

酵素標識抗體法에 의한 Human Chorionic Gonadotropin의 흰쥐 組織內 位置檢定에 관한 研究

Immunohistochemical Localization of Injected Human Chorionic Gonadotropin in the Rat Tissues

서울대학교 醫科大學 解剖學教室

徐 丙 台 · 白 相 豪

緒 論

動物組織 切片上에서 特定한 hormone 을 組織化學的으로 染色함으로써 位置檢定(localization)을 하는 일은 1942年 Coons 等이 螢光抗體法을 發表하기 以前까지만 해도 그 特異性에 있어서 認定받기 어려웠으나 約 30 年에 걸친 동안 많은 研究者들에 의해 方法이 改良됨으로써 이제는 普遍化한 研究手段이 되었고 더욱이 1966 年에는 Nakane 等에 의해 보다 感도가 높은 酵素標識抗體法이 開發됨으로써 特異抗體와 抗原의 保存만 適切하면 單一 hormone 뿐 아니라 同一切片上에서 同時에 2種類 乃至는 3種類的 hormone 을 光學 또는 電子顯微鏡下에서 觀察할 수 있도록 染色할 수 있기에 이르렀다 (Sri Ram 等 1966, Nakane 等 1967¹⁾, 1967²⁾, 1968, Nakane 1968).

이러한 免疫組織化學的 研究法에 따라 많은 研究者들은 human chorionic gonadotropin(以下 HCG 로 略記)의 位置檢定 및 細胞內 變動을 調查觀察한 바 있다. (Midgley 等 1962, 沈等 1970). 한편 生體內에서 形成된 hormone 뿐 아니라 體外에서 注射로 投與한 exogenous hormone 에 對해서는 比較的 發表된 報告가 적긴 하지만 投與한 hormone 이 生體內에 들어가 標的 器官에 어떠한 時期에 어느 程度 蓄積하는지를 주로 究明하기 爲한 것이었다. 이들의 研究對象은 腦下垂體의 gonadotropin(Sonenberg 等 1954, Mancini 等 1965, 1966, Kretser 等 1969), thyroid stimulating hormone(De Robertis 等 1963)과 growth hormone (Kretser 等 1969) adrenocorticotropin (Sonenberg

等 1951³⁾, Siperstein 1963), prolactin (Sonenberg 等 1951²⁾, 1954)이 주가 되어있고 그밖에 steroid hormones (Rogers 等 1965, Sar 等 1966, Stump 1968¹⁾, 1968²⁾) PBI (Wollman 等 1955) 및 insulin (Worthington 等 1964)이 있다.

이들 業績은 모두가 螢光色素를 注入할 hormone 에 標識하거나 放射性 同位元素를 標識하여 觀察한 것으로서 낮은 特異성과 暗視野가 주는 障害等으로 明確한 觀察이 어려웠을 것으로 보아 著者は 낮은 濃度에서도 比較的 높은 感도를 나타낼 수 있는 酵素抗體로 HCG 를 染色함으로써 暗視野에서 보다는 더욱 明確한 觀察을 할 수 있을 것을 期待하여 本實驗을 施行하게 된 것이다.

材料 및 方法

實驗動物

體重 160gm 內外의 Sprague-Dawley 系 흰쥐 48마리를 使用하였다. 動物들은 飼育期間中 室溫의 急變을 가능한 限 避하도록 努力하였고 晝夜의 區分은 人工的으로 照明時間을 定하여(晝14時間, 夜 10時間)生活하도록 하였다.

動物들은 4個群으로 나누어 各各 HCG (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) 1 mg(10 I. U.), 5 mg(50 I. U.), 30 mg(300 I. U.)을 0.5 ml 의 生理的 食鹽水에 溶解하여 靜脈內注射로 投與하였고 나머지 1群의 動物에는 同量의 生理的 食鹽水만을 投與하여 對照群으로 使用하였다.

注射後 여러 時間間隔을 두고(5分, 15分, 30分, 60分 5時間, 24時間) 動物들을 屠殺하여 即時 組織을 採取하였다.

組織處理

各動物에서 辜丸, 副辜丸, 精管, 腦下垂體, 腸間膜淋巴節, 甲狀腺, 肝臟 및 腎臟을 摘出하여 組織片을 即時 Bouin's solution 에 4~5時間 固定하였고 그後 約 3日 間 70% alcohol로 數次에 걸쳐 液을 交換하면서 徹底한 洗滌을 하였다. 固定液의 成分中의 하나인 picric acid의 黃色이 組織片에서 完全히 消失된뒤 高濃度의 alcohol로 脫水를 하고 通常方法에 따라 paraffin에 包埋하였다. 組織切片은 6 μ 두께로 細切하였다.

抗體液

酵素標識抗體法에 使用된 두 種類의 抗體液은 아래와 같은 過程을 거쳐 製造하였다. 第1抗體인 rabbit anti-human chorionic gonadotropin(以下 anti-HCG로 略記)은 精製한 HCG를 抗原으로 하여 Freund complete adjuvant와 함께 正常토끼에 注射하여 免疫을 시킴으로써 얻은 抗血清이고 第2抗體인 sheep anti-rabbit gamma globulin(以下 anti-RGG로 略記)은 正常토끼의 血清蛋白中 gamma globulin을 分割精製하여 Freund complete adjuvant와 함께 羊에 反復 注射함으로써 얻은 抗血清이다. 이 anti-RGG serum을 ammonium sulfate 鹽析法으로 다시 分割하여 透析 凍結 乾燥 過程을 거쳐 精製된 gamma globulin의 白色粉末을 얻었고 使用時까지 -40°C 에 密封 保管하였다. 第2抗體에 標識하는 酵素로는 horseradish peroxidase type II (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)를 使用하였다. Anti-RGG와 peroxidase는 bifunctional reagent인 FNPS(p, p'-difluoro-m, m'-dinitrophenyl sulfone)를 使用하여 結合시켰으며 標識되지 않은 遊離酵素 및 變性된 標識抗體를 除去하기 爲하여 다시 鹽析法으로 精製한 後 透析을 거쳐 少量씩 分瓶하여 -40°C 에 使用時까지 保管하였다. Anti-HCG는 1:100, anti-RGG-peroxidase는 1:25 稀釋液으로 抗原과 特異的으로 結合할수 있음을 確認한 後 使用하였다.

