

면역전자현미경 검색에 의한 뉴우모시스티스 카리니 표면 항원 물질의 발현

계명대학교 의과대학 병리학교실 및 의과학연구소

권건영 · 조승제 · 김상표 · 박관규 · 장은숙

Expression of Antigenic Surface Molecules of *Pneumocystis Carinii* by Immunoelectron Microscopic Examination

Kun Young Kwon, Seung Che Cho, Sang Pyo Kim
Kwan Kyu Park, and Eun Sook Chang

Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine and Institute
for Medical Science, Taegu 700-712, Korea

This study was carried out to investigate the morphologic characteristics and localization of antigenic molecules of *Pneumocystis carinii* in experimentally induced *P. carinii* pneumonia in rats. After six weeks of administration of low protein diet and dexamethasone, Sprague-Dawley rats were sacrificed to submit lungs or bronchoalveolar lavage for the study. Monoclonal (092, 900, 902, and 904) and polyclonal (SP-D) antibodies were used for immunohistochemistry and immunoelectron microscopy (ITEM and ISEM). Immunohistochemically *P. carinii* organisms were well identified as clusters or separated forms in the alveolar spaces being frequently attached to the alveolar walls. Immunoelectron microscopically the adherences of gold particles were observed on the surface of all stages of the *P. carinii*. Occasionally positive immunogold labeling was observed in the cytoplasm of the trophozoites and on the pellicle of the intracystic bodies within the cysts. The monoclonal antibodies 092, 900, 902, and 904 reacted mainly with pellicles of *P. carinii*, whereas SP-D labeled on the pellicles, intracystic bodies, cytoplasm of the alveolar macrophages, and free floated surfactant material in the alveolar spaces. The immunogold particles were observed more diffusely and intensely in the cysts than in the trophozoites. These results indicate that antigen is mainly localized on the pellicles, and accumulated during development from the trophozoite to the cyst stages. (Korean J Pathol 1998; 32: 393~403)

Key Words: *Pneumocystis carinii*, Electron microscopy, Immunohistochemistry, Immunoelectron microscopy

서 론

Pneumocystis carinii (*P. carinii*) 폐렴은 주로 면역저하 상태에서 초래되며 후천성 면역결핍증후군 (AIDS)의 증례가 많이 보고되기 이전에는 주로 백혈병을 가진 어

린이들이나 암 환자 또는 장기이식술을 받은 성인에서 폐 합병증으로 가끔 볼 수 있는 질환으로 알려져 왔다.^{1~4} 1981년 이후 AIDS 환자가 자주 보고되면서 약 80%의 환자에서 *P. carinii* 폐렴이 동반되거나 합병증으로 초래됨이 밝혀졌다.^{4,5} 최근 AIDS에 대한 경각심이 더욱 높아지면서 AIDS의 중요한 합병증인 *P. carinii* 폐렴에 대한 관심도 높아지고 이에 관한 연구가 활기를 띠고 있다.^{5~8}

P. carinii 폐렴은 그 다양한 선행질환이 있음에도 불구하고 형태학적으로는 유사한 소견을 볼 수 있는데, 중요한 병리조직학적 소견으로는 폐실질 내에 미만성

접 수: 1998년 1월 30일, 게재승인: 1998년 3월 23일
주 소: 대구광역시 중구 동산동 194, 우편번호 700-712
계명대학교 의과대학 병리학교실, 권건영

ISSN : 0379-1149

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(과제번호 038)에 의해 연구되었음.

폐포 손상을 보이며 폐포 내에는 포말성 삼출액이 차여 있고 여기에 *P. carinii*가 덩어리 혹은 산재되어 관찰되며 Gomori methenamine silver (GMS) 염색이나 면역조직화학적 염색을 실시할 경우 더욱 용이하게 *P. carinii*를 관찰할 수 있다.^{2,5}

*P. carinii*는 흔히 폐포 상피세포 특히 I형 폐포상피세포에 부착하여 폐조직의 손상과 폐렴을 야기시키며,^{9,10} *P. carinii*가 폐포상피세포에 부착되는 과정에서는 *P. carinii* 표면에 존재하는 당단백, mannose 수용체, fibronectin, vitronectin 및 *P. carinii* 세포질 내에 존재하는 세포골격이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹⁴

P. carinii 폐렴에 관한 연구는 종래의 통상적인 광학 및 전자현미경적 연구와 함께 분자생물학적 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹⁵⁻¹⁷ 또한 여러 가지의 단클론 항체를 사용하여 면역조직화학적 방법을 실시함으로써 *P. carinii* 군체에 존재하는 항원성 단백질을 광학 및 전자현미경을 사용하여 관찰함으로써 *P. carinii*의 항원성 단백질이 존재하는 위치를 정확히 알아내어 폐포 상피세포에 손상을 야기시키는 기전을 밝히는 연구가 이루어지고 있다.¹⁸⁻²¹ 한편 *P. carinii*의 배양에는 어려움이 많으나, *P. carinii* 폐렴 환자에서 얻은 폐조직 소견이 실험동물에서 야기시킨 *P. carinii* 폐렴의 소견과 거의 일치하므로 *P. carinii* 폐렴에 관한 각종 연구재료로써 일반적으로 *P. carinii*의 실험적 모델을 만들어 사용하고 있다.²²⁻²⁴

저자는 상기한 문헌적 지견을 기초로 하여 흰쥐에서 *P. carinii* 폐렴을 만든 후 폐장조직의 형태학적 변화를 광학 및 전자현미경으로 관찰하고, 이어서 *P. carinii*의 항원성 물질을 형태학적으로 검출하고 나아가 그 위치를 알아내기 위해 단클론 및 다클론 항체를 사용하여 면역전자현미경적 검색을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 200~250 g되는 Sprague-Dawley종 흰쥐 105마리를 사용하여 대조군 및 실험군의 재료로 사용하였다.

1) **대조군:** 정상식을 제공하고 아무런 처치를 하지 않는 군 (5마리)

2) **실험군:** 텍사메타손 (2 mg/liter)을 물에 혼합하여 투여하고 저단백식 (8%)을 투여하면서 6~8주 경과한 군 (100마리). 이들 중 기관지폐포 세척검사 (bronchoalveolar lavage)나 조직 검색에서 *P. carinii* 폐렴으로 확인된 20마리를 선택하여 실험군의 관찰 방법에 따라 다음과 같이 세분하였다.

I 군: 폐장조직을 적출한 후 광학, 투과 및 주사전자현미경으로 관찰한 군

II 군: 폐장조직에 대한 단클론 및 다클론 항체를 사용하여 면역조직화학적 관찰과 면역 투과전자현미경적 관찰을 실시한 군

III 군: 기관지폐포 세척검사 (bronchoalveolar lavage)를 하여 얻은 시료로 Papanicolaou 및 Diff-Quik 염색을 하고 면역조직화학적 검사, 투과전자현미경 및 주사전자현미경적 관찰을 실시한 군

IV 군: 기관지폐포 세척액으로 단클론 및 다클론 항체를 사용하여 면역투과전자현미경 및 면역주사전자현미경적 관찰을 실시한 군

2. 단클론 및 다클론 항체

P. carinii 군막을 구성하는 항원성 단백질에 대한 단클론 항체로서 092 (MAB 092, Biodesign INC, USA), 900, 902 및 904 (MAB 900, MAB 902, MAB 904: Chemicon INC, USA)를 사용하였고 다클론 항체로는 Surfactant-D (SP-D, Thoracic Research Laboratory, Mayo Foundation, USA)를 사용하였다.

3. 실험방법

1) ***P. carinii* 폐렴의 실험적 모델:** Sprague-Dawley종 흰쥐 100마리에 매일 텍사메타손과 저단백식을 제공하여 6~8주간 지속하였다. 이들 중 몸무게가 현저히 감소하고 육안적으로 여위며 병색이 뚜렷하다고 판단되는 흰쥐부터 도살하여 기관지폐포 세척액을 채취하여 Diff-Quik 및 GMS 염색을 하거나, 채취한 폐조직을 H&E 및 GMS 염색을 하여 *P. carinii*가 다수 확인되는 흰쥐를 실험군 재료로 사용하였다. 실험 도중 세균 감염을 방지하기 위하여 테트라사이클린 (500 mg/liter)을 투여하였고, 진균 감염을 방지하기 위해 니스타틴 (200,000 U/liter)을 병용 투여하였다. *P. carinii* 폐렴의 실험적 모델을 만드는 과정에서 65마리는 도중에 사망하여 실험 재료에서 제외하였다. 15마리는 도살하여 실시한 조직 검색에서 비특이적인 감염을 보일 뿐 *P. carinii*의 확인이 어려워 제외하였고 나머지 20마리에서 기관지폐포 세척액 혹은 광학현미경 검색에서 *P. carinii*에 의한 폐렴이 확인되었다.

2) **광학현미경적 관찰:** 적출한 폐장조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 계열에탄올로 탈수한 후 파라핀 침투과정과 파라핀 포매를 거쳐서 4 μ m의 박절편을 만들어 H&E와 GMS염색을 실시하였다.

