

발생중인 태아 뇌하수체의 「호르몬」 분비세포에 관한 면역 조직화학 및 전자현미경적 연구

Immunohistochemical and Electron Microscopic Studies on the Hormone Secretory Cells in the Developing Adenohypophysis of the Human Fetuses

서울대학교 의과대학 해부학교실
조사선 · 백상호 · 이명복

서 론

태아의 뇌하수체 전엽에서는 여러가지 조직화학반응에 염색되는 호염성 세포들(chromophils)이 나타난다는 것이 비교적 오래전부터 알려져 있으며(Keene 1924, Halpern 1938, Falin 1961, Anderson 1970), 최근에는 극미량을 검출할 수 있는 새로운 「호르몬」검출방법(hormone assay)들이 개발되면서 비교적 이른 시기부터 태아의 뇌하수체나 혈액에서 여러 종류의 단백 「호르몬」이 검출된다는 보고들이 나오고 있다(Fukuchi 1970, Groom 등 1971, Dubois 등 1973, Aubert 1975).

이러한 사실들은 발생중에 있는 뇌하수체 전엽에 「호르몬」을 생성분비하는 세포들이 초기부터 분화되어 그 기능을 하고 있다는 것을 암시한다. 그러나 그 「호르몬」의 화학적 조성이 서로 다르고 그 함량이 극히 미량 이므로 일반조직화학 염색법만으로는 이러한 「호르몬」분비세포들을 선택적으로 감별 염색하는데 많은 어려움이 있다.

한편 비교적 근래에 개발된 효소표지항체법(Nakane 과 Pierce 1966)은 조직내에 들어있는 항원의 위치를 밝히는데 가장 특이성이 높은 것으로 알려져 있으며 특히 「호르몬」항체와 세포내의 「호르몬」과립(tissue antigen)이 일으키는 특이반응을 이용하여 여러 실험 동물의 뇌하수체 전엽에서 각종 「호르몬」 분비세포를 동정 감별하는데 사용되어 왔다(Baker 1969, 1970, Nakane 1970, 심과 백 1972, 박과 백 1973, Herbert 1975, 최 등 1977).

그러나 태생기 뇌하수체의 분비세포를 면역조직화학 반응이나 전자현미경에 의하여 관찰한 보고는 매우 드물고 단편적이어서(Anderson 등 1970, Baker와 Jaffe 1975), 아직도 여러 「호르몬」 분비세포들의 출현시기나

세포학적 성상등에 대하여 밝혀지지 않은 점이 많이 있다. 저자는 이러한 점들에 착안하여 인태아를 재료로 발생중인 뇌하수체 전엽에서 「호르몬」 분비세포의 출현시기, 분포 및 증식정도와 그 미세구조를 관찰하기 위하여 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

재료: 실험에는 표 1에 표시한 바와같이 태령 5주에서 40주에 이르는 정상 태아의 뇌하수체를 사용하였다. 태령과 정상 태아의 관정은 재료를 제공하여 준 병원의 병록과 외관상 관찰, 그리고 태아의 좌고(crown-rump length) 및 체중의 계측치를 이용하여 정하였다(Streeter 1920, 이 1975).

조직처리: 배자전체(whole embryo) 또는 태아의 경우 뇌하수체만을 적출하여 그 중량을 계측한 다음 면역조직화학 반응을 위하여는 Bouin액에 4~6시간 고정 후 70% ethanol에 10여회에 걸쳐 세척함으로써 고정액의 한 성분인 picric acid의 황색 색소를 가능한 한 모두 제거하였다. 통상방법에 따라 탈수과정을 거쳐 paraffin에 포매하였고 5 μ 두께의 연속절편을 만들어 먼저 일반조직화학염색을 시행하여 조직을 선정한 다음 이어서 면역조직 화학반응을 시행하였다. 한편 전자현미경적 관찰을 위하여서는 적절한 조직을 4°C의 2.5% glutaraldehyde용액(0.1M phosphate buffer pH 7.3)에 2~4시간 고정한 다음 1% osmium tetroxide에 후고정하였다. ethanol과 propylene oxide로 탈수하여 Epon 812에 포매하였고 600~900Å의 초박편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate의 이중염색을 시행한 다음 AEI Corinth 500 전자현미경으로 관찰하였다.

항체: 제 1 항체는 사람의 성장 「호르몬」, 최유 「호르몬」 감상선자극 「호르몬」 및 융모성 성선자극 「호르

문]을 각각 토끼에 반복 주사하여 얻은 가토 항[호르몬] 혈청(rabbit anti-hormone serum)으로서 anti-human growth hormone (anti-hGH), anti-human prolactin (anti-hPRL), anti-human thyrotropin (anti-hTSH) 및 anti-human chorionic gonadotropin (anti-hCG) 등을 사용하였으며 제 2 항체로는 horseradish peroxidase가 표지된 sheep anti-rabbit gamma globulin (peroxidase-labeled anti-rGG)을 사용하였는데 이는 정제된 가토의 gamma globulin을 양에 면역하여 얻은 항혈청에서 ammonium sulfate염석법에 의하여 anti-rGG를 분리한 다음 여기에 bifunctional reagent인 FNPS (P, P'-difluoro-m, m'-dinitrodiphenyle sulfone)를 사용하여 화학적으로 horseradish peroxidase(Sigma, Chem.)를 결합시킨 것이다(Nakane Pierce 1966, 1967).