組織化學反應過程

Nakane 및 Pierce(1967¹⁾, 1967²⁾)가 開發한 酵素標識抗體(enzyme-labeled antibody)를 利用한 免疫組織化學的方法(immunohistochemical method)에 따라 注射로 投與한 組織內의 HCG를 特異的으로 染色하였다.

脫 paraffin 한 切片들은 水洗를 거친뒤 4°C 의 pH 7.4, 0.05M phosphate buffered saline(以下 PBS로 略記)으로 30分間 洗滌하고 抗體液으로 反應시켰다. 第1抗體인 anti-HCG液 몇방울을 떨어뜨려 完全히 液이 切片을 덮은 뒤 室溫에서 30分間 反應시켰다. 이때 乾燥되면서 抗體液이 濃縮될 可能性에 對備하여 시계접시

로 反應시키는 slide glass全體를 덮었으며 濕度를 維持시키기 爲하여 젖은 濾過紙를 slide glass의 바닥에 깔아 놓았다. 反應이 끝난뒤에는 다시 4°C 의 PBS로 約 30分間 洗滌하였으며 이때 3次에 걸쳐 新鮮한 PBS를 交換하여 줌으로써 切片上에 結合되지 않은 抗體가 남아 있지 않도록 하였다.

第2抗體인 anti-RGG-peroxidase도 第1抗體와 같은 方法으로 反應시켰으며 PBS로 洗滌한뒤 標識된 酵素에 對한 組織化學的 染色反應을 施行하였다. 反應液은 0.05 M, pH 7.6의 tris buffer液에 3,3'-diaminobenzidine을 飽和시키고 여기에 hydrogen peroxide를 0.001%가 되게끔 加한 것으로서 이 液에 組織切片을 40分間 浸漬시킨뒤 蒸溜水로 充分히 洗滌하고 1% osmium tetroxide로 呈色強化와 後固定을 兼하여 施行하였다. 다시 徹底한 水洗後 脫水過程을 거쳐 xylene을 通過시킨뒤 balsam으로 封入하여 檢鏡하였다.

調査方法 :

酵素標識抗體로 染色反應을 시킨 組織은 特異抗原部位만 選擇의으로 染色되므로 나머지 部位는 淡黃色乃至는 無色을 띠게 되며 微細構造物들의 位置鑑別은 一般的인 hematoxylin-eosin 染色 標本과 對照하면서 觀察하였다.

特異反應을 일으킨 部位의 反應程度를 表示함에 있어서는 生理的食鹽水를 注射한 對照群, anti-HCG代身 normal rabbit serum (NRS로 略記) 1:100 稀釋液으로 反應시킨 對照群들과 比較하여 反應이 陽性으로 나타난 呈色程度에 따라 識別이 曖昧한 것은 (±)로, 微弱한 程度는 (+)로, 中等度는 (++)로, 강한 強度는 (###)로 區分하였으며 이 基準은 觀察者의 主觀的인 判斷에 依存하였다.

成 績

Anti-HCG의 特異性

Anti-HCG는 抗原인 HCG에 對해 特異的으로 結合되며 腦下垂體前葉의 luteinizing hormone(LH로 略記)과는 特異的 交叉反應이 일어남을 考慮하여 注射한 HCG를 染色함에 있어 恒常 腦下垂體前葉의 組織切片을 觀察對象이 되는 器官의 組織들과 同時에 反應시켜 腦下垂體前葉의 LH細胞의 顆粒이 강한 陽性反應이 일어났음을 確認한後 나머지 切片들을 調査觀察하였다. 이것은 陽性反應의 程度를 規定하는 基準도 되었으며 anti-HCG의 特異性을 證明하는 한 方法으로도 適用될수 있었다.

實際로 反應시킨 結果에 있어 腦下垂體前葉의 LH細胞顆粒들은 例外없이 강한 陽性反應을 나타냈으며 또하나

Table 1. Results of immunohistochemical reaction stained with anti-HCG and NRS respectively followed by anti-RGG-peroxidase

Serum used	HCG injected rats		Saline injected rats	
	LH cells	Leydig cells	LH cells	Leydig cells
Anti-HCG	+	+	+	-
NRS	-	-	-	-

※ Without concerning the intensities the results are expressed as (+) if the reaction was positive and as (-) if it was negative.

Table 2. Reaction densities of localized HCG under the various time intervals on the testis of the rats

Time after injection	No. of rats	Dosage of injection	Interstitial tissue				Seminiferous tubule				Tunica albuginea
			Fibroblast	Cells of Leydig	Capillary	The other tissue	Wall	Sertoli cells	Spermatocytes	Lumen	
5min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	-	-	±	-	-	-	-	-	+
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	±	+	+	±	±	-	-	-	+
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	±	+	+	-	±	-	±	-	+
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	+	##	±	-	+	+	-	-	±
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 hrs	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	±	+	-	-	+	+	±	-	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24hrs	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	±	+	-	-	-	±	-	-	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-

의 對照가 되는 NRS로 反應시킨 切片에서는 陰性을 나타낸 結果로 보아 anti-HCG는 特異성이 높으며 따라서 이 抗血清으로 反應시켰을때 陽性으로 나타난 部位는 注射한 HCG가 蓄積된 部位임을 主張함에 無理가 없다고 하겠다. 生理的 食鹽水로 注射한後 同一時間에 屠殺한 對照群의 組織切片에서는 anti-HCG로서 腦下垂體 LH 顆粒만이 陽性反應을 보였고, 實驗群에서 陽性反應을 보였던 辜丸組織에서 陰性을 보인 結果는 陽性部位가 HCG임을 더욱 強力히 뒷받침해주는 證據로 볼수 있다.