3) **투과전자현미경적 관찰:** 투과전자현미경용으로 제공된 폐장조직을 1 mm³ 크기로 세절하여 폐포내 공기를 탈기방법으로 제거한 후 2.5% glutaraldehyde 용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1 M 인산염 완충용액으로 세척한 후 1% OsO₄ 용액에서 2시간 후고정을 실시하고 같은 완충용액으로 세척한 후 계열에탄올로 탈수를 하였다. Propylene oxide로 치환한 후, Luft방법²⁵에 의한 epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열 중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μ m 두께로 박절하여 toluidine blue 염색을 하고 광학현미경하에서 관찰 부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT

5000형 초박절기에서 40~60 nm의 회백색의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson²⁶ 및 Reynolds²⁷방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

4) 주사전자현미경적 관찰: *P. carinii* 폐렴을 잘 일으킨 흰쥐를 선택하여 양와위로 고정시킨 후 정중선을 따라 개복한 후 하대정맥에 cannula (18 G polyethylene tube)를 넣어 생리식염수를 주입하면서 흉부대동맥을 절개하여 폐장혈관내의 혈액을 제거한 후 즉시 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde를 혼합한 고정액으로 관류하여 고정시킨 후 폐장을 절취하여 1×1×4 mm 정도 크기로 세절한 후 같은 고정액에 넣어 1일간 더 고정한 후 1% OsO₄ 용액으로 2시간 동안 후고정을 하고 0.1 M 인산염 완충용액으로 수세한 다음 25% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 30분간, 50% DMSO에 30분간 담근 다음 액체질소로 동결한 후 조직을 할단 (cracking)하였다. 할단된 조직을 50% DMSO에 녹여 수세 후 2% tannic acid에 침투시킨 다음 1% OsO₄ 용액으로 전도염색을 한 후 계열에탄올로 탈수를, isoamyl acetate로 침투를 시킨 후 임계점 건조를 실시하고 이온증착기 (IB-3 Ion-coater, Eiko Co., Japan)를 사용하여 Pt-Pd로 증착한 후 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

5) 기관지폐포 세척검사의 시료 제작: Cytospin하여 얻은 시료를 paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP) 용액으로 고정한 후 0.1 M 인산염 완충용액으로 수세하고 1% OsO₄ 용액으로 1시간 동안 후고정을 하였다. 같은 완충용액으로 수세한 후 2% tannic산에 12시간 침투시킨 다음 1% OsO₄ 용액으로 1시간 동안 전도염색을 실시한 후 계열 에탄올로 탈수를, isoamyl acetate로 침투를 시켜 임계점 건조기 (Critical Point Dryer HCP-II, Hitachi Co., Japan)로 이산화탄소를 사용하여 임계점 건조를 실시하였다. 건조된 시료를 시료 대에 부착시킨 후 이온증착기 (Ion coater, IB-III, Eiko Co., Japan)로 Pt-Pd를 증착한 후 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

6) 면역조직화학적 관찰: 채취한 폐장조직에서 5 μm 두께로 파라핀 절편을 얻어 유리슬라이드에 부착시키고 xylene과 계열알코올로 탈 파라핀 및 함수를 하였다. 내인성 peroxidase의 차단을 위하여 30% 과산화수소 1 ml에 메탄올 99 ml를 혼합하여 만든 용액에서 30분간 처리하고 0.1 M 인산염 완충용액으로 수세하였다. 조직 항원이 잘 노출될 수 있도록 조직절편을 단백분해효소인 0.4% pepsin으로 37°C에서 1시간 동안 방치시킨 후 인산염 완충액으로 수세하였다. 일차항체인 092, 900, 902, 904 및 SP-D를 사용하여 1:100으로 희석하여 2시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 인산염 완충용액으로 수세하고 이차 항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vectastain Elite Kit, USA)를 가하여 37°C에서 30분간 방치한 후 인산염 완충용액으로 수세하고, Avidin-biotin 혼합용액 (ABC Elite Kit, Vector, USA)으로 37°C에서 30분간

작용시켰다. DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)으로 10분간 실온에서 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시한 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 후포매법에 의한 면역투과전자현미경적 관찰:

(1) Lowicryl 포매 제작: PLP 용액으로 고정된 폐장조직 또는 기관지폐포 세척액을 cytopspin하여 얻은 시료를 0.1 M 인산염 완충용액으로 수세한 후 계열 알코올로 탈수하고 Lowicryl (Lowicryl K4M, Chemical Werke Lowi GMBH & CO., Germany)로 조직에 침투 및 포매를 실시하고 자외선 하에서 5일간 중합시켰다. 탈수 과정 중 에탄올 70%부터 침투, 포매 및 중합과정에 이르기까지는 모두 -20°C의 냉동 하에서 실시하였다. 중합이 끝난 시료 block은 단단하게 굳어져 있으나 초박절이 용이하도록 시료를 더욱 단단하게 만들기 위해 백열등 하에서 약 1주일간 두어서 시료가 위치한 Lowicryl포매 물질의 색깔이 투명하게 되도록 단단하게 만든 후, 1 μm 세박절을 실시하여 toluidine blue 염색을 한 후 광학현미경으로 검경하여 관찰할 부위를 결정한 다음 Sorvall MT 5000형 초박절기로 70~100 nm의 두께로 초박절편을 얻어 슬라이드에 부착한 다음 면역금 표지 염색 (immunogold labeling)을 실시하였다.

(2) 면역금 표지 염색: 0.1% trypsin과 0.1% CaCl₂ 용액으로 30분간 전 처치를 한 후 1% 소의 혈청알부민으로 처리한 후 일차항체로 092, 900, 902, 904 및 SP-D를 사용하여 tris 완충용액 (tris buffer saline-tween 20)에서 1:50으로 희석하여 4시간 동안 상온에서 반응시킨 후 같은 완충용액으로 수세하였다. Colloidal gold를 결합시킨 이차항체인 antimouse IgG (Auro Probe EM GAM IgG 15, Amersham INC., USA)을 사용하여 1:20으로 희석하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 tris 완충용액으로 수세하고 다시 여과된 물로서 충분히 수세하였다. Uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 한 후 슬라이드로부터 시료를 떼어내어 grid에 옮긴 후 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

8) 면역주사전자현미경적 관찰: 기관지폐포 세척액을 cytopspin하여 얻은 슬라이드를 PLP 용액으로 고정한 후 0.1M 인산염 완충용액으로 수세한 후 1% 정상 염소 혈청 (normal goat serum)을 점적하여 1시간 동안 실온에서 방치한 후 같은 완충용액으로 수세하였다. 일차항체인 092, 900, 902, 904 및 SP-D를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 같은 완충용액으로 충분한 수세를 하고 이차항체인 protein A gold (Protein A, 20 nm, Sigma Co., USA)를 1:20으로 희석하여 37°C에서 1시간 동안 시료에 반응시킨 다음, 인산염 완충용액으로 수세하였다. 2.5% glutaraldehyde 용액으로 30분간 고정된 다음 같은 완충용액과 증류수로 수세한 후, 면역금 입자를 보다 용이하게 관찰하기 위해 silver enhancement (IntenSE™ M Silver Enhancement Kit, RPN491, Amersham INC., USA)를 사용하여 10분씩 2회 처리하고, 증류수로

수세를 하였다. 2.5% glutaraldehyde 용액으로 다시 고정하고 같은 완충용액으로 수세한 다음 제일에탄올로 탈수를 하고 isoamyl acetate로서 침투를 시켜 임계점 건조기 (Critical Point Dryer HCP-II, Hitachi Co., Japan)로 이산화탄소를 사용하여 임계점 건조를 하였다. 건조된 시료를 시료 대에 부착한 후 고진공 증착기 (High Vacuum Evaporator HUS-5GB, Hitachi Co., Japan)에 탄소봉을 사용하여 30~40 nm 두께로 이온 증착을 한 후 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경적 소견

*P. carinii*에 의해 폐조직에 광범위한 병변을 보이는 군에서 대부분의 폐포 내에는 포만성 호산성 삼출액으로 차여 있으며 (Fig. 2A) 기관지폐포 세척검사에서 폐포 강에는 *P. carinii* 군체와 섬유소, 소수의 탈락된 폐포상피세포 및 대식구의 혼합물이 덩어리 형태로 관찰되었다. 폐포 중격에는 림프구 및 형질세포를 포함한 단핵구들이 침윤되어 있으며, 이들 염증세포들의 침윤 정도는 다양하게 관찰되었다. GMS 염색에서 *P. carinii* 군체가 대부분 둥글거나, 킵 또는 반달 모양의 낭성 구조를 가지며, 그 표면에 주름이 있거나 피막 점 (capsular dot)을 보여 주었다 (Fig. 2B). *P. carinii* 폐렴의 진행적인 소견을 보이는 병변 내에서는 염증세포들의 수가 많지 않았고, 폐포벽은 섬유모세포, 대식구 및 림프구의 수적 증가와 교원질 침착으로 인해 비후 되어 있었다.