면역조직화학반응: Nakane 및 Pierce(1966, 1967)의 효소표지항체법에 따라 뇌하수체 절편상에서 면역조직화학반응을 시행하였으며 항체들은 모두 예비 실험을 통하여 정한 적정배수로 희석사용 함으로써 비특이적 반응을 가능한 한 배제하였다. 통상방법에 따라 paraffin이 제거된 조직절편을 4°C pH 7.4, 0.05M phosphate buffered saline (PBS)으로 충분히 씻고 제 1 항체를 몇 방울 떨어뜨려 절편을 완전히 덮게 하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 이때 건조를 막고 동시에 습도를 유지하기 위하여 젖은 여파지를 바닥에 깔고 side glass 위를 시계질서로 덮어주었다. 반응이 끝난 뒤에는 다시 PBS로 약 30분간 씻어 줌으로써 절편상에 결합되지 않은 항체가 제거되도록 하였다. 제 2 항체도 제 1 항체와 같은 방법으로 반응시켰으며 이어서 표지된 효소에 대하여 조직화학적 염색반응에 들어갔다. 반응액은 0.05M, pH 7.4 Tris buffer에 3, 3'-diaminobenzidine을 포화시키고 여기에 과산화수소(H₂O₂)를 0.001%가 되도록 첨가시킨 것으로서 이 기질액에 40분간 침적시킨 다음 증류수로 충분히 씻고 1% osmium tetroxide로 정색 강화와 후고정을 결합하여 시행하였다. 이상의 과정을 거친 조직을 통상방법에 따라 수색 및 탈수를 거쳐 balsam봉입한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

관찰방법: 특이항체를 사용한 면역조직화학반응의 결과는 그 해당 항체와 결합한 세포의 과립(항원)만이 갈색으로 나타나고 항체가 결합되지 않은 나머지 조직은 담황색의 비특이적 배경으로 나타나므로 쉽게 반응한 세포를 확인할 수 있었다. 반응을 보인 세포는 그 염색도에 따라 3등급의 부호로 표시하여 태령별로 그 차이를 비교하였고 세포의 계수는 각 주령별 뇌하수체의 연속절편에서 대표적인 10개 절편을 선정하여 450배율

로 절편상에 나타나는 모든 세포를 계수한 다음 시야당 평균 세포수로 환산 비교하였으며 특이세포의 위치 결정에는 인접 절편에서 반응을 일으킨 세포들을 대조 비교하였고, 이밖에 일반조직화학염색을 시행하여 검정에 참고가 되도록 하였다.

성 적

1. 뇌하수체의 발육

태령 5주의 배자(embryo)에서 구강 외배엽의 일부가 뇌저쪽으로 함입되어 생긴 라드케낭(Rathke's pouch)과, 간뇌(diencephalon)의 저부를 이루고 있던 신경외배엽의 일부가 구강쪽으로 돌출되어 이루어진 누두돌기(infundibular process)가 서로 근접되어 있는 것이 관찰되었다. 태령 6주에는 라드케낭과 구강과의 연결이 이미 끊어져 있었으며 낭의 후벽은 누두돌기에 의하여 전방으로 약간 밀려 있는 반면, 전벽에서는 좌우 양면과 중심부에서 세포삭(cell cord)들이 전내방의 간엽조직(mesenchymal tissue)속으로 자라 나와서 마치 "W"자와 유사한 모양을 나타내었다. 8주에는 이 세포삭들이 서로 융합되어 그 안에 간엽조직을 간직하고 있었는데 그 간엽조직내에서 많은 모세혈관들이 관찰되었다. 태령이 증가함에 따라 낭의 전벽에서 증식되어 나온 상피성 세포삭들이 소포(follicle)를 이루면서 서로 분기 분합하여 점차 뇌하수체전엽의 모양을 이루어 갔다. 누두돌기는 라드케낭의 후벽과 접촉하여 하방으로 내려가 결국 신경하수체가 되고 낭의 후벽은 중간부(pars intermedia)가 되는데, 후벽에서의 세포증식은 전벽에서 보다 훨씬 미약하기 때문에 중간부는 좁은 세포층으로 남게 되고, 낭의 내강은 전후벽의 세포증식에 의하여 점차 줄어들어 결국 라드케낭의 유물(residual lumen)로 남게 되었다.

한편 뇌하수체의 중량은 체중과 좌고에서와 같이(제 1 도), 태령 증가에 따라 증가되었으며, 특히 5개월 말부터 급속한 증가를 보였다. 그러나 체중에 대한 뇌하수체 중량의 비율은 15주의 13.7에서 태생 말기에는 3.2로 급격한 감소를 나타내었다(표 1 및 제 2 도).

2. 면역조직화학반응

성장[호르몬]세포: anti-hGH에 대하여 반응을 나타낸 성장[호르몬]세포는 태령 10주에 처음으로 출현되었다(표 2). 이 세포는 세포삭 또는 소포를 이루고 있는 실질세포들 내에서 관찰되었는데, 그 크기가 매우 작고 세포내 과립량도 아주 빈약하였다(제 4 도). 그러나 태령이 증가함에 따라 점차 과립량이 많아졌고 특히 25주 이후부터는 분비과립으로 충만된 세포들이 다

Table 1. Crown-rump length, body weight and hypophyseal weight of the human fetuses studied