注射後 5分群 :

HCG 1mg을 注射한지 5分後에 屠殺한 動物에서는 모두 陰性反應을 나타냈고 다만 腦下垂體 前葉의 LH細胞顆粒만이 強한 陽性反應의 暗褐色 色調를 나타냈다. HCG 5mg을 注射한 動物에서도 結果는 同一하여 LH細胞顆粒만이 陽性이었다. HCG 30mg을 注射한 動物에서는 辜丸의 間質組織中에 있는 毛細血管內腔에서 認知될만한 微弱한 陽性反應物質이 染色되었고 辜丸實質을 둘러싸고 있는 白膜의 結合組織(主로 膠原纖維間隔)에서 弱한 陽性反應이 있었음이 觀察되었다. 그밖의 組織으로서 精管의 上皮 밑에 있는 結合組織部位에서 亦是 認知될만한 微弱한 陽性이 나타났을뿐 나머지 器官의 組織들에서는 모두 陰性反應을 보였다. 腦下垂體에서는 LH顆粒이 陽性이었다. 生理的 食鹽水를 注射한 흰쥐에서는 腦下垂體 LH顆粒을 除外하고는 모든 組織에서 陰性이었다.

注射後 15分群 :

HCG 1mg을 注射한後 15分에 屠殺한 흰쥐에서는 腦下垂體 LH顆粒을 除外하고는 모든 器官의 組織들에서 陽性反應이 전혀 觀察되지 않았음은 注射後 5分群의 境遇와 같았다. HCG 5mg을 注射한 動物에서는 調査한 모든 器官에서 亦是 反應은 陰性이었으며 腸間膜淋巴節의 髓質에서 認知될만한 微弱한 陽性反應이 몇몇 巨噬細胞에서 觀察되었다. 腦下垂體 LH顆粒은 如前히 強한 陽性反應을 보였다. HCG 30mg을 注射한 흰쥐에서 陽性反應은 여러 組織에서 나타났다. 即 辜丸에서는 間質에서 Leydig細胞와 毛細血管內腔에 弱한 陽性物質이 反應되었고 纖維母細胞, 結合組織纖維間隔에서 微弱한 陽性反應이 認知되었다. 白膜에서는 弱한 反應이 繼續 觀察되었고 精細管의 壁에도 微弱한 陽性反應을 認定할수 있었다.

副辜丸에서는 副辜丸管의 上皮細胞와 基底膜, 그리고 그 밑에 位置하는 平滑筋細胞에서 認知될만한 陽性反應이 보였고, 管들 사이의 結合組織에서도 弱한 陽性反應

이 觀察되었다. 精管에서는 上皮와 筋肉層사이의 結合組織에서 微弱한 反應이 보였다. 淋巴節의 巨噬細胞는 陽性反應이 同一時間의 HCG 5mg 注射群보다 더욱 確實하게 나타났고 肝臟의 靜脈洞을 被覆하고 있는 噬細胞인 Kupffer cell에서 微弱한 反應이 認定되었다. 甲狀腺 및 腎臟의 組織에서는 모두 陰性이었고 腦下垂體 LH顆粒은 如前히 強한 陽性이었다. 正常對照群에서는 LH顆粒을 除外한 모든 部位가 陰性이었다.

注射後 30分群 :

HCG를 1mg 注射한 흰쥐 및 5mg 注射한 흰쥐에서는 腦下垂體 LH顆粒을 除外하고는 모두 陰性이었으며 淋巴節의 巨噬細胞들만이 微弱한 陽性反應을 보였을뿐이다. HCG를 30mg 注射한 흰쥐들에서는 注射後 15分群에 比하여 어느 組織에서는 더 뚜렷이 나타났는가 하면 어느 組織에서는 微弱하나마 陽性을 보이던 것이 陰性이 되는等 變化가 많았다. 即 辜丸에서는 間質의 纖維母細胞, 毛細血管, 精細管壁, 白膜등은 注射後 15分群과 거의 같은 程度의 反應狀態를 보였으나 間質結合組織間隔에서는 消滅되어 陰性이 되었고 새로이 精細管의 精母細胞에서 微弱한 反應을 보였는가 하면 間質의 Leydig細胞에서는 中等度의 陽性이 觀察되었다. 이 反應은 모든 Leydig細胞에 나타나지는 않았으며 또 陽性細胞間에도 그 程度가 均等한 것은 아니었다. 陽性反應部位 即 注射로 投與된 HCG로 示做되는 이들 物質은 Leydig細胞의 細胞質中에 어떤 細胞에서는 顆粒모양으로, 어떤 細胞에서는 比較的 輪廓이 不分明한 덩어리로 나타났으며 적은 數의 細胞에서는 細胞質內에 比較的 均等한 褐色調를 띠는 것도 더러 있었다.

副辜丸에서는 上皮細胞와 基底膜部位에서 좀더 뚜렷해졌고 平滑筋纖維와 結合組織에서는 注射後 15分群의 그것들과 거의 비슷한 程度였다. 精管에서는 結合組織에서 좀더 確實하게 反應되었고 새로이 上皮細胞에서도 弱한 陽性反應을 나타냈다. 淋巴節의 巨噬細胞는 더욱 強한 陽性이었고 肝臟의 Kupffer cells에서도 反應은 좀더 뚜렷해졌다. 甲狀腺 및 腎臟에서는 繼續 陽性反應을 觀察할수 없었다.