2. 면역조직화학적 소견

단클론 항체인 092, 900, 902, 및 904를 사용하여 면역조직화학적 염색을 실시하였을 때 H&E염색상 포만성 호산성 삼출액을 보이는 부분에서 *P. carinii*의 포낭 및 영양형이 밀집하게 엉겨 덩어리 형태로 폐포 강에서 관

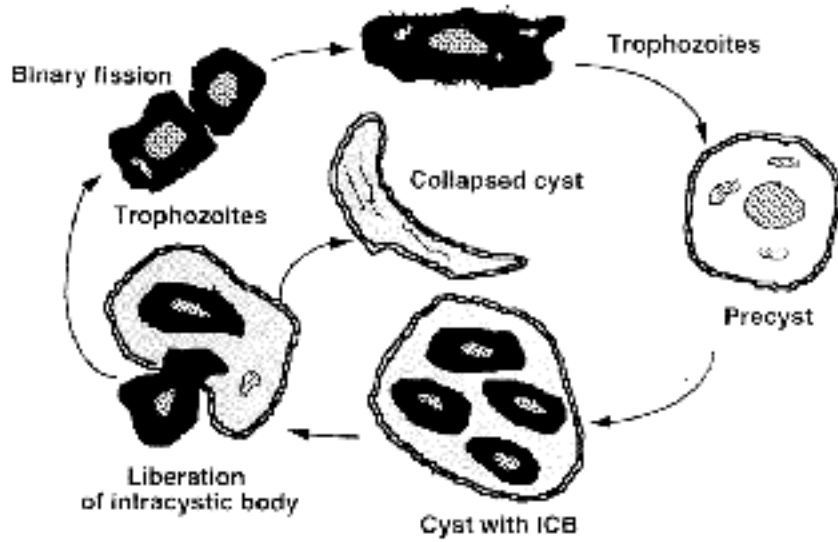


Fig. 1. Life Cycle of *Pneumocystis carinii*.



Fig. 2. A: Light micrograph showing intra-alveolar eosinophilic foamy exudate of *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats. B: *Pneumocystis carinii* cysts with round, collapsed or crescentic forms and occasionally eccentric capsular dots. (GMS) C: Immunohistochemical staining (Pri Ab=092) of *Pneumocystis carinii*. The organisms are well identified as clusters in the alveolar lumina and frequently attached to the alveolar walls.

찰되었으며 흔히 폐포벽에 부착하는 경향이 뚜렷하였다 (Fig. 2C). *P. carinii*의 일부는 폐포관, 호흡세기관지 및 세기관지 내에서도 관찰되었으며 때로는 *P. carinii*가 덩어리형태 혹은 개별적으로 비후된 폐포 중격 내에서도 관찰되었고, H&E 염색소견과 대조하였을 때 이런 부위에서 흔히 폐포 허탈이 동반되어 있음을 알 수 있었다. H&E에서 *P. carinii*의 존재가 애매한 병변에서도 면역조직화학적 검사를 통하여 폐포벽을 따라서 용이하게 균체를 식별할 수 있었다.

3. 투과전자현미경적 소견

*P. carinii*의 포낭 및 영양형 (trophozoite)들이 폐포 내에서 서로 붙어 덩어리를 만들거나 개별적으로 산재되어 관찰되었다. 폐포상피세포와 부착되는 *P. carinii*는 주로 영양형이며, 주로 I형 폐포상피세포와 부착하고, 고배율상에서 자세히 관찰하면 영양형의 균막과 폐포

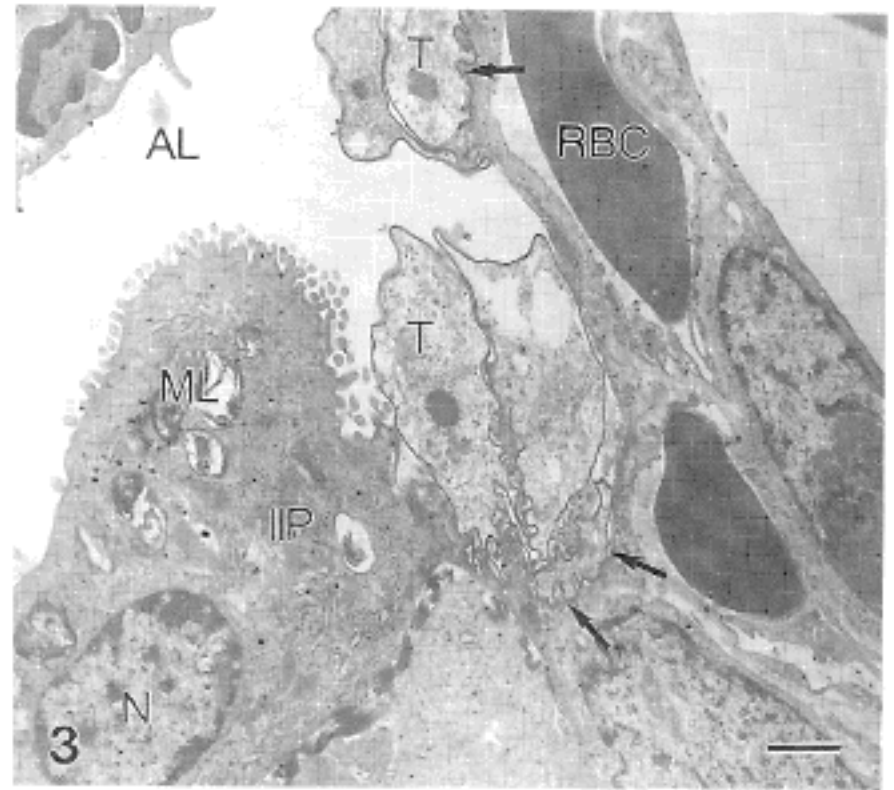


Fig. 3. Transmission electron micrograph illustrating the relationship of *Pneumocystis carinii* with alveolar epithelial cells. Several trophozoites are closely attached to the type I epithelial cell (arrows). Uranyl acetate and lead citrate, Bar=1 μ m, $\times 10,200$.

Key for Abbreviations; AL: Alveolar lumen, C: Cyst, CC: Crescentic cyst, EC: Empty cyst, ICB: Intracystic body, IIP: Type II pneumocyte, M: Mitochondria, N: Nucleus, RBC: Red blood cell, T: Trophozoite, TE: Tubular extensions

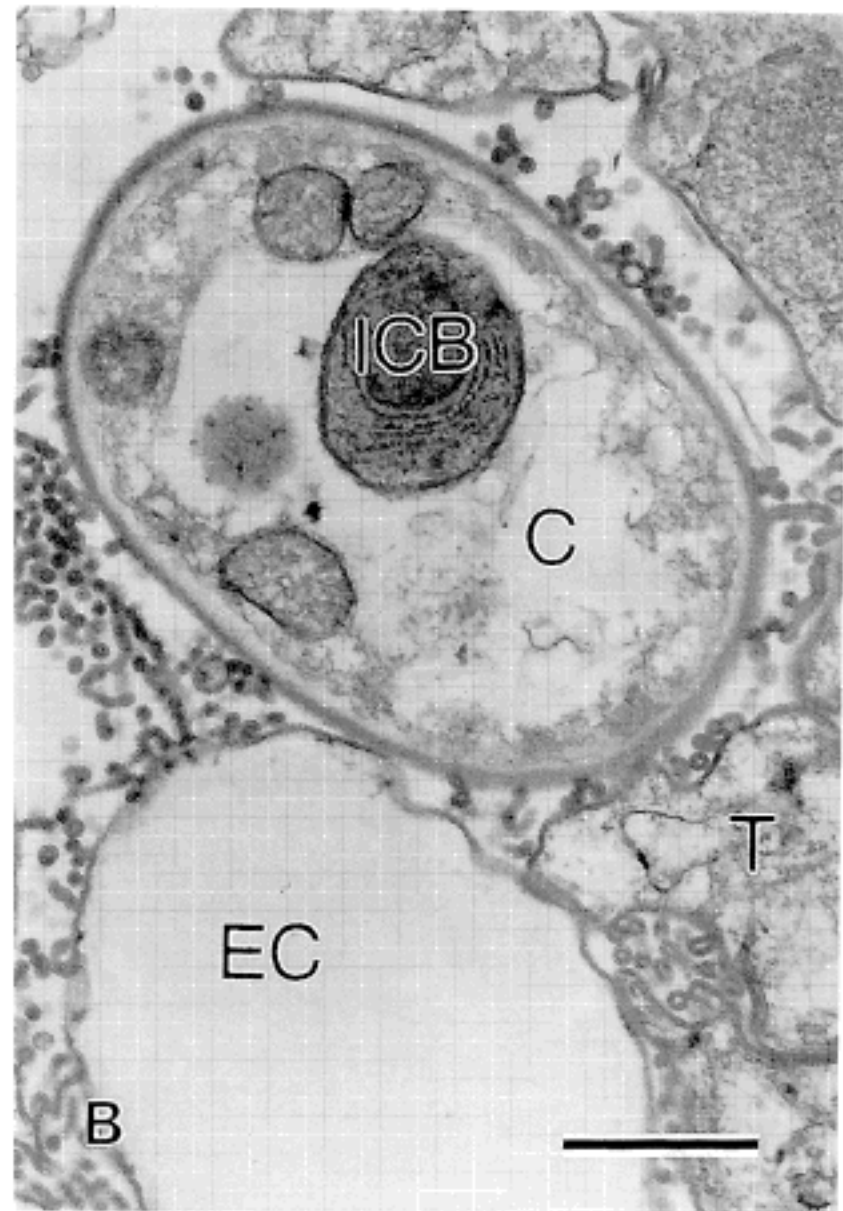
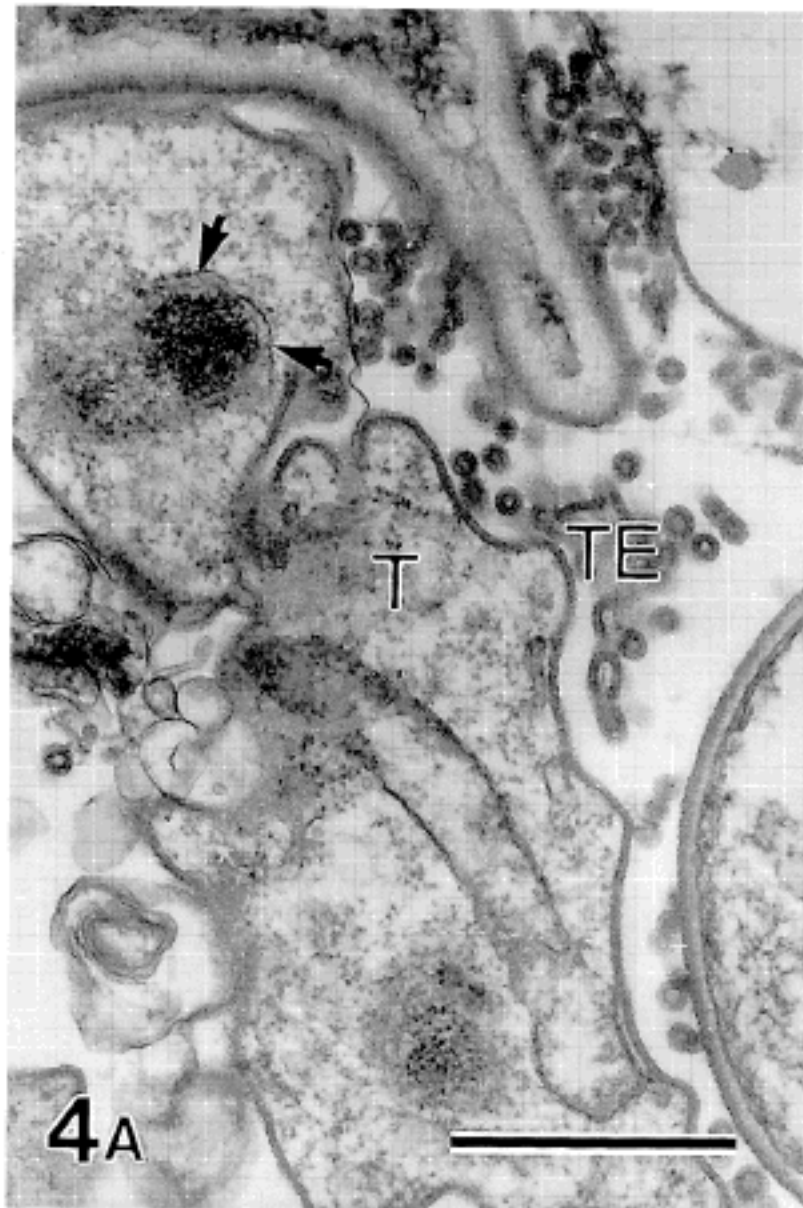


