrograph shows a trophozoite (T) which attached to the alveolar wall. The trophozoite shows nodular central portion and peripherally irregular shaped tubular expansions. AS: alveolar space (x 6,900).

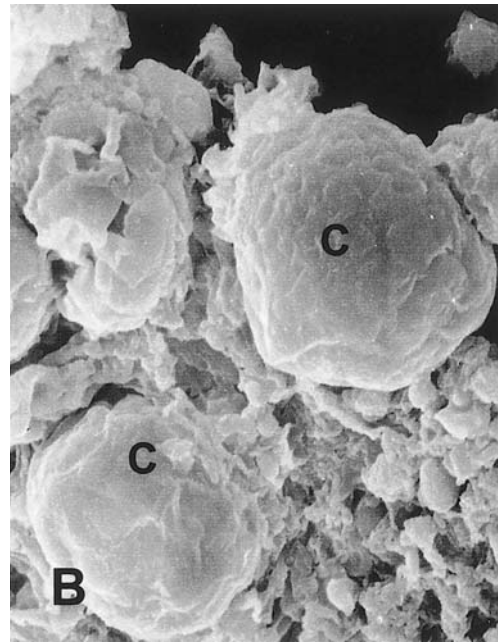


Fig. 5B. Scanning electron micrograph shows two round shaped cysts (C) (x 8,200).

험에서는 40일 경에 쥐의 생존율은 D, A, C군 순이었으며, 폐포자충 발견율은 D, A, C군 순이었던 것으로 보아서 오래 생존한 흰쥐에서 폐포자충 발견율이 증가함을 알 수 있었다. 그러므로 폐포자충 폐렴의 좋은 흰쥐모델을 얻기 위해서는 면역저하된 상태에서 적어도 40일 이상 생존시키는 것이 중요함을 알 수 있다. 따라서 복강 내 덱사메타손을 주사한 군에서는 경구 투여한 군에 비해서 생존율이 낮아서 폐포자충 병원체의 발견율이 낮았다고 생각한다. 이 실험에서 생존율이 28일에서 40일 사이에서 가장 낮음을 알 수 있는데, 이 기간에 흰쥐를 집중적으로 관리해 주면 생존율을 더욱 높일 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 흰쥐의 생존율에 영향을 미치는 감염을 억제하기 위해서 실험기간동안 테트라사이클린과 니스타틴을 증량시켜 주는 것이 좋을 것으로 생각한다.

이 연구에서 폐포자충의 실험모델을 평가하기

위해서 GMS염색을 한 슬라이드를 사용하여 폐포자충의 감염 정도에 따라 5개의 군으로 분류하였다(Table 3). 그 중 폐포자충을 관찰하지 못한 경우나 적은 수의 폐포자충을 관찰한 I을 제외하고, II에서 IV까지를 폐포자충의 적절한 실험모델로 보았다. 그리고 A군에서 D군 중 어느 군이 가장 적절한 폐포자충 모델인지를 평가하여 보았다. 그 결과 29건의 GMS염색 슬라이드 중에서 I이 13건(45%)을 차지하였고, II에서 IV는 12건(41%)였다. 각 실험군에 따른 적절한 폐포자충 모델의 수는 A군에서 4마리, B군에서 1마리, C군에서 3마리, D군에서 4마리로 B, C군 보다 A군 및 D군에서 더욱 용이하게 폐포자충을 얻을 수 있음을 알 수 있었다. D군은 폐포자충 폐렴에 걸린 흰쥐의 폐장을 갈아서 기관 내로 주입하였던 실험군임에도 불구하고 단순히 덱사메타손을 경구 투여한 A군과 비슷한 결과를 보였던 것으로

보아 D군의 실험은 방법 상에서 다소 보완할 점이 있다고 생각된다. B군은 복강내 주사로 인한 스트레스와 함께 덱사메타손 용량이 높았을 가능성이 있다. C군과 A군을 비교해보면 C군 3마리와 A군 4마리로 비슷한 결과를 보였으나, 폐포자충의 적절한 실험모델을 만들기 위해서 덱사메타손을 경구 투여할 경우에는 덱사메타손의 용량을 복강내 주사하는 양보다 다소 높일 때 더욱 좋은 결과를 얻을 것으로 생각되었다.