生理的 食鹽水로 注射한 對照群에서는 腦下垂體를 除外한 모든 器官에서 陽性反應部位는 없었다.

注射後 60分群 :

HCG의 投與量이 1mg 및 5mg이었던 動物에서는 注射後 60分이 經過하였어도 反應은 거의 없었으며 다만 淋巴節의 巨噬細胞들 및 肝臟의 Kupffer細胞들만이 微弱한 陽性反應을 보였을 뿐이고 腦下垂體에서만은 繼續 強한 陽性을 나타냈다.

Table 3. Reaction densities of localized HCG under the various time intervals on the epididymis, ductus deferens and pituitary gland of the rats

Time after injection	No. of rats	Dosage of injection	Epididymis				Ductus deferens		Pituitary glands			
			Epithel.	Basal lamina	Smooth m. cells	Connect. tissue	Epithel.	Connect. tissue	Acidophils	Basophils	Chromo-phobes	Sinusoids
5 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 30 mg	-	-	-	-	-	±	-	-	(#)	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
15 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 30 mg	±	±	±	+	-	±	-	-	(#)	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
30 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 30 mg	+	+	±	+	-	-	-	-	(#)	-
	2	saline	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
60 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 30 mg	+	+	±	-	-	±	-	-	(#)	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
5 hrs	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 30 mg	+	+	±	-	-	+	-	-	(#)	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
24 hrs	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	HCG 30 mg	+	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	(#)	-

Table 4. Reaction densities of localized HCG under the various time intervals on the lymph node, liver, thyroid gland, kidney of the rats

Time after injection	No. of rats	Dosage of injection	Lymph node			Liver		Thyroid gland		Kidney	
			Capsule	Lymph nodule	Macro-phages	Plasma cells	Hepatic cells	Kupffer cells	Foll. epith	Conn. tissue	Glomerulus
5 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60 min	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 hrs	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 hrs	2	HCG 1 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 5 mg	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2	HCG 30 mg	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	2	Saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-

30 mg 의 HCG 를 投與한 動物에서는 特異反應部位에서 그 陽性의 程度가 가장 強하였던 時期였다. 即 辜丸의 間質에서 Leydig 細胞는 強한 陽性을 보였고 纖維母細胞와 毛細血管에서는 微弱한 陽性을, 精細管에서는 壁에서 弱한 反應을, 그리고 Sertoli 細胞에서 처음으로 弱한 陽性反應이 觀察되었다. 白膜에서는 陽性程度가 微弱해졌다.

副辜丸에서는 上皮細胞가 中等度の 陽性을, 基底膜이 弱한 陽性, 그리고 平滑筋細胞가 微弱한 陽性을 各各 나타냈다. 精管에서는 上皮細胞가 弱한 陽性反應, 結合組織이 微弱한 反應을 보였으며 淋巴節 巨噬細胞는 더욱 強한 陽性反應을 보였을뿐 아니라 陽性細胞의 數도 注射後 15分群이나 30分群에 比하여 增加된것 같았다. 肝臟의 Kupffer 細胞도 注射後 30 分群보다 더욱 뚜렷한 中等度の 反應을 나타냈다.

甲狀腺과 腎臟에서는 陰性이었고 對照群에서도 모두 陰性이었으며 腦下垂體 LH 顆粒만이 陽性을 보였다.

注射後 5 時間群 :

1 mg 또는 5 mg 의 HCG 를 投與한 흰쥐에서 微弱하나 陽性反應을 認知할수 있었던 곳은 淋巴節과 肝臟의 巨噬細胞들 뿐으로서 나머지 器官의 組織들에서는 모두 陰性이었다.

30 mg 의 HCG 를 注射한 群에서는 辜丸間質의 Leydig 細胞도 中等度の 陽性으로 注射後 60分群에 比해 弱화되었고 毛細血管의 陽性物質은 消失, 纖維母細胞는 如前히 微弱한 反應을 보였다. 精細管의 壁은 弱한 陽性, Sertoli 細胞는 中等度, 精母細胞는 微弱한 陽性反應을 나타냈고 白膜에서는 陽性物質을 觀察할수 없었다.

副辜丸의 上皮細胞는 反應이 弱화되었고 基底膜, 筋細胞 및 精管의 上皮細胞等은 注射後 60分群과 거의 비슷하였다. 다만 精管의 結合組織에서는 陽性物質이 完全히 消失되었다.

淋巴節과 肝臟의 巨噬細胞에서는 繼續 強한 陽性을 觀察할 수 있었고 其他 組織 및 甲狀腺과 腎臟에서는 如前히 觀察되지 않았다.

注射後 24 時間群 :

HCG 1 mg 및 5 mg 注射群에서의 所見은 注射後 60分 및 5時間群의 그것과 같았으며 30 mg 의 HCG 를 注射한 群에서도 前記한 實驗群들에 比해 훨씬 陽性程度가 낮아졌다. 辜丸間質의 Leydig 細胞만이 中等度の 反應으로 남아 있었고 纖維母細胞와 精細管의 Sertoli 細胞는 微弱한 陽性을 보였으며 副辜丸의 上皮가 弱한 陽性을 보였다.

淋巴節과 肝臟의 巨噬細胞들은 繼續 強한 陽性反應이

남아있음을 觀察하였다. 腦下垂體 LH 顆粒 亦是 如前히 強한 陽性이었고 對照群에서는 腦下垂體를 除外하고는 모두 陰性反應을 나타냈다.