Fig. 4. A: Trophozoites showing irregular shape and cytoplasmic amorphous material, ill defined nucleus (arrows) and few organelles. B: Cysts showing oval and empty forms are present. The cyst contains one intracystic body, four mitochondria and amorphous material. Uranyl acetate and lead citrate. Bar(A&B)=1 μ m, A: $\times 25,000$, B: $\times 17,000$.

상피세포의 형질막이 서로 강하게 붙어 맞물려 있으며 유리된 영양형에 비해 폐포상피세포와 부착된 영양형은 폐포상피세포와 접해있는 부분에서 그 모양이 변조되었다 (Fig. 3). *P. carinii*는 대부분 I형 폐포상피세포와 부착되어 관찰되나 때로는 폐포 중격 또는 폐포모세혈관 내를 침범하는 소견을 볼 수 있었다. 영양형의 균막은 한 층의 전자밀도가 높은 외층과 내형질막으로 구성되어 있으며 균막의 표면에는 무수한 관상연장 (tubular extension)을 갖고 있었고 세포질 내에는 무정형의 과립상 물질로 차여있고 세포 소기관은 뚜렷하게 관찰되지 않았다 (Fig. 4A). 전포낭 및 포낭의 균막에는 중등도의 전자밀도를 가진 중간층이 외층과 내형질막 사이에 존재하여 영양형과 다른 구조를 보여주었다 (Fig. 4B). 전포낭의 내부는 미세과립상의 세포질로 구성되어 있으며, 불규칙하게 배열된 선상층과, 전자밀도가 다소 높은 과립들, 핵막이 불분명한 핵구조 및 간혹 뚜렷한 핵소체들을 포함하는 소수의 세포 소기관을 보였으며, 이들 소기관들은 전반적으로 잘 성숙되지 못하였다. 포낭들은 대부분 둥글거나 타원형을 보이며, 때로는 그 내부가 비어 있거나 허탈 되어 있었고, 포낭의 세포질 내에

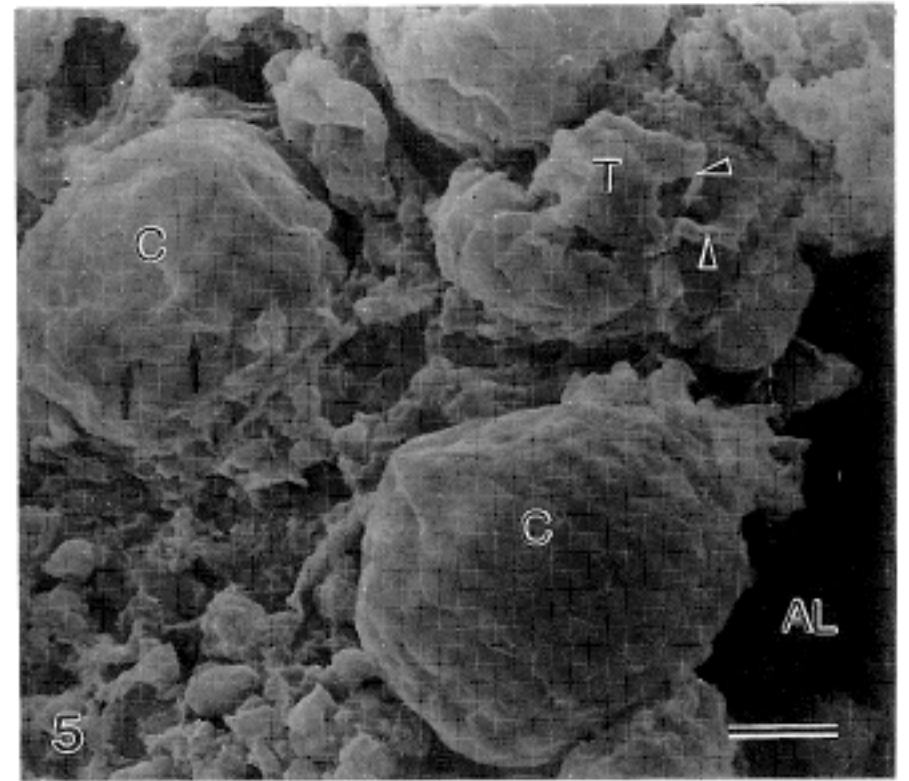


Fig. 5. Two cysts showing round shape and relatively smooth surface with few tubular extensions (arrows) and one trophozoite with surface tubular extensions (arrow heads). Bar=2 μ m, \times 8,200.