이 실험에서 덱사메타손을 경구 투여와 복강내 주사를 실시하였을 때 경구 투여법이 복강내 주사보다 쥐의 생존기간이 길었으며 폐포자충의 발견율을 높일 수 있었다. 폐포자충의 감염을 가진 폐조직 추출물을 기관 내로 투입하고 경구로 덱사메타손을 투여한 실험군과 덱사메타손만을 경구투여한 군에서 비슷한 생존기간과 폐포자충 발견율을 보여서, 폐포자충 폐렴 모델을 만드는 데에는 단순히 덱사메타손 경구투여와 8% 저단백식 투여만으로도 충분하다는 것을 알게 되었다. 따라서 실험동물들에게 면역억제 상태를 만들어서 체내에 잠복해 있는 폐포자충을 재활성화시켜 줌으로써 적절한 실험모델이 만들어 질 수 있음을 입증하였다. 또한 실험군의 제조건에 관계없이 세균감염과 진균감염이 흔하게 동반됨으로 보아 세균 및 진균에 의한 합병증을 줄이기 위해서는 테트라사이클린과 니스타틴을 보다 증량하는 것이 필요할 것으로 생각하였다. 그리고 실험 시작 후 28일에서 40일 사이에 흰쥐의 치사율이 높았으므로 이 기간동안 실험 동물에 대한 세심한 관리가 요구됨을 알았다.

이 연구 결과를 종합하면, 경구로 덱사메타손과 8% 저단백식을 투여하는 동시에 테트라사이클린과 니스타틴을 흰쥐에 투여할 때 보다 적절한 폐포자충 폐렴의 실험적 모델을 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 실험에서 얻은 폐포자충 폐렴 조직을 사용하여 광학 및 전자현미경 관찰을 함으로써 폐포자충 감염의 진단과 함께 이 병원체의 형태 및 생물학적 특성과 생활 주기 등을 알 수 있으며, 폐포자충 폐렴의 발병기전을 규명하는

연구에 중요한 정보를 줄 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

폐포자충 폐렴의 적절한 실험 모델을 만들기 위하여 Sprague-Dawley 종 흰쥐에 경구 및 복강내 주사로 덱사메타손을 투여하였고, 8% 저단백식을 경구 투여하였다. 일부 실험군에서는 흰쥐의 기관내에 직접 폐포자충 폐렴을 가진 폐장 추출액을 주입하고 덱사메타손을 투여하였다.

덱사메타손의 경구 투여법이 복강내 주사보다 쥐의 생존기간을 늘이고 폐포자충의 검출율을 높일 수 있었다. 폐포자충 감염의 폐장 추출물을 흰쥐의 기관 내로 주입한 후 덱사메타손을 투여한 실험군과 덱사메타손만을 투여한 실험군에서 비슷한 생존기간과 폐포자충의 검출율을 보였다. 따라서 저단백식과 함께 덱사메타손을 투여하는 것만으로도 쥐에게 면역 저하를 야기시켜서 이미 잠복해 있는 폐포자충을 재활성화 시켜서 폐포자충 폐렴 모델을 만들 수 있었다. 또한 모든 실험군에서 세균감염과 진균감염이 동반되었으므로 더욱 좋은 폐포자충 실험모델을 얻기 위해서는 테트라사이클린과 니스타틴의 용량을 높이는 것이 필요할 것으로 생각된다. 그리고 실험 시작 후 28일에서 40일 사이에 치사율이 높았으므로 이 기간동안 흰쥐에 대한 세심한 관리가 필요하였다.