考 按

HCG 와 Anti-HCG 와의 關係

Anti-HCG 가 HCG 에 對하여 特異的으로 免疫學的結合을 하므로 Midgley(1962) 등은 螢光抗體法으로 사람 胎盤組織의 syncytiotrophoblast 에서 HCG 를 證明하였고 沈等(1970)은 酵素抗體法으로 妊娠各周期の 사람胎盤에서 HCG 의 變動狀況을 證明한바 있다. 한편 anti-HCG 가 腦下垂體 LH 와 特異的으로 交叉反應을 일으킴을 報告한 Midgley 等 (1961)의 研究結果에 따라 사람의 腦下垂體 LH (Midgley 1963) 및 흰쥐의 LH (Monroe 1966, 1969, Baik 等 1969) 를 組織切片上에서 染色할수 있게 되었다. 따라서 HCG 를 흰쥐에 投與하였을 境遇 Anti-HCG 로 免疫學的인 結合을 할수 있는 것은 投與되어 組織內에 蓄積된 HCG 와 生體內에서 形成되어 있던 LH 의 두가지가 豫想된다. 그中 LH 의 境遇는 腦下垂體의 特定된 鹽基好性細胞의 一部에서 높은 濃度로서 存在하고 一旦 放出이 되어 血中 또는 標的器官에 到達될때에는 그 量이 微少하므로 組織化學的으로 檢定하기는 어렵고 따라서 腦下垂體 LH 顆粒만이 強한 染色反應을 나타내게 된다. HCG 를 體外에서 注射로 投與할 境遇 그 量이 微少한 境遇에는 亦是 組織化學的檢定은 不可能해진다. 本實驗에서도 이러한 結果는 明白히 나타나 1mg 乃至는 5mg 을 投與한 實驗群에서는 染色이 거의 不可能하였고 30mg 投與群에서 비로서 뚜렷한 陽性反應이 可能하였다. HCG 注射群의 LH 細胞와 Leydig 細胞가 anti-HCG 에 陽性反應을 보인 反面 NRS 를 第 1 抗體代身에 使用한 對照群에서는 모두 陰性을 보인 結果는 anti-HCG 가 既存의 LH 및 投與한 HCG 와 모두 特異反應을 일으켰음을 나타내는 것으로 볼수 있고 또 하나의 對照群인 食鹽水注射群에서는 既存의 LH 顆粒만이 陽性을 보인 結果가 이 anti-HCG 의 特異性을 더욱 強力히 뒷받침 해주고 있다고 보아야 할것이다.

HCG 投與濃度와 染色反應程度와의 關係 :

HCG 1mg 을 投與한 動物群에서는 時間經過의 長短에 不拘하고 陽性反應을 보인것은 전혀 없었으며 다만 腦下垂體 LH 顆粒만이 強한 陽性反應을 보인것은 HCG 投與量이 檢定될수 있는 限界以下인것으로 解釋되며 5mg 投與群에 있어서도 淋巴節 및 肝臟의 巨噬細胞에서 의 微弱한 噬作用에 依해 感知된 程度의 反應을 보인

것으로 보아 이 量 亦是 免疫組織化學反應의 限界以下인 것으로 보인다.

HCG 投與量이 30mg 인 實驗群에서는 時間經過에 따른 差異는 있으나 反應에 感知될 수 있는 充分한 量으로 보인다. 따라서 本實驗의 結果分析은 30mg 投與群을 基準으로 하여야 適切할 것이 아닌가 보여진다.

器官別 反應樣相

時間經過의 長短에 不拘하고 陽性反應을 보인 器官은 辜丸, 副辜丸, 精管, 淋巴節, 肝臟 등이었으며 甲狀腺과 腎臟에서는 全혀 陽性反應을 觀察할 수 없었다. HCG의 標的器官으로서의 가장 代表的인 辜丸은 間質細胞, 精細管上皮의 Sertoli 細胞 및 精母細胞에서 陽性을 보였고 其他部位 即 白膜, 毛細血管等은 血流를 따라 到達되던 途中의 것으로 考慮된다. 特히 間質組織中 纖維母細胞에 나타난 微弱한 陽性反應은 이것만으로서 HCG의 標的이 될 수 있다고 생각하기에는 證據가 不足하므로 論議對象에서 除外되어야 할 것이다. 副辜丸 및 精管의 境遇도 이와 恰似하여 上皮細胞들을 除外한 基底膜, 平滑筋細胞, 結合組織等의 陽性反應은 標的의 對象이 될 수 있다고 確信하기는 힘들다. 그러나 副辜丸管 上皮下의 平滑筋細胞에서는 微弱하나마 陽性이지만 精管壁을 이루는 筋肉層에서는 이것이 陰性이었음에 비추어 HCG가 어떤 機轉에 의해 副辜丸에 作用할 수 있을 可能性도 內包하고 있는 것으로 보아도 無妨할 것 같다.

淋巴節과 肝臟에서 보인 反應은 모두가 巨噬細胞에 의한 異種蛋白의 吮作用結果에 의한 것이라고 보아야 할 것이다. 腎臟에서는 絲球體에서 陽性反應이 있는 物質이 停滯되지 않은 것으로 보아 HCG 分子의 크기로는 쉽게 濾過되었기 때문인 것으로 보이며 實際로 妊娠婦의 尿中에서 HCG가 多量 排泄되는 現象으로 보아 이것은 首肯이 될 수 있다.

Mancini 등(1966)은 LH의 位置檢定을 螢光을 標識한 hormone을 投與함으로써 觀察한 그의 報告에서 LH는 辜丸, 副辜丸에서 觀察되었고 그 밖의 生殖器官 또는 다른 內分泌器官에서는 陰性이었음을 記述하고 있다. 또 그는 腎臟의 尿管上皮細胞에서도 觀察되었음을 報告하면서 이것은 標識한 hormone의 異種성과 變性에 起因하는 것 같다고 主張하였다. 이러한 Mancini 등의 報告는 本實驗結果에서 나타난 精管上皮의 陽性反應 및 尿管上皮의 陰性反應과는 差異가 있으며 Sertoli 細胞에서 나타났던 HCG의 陽性反應과도 差異가 있었다. 그러한 差異들은 HCG의 指向성에 따른 것이라기 보다는 反應過程의 差異 및 投與한 hormone 自體의 量, 標識與否 및 標識螢光의 時間經過에 따른 消滅성과 더욱 깊은

聯關이 되는 것 같다.