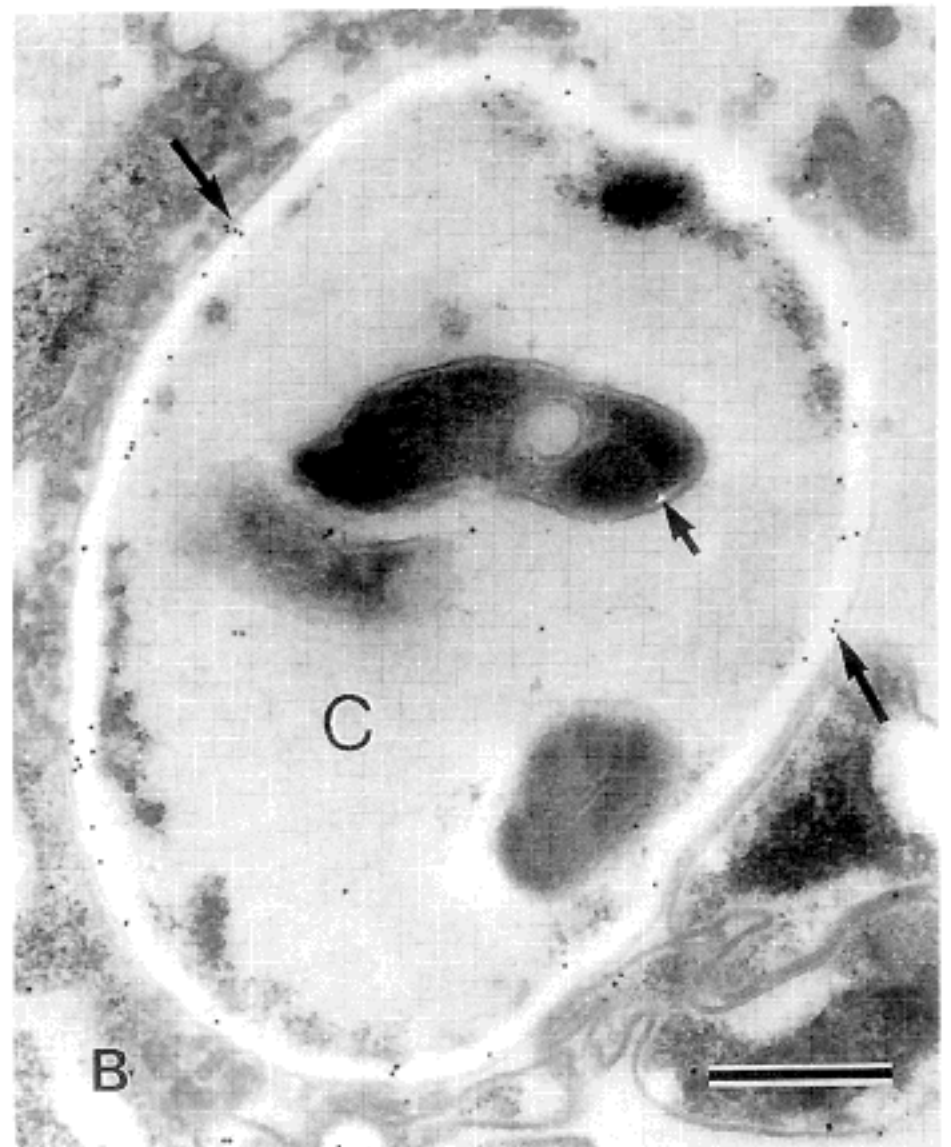
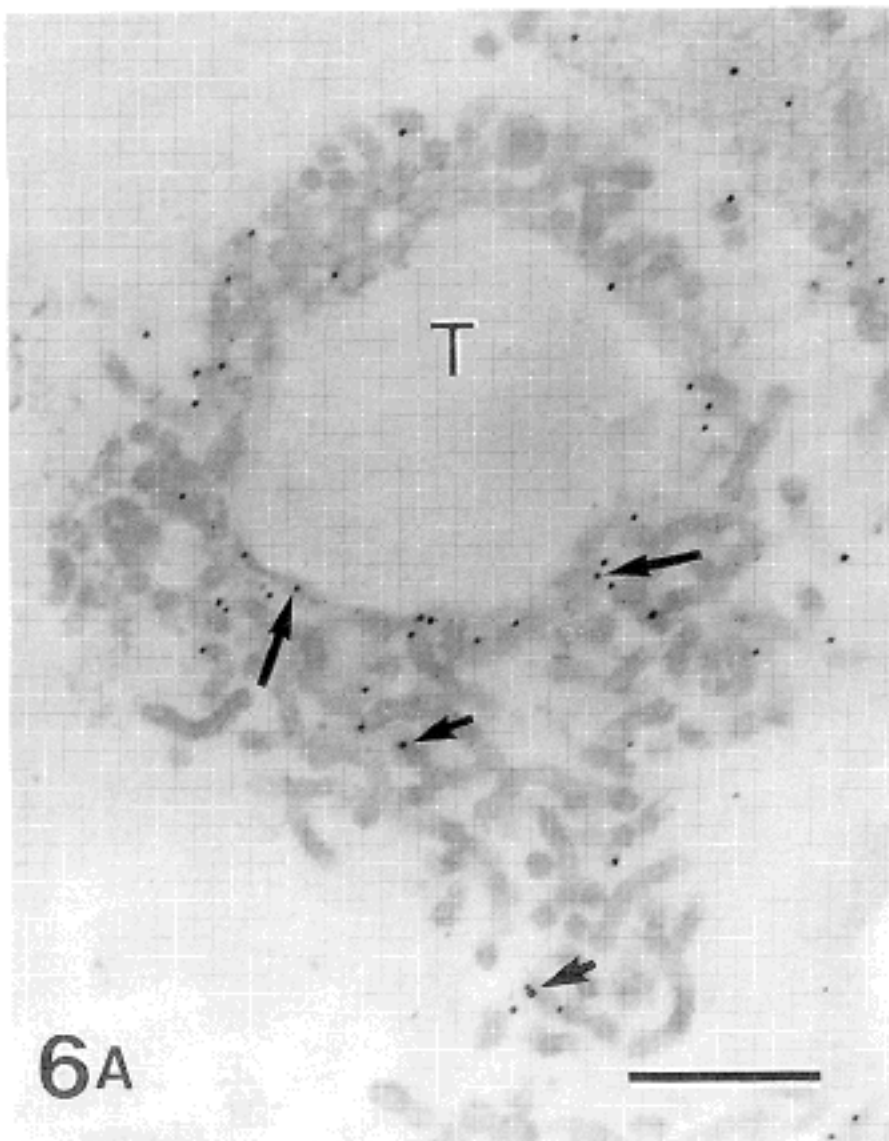


Fig. 6. A: Ultrastructural localization of antigenic molecules of *Pneumocystis carinii* trophozoite using monoclonal antibody (902). Electron dense immunogold particles are adhered mostly to the surface pellicle (long arrows) and tubular extensions (short arrows). B: In the cysts, electron dense immunogold particles are observed mostly on the surface pellicle (long arrows) and some particles are labeled on the cytoplasmic organelles (short arrows). ITEM, Bar(A&B)=0.5 μ m, A: \times 34,000, B: \times 32,000.

는 2개, 4개, 6개 혹은 8개의 포낭내체 (intracystic bodies)를 갖고 있었다. 전포낭 및 포낭의 균막 표면에도 관상연장이 존재하였으나 그 수는 영양형에 비해 상당히 적은 편이었다. 허탈된 포낭은 흔히 반달 형태로 관찰되었으며 그 내부에는 약간의 세포질이 남아 있었다. 폐포 내에는 섬유소 덩어리, 세포 잔해물 및 막성표면활성 물질이 관찰되었으며 폐포 대식구는 흔히 *P. carinii*의 영양형 또는 포낭과 인접하여 있으면서 이들을 탐식하였다. 비후된 폐포 중격 내에는 섬유모세포가 증식하여 있으며, 교원질 섬유가 침착되었다.

4. 주사전자현미경적 소견

영양형은 그 표면이 매우 불규칙하고 무수한 관상연장 구조를 볼 수 있었고 위축 형태로 주위 폐조직과 유착되어 있었다. 폐포 내에 유리되어 있는 영양형은 폐포상피세포에 부착되어 있는 것에 비해서 보다 다양한 형태를 보여주었다. 포낭은 대체로 둥글면서 그 표면이 영양형에 비해 매끈하며 관상연장구조가 가끔 관찰되었고 (Fig. 5), 때로는 그 내용물이 빠져나간 채 반달 형

태를 나타내었으며 이들 포낭의 주위에는 폐포대식구가 인접하고 있었다. 폐포대식구의 세포질 내에는 무수한 이차 분해소체가 존재하였던 것으로 여겨지는 공포가 관찰되었고 몇 개의 포낭이 탐식되었다.

5. 후포매법에 의한 면역금 표지 (immunogold labeling)

092, 900, 902 및 904 단클론 항체를 사용하여 면역금 표지 염색을 실시하였을 때 대부분 *P. carinii*의 균막에 고전자 밀도를 가진 과립상으로 관찰되었다. Colloidal gold를 표지자로 사용한 이들 과립은 영양형의 균막 표면에 불규칙하게 부착되었고, 관상연장과 세포질 내에도 가끔 관찰되었다 (Fig. 6A). 포낭에서는 균막 중 전자 밀도가 높은 외층과 전자밀도가 낮은 중간층에 주로 규칙적으로 산재되었고, 가끔 과립들이 세포질 내에 산재되거나 포낭내체에서도 관찰되었다 (Fig. 6B). 단클론 항체인 SP-D를 사용하였을 때는 면역금 표지 과립들이 영양형의 외표면과 포낭의 균막 및 포낭내체와 관상연장 구조에 과립상으로 관찰되었고, 폐포 내에 유리된