Fetal age Month(week)	No. of case	CRL(mm)	Body weight (gm)	Hypoph. wg (mg)	Ratio of hypoph. wgt. to body wgt.
2 (5)	1	8.4	0.3	—	—
(6)	2	14.6	0.5	—	—
(8)	2	27.0	1.8	—	—
3 (10)	1	42.4	5.3	—	—
(11)	1	56.3	10.6	—	—
(12)	2	65.2	18.2	—	—
4 (13)	2	79.1	30.3	—	—
(14)	2	86.1	50.4	—	—
(15)	3	109.3± 4.5*	61.3± 4.0	8.4± 0.85	13.7**
(16)	12	116.2± 7.8	91.0± 7.5	9.3± 1.9	10.2
5 (17)	11	133.8± 5.2	119.8±19.4	10.8± 2.1	9.0
(18)	6	135.6± 2.8	158.5±10.8	12.4± 3.8	7.8
(19)	8	147.1± 2.4	211.7± 8.3	13.9± 3.0	6.5
(20)	8	159.3± 7.3	283.7±15.7	15.5± 4.7	5.4
6(21~24)	27	187.0±17.1	465.2±80.7	25.9± 6.2	5.5
7(25~28)	37	225.4±11.7	780.0±106.4	39.9± 7.6	5.1
8(29~32)	27	261.3± 9.7	1,240.1±155.8	53.6±11.6	4.3
9(33~36)	22	303.9±10.8	1,996.8±157.5	79.3±17.4	3.9
10(37~40)	13	332.9±11.8	2,916.8±383.1	95.2±10.1	3.2

*: Mean±S.D., **: Ratio = $\frac{\text{Hypoph. wgt. (mg)}}{\text{Body wgt. (gm)}} \times 100$

수 출현되었다(제 6 도). 성장「호르몬」세포는 태생 초기부터 뇌하수체 전엽에 비교적 고루 산재되어 있었으며 태생중기나 후기에서도 전엽의 전역에서 관찰되었고 특히 전엽의 외측부(lateral wing)에 많이 나타났다. 시야당 평균 세포수는 태령 3개월에는 25.2에서 태령 8개월의 116.1로 급격한 상승을 보였으며 태생 후

기에는 비슷한 수를 나타내었다(표 3 및 제 3 도).

한편 Hematoxylin & Eosin염색에 의하여는 태령 16 주부터, Masson's trichrom염색에 의하여는 14주부터 산호성 세포들의 출현을 관찰할 수 있었다.

최유 「호르몬」세포 : anti-hPRL에 대하여 반응을 보인 최유 「호르몬」세포는 태령 18주에 처음으로 관찰할 수 있었다(표 2). 이때 이 세포의 모양은 매우 불규칙하고 소량의 세포질을 함유하고 있었으나(제 5 도) 태령이 증가함에 따라 점차 분비과립의 양이 증가된 원형의 세포들이 나타났다. 세포의 분포는 성장「호르몬」세포와 같이 대체로 뇌하수체 전엽에서 고루 관찰되었으나 anti-hGH로 반응시킨 인접 절편과 대조한 결과 성장「호르몬」세포와는 다른 세포임을 확인할 수 있었다(제 6, 7 도). 시야당 평균 세포수는 태령 5개월의 18.0에서 급속히 증가되어 태령 9개월에는 70.8에 이르렀고 태령 9개월과 10개월 사이에는 별로 차이가 없었다(표 3 및 제 3 도).

한편 태령 25주 이후부터는 Azocarmine-Aniline blue-Orange G염색에 의하여 carminophils와 orangeophils를 구별할 수 있었다.

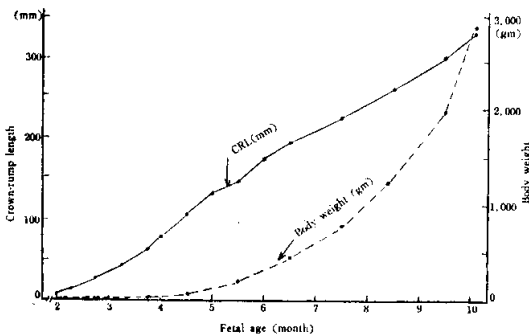


Fig. 1. Changes of crown-rump length and body weight of human fetuses during gestation.

Table 2. Intensity of reactions of specific secretory cells in the fetal adenohypophysis treated with immunohistochemical reactions

Fetal age Month (week)	Cell type			Gonadotroph (LH cell)
	Somatotroph	Mammotroph	Thyrotroph	
2(5~8)	—	—	—	—
3(10~12)	(10+)*	—	(12+)*	(12+)*
4(13~16)	++	—	+	+
5(17~20)	++	(18+)*	++	+
6(21~24)	++	+	++	++
7(25~28)	+++	++	++	++
8(29~32)	+++	+++	+++	++
9(33~36)	+++	+++	+++	+++
10(37~40)	+++	+++	+++	+++

+: weak, ++: moderate, +++: intense, —: no reaction
 *: The numbers indicate the week when the specific cell types first appeared.

Table 3. Average numbers of specific cell types in the adenohypophysis of human fetus

Fetal age Month (week)	Cell types			
	Somatotroph	Mammotroph	Thyrotroph	Gonadotroph(LH cell)
3 (10~12)	25.2± 6.0*	—	9.5± 3.7	21.6± 3.2
4 (13~16)	55.9±13.5	—	18.2± 3.9	35.9± 6.5
5 (17~20)	70.8±16.7	18.0± 4.9	25.3± 6.7	45.5± 5.3
6 (21~24)	87.5±18.6	32.8±14.6	37.1± 7.3	48.2± 6.3
7 (25~28)	104.0±17.5	57.5±16.7	47.9±15.3	53.1±12.1
8 (29~32)	116.1±20.3	63.4±17.3	52.0±15.2	73.7±15.9
9 (33~26)	117.1±15.5	70.8±15.5	52.2±14.9	82.6±17.0
10 (37~40)	116.1±18.2	72.8±15.9	51.2±13.2	81.8±18.9

* Mean±S.D., cell counts/high power visual field

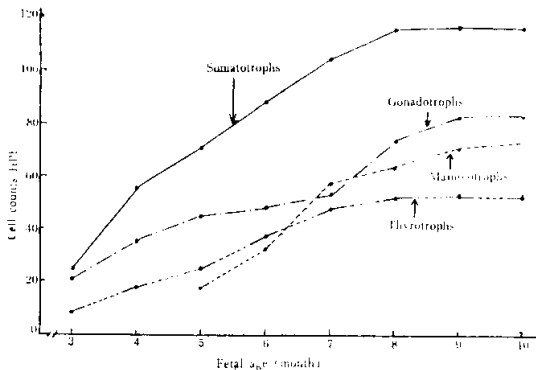


Fig. 3. Changes of average numbers of specific cell types in the adenohypophysis of human fetuses.