注射後時間과 陽性部位 :

靜脈內注射로 投與한 HCG가 組織에 到達할 수 있는 時間은 매우 짧다. 그러나 末梢血管에서 組織으로 浸透되어 다시 擴散되어 細胞에 까지 到達되는데는 어느 程度의 時間이 所要될 것으로 推測되며 이러한 點에서 注射後 5분에 辜丸의 實質에 앞서 白膜에 나타난 陽性物質은 器官의 血管分布狀況으로 보아 當然하며 比較의 出現이 빠른 15分後의 巨噬細胞의 陽性物質들도 靜脈洞의 構造 및 位置로 보아 首肯이 간다. 그러나 一般적으로 注射後 15分의 陽性反應은 弱하였고 30분이 經過된 實驗群에서 비로서 강한 陽性이 나타난 것으로 보아 靜脈內注射로 投與하였을 境遇 活潑히 細胞內에 蓄積되는 것은 最少限 30分後라야 된다는 것으로 解釋될 수 있다. 그리고 陽性物質의 反應程度가 60分後에 더욱 強力해진 것은 繼續 HCG의 到達이 있다는 것으로 解釋되고 注射한 後 5時間 또는 24時間에는 漸次 呈色程度가 낮아지는 것으로 보아 注射後 60분이 고비인 것으로 보여지나 本實驗에서는 60分에서 5時間사이의 觀察이 없었으므로 60分以後에 더욱 강한 反應이 오는지 與否는 斷言하기 어렵다. 비록 色調는 低下되었으나 24時間後까지도 陽性物質의 反應이 있었던 것으로 보아 投與한 HCG의 組織內에서 停滯하는 時間은 相當히 긴 것으로 看做된다.

腦下垂體 LH 細胞의 顆粒은 投與量別, 時間別에 關係없이 繼續 一定한 程度의 강한 反應을 보인 것은 두가지 面을 考慮하는데 도움이 되고 있다. 即 實驗에 適用한 免疫組織化學反應이 特異성이 있었다는 點과 비록 短期間이지만 HCG 注射가 腦下垂體 LH 顆粒의 變動에는 뚜렷이 어떤 影響을 미치는 것 같지 않다는 點이다.

結 論

靜脈內注射로 靚취에 投與한 HCG가 投與後 時間別, 容量別, 器官別로 어떤 相異한 反應을 나타내는 지를 觀察하기 위하여 1mg에서 30mg에 이르는 HCG를 各各 注射하고 注射後 5分에서 24時間에 이르는 여러 時期에 靚취들을 犧牲시켜 그 切片을 anti-HCG와 anti-RGG-peroxidase로 染色함으로써 位置檢定을 하여 다음의 結論을 얻었다.

1. 辜丸 實質의 Leydig 細胞에서 가장 강한 HCG의 陽性反應을 나타냈으며 그밖에도 精細管의 一部細胞와 副辜丸, 精管 上皮等에서도 弱한 陽性反應이 觀察되었다.
2. 肝臟 및 淋巴節의 巨噬細胞들에서 나타난 강한 陽性反應은 異種蛋白을 捕喰한 結果로 보이며 標的 器官은



로 看做되기는 어렵다.

3. 組織切片上에서 酵素標識抗體法으로 位置檢定을 할수 있었던것은 HCG를 30 mg 注射한 境遇이었으며 그 以下의 投與量에서는 陽性反應이 나타나지 않았다.

4. HCG 注射後 30分에 明確히 反應되기 시작하였으며 60分後까지는 時間經過에 따라 더욱 反應이 強해졌다.

5. 組織 또는 細胞內에 到達된 HCG는 部位에 따라 24時間까지도 變性이 없이 머물러 있음이 觀察되었다.

ABSTRACT

Immunohistochemical Localization of Injected Human Chorionic Gonadotropin in the Rat Tissues

Byung Te Suh, Sang Ho Baik

Department of Anatomy, College of Medicine
Seoul National University

Forty eight male rats weighing 140-170 gm were injected intravenously with 1 to 30 mg of human chorionic gonadotropin. The localization of this hormone within 5 minutes to 24 hours after injection was carried out immunohistochemically using the specific rabbit anti-human chorionic gonadotropin and sheep anti-rabbit gamma globulin labeled with horseradish peroxidase followed by enzyme staining and then was examined under the ordinary light microscope.

The most frequent and intense reaction sites were the cells of Leydig of the testis, epithelial cells of ductus epididymis, and ductus deferens. Some localization of hormone was also observed in the tunica albuginea of the testis, macrophages of the mesenteric lymph node, and Kupffer cells of the liver. No positive reactions were observed in the thyroid gland and the kidney. In the pituitary gland, endogenous luteinizing hormone which is known as having specific cross reaction with the anti-human chorionic gonadotropin was localized intensely both in the experimental and control group of rats.

Positive reaction was appeared weakly 15 minutes after injection of hormone and was reached to maximum intensity 60 minutes after injection, thereafter intensities were reduced gradually.