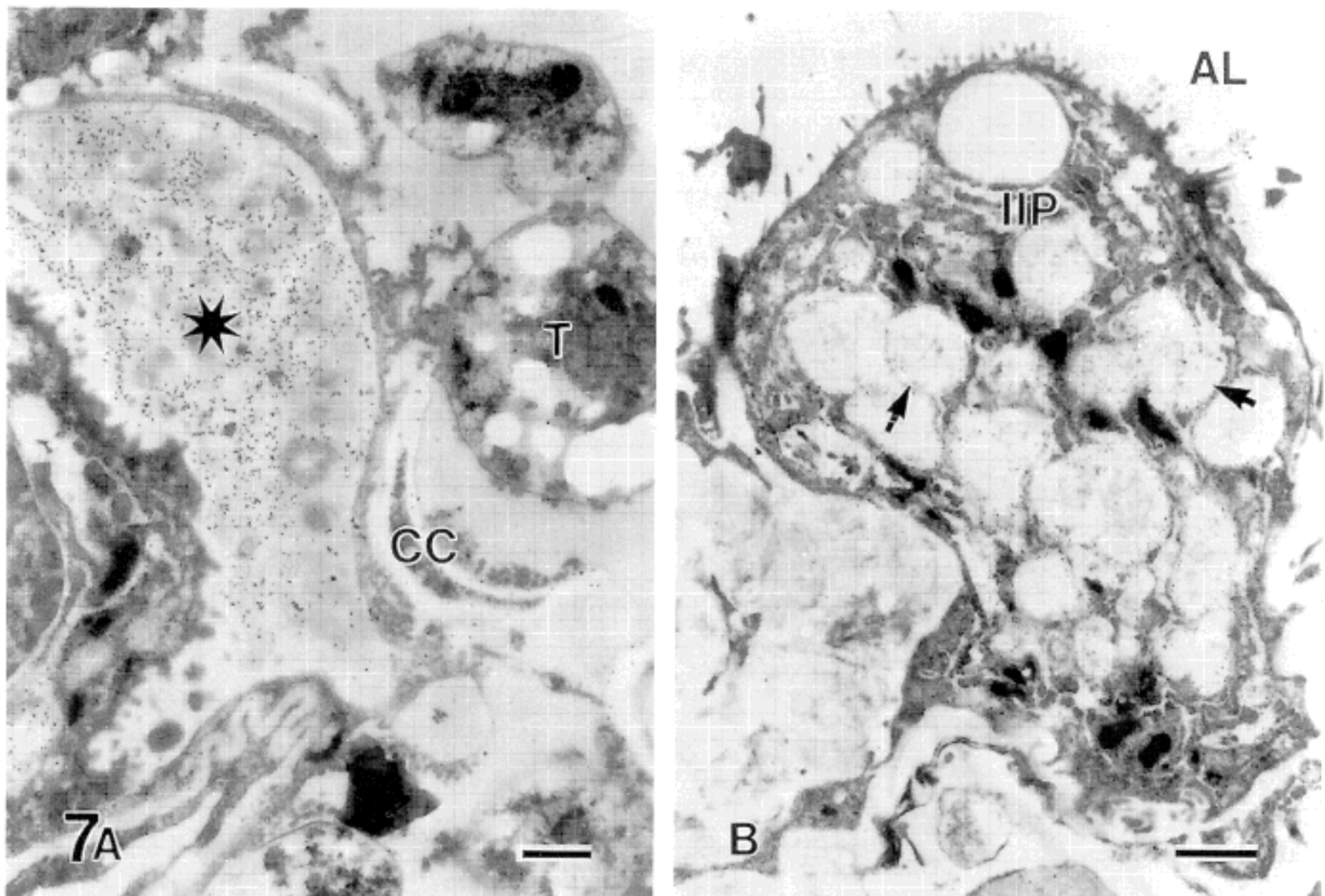


Fig. 7. A: Ultrastructural localization of antigenic molecules of *Pneumocystis carinii* using polyclonal antibody (SP-D). Immunogold particles are labeled on the free floating surfactant material (asterisk) as well as the pellicles of the collapsed cyst and trophozoites. B: Numerous immunogold particles are observed in the empty spaces of type II epithelial cell (arrows) in which previously surfactant materials were contained. ITEM, Bar(A&B)=1 μ m, A: \times 8,800, B: \times 9,100.

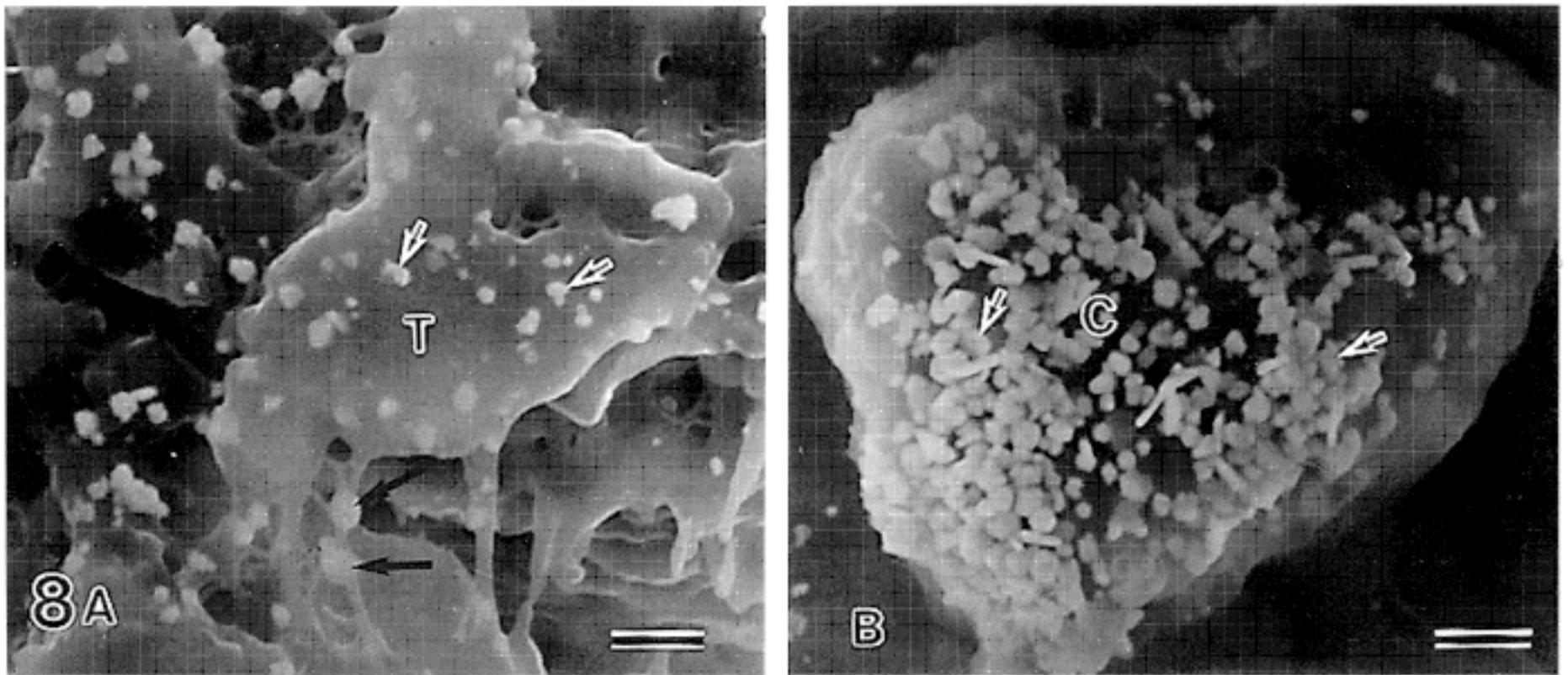


Fig. 8. A: Silver enhanced immunogold particles (Pri Ab= 902) are well identified on the pellicle surface (short arrows) and tubular extensions (long arrows) of the trophozoites. B: More intense labeling of silver enhanced gold particles on the pellicle surface (arrows) of *Pneumocystis carinii* cyst than that of trophozoites. ISEM, Bar(A&B)=1 μ m, A & B: \times 10,200.

표면활성 물질이 있는 곳에서도 면역금 표지 과립들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7A). 또한 II형 폐포상피세포내의 표면활성 물질이 포함되어 있는 다층판체 (multilamellar body)와 대식구내에도 면역금 표지 과립들이 관찰되었다 (Fig. 7B). 전반적으로 면역금 표지 과립들은 영양형에 비해 포낭에서 더욱 균일하게 관찰되었고 과립 수도 포낭에서 더욱 많이 관찰할 수 있었다. 대조군에서는 *P. carinii* 군체 표면에 면역금 표지 과립이 관찰되지 않았다.

6. 면역주사전자현미경적 소견

면역금 표지 과립을 은으로 다시 처리한 후 탄소로 피복 시킨 기관지폐포 세척액 시료에서 면역금 표지 과립들은 백색과립 형태로 영양형의 표면과 관상연장에 뚜렷하게 관찰되었으며 포낭의 표면에는 보다 밀접하게 많은 수의 과립들이 관찰되었다 (Fig. 8). 다클론 항체인 SP-D를 사용한 군에서는 영양형 및 포낭 뿐 만 아니라 이들 주위에도 과립들이 다수 산재되어 있어 인공 산물과 구별이 어려웠다. 대조군에서는 *P. carinii* 군체 표면에 면역금 표지 과립들이 관찰되지 않았다.

고 찰

Chagas²⁸가 1909년 guinea pig 폐조직에서 *P. carinii*와 유사한 군체를 기술한 이래로 *P. carinii*의 성상에 관하여 여러 연구자들에 의해 많은 연구가 이루어져 왔으며 *P. carinii*의 특성이 보고되어 왔다.²⁹⁻³¹ 초기에는 *P. carinii*는 포낭 및 영양형을 가지면서 일정한 생활사를 보이는 단세포성 원충류로 분류되었으나 *P. carinii*가 낭

벽을 만들고 GMS 염색등 진균류 염색에 양성으로 반응하고 있는 점에서 진균류로 분류하게 되었다.^{31,32} 그리고 Edman et al¹⁵은 *P. carinii*로부터 16S ribosomal RNA를 분리하여 진균류의 성상이 있음을 보고하였다.