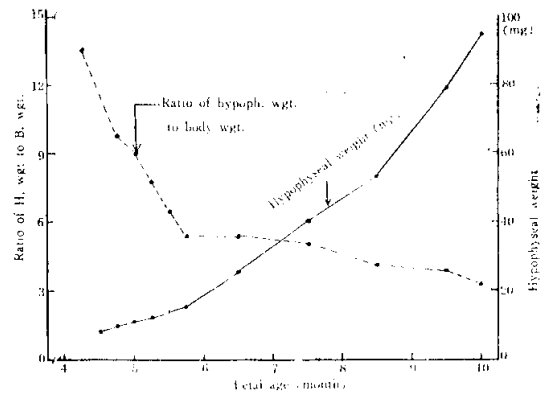


Fig. 2. Changes of hypophyseal weight and the ratio of hypophyseal weight to body weight of human fetuses during gestation.

갑상선자극「호르몬」세포: anti-hTSH에 대하여 반응을 나타낸 갑상선자극「호르몬」세포는 태령 12주에 처음 관찰되었다(표 2). 이 세포들은 흔히 2~3개가 나

란히 인정되어 있었으며 초기에는 소량의 과립을 함유하고 있었으나(제 9도), 태령이 증가함에 따라 긴돌기를 가진 세포들이 자주 나타났고 세포내 과립량도 증가되었다. 세포의 분포는 초기에는 주로 뇌하수체 전엽의 상부에서 나타났고, 태생중기 이후에는 전내부까지 분포되어 있었다. 시야당 평균 세포수는 태령 3개월에는 9.5로 세포형 중 가장 적었으며, 태생중기까지 급속한 증가를 보였고, 태생말기에는 51.2~52.2로 비슷한 수를 보였다(표 3 및 제 3도).

성선자극「호르몬」세포(LH세포): anti-hCG에 대하여 양성반응을 보인 LH세포는 태령 12주에 처음 나타났다(표 2). LH세포는 실질세포의 소포 또는 세포삭들이 간엽조직과 접하는 곳에서 주로 관찰되었으며 세포내 과립량은 6개월부터 증가되어 태생 말기에는

풍부한 과립을 함유한 세포가 출현되었다(제 8 도). 분포는 초기에 뇌하수체 전엽의 상부와 후내부에 많이 나타났고 태생중기 이후에는 전엽에서 광범위하게 관찰되었다. 평균 세포수는 태령 3개월에 21.6에서 9개월에는 82.6으로 급속히 증가되었으나 다른 세포형에서와 같이 태생 말기에는 별로 변화가 없었다(표 3 및 제 3 도).

한편 Aldehyde fuchsin-PAS-Orange G염색에 의하여 감상선「호르몬」세포와의 구별을 시도하였으나 염색성이 좋지 않아 이들 두 종류를 감별할 수 없었다.

3. 전자현미경적 관찰

과립세포 : 태령 12주에 비과립세포들 사이에서 소수의 과립세포를 관찰할 수 있었다(제10도). 태생기의 과립세포들은 그 크기나 세포 내용물의 함유 정도에 있어서 매우 다양한 양상을 보였는데, 대체로 태령이 증가함에 따라 세포의 크기와 과립량이 증가되고, 일부 소기관(organelles)이 현저히 발달된 세포가 많이 보였다. 과립의 크기는 100~700nm로 한 세포내에서도 크기가 다른 과립들이 혼재되어 있었고 세포내의 과립의 위치는 대개 불규칙하게 분포되어 있었으나 간혹 일렬로 세포막에 근접되어 있는 경우도 있었다(제11도). 과립의 전자 밀도에 있어서도 일정하지 않았고 특히 골지장치(Golgi apparatus) 주변부와 그 내에서 전자밀도가 비교적 낮은 과립들이 관찰되었다(제13도). 과립내형질세망(granular endoplasmic reticulum)은 현저히 발달되어 흔히 소조(cisternae)들이 집단을 이루고 있었으며(제12도), 골지장치 내에서 형성중의 과립양 물질을 관찰할 수 있었다(제13도). 이밖에 과립세포내에는 사립체(mitochondria)를 많이 함유하고 있었으며 핵은 원형 또는 타원형으로 하나 또는 두개의 뚜렷한 핵소체를 가지고 있었고 세포질내의 위치는 대개 편심성이었다.

비과립세포 : 태생초기의 비과립세포들은 대부분이 세포질내에 세포 소기관들을 가지고 있지 않아서 투명하게 보였다. 그러나 태생중기에 이르러서는 흔히 세포질내에 아주 작은 전자차밀소체(electron dense particles)를 함유한 비과립세포가 관찰되는 것이 특징적이었고, 이밖에 free ribosome과 polysome은 비교적 많았으나 과립내형질세망과 골지장치의 발달 정도는 미약하였다.