We failed to localize HCG in the rats which were injected 1 mg and 5 mg of hormone respectively. Control group of rats did not reveal any positive

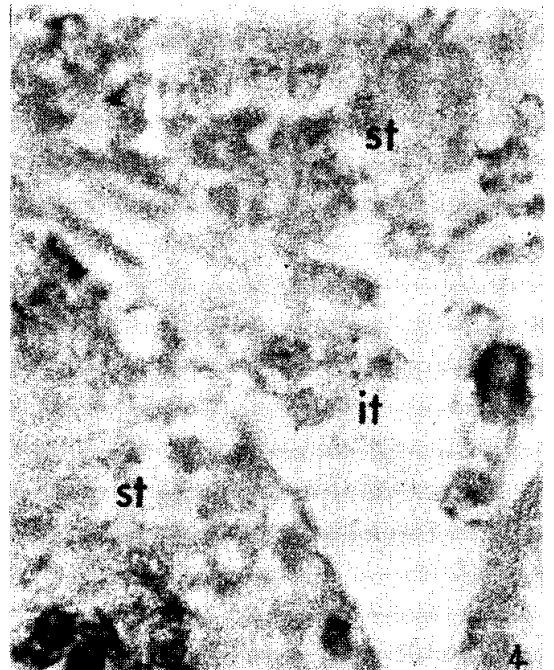
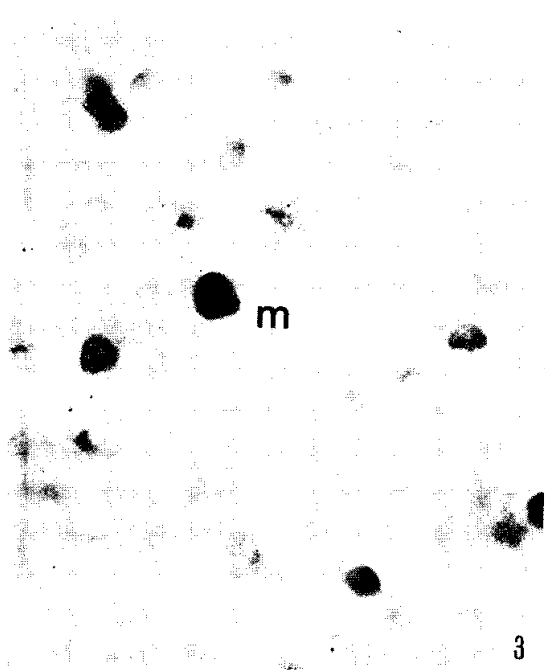
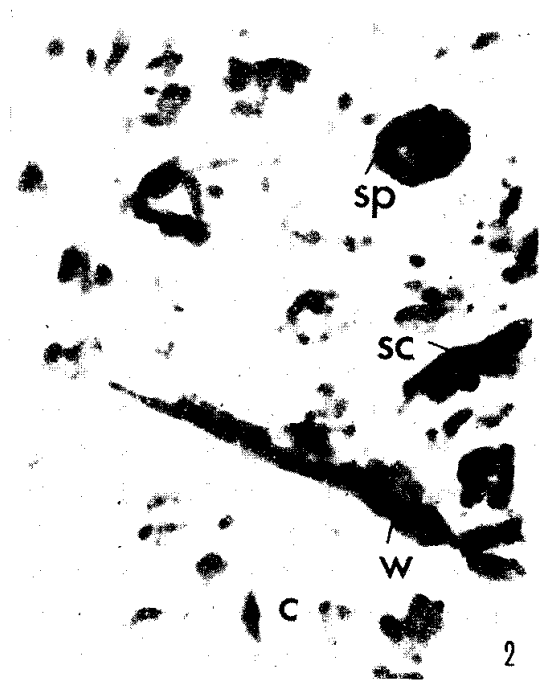
reaction site except the luteinizing hormone granules of the pituitary glands.

REFERENCES

- 1) Baik, S.H., Lee, K.H., Rha, B.J., Kang, J.B. and Chung, B.S.: *Immunohistochemical localization of LH and FSH in the rat pituitary gland. Kor. J. Anat.* 2:61, 1969.
- 2) Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. and Berliner, E. J.: *The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. J. Immunol.* 45:159, 1942.
- 3) De Robertis, E. and Mancini, R.E.: *Ultrastructure and localization of labeled TSH in the thyroid gland. 1963(cited from Mancini, 1966).*
- 4) Dipalma, J.R.(ed.): *Chorionic gonadotropin. In: Pharmacology in Medicine, 3rd ed., McGraw-Hill Co., New York, 1965.*
- 5) Kretser, D. M., Catt, K. J., Burger, H. G. and Smith, G. C.: *Radioautographic studies on the localization of ¹²⁵I-labelled human luteinizing and growth hormone in immature male rats. J. Endocrinol.* 43:105, 1969.
- 6) Mancini, R.E., Vilar, O., Dellacha, J.M., Davidson, O. W. and Castro, A.: *Histological localization in rat tissues of intravenously injected thyrotrophin labeled with fluorescent dye. J. Histochem. Cytochem.* 9:271, 1961.
- 7) Mancini, R.E., Vilar, O., Alvarez, B. and Seiguer, A.C.: *Extravascular and intratubular diffusion of labeled serum proteins in the rat testis. J. Histochem. Cytochem.* 13:376, 1965.
- 8) Mancini, R.E., Castro, A. and Seiguer, A.C.: *Histologic localization of follicle-stimulating and luteinizing hormones in the rat testis. J. Histochem Cytochem.* 15:516, 1966.
- 9) Midgley, A.R. Jr., Pierce, G.B. Jr. and Weigle, W.O.: *Immunological identification of human chorionic gonadotropin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108:85, 1961.
- 10) Midgley, A.R. Jr. and Pierce, G.B. Jr.: *Immunohistochemical localization of human chorionic gonadotropin. J. Exp. Med.* 115:289, 1962.
- 11) Midgley, A.R. Jr.: *Immunofluorescent localization of human pituitary luteinizing hormone. Exp. Cell Res.* 22:606, 1963.
- 12) Monroe, S.E. and Midgley, A.R. Jr.: *Localization of luteinizing hormone in the rat pituitary gland by a cross-reaction with antibodies to human chorionic gonadotropin. (abstract) Fed.*