전자현미경적 관찰로 *P. carinii*의 생활사에 대한 자세한 연구 결과가 보고되고 있다.^{1,33,34} *P. carinii*의 영양형은 그 표면에 무수한 관상연장을 가지며, 성숙한 전포낭과 포낭 표면에는 관상연장의 수가 감소하면서 비후된 균막을 가진다. 포낭 내에는 2개, 4개, 또는 8개의 포낭내체를 포함하며 이들은 유사분열로서 그 수가 많아지는 것으로 알려져 있다.³⁵ 성숙한 포낭은 그 벽이 파열되면서 포낭내체가 밖으로 유리되어 영양형으로 성숙된다. 한편 포낭내체가 빠져나간 포낭은 흔히 허탈되어 반달 형태의 구조를 보여준다 (Fig. 1). 영양형 들은 폐포상피세포 특히 I형 폐포상피세포에 부착하려는 경향이 크며, 아주 드물게는 II형 상피세포에서도 부착됨이 관찰된다.¹²

*P. carinii*에 대한 면역조직화학적 검색을 실시하면 군체를 보다 용이하게 관찰할 수 있다.³⁶⁻³⁸ 면역조직화학적 검사가 활발히 시도된 초기에는 주로 다클론 항체를 사용하여 많은 연구를 하였으나 *P. carinii*를 혈청학적 또는 형태학적으로 밝혀내는데 있어서 많은 문제점을 동반했다.³⁹⁻⁴¹ 최근 여러 가지의 단클론 항체들, 즉 3F6, 2G2, 그리고 4F2 등이 개발되어 포르말린에 고정하고 파라핀 포매를 한 조직에서 *P. carinii*를 용이하게 검색할 수 있게 되었다.^{20,21,42,43} 본 연구에서 저자는 단클론 항체인 092, 900, 902, 및 904를 사용하였고, 다클론 항체인 SP-D를 사용하여 면역조직화학적 검색을 실시하였는데 *P. carinii*는 대부분 폐포 내에서 존재하면서

흔히 폐포벽의 폐포상피세포들에 연하여 개별적으로 혹은 덩어리를 이루며 부착되어 있었으며, 가끔 세기관지 내와 폐포중격에서도 관찰되었다. H&E상에서 *P. carinii*의 존재 유무의 감식이 어려웠던 부위에서도 면역조직화학적 검사에서는 쉽게 식별되었다. 단클론항체 중에는 902와 092가 가장 진하게 염색되어 *P. carinii*에 대해 민감하게 반응함을 알 수 있었다.

*P. carinii*의 균막 표면에는 여러 가지 당단백을 포함하는데, 이들 당단백은 110내지 120 kDa의 분자량을 가지며, 균체의 표면항원을 형성하는데 주 역할을 한다.¹⁷ *P. carinii* 흰쥐로부터 분리한 표면 당단백은 사람에서 분리한 *P. carinii*와 연관성이 많으나 면역학적으로는 분명히 다르다.⁴⁴ *P. carinii*표면에 존재하는 당단백 120 (GP 120)은 그 구성분에서 mannose가 풍부하며, 특히 *P. carinii* 균체의 균막표면에 주로 존재한다.¹⁷ 최근 분자생물학적 연구가 활발히 진행되면서 *P. carinii*의 균막에 존재하는 당단백에 대한 연구가 활발하며 생화학적 성상이 다른 항원성 단백질에 대한 분리작업이 다각도로 진행되고 있고,^{45,46} 이를 바탕으로 3F6, 2G2, 4F2, 092, 900, 902 및 904 등 다양한 단클론 항체들이 생산되어 *P. carinii*의 항원성 물질을 검색하는데 많이 이용되어 왔다.^{20,21,42,43}

저자는 본 연구에서 여러 가지 단클론 항체들을 사용하였으며, 성적에서 모두 *P. carinii*표면 항원에 해당하는 면역금 입자를 검출할 수 있었다. *P. carinii*의 항원성은 대체로 잘 유지되었고 단클론 및 다클론 항체들 사이에 항원 물질의 검출은 모두 가능하였다. 단클론 항체를 사용하였을 때 *P. carinii* 항원의 위치는 매우 특이하였으며 대부분 *P. carinii* 균막에 존재하였고, 간혹 포낭내체와 세포질 내에서도 산재되어 있었다. 면역금 표지 입자들의 비특이적 침전이 *P. carinii* 주변에도 소수 관찰되었으나, 단클론 항체를 사용하였을 때는 폐포상피세포 내에서는 볼 수 없었다. 단클론 또는 다클론 항체를 사용하여 면역전자현미경적 검색을 할 때 유의할 점으로는 *P. carinii* 주변에 비특이적으로 관찰되는 면역금 입자들을 최소화 할 수 있도록 하기 위해 일차항체의 희석배율을 가능한 높이고, 세척과정을 충분히 하는 것이 필요하다.⁴⁷

본 실험에서 *P. carinii*의 영양형, 전포낭, 포낭 및 포낭내체는 단클론 항체들과 각각 면역학적 반응을 잘 하였는데, 포낭 및 전포낭에서는 *P. carinii* 균막 중 전자밀도가 높은 외층과 전자밀도가 낮은 중간층에서 강하게 반응하였고, 영양형에 비해 전포낭 및 포낭에서 균일하면서 강한 면역반응을 관찰할 수 있었다. 본 실험 성적에 의하면 *P. carinii* 균막에 위치한 항원물질 중 일부는 전포낭과 포낭에서도 그 항원성이 변하지 않는다고 해석할 수 있으며, 영양형에서 포낭으로 진전되는 동안 항원의 축적 또는 변형이 일어날 수 있을 것으로 생각되고 있다.⁴³ 더불어 항원 물질이 포낭의 외층과 중간층에서 고르게 표지반응을 보여주는 점은 이들 두층

에서 비슷한 성상의 항원이 존재함을 나타내주고 있다.^{43,48} 본 연구에서 사용한 단클론 항체들 중에서 092 및 902가 민감한 면역반응을 나타내었다.

다클론 항체로 사용된 SP-D는 교원성 당단백으로서 II형 폐포상피세포와 비섬모성 세기관지 세포 즉 Clara 세포에서 만들어져 폐포 내로 분비된다고 알려져 있다.^{45,49} 본 연구에서 SP-D 항체를 사용하여 면역금 표지 염색을 하였을 때 영양형, 포낭, 폐포 내에 유리된 표면활성 물질은 물론 II형 폐포상피세포의 세포질 내에서도 검출되었다. II형 폐포상피세포 내에서는 SP-D항체에 대한 면역금 입자들이 주로 공포 내에서 발견되었는데 이들 공포는 원래 표면활성 물질을 포함한 다층판체였음을 알 수 있었다. 또한 SP-D는 폐포대식구의 세포질 내에서도 관찰되어, SP-D가 폐포대식구에 *P. carinii*와 함께 탐식되어진 것으로 볼 수 있으며, *P. carinii*를 제거하는데 역할을 할 수 있을 것으로 해석된다.⁵⁰

결 론

실험적으로 유도된 흰쥐의 *P. carinii* 폐렴에서 폐조직의 형태학적 변화를 광학 및 전자현미경으로 관찰하고, *P. carinii*의 항원성 물질을 092, 900, 902 및 904의 단클론 항체와 SP-D의 다클론 항체를 사용하여 면역 조직 화학 및 전자현미경적 검색을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

광학현미경적 소견으로 폐포 내에는 포말성 호산성 삼출액이 차여있으며 폐포중격에는 림프구 및 형질세포를 포함한 단핵구들이 침윤되었다. GMS염색에서 *P. carinii* 균체가 둥글거나 썩 또는 반달 모양을 취하며, 때로는 피막점을 보였다. 면역조직화학적으로 포말성 삼출액이 존재하는 폐포와 폐포관, 호흡세기관지 및 세기관지 내에 *P. carinii*가 존재하는 부위에 강한 양성 반응을 보였고 국소적으로 폐포중격 내에도 염색되었다. 투과전자현미경적으로 *P. carinii*는 영양형 또는 포낭을 보이면서 서로 덩어리를 이루거나 유리되면서 폐포벽에서 I형 폐포상피세포에 밀착하여 있었고 간혹 폐포중격 또는 폐포모세혈관을 침범하였다. 영양형의 균막은 한층의 전자밀도가 높은 외층과 내형질막으로 구성되어 있는데 비하여 전포낭 및 포낭의 균막은 중등도의 전자밀도를 가진 중간층이 외층 및 내형질막 사이에 존재하였다. 다수의 포낭들은 둥근 형태였으나 일부에서는 그 내부가 비어있거나 허탈 되어 있었고 포낭 내에는 2개, 4개 내지 8개의 포낭내체를 갖고 있었다. 영양형에서는 전포낭 또는 포낭에 비해 관상연장이 잘 발달되었다.

후포매법에 의한 면역금 표지 염색에서 092, 900, 902 및 904 단클론 항체를 사용한 면역금 표지 입자가 대부분 *P. carinii* 균막에 고전자밀도의 과립성으로 관찰되었다. 특히 포낭에서는 균막의 전자밀도가 높은 외층과 전자밀도가 낮은 중간층에 균일하게 산재되었고, 가끔

세포질 내에도 산재되거나 포낭내체 또는 관상연장을 따라서도 관찰되었다. SP-D의 다클론 항체를 사용하였을 때 영양형의 외표면, 포낭의 균막 및 포낭내체와 관상연장에 골고루 과립들을 관찰할 수 있었고, 폐포 내에서도 표면활성 물질이 있는 곳에 면역금 표지 과립들을 볼 수 있었다. 면역주사전자현미경적 소견에서도 면역금 입자들이 영양형 및 포낭표면과 관상연장에서 잘 관찰되었다. 전반적으로 면역금 표지 과립들은 영양형에 비해 포낭에서 더욱 균일하게 관찰되었고 보다 강하게 발현되었다. 대조군에서는 *P. carinii* 군체에 면역금 표지 과립이 관찰되지 않았다.