고 찰

효소표지항체법에 의한 염색의 특이성 : 효소표지항체법은 항원과 항체가 일으키는 특이반응(specific re-

action)을 이용하여 조직내에서 항원의 위치를 찾는 방법으로 가장 중요한 것이 항체의 특이성이다. 본 실험에 사용한 항체들은 고도로 정제된 항원으로 면역하여 얻은 것으로서 그 해당 항원과의 특이반응이 증명된 것을 사용하였다(백등 1973, 최등 1977). 「호르몬」과립을 함유하고 있는 세포는 제1항체와 horseradish peroxidase를 표지한 제2항체에 의하여 결합되었고 이 효소가 기질액 속에서 diaminobenzidine을 산화시켜 가지화된 갈색 색소를 침착시켰음은 효소의 활성을 의미하므로 그것은 곧 항원의 소재를 알려주는 것이라고 할 수 있다.

성장「호르몬」세포 : 면역조직화학적 방법에 의하여 사람의 태아에서 성장「호르몬」세포의 출현을 조사한 것은 Ellis등(1966)이 그 시초로서, 태령 14주에 이 세포를 처음 관찰하였다. 이어서 Baker와 Jaffe(1975)에 의하여 이 세포가 태령 11주에 출현된다는 것이 보고되었다. 이러한 점에서 태령 10주에 성장「호르몬」세포를 관찰할 수 있었던 본 실험결과는 시기적으로 가장 앞서고 있다. 성장「호르몬」이 태아 뇌하수체에서 직접 검출되는 시기는 연구 방법에 따라 차이가 있다. 즉 생물검정법(bioassay)에 의하여는 태령 15주(Lovina 1968)에, 방사면역검정법(radioimmunoassay)에 의하여는 10주(Hartman 1972)에 각각 검출됨이 보고되어 있다. 이와같은 시기상의 차이는 곧 「호르몬」을 검출하는 방법이 개선되어 왔음을 의미하는 것으로 사료된다. 한편 태령에 따른 「호르몬」세포의 숫적 변화에 대하여 조사된 보고는 없으나, 태령 16~21주 사이에 산호성세포의 뚜렷한 증가를 관찰하였다는 것이 보고되어 있다(Pearce 1953, Levina 1968). 본 실험에서 성장 「호르몬」세포의 시야당 평균 세포수가 태령증가에 따라 급속히 증가하였으나 태생후기에는 큰 차이를 보이지 않았다. 이와같은 결과는 태생후기에 분비세포의 증식이 정제되는 것이 아니라 태생초기에는 간엽조직 또는 미분화 세포들에 비하여 분비세포의 수가 아주 적지만 이들이 급속히 분화 증식됨에 따라 태생후기에 이르면 분비세포들이 차지하는 비율이 어느정도 일정하게 되기 때문에 시야당 평균 세포수에는 차이를 보이지 않았던 것으로 해석된다.

최유「호르몬」세포 : Conklin(1966)은 태생기 뇌하수체에서 orange G에 염색되는 orangeophils 외에도 erythrosin에 염색되는 또 한 종류의 산호성 세포가 관찰된다고 보고 함으로서 태생기에 최유「호르몬」세포가 출현된다는 것을 암시하였다. 본 실험에서는 이 최유「호르몬」세포를 태령 18주에 관찰할 수 있었다. 그러

나 Baker와 Jaffe(1975)는 면역조직화학반응에 의하여 이세포를 태령 23주이후에 관찰하였다. 이와같은 시기상의 차이는 그들이 사용한 항체가 이중「호르몬」항체(species different antiserum)인 anti-bovine prolactin이었기 때문에 항체 항원의 반응이 보다 약화된 때문이 아닌가 생각된다. 한편 Levina(1968)는 생물검정법에 의하여 태령 18~19주의 뇌하수체에서 prolactin을 처음 검출하였으며, Aubert(1975)는 방사면역검정법에 의하여 뇌하수체의 prolactin량을 측정할 결과 태령 10~14주에 미량이 검출되기 시작하여 20주이후에는 급속히 증가하였다고 한다. 이상의 자료들과 본 실험성적으로 보아 최유「호르몬」세포가 분화되는 시기는 적어도 태령 18주 이전부터 시작되는 것으로 추측된다.

갑상선자극「호르몬」세포: 이 세포는 본 실험에서 태령 12주에 처음 관찰되었으며 다른 연구자들도 태령 12~14주의 뇌하수체에서 갑상선자극「호르몬」을 처음 검출하였다(Giltin과 Biasucci 1969, Fukuchi등 1970, Hartman등 1973). 한편 이「호르몬」의 표적기관(target organ)인 갑상선도 대체로 이 시기에 분비기능이 시작되는 것으로 알려져 있다. Shepard등(1964, 1967)은 태아에서 체중에 대한 갑상선 중량의 비율을 조사한 바 태령 11~12주에 성인에서와 비슷한 비율에 도달하였으며 이때 갑상선소포(thyroid follicle)내의 교질(collloid)의 양이 급격히 증가되었고 이 시기에 갑상선내에 요소(I)의 축적이 관찰되었다고 한다. 그리고 Fisher등(1970)은 태령 12주의 태아 혈액에서 갑상선자극「호르몬」과 thyroxin을 동시에 검출하여 이시기에 뇌하수체와 갑상선이 서로 기능상의 상호관계가 있음을 시사하였다.