이상의 결과를 통해서, 경구로 덱사메타손과 8% 저단백식을 투여하는 동시에 테트라사이클린과 니스타틴을 쥐에 투여할 때 적절한 폐포자충 폐렴 모델을 얻을 수 있었다. 이 연구는 동물 실험 모델을 통해서 얻은 폐포자충 폐렴의 진단과 이 병원체의 형태학적 특성과 생물학적 특성 등을 이해하고 관련된 향후 연구를 위한 중요한 정보를 줄 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 권건영, 윤철희, 김상표, 박관규, 장은숙. *Pneumocystis carinii* 폐렴의 기관지 폐포 세정액: 세포학적 및 전자 현미경적 소견. *대한세포병리학회지* 1994;5:1-9.
2. Rifkind D, Faris TD, Hill RB. *Pneumocystis carinii* pneumonia: studies on the diagnosis and treatment. *Ann intern Med* 1996;65:943-56.
3. Dutz W. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Pathol Annu* 1970;5:309-41.
4. Dutz W. *Pneumocystis carinii* infection and interstitial plasma cell pneumonia: what dose history teach? *Semin Diagn Pathol* 1989;6:195-202.
5. Gal AA, Koss MN, Strigle S, Angritt CP. *Pneumocystis carinii* infection in the acquired immune deficiency syndrome. *Semin Diagn Pathol* 1989;6:287-99.
6. Murray JF, Garay SM, Hopewell PC, Mills J, Snider GL, Stover DE. Pulmonary complications of the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:504-9.
7. Fraser RS. Protozoal and Helminthic pulmonary infection. In: Thurlbeck WM, Churg AM, editors. *Pathology of the Lung*. 2nd ed. New York: Thieme;1995.p.333-8.
8. Pintozzi RL. Technical methods. Modified Grocott's methenamine silver nitrogen method for quick staining of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Pathol* 1978;31:803-5.
9. Musto L, Flanagan M, Elbadawi A. Ten-minute silver stain for *Pneumocystis carinii* and fungi in tissue sections. *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:292-4.
10. Pintozzi RL, Blecka LJ, Nanos S. The morphologic identification of *Pneumocystis carinii*. *Acta Cytol* 1979;23:35-9.
11. Blumenfeld W, McLeod GJ. *Pneumocystis carinii* in sputum. Comparable efficacy of screening stains and determination of cyst density. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:816-20.
12. Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;9:409-14.
13. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 1958;25:4:475-8.
14. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208-12.
15. 권건영, 조승제, 김상표, 박관규, 장은숙. 면역 전자현미경 검색에 의한 뉴유모시스티스 카리니 표면 항원 물질의 발현. *대한병리학회지* 1998;32:393-403.
16. 주종운, 정명숙 편저. *기생충학 개론*. 대영문화사; 1997,p.85-8.
17. O'Leary TJ, Tsai MM, Wright CF, Cushion MT. Use of semiquantitative PCR to assess onset and treatment of *Pneumocystis carinii* infection in rat model. *J Clin Microbiol* 1995;33:718-24.
18. Limper AH. Parasitic adherence and host responses in the development of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Semin Respir infect* 1991;6:19-26.
19. Armengol CE. A historical review of *Pneumocystis carinii*. *JAMA* 1995;273:747,750-1.
20. Powles MA, McFadden DC, Pittarelli LA, Schmatz DM. Mouse model for *Pneumocystis carinii* pneumonia that uses natural transmission to initiate infection. *Infect Immun* 1992;60:1397-400.
21. Millard PR, Wacefield AE, Hopkins JM. A sequential ultrastructural study of rat lungs infected with *Pneumocystis carinii* to investigate the appearances of the organism, its relationships and its effects on pneumocytes. *Int J Exp Pathol* 1990; 71:895-904.
22. Radding JA, Armstrong MYK, Ullu E, Richards FF. Identification and isolation of a major cell surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1989;57:2149-57.