이상의 실험성적을 근거로 본 실험에서 *P. carinii*의 항원성 면역단백 물질에 대한 면역금 표지 입자들은 균막에 주로 위치하고 있었으며, 영양형에 비해 전포낭 및 포낭에서 더욱 강하게 발현되었다. 이는 영양형에 비해 포낭으로 성숙할수록 항원성이 높아짐을 나타내는 소견으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bedrossian CWM. *Pneumocystis carinii* - The enigma goes on. *Semin Diagn Pathol* 1989; 6: 191-4.
2. Luna M, Cleary KR. Spectrum of pathologic manifestations of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with neoplastic diseases. *Semin Diagn Pathol* 1989; 6: 262-72.
3. Masur H, Lane HC, Kovacs JA, Allegra C, Edman JC. *Pneumocystis* pneumonia: from bench to clinic. *Ann Intern Med* 1989; 111: 813-26.
4. Travis WD, Pittaluga S, Lipschik GY, et al. Atypical pathologic manifestations of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 615-25.
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. Burns SM, Read JA, Yap PL, Brett RP. Antibodies to *Pneumocystis carinii*: reduced levels in HIV infected patients during *Pneumocystis* infection and evaluation of passive immunization. *Infect Control AIDS* 1989; 5: 287 (Abstract).
7. Tran Van Nhieu J, Vojtek AM, Bernaudin JF, Escudier E, Fleury-Feith J. Pulmonary alveolar proteinosis associated with *Pneumocystis carinii*: ultrastructural identification in bronchoalveolar lavage in AIDS and immunocompromised non-AIDS patients. *Chest* 1990; 98: 801-5.
8. Gori S, Paladini A, Paoletti P, Del Bono L, Scasso A. Laboratory diagnosis of *Pneumocystis carinii*: comparison of cytological, immunofluorescent and immunocytochemical staining. *Pathologica* 1992; 84: 225-33.
9. Limper AH, Pottratz ST, Martin WJ. Modulation of *Pneumocystis carinii* adherence to cultured lung cells by a mannose-dependent mechanism. *J Lab Clin Med* 1991; 118: 492-9.
10. Martin WJ. Pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 356-7.
11. Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 1991; 351: 155-8.
12. Long EG, Smith JS, Meier JL. Attachment of *Pneumocystis carinii* to rat pneumocytes. *Lab Invest* 1986; 54: 609-5.
13. Pottratz SA, Martin WJ. Role of fibronectin in *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells. *J Clin Invest* 1990; 85: 351-6.
14. Limper AH, Standing JE, Hoffman OA, Castro M, Neese LW. Vitronectin binds to *Pneumocystis carinii* and mediates organism attachment to cultured lung epithelial cells. *Infect Immunol* 1993; 61: 4,302-9.
15. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 1988; 334: 519-22.
16. Tanabe K, Fuchimoto M, Egawa K, Nakamura Y. Use of *Pneumocystis carinii* genomic DNA clones for DNA hybridization analysis of infected human lungs. *J Infect Dis* 1988; 157: 593-6.
17. Linke MJ, Cushion MT, Walzer PD. Properties of the major antigens of rat and human *Pneumocystis carinii*. *Infect Immunol* 1989; 57: 1547-55.
18. Kovacs JA, Halpern JL, Swan JC, et al. Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 1986; 2: 1-3.
19. Matsumoto Y, Amagai T, Yamada M, Imanishi J, Yoshida Y. Production of monoclonal antibody with specificity for the pellicle of *Pneumocystis carinii* by hybridoma. *Parasitol Res* 1987; 73: 228-33.
20. Soulez B, Palluault F, Dei-Cas E, Aliouat EM, Camus D. Production of a monoclonal antibody using lymphocyte from *Pneumocystis carinii* infected mice. *J Protozool* 1991; 38: 189S-90S.
21. Kobayashi M, Moriki T, Uemura Y, et al. Immunohistochemical detection of *Pneumocystis carinii* in transbronchial lung biopsy specimens: antigen difference between human and rat *Pneumocystis carinii*. *Jpn J Clin Oncol* 1992; 22: 387-92.
22. Eisen S. Decreased yield of *Pneumocystis carinii* from cortisonized rats. *J Parasitol* 1989; 75: 82-5.
23. Soulez B, Dei-Cas E, Charet P, Mougeot G, Caillaux M, Camus D. The young rabbit: a nonimmunosuppressed model for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Infect Dis* 1989; 160: 355-6.
24. Powles MA, McFadden DC, Pittarelli LA, Schmatz DM.

- Mouse model for *Pneumocystis carinii* pneumonia that uses natural transmission to initiate infection. *Infect Immunol* 1992; 60: 1397-400.
25. Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophysic Biochem Cytol* 1961; 9: 409-17.
 26. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 1958; 6: 475-9.
 27. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17: 208-12.
 28. Chagas C. Nova trypanomiazaia humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 1: 159 (Abstract).
 29. Delanoe P, Delanoe M. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec *Trypanosoma lewis*. *CRAcad Sci* 1912; 155: 658.
 30. Vaněk J, Jirovec O. Parasitäre Pneumonie. "Interstitielle" Plasmazellen-pneumonie der Frühgeborenen, verursacht durch *Pneumocystis carinii*. *Zentralbl Bakteriol* 1952; 158: 120-7.
 31. Hughes WT. Current status of laboratory diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1975; 6: 145-75.
 32. Musto L, Flanigan M, Elbadawi A. Ten-minute silver stain for *Pneumocystis carinii* and fungi in tissue sections. *Arch Pathol Lab Med* 1982; 106: 292-4.
 33. Matsumoto Y, Yoshida Y. Recent advances in *Pneumocystis* biology: life cycle of *Pneumocystis* and experimental models of *Pneumocystis* infection. *Parasitol Today* 1986; 2: 137-42.
 34. Baskerville A, Dowsett AB, Cook RW, Dennis MJ, Cranage MP, Greenaway PJ. *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus infection: Immunohistological and scanning and transmission electron microscopical studies. *J Pathol* 1991; 164: 175-84.
 35. Campbell WG. Ultrastructure of *Pneumocystis* in human lung. *Arch Pathol* 1972; 93: 312-30.
 36. Blumenfeld W, Kovacs JA. Use of a monoclonal antibody to detect *Pneumocystis carinii* in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid by immunoperoxidase staining. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 1233-6.
 37. Linder J, Radio SJ. Immunohistochemistry of *Pneumocystis carinii*. *Semin Diagn Pathol* 1989; 6: 238-44.
 38. Radio SJ, Hansen SH, Goldsmith J, Linder J. Immunohistochemistry of *Pneumocystis carinii* infection. *Mod Pathol* 1990; 3: 462-9.
 39. Lim SK, Eveland WC, Porter RJ. Direct fluorescent-antibody method for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonitis from sputa or tracheal aspirates from humans. *Appl Microbiol* 1974; 27: 144-9.
 40. Myers JD, Pifer LL, Sale GE, Thomas ED. The value of *Pneumocystis carinii* antibody and antigen detection for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia after marrow transplantation. *Am Rev Resp Dis* 1979; 120: 1283-7.
 41. Maddison SE, Hayes GV, Slemenda SB, Norman LG, Ivey MH. Detection of specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay and antigenemia by counter-immunoelectrophoresis in humans infected with *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 1036-43.
 42. Cartun RW, Lachman MF, Pedersen CA, Long DM, Cole SR. Immuno-cytochemical identification of *Pneumocystis carinii* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues with monoclonal antibody 2G2. *Mod Pathol* 1989; 2: 16A (Abstract).
 43. Yoshikawa H, Debault LE, Graves DC. Ultrastructural localization of epitopes recognized by monoclonal antibodies produced to rat *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 1991; 38: 18S-20S.
 44. Limper AH. Parasitic adherence and host responses in the development of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Semin Respir Infect* 1991; 6: 19-26.
 45. Persson A, Chang D, Rust K, Moxley M, Longmore W, Crouch E. Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D): a collagenous surfactant-associated protein. *Biochemistry* 1989; 27: 6361-7.
 46. Lundgren B, Lipschik GY, Kovacs JA. Purification and characterization of a major human *Pneumocystis carinii* surface antigen. *J Clin Invest* 1991; 87: 163-70.
 47. McPhail GD, Finn T, Isaacson PG. A useful low temperature method for postembedding electron immunocytochemistry in routine histopathology. *J Pathol* 1987; 151: 231-8.
 48. Palluault F, Dei-Cas E, Slomianny C, Soulez B, Camus D. Golgi complex and lysosomes in rabbit derived *Pneumocystis carinii*. *Biol Cell* 1990; 70: 73-82.
 49. Persson A, Chang D, Crouch E. Surfactant protein D (SP-D) is a divalent cation-dependent carbohydrate binding protein. *J Biol Chem* 1990; 265: 5755-60.
 50. Kuan SF, Rust K, Crouch E. Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides: surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in bronchoalveolar lavage. *J Clin Invest* 1992; 90: 97-106.