성선자극「호르몬」세포(LH cell): anti-hCG를 LH세포의 특이염색에 이용하게 된 것은 Wide등(1961)이 anti-hCG와 뇌하수체 LH가 서로 특이적 교차반응(specific cross reaction)을 일으킨다고 한 실험보고에 근거를 두고 있다. 그후 이 반응을 이용하여 사람의 LH세포(Midgley 1963, Koffler와 Fogel 1964, Baker와 Jaffe 1975, 최등 1977)와 흰쥐의 LH 세포(Monroe 1969, 백등 1973)를 특이염색하는데 이 anti-hCG를 사용하였다. 한편 태아의 뇌하수체에서도 LH가 검출된다는 것이 몇몇 연구자들에 의하여 보고되어 있으나 그 분비세포의 성상이나 출현 시기등에 대하여는 잘 밝혀져 있지 않다. Conklin(1968)은 일반 조직화학염색법에 의하여 LH를 분비하는 것으로 추정되는 세포(type V cells)를 태령 22주에 관찰하였다. 그러나 뇌하수체에서 LH가 실제로 검출되는 시기는 이보다 훨씬 이른 것으로 되어있다. 즉 생물검정법에 의하여는

태령 18주(Levina와 Ivanova 1964)에, 방사면역검정법에 의하여는 13주(Groom등 1971)에 각각 LH가 처음 검출되었다. 본 실험에서 LH세포를 처음 관찰할 수 있었던 태령 12주는 그 출현시기가 방사면역검정법에 의한 출현시기와 대체로 일치하고 있다.

전자현미경적관찰: 본 실험에서 관찰된 태령 12주의 뇌하수체에 이미 과립세포들이 출현되었고 과립세포내에는 다양한 크기의 분비과립을 함유하고 있었으며, 과립내형질세망이 현저히 발달되어 있고 골지장치내에는 과립형 물질들이 들어있는 등, 단백분비세포가 보이는 소견을 나타냈던 점으로 보아서 이 과립세포들이「호르몬」들을 생성하고 있다는 것은 의심의 여지가 없다. 과립세포의 출현 시기에 대하여 아직 확실하게 밝혀져 있지 않으나 Dubois(1968)와 Anderson등(1970)은 태령 7~8주에 과립세포를 관찰 하였다고 한다.

한편 과립세포의 미세구조적 특징을 관찰하므로써 분비세포형(cell type)을 밝히려는 시도가 여러 실험동물을 대상으로 시행되어 왔다. Farquhar와 Rinehart(1954, 1955)는 갑상선이나 고환을 적출한 흰쥐의 뇌하수체에서 이른바 갑상선적출세포(thyroidectomy cells)와 거세세포(castration cells)가 각각 나타나는 것을 전자현미경으로 관찰하여 갑상선「호르몬」세포와 성선자극「호르몬」세포의 미세구조를 처음으로 밝혔으며 그 이후 많은 연구자들에 의하여 인위적으로 내분비변조를 일으킨 동물에서 분비과립의 크기와 형태에 따라 세포형을 구분하였다(Kurosumi와 Oota 1968, Heath 1970, Shiino등 1972). 사람의 경우는 Shelin(1962)이 뇌하수체선종(pituitary adenoma)에서 종양세포의 미세구조를 조직화학반응과 비교 관찰한 보고가 있고, Paiz와 Hening(1970), Lewzewitsch등(1972)은 성인 뇌하수체에서 분비세포의 염색반응과 미세구조를 비교 관찰하므로써 세포간의 특성을 어느정도 구분하였으나 태아의 경우는 아직까지 보고된 것이 없다. 본 실험에서는 과립세포의 형태, 과립의 크기 및 모양, 세포소기관의 발달정도등에 의하여 관찰하였으나 세포간의 큰 특징을 관찰할 수 없었다. 이러한 점에서 태생기에는 과립세포의 분화증식이 급속히 일어나기 때문에 형태학적인 관찰만으로는 세포형을 구분하기 곤란한 것으로 사료된다.

결론

발생중에 있는 태아의 뇌하수체 전엽에서 「호르몬」분비세포의 출현과 그 미세구조를 관찰하기 위하여 태령 5주에서 40주에 이르는 뇌하수체를 효소표지항체법

과 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 성장 「호르몬」 세포가 처음 관찰된 시기는 태령 10주이었고, 최유 「호르몬」 세포는 18주에, 그리고 갑상선자극 「호르몬」 세포와 성선자극 「호르몬」 세포는 12주에 각각 처음으로 관찰되었다.

2. 성장 「호르몬」 세포와 최유 「호르몬」 세포는 뇌하수체전엽의 전역에서 고루 관찰할 수 있었으나 특히 외부측에서 많이 나타났고, 성선자극 「호르몬」 세포와 갑상선 자극 「호르몬」 세포는 전엽의 후내부와 상부에 주로 분포되어 있었다.

3. 분비세포의 시야당 평균세포수는 태생 중기까지 급속히 증가하였고, 세포내 과립량은 대체로 태령증가와 비례하여 증가하였다.

4. 분비세포 내에는 다양한 크기의 분비과립이 있으며 과립내형질세망이 현저히 발달되고 있었고 골지장치내에서 과립형 물질이 관찰되었다.

5. 한 세포내에서도 과립의 크기, 형태 및 전자밀도 등이 다양하게 나타나서 이러한 소견을 기준으로 「호르몬」 분비세포형을 구분하기는 곤란하였다.

—ABSTRACT—

Immunohistochemical and Electron Microscopic Studies on the Hormone Secretory Cells in the Developing Adenohypophysis of the Human Fetuses

Sa Sun Cho, Sang Ho Baik and Myung Bok Lee

Department of Anatomy, College of Medicine
Seoul National University

The hypophyses of human fetuses aged from 5 to 40 weeks were studied with the peroxidase-labeled antibody method and the electron microscope to investigate hormone secretory cells, and to ascertain the fine structural evidence for hormone synthesis.

The pituitary gland excised were fixed in Bouin's fluid and serial sections were made at 5 μ . Tissue sections were reacted with rabbit antisera to human growth hormone, prolactin, thyrotropin, and human chorionic gonadotropin respectively and then with peroxidase-labeled sheep anti-rabbit gamma globulin,

followed by enzyme histochemical reaction. Observation were made under the light microscope. Some tissues were fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide, and stained with uranyl acetate and lead citrate for electron microscopic observation.