- Proc.* 25:315 (709), 1966.
- 13) Monroe, S.E. and Midgley, A.R. Jr.: *Immunofluorescent localization of rat luteinizing hormone.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130:151, 1969.
 - 14) Nakane, P.K. and Pierce, G.B.¹⁾: *Enzyme labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens.* *J. Histochem. Cytochem.* 12:929, 1967.
 - 15) Nakane, P.K. and Pierce, G.B.²⁾: *Enzyme labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens.* *J. Cell Biol.* 33:307, 1967.
 - 16) Nakane, P.K.: *Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase labeled antibody method: A study on pituitary glands of the rat.* *J. Histochem. Cytochem.* 16:557, 1968.
 - 17) Nakane, P.K., Rebar, W. and Midgley, A.R.: *Changes in rat pituitary cell containing luteinizing hormone(LH) during post-partum LH release studied with peroxidase-labeled antibody method.* *Excerpta Medica* 157:103, 1968.
 - 18) Parker, M.L., Jarett, L., Schalch, D.S. and Kipnis, D.M.: *Rat growth hormone: immunofluorescent and radio-immunologic studies.* *Endocrinology* 76:628, 1965.
 - 19) Petrovic, A. and Linck, G.: *Further radioautographic studies on the site of the thyroglobulin iodination reaction. (abstract)1966 (cited from Mancini 1961)*
 - 20) Rogers, A.W., Thomas, G.H. and Yates, K.M.: *Autoradiographic studies on the distribution of labeled progesterone in the uterus of the rat.* *Exp. Cell Res.* 40:668, 1965.
 - 21) Sar, M., Liao, S. and Stumpf, W.E.: *In vivo and in vitro autoradiographic studies with ³H testosterone in the ventral prostate.(abstract)* *Fed. Proc.* 28:707, 1966.
 - 22) 沈載道, 李懸式, 白相豪: *妊娠各周期에 있어서의 HCG의 免疫組織化學的 染色.* *大韓解剖學會誌* 3:23, 1970.
 - 23) Siperstein, E.R.: *Identification of the adrenocorticotrophin-producing cells in the rat hypophysis by autoradiography.* *J. Cell Biol.* 17:521, 1963.
 - 24) Sonenberg, M., Keston, A.S. and Money, W.L.¹⁾: *Studies with labeled anterior pituitary preparation: adrenocorticotropin.* *Endocrinology* 48:148, 1951.
 - 25) Sonenberg, M., Money, W.L., Keston, A.S., Fitzgerald, R.J. and Godwin, J.T.²⁾: *Localization of radioactivity after administration of labeled prolactin preparation, to the female rat.* *Endocrinology* 46:707, 1951.
 - 26) Sonenberg, M. and Money, W.: *The fate and metabolism of anterior pituitary hormones.* *Recent Progr. Hormone Res.* 11:43, 1954.
 - 27) Sri Ram, J., Nakane, P.K., Rawlinson, D.G. and Pierce, G.B.: *Enzyme-labeled antibodies for ultrastructural studies.* *Fed. Proc.* 25:732, 1966.
 - 28) Stumpf, U.E.: *Cellular and subcellular ³H estradiol localization in the pituitary by autoradiography.* *Z. Zellforsch* 62:23, 1968.
 - 29) Stumpf, W.E.: *Subcellular distribution of ³H estradiol in rat uterus by quantitative autoradiography, a comparison between ³H estradiol and ³H norethynodrel.* *Endocrinology* 83:777, 1968.
 - 30) Wollman, S.H. and Wodinsky, I.: *Localization of protein-bound I¹³¹ in the thyroid gland of the mouse.* *Endocrinology* 56:6, 1955.
 - 31) Worthington, W.C., Jr., Jones, D.J. and Buse M.G.: *Autoradiographic study of insulin distribution in the rat with special reference to elastic tissue.* *Endocrinology* 74:614, 1964.



Legends for figures

Fig. 1. Photomicrographs of HCG injected rat tissues which were stained immunohistochemically with anti-HCG (1,2,3) and normal rabbit serum (4). $\times 450$

- 1) Testis 60 minutes after injection: Three intensely stained cells of Leydig (arrows) in the interstitial tissue (it) are located between the seminiferous tubules (st).
- 2) Testis 60 minutes after injection: Spermatoocyte (sp), Sertoli cell (sc) and wall of the seminiferous tubule (w) are reacted positively. No positively stained materials are visible in the capillary (c) of the interstitium.
- 3) Mesenteric lymph node 30 minutes after injection: Intensely stained macrophage (m) and several weakly stained macrophages around it contrasted in the other cells of the medulla.
- 4) Testis 60 minutes after injection which was stained with normal rabbit serum instead of anti-HCG. No positive reaction is visible. (st: seminiferous tubules, it: interstitial tissue).

Fig. 2. Photomicrographs of HCG injected rat tissues which were stained immunohistochemically with anti-HCG followed by anti-RGG—peroxidase (1,3,5) and with hematoxylin eosin (2,4,6). $\times 450$.

- 1) Pituitary gland 5 minutes after injection: Endogenous LH granules are darkly stained in the anterior lobe.
- 2) Another section of same block of 1) stained with H-E. Identification of LH cells is very difficult.
- 3) Liver 30 minutes after injection: Darkly stained Kupffer cells (k) are located between the hepatic cords in which the nuclei of hepatic cells (h) are visible. Left lower corner of the picture is the lumen of central vein (cv) of the hepatic lobule.
- 4) H-E stained section of liver tissue.
- 5) Epididymis 15 minutes after injection: Some epithelial cells (ep) revealed positive reaction while the neighboring cells of the same duct and the another duct beside showed negative reaction (itc: intertubular connective tissue).
- 6) H-E stained section of epididymis.

> 徐丙台論文寫真附圖 ② <