The results observed were summarized as follows.

1. Somatotrophs were detected first at 10 weeks, mammotrophs at 18 weeks, thyrotrophs and gonadotrophs at 12 weeks respectively, but no hormone secretory cells were identified before 10 weeks.
2. Somatotrophs and mammotrophs were found throughout the the pars distalis and most numerous in the lateral regions, and gonadotrophs and thyrotrophs appeared chiefly in the posteromedian zone and in its superior portion.
3. Average numbers of hormone secretory cells and reacting intensities of the cytoplasmic granules generally increased with advancing fetal age.
4. Electron microscopic findings of secretory cells were the presence of distinct granules, extensive development of rough surfaced endoplasmic reticulum and signs of granular formation in Golgi complex, and these findings strongly suggest that fetal adenohypophysis was producing hormones during it's development.

REFERENCES

박철규, 백상호, 박길수 : *Perphenazine hydrochloride* 가 흰쥐 뇌하수체 prolactin에 미치는 영향에 관한 면역조직화학적 연구. 서울의대잡지, 14:61, 1973.

심재도, 백상호: 거세가 흰쥐 뇌하수체 LH세포에 미치는 면역조직화학적 연구. 서울의대잡지, 13:209, 1972.

이명복 : 한국인 태아 발육에 관한 연구. 대한해부학회지, 8:73, 1975.

최충신, 백상호 : 시람 및 동물뇌하수체 세포의 「호르몬」 항체와의 교차반응에 대한 면역조직화학적 연구. 대한해부학회지. 10:107, 1977.

Andersen, Ho, Bülow, F.A. von, and Møllgard, K.: *The histochemical and ultrastructural basis of the cellular function of the human foetal adenohypophysis. Progr. Histochem. Cytochem., 1:153, 1970.*

Aubert, M.L., M.M. Grumbach, and S.L. Kaplan: *The ontogenesis of human fetal hormones. III. Pro-*

- lactin*. *J. Clin. Invest.*, 56:155, 1975.
- Baker, B.L., and R.B. Jaffe: *The genesis of cell types in the adenohypophysis of the human fetus as observed with immunocytochemistry*. *Am. J. Anat.*, 143:137, 1975.
- Baker, B.L., Midgley, A.R. Jr., Gersten, B.E., and Yu, Y.Y.: *Differentiation of growth hormone and prolactin-containing acidophils with peroxidase labeled antibody*. *Anat. Rec.*, 164:163, 1969.
- Baker, B.L. Pek, S., Midgley, A.R. Jr., Gersten, B. E.: *Identification of the corticotropin cell in rat hypophysis with peroxidase-labeled antibody*. *Anat. Rec.*, 166:557, 1970.
- Conklin, J.L.: *The development of the human fetal adenohypophysis*. *Anat. Rec.*, 160:79, 1968.
- Dubois, P.: *Donnees ultrastructurales sur l'antehypophyse dum embryon humain a la huitieme semaine de son developpement*. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*. 162-689, 1968.
- Dubois, P., H. Vargues-Regairaz and M.P. Dubois: *Human foetal anterior pituitary immunofluorescent evidence for corticotropin and melanotropin activities*. *Z. Zellforsch.*, 145:131, 1973.
- Ellis, S.T., J.S. Beck and A.R. Currie: *The cellular localization of growth hormone in the human foetal adenohypophysis*. *J. Path. Bact.*, 92:179, 1966.
- Falin, L.I.: *The development of human hypophysis and differentiation of cells of its anterior lobe during embryonic life*. *Acta Anat.*, 44:188, 1961.
- Farquhar, M.G., and J.F. Rinehart: *Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of cast-rate rat*. *Endocrinology*, 54:516, 1954.
- Farquhar, M.G. and J.F. Rinehart: *Cytological alterations in the anterior pituitary gland following thyroidectomy: An electron microscope study*. *Endocrinology* 55:857, 1955.
- Fisher, D.A., C.J. Hobel, R. Carza and C.A. Pierce: *Thyroid function in the preterm fetus*. *Pediatrics*, 46: 208, 1970.
- Fukuchi, M., T. Inoue, H. Abe Y. Kumahara: *Thyrotropin in human fetal pituitaries*. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 31:565, 1970.
- Gitlin, D., and Biasucci: *Ontogenesis of immunoreactive growth hormone, follicle-stimulating hormone, thyroid-stimulating hormone, chorionic prolactin and chorionic gonadotropin in the human conceptus*, *J. Clin. Endocr.*, 19:926, 1969.
- Groom, G.V., M.A. Groo, I.D. Cooke and A. Boyns: *The secretion of immunoreactive luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by the human foetal pituitary in organ culture*. *J. Endocr.* 49:335, 1971.
- Halpern, S.R.: *Quantitative cytological studies of the anterior lobe of the hypophysis in fetuses and children, correlated with sexual and skeletal development*. *Endocrinology*, 22:173, 1938.
- Hartemann, Ph., D. Malaprade, D. Lemoine, G. Grignon, P. Nabet and M. Pierson: *Mise en evidence des elements morphologiques et des activites secretoires STH et LH dans l'hypophyse de foetus humain au cours du development*. *C.R. Soc. Biol.*, 167:105, 1973.
- Heath, E.: *Cytology of the pars anterior of the bovine adenohypophysis*. *Am. J. Anat.*, 127:131, 1970.
- Herbert, D.C.: *Localization of antisera to LH and FSH in the rat pituitary gland*. *Am. J. Anat.*, 144: 379, 1975.
- Kalplan, S.L., M.M. Grumbach and T.H. Shepard: *The ontogenesis of human fetal hormones. I. Growth hormone and insulin*. *J. Clin. Invest.*, 51:3080, 1972.
- Keene, M.F.L.: *Glandular activity in the human fetus*. *Lancet*, 2:111, 1924.
- Koffler, D., and Fogel, M.: *Immunofluorescent localization of LH and FSH in the human adenohypophysis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115:1080, 1964.
- Kurosumi, K., and Oota, Y.: *Electron microscopy of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary glands of persistent estrous and diestrous rats*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 85:34, 1968.
- Lawqewitsch, Irene Von, Dickman, G.H., Amezua, L., and Pardal, C.: *Cytological and ultrastructural characterization of the human pituitary*. *Acta Anat.* 81:286, 1972.
- Levina, S.E.: *Endocrine features in development of human hypothalamus, hypophysis, and placenta*. *Gen. Comp. Endocr.*, 11:151, 1968.
- Levina, S.E., and E.A. Ivanova: *Biological determination on pituitary prolactin in the human embryo*. *Dokl. Akad. Nauk, SSSR*, 155:988-991, 1964.
- Midgley, A.R. Jr.: *Immunofluorescent localization of*

- human pituitary luteinizing hormone. Exp. Cell Res.*, 22:606, 1963.
- Monroe, S.E. and Midgley, A.R. Jr.: *Immunofluorescent localization of rat luteinizing hormone. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 130:151, 1969.
- Nakane, P.K., and G.B. Pierce: *Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens, J. Histochem. Cytochem.*, 14:929, 1966.
- Nakane, P.K., and G.B. Pierce: *Enzyme-labeled antibody for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. J. Cell. Biol.*, 33:307, 1967.
- Nakane, P.K.: *Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. J. Histochem. Cytochem.*, 18:9, 1970.
- Paiz, C. and G.R. Hennigar: *Electron microscopy and histochemical correlation of human anterior pituitary cells. Am. J. Path.*, 59:43, 1970.
- Pearse, A.G.E.: *Cytological and cytochemical investigations on the foetal and adult hypophysis in various physiological and pathological states. J. Path. Bact.*, 65:355, 1953.
- Schelin, U.: *Chromophobe and acidophil adenoma of the human pituitary gland. A light and electron microscopic study. Acta Path Microbiol. Scand.*, 158 (Suppl.): 80, 1962.
- Shepard, T.H., N.J. Andersen and H. Andersen: *The human fetal thyroid. I. Its weight in relation to body weight, crown. rump length, foot length and estimated gestation age. Anat. Rec.*, 148:123, 1964.
- Shepard, T.H.: *Onset of function in the human fetal thyroid: Biochemical and radio-autographic studies from organ culture. J. Clin. Endocr.*, 27:945, 1967.
- Shiino, M., Arimura, A., Schally, A.V., and Rennels, E.G.: *Ultrastructural observations of granule extrusion from rat anterior pituitary cells after injection of LH-releasing hormone. Zellforsch. Microsk. Anat.*, 128:152, 1972.
- Siperstein, E.R., and Miller, K.J.: *Further cytophysiologic evidence for the identity of the cells that produce adrenocorticotrophic hormone. Endocrinology* 86:451, 1970.
- Streeter, G.L.: *Weight, sitting height, head size, foot-length and menstrual age of the human embryos. Contrib to Embryol.*, 11:144, 1920.
- Wide, L., Roos, P., and Gemzell, C.: *Immunological determination of human pituitary luteinizing hormone(LH). Acta Endocrinol.*, 37:455, 1961.

Explanation of Figures

Photomicrographs of hormone secretory cells from the human fetal adenohypophysis (All preparations illustrated were stained immunohistochemically except those for figures 10-14).

- Fig. 4.** Somatotrophs revealed with anti-hGH in the 10 weeks old adenohypophysis. This is the youngest specimen in which hormone secretory cells could be identified. A few cells are seen in the parenchymal cells constituted follicular structure. Anti-hGH. $\times 450$.
- Fig. 5.** Mammotrophs from the 18 weeks old adenohypophysis. Note small cells with little cytoplasm. Anti-hPRL. $\times 450$.
- Fig. 6.** Somatotrophs from 28 weeks old adenohypophysis. Many well-granulated cells are seen around blood vessels(BV). Anti-hGH. $\times 450$.
- Fig. 7.** Mammotrophs in the adjacent section of the same specimen in fig. 6. Note different locations of mammotrophs from those of GH cells. Anti-hPRL. $\times 450$.
- Fig. 8.** LH gonadotrophs from the 12 weeks old adenohypophysis. LH cells are seen alongside the epithelial-parenchymal junction. Anti-hCG. $\times 450$.
- Fig. 9.** Thyrotrophs from the 12 weeks old adenohypophysis. These cells are located primarily superior margin of the pars distalis and appeared in the groups of a few cells. Anti-hTSH. $\times 450$.
- Fig. 10.** Survey electron micrographs of the 13 weeks old adenohypophysis. The granular cells are seen at the upper right and the left sides. Uranyl acetate and lead citrate staining. $\times 3,000$.
- Fig. 11.** A granular cell from 20 weeks old adenohypophysis. The granular cell is rich in organells: Rough surfaced endoplasmic reticulum (RER), Golgi apparatus (G), Mitochondria (M). $\times 5,000$.
- Fig. 12.** Higher magnification of the portion of the granular cell, showing the stack of the rough surfaced endoplasmic reticulum and abundant free ribosomes in the form of polysomes. SG: secretory granule. $\times 35,000$
- Fig. 13.** Golgi region of the granular cell. Note relatively less electron dense mass in the inner cisterna (arrow). $\times 20,000$.

