

家兎의 好中性白血球 性染色質의 正常頻도와 X 線照射에 關하여

朴大圭·金茂淵
(慶北大·文理大·生物學科)

Studies on the Normal Frequency and Effects of X-irradiation on Sex Chromatin of Neutrophil Leukocyte in the Rabbit.

PARK, Tae Kyu and Moo Yun KIM
(Dept. of Biology, Kyung Pook University)

(1965. 10. 5. 接受)

SUMMARY

The frequency of sex chromatin in neutrophil leukocyte of 14 female and 4 male normal, adult rabbits was examined and compared to those of single total X-ray irradiation.

1. The average frequency of drumstick was 9% in female and 0.1% in male, and that of sessile nodule was 3.35% in female and 0.9% in male, in normal condition rabbit. These results fairly determined sex ratio by sex chromatin in neutrophil leukocyte.

2. The drumstick frequency increases significantly with increasing lobe count, as determined by Arneht's type of lobe classification for neutrophil leukocyte.

3. The drumstick frequency reduces to half after X-irradiation but did not show any regular tendency or variation in morphological form, indicating the stability of chromatin to X-irradiation.

4. The chromatin satellite was found with a reasonable frequency in the some kind of irradiated cells, polymorphnuclear neutrophil (above 7 lobes) and megakaryocyte.

序 論

性染色質에 關한 研究는 Barr and Bertram (1949)이 고양이의 雌性 神經細胞에서 처음 發見한 이후 Moor *et al.* (1951), Moor and Barr (1955)等 많은 學者들에 의하여 人類를 爲始한 많은 動物을 對象으로 시행되었다. 結果 여러 種類의 體細胞 靜止核에서 雌性만이 性染色質을 갖는다는 것을 確證하고 이것으로 細胞學的 性別의 可能性을 認定하게 되었다.

Davidson and Smith (1954)는 末梢血液塗抹標本에서 雌性 好中性多核白血球內에 나타나는 性染色質인 所謂 drumstick 와 sessile nodule 型에 의한 새로운 性別法을 發見하였다. 家兎를 材料로한 性染色質調査는 Hyden (1952) 이 紫外線顯微鏡으로 休止期 體細胞에서 性別 可能에 對한 報告를했고, Melander (1962)는 性染色體와 性染色質과의 相關研究에서 胚의 間期細胞에서 性染色質이 高率로 나타난다고 報告하였다. 또한 Smith and Davidson (1954)과 Lucrs (1956)는 雌性 好中性白血球에

나타나는 性染色質 drumstick에 의한 性別法을 報告했다. 그러나 Kang and Park (1961)은 血液에 의한 性別이 곤란하다고 했다. 本實驗은 家兎를 材料로 하여 好中性多核白血球에 나타나는 性染色質인 drumstick 와 sessile nodule의 正常出現頻도와 葉數에 따른 出現頻도를 算定하였다.

性染色質의 內的外的 要因에 因한 安定性에 對한 研究로는 Sohval *et al.* (1955), Grumbach *et al.* (1955)이 hormone에 對하여, Hunter and Lennox (1954)과 Cruickshank (1955)가 各種 畸型腫瘍에 對하여 行한바 있다. 그러나 物理的 要因인 各種 放射線의 影響에 對한 報告는 아직 發見하지 못했으므로 우선 X線照射에 對한 그 影響을 調査하였다. 本研究에 X線 照射를 擔當하여 주시고 助言하여 주신 本大學校大學病院 金舜鏞博士께 深甚한 感謝를 드립니다.

材料 及 方法

體重 約 1700g의 健康한 家兎(mixed stock) 雌性 14頭와 雄性 4頭를 材料로 末梢血液塗抹標本을 作成하여

methanol에 固定한 後 Wright stain solution (pH, 6.5 phosphate buffer)으로 10分 染色하여 다시 Harris haematoxylin에 再染色하였다.

Oil immersion으로 1500倍 擴大하여 各 個體의 好中性白血球에 出現하는 性染色質 即 drumstick과 sessile nodule의 頻度와 好中性白血球 分離算定法(Arneth's classification)에 依한 葉數에 따른 性染色質의 出現頻度を 算定하였다.

頻도가 control된 3頭의 雌性兎에 對하여 Jacobson *et al.* (1947)이 行한 方法과 같이 100r, 300r, 500r의 單位로, 2頭의 雄性兎에 對하여 100r, 500r單位로 單一全身 照射하였다. X線照射는 本大學校 附屬病院의 X線深

部治療機 (200KW, 15 AM. Picker machine)를 使用했다. 焦點皮膚間 거리는 110cm였으며 filter는 0.25mm Cu+1mm Al을 使用했고 이때 Victoren ionization chamber로 測定한 1分間の 露出率은 11r였다.

照射後 24時間 까지는 每 8時間 간격으로 그 後는 1日 간격으로 10日間 各 個體에 對하여 照射前과 같은 條件으로 算定했다.

結果 및 考察

1. 正常狀態의 性染色質의 出現頻照.

14 個體의 雌性과 4 個體의 雄性 家兎의 正常末梢血液中 各 個體 1000個의 好中性白血球에 出現하는 性染色質 即 drumstick과 sessile nodule의 頻度は Table 1, 2와 같다.

Table 1. The percentage of sex chromatin of neutrophil leukocyte for normal female rabbit.

Sex chromatin	No. of material														Average
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Drumstick %	9.3	7.2	10.3	13.4	10.6	7.2	11.8	3.2	13.6	8.6	5.8	3.6	11.4	5.4	9.00
Sessile nodule %	4.0	3.8	5.6	6.8	5.9	4.7	3.6	1.9	4.1	1.6	1.3	0.8	1.6	1.0	3.35

Remark: Percentage vs. 1000 neutrophils.

Table 2. The percentage of sex chromatin of neutrophil leukocyte for normal male rabbit.

Sex chromatin	No. of material				Average
	15	16	17	18	
Drumstick %	0.7	0.1	0.0	0.0	0.1
Sessile nodule %	2.0	0.2	0.7	0.3	0.9

Remark: The types of drumstick are not typical in males.

雌性에 있어서 drumstick型이 最高 頻度は 13.6%이며 最低頻度は 3.2%로서 總 平均 9%이며 雄性에서는 平均 0.1% 以下이다.

Sessile nodule型은 雌性에 있어서는 最高 6.8%, 最低 0.8%이며 平均 3.35%로서 drumstick型의 約 半數에 達하며 雄性에 있어서는 最高가 2%로 나타났다.

Smith and Davidson (1954)은 家兎의 正常血液中 好中性白血球에 나타나는 drumstick에 依한 性別이 可能하다고 報告하였고 Luers (1956)는 家兎도 人類와 비슷한 比率로 나타낸다고 했다.

今般 筆者들이 行한 調査에 依하면 比較的 明確하고 높은 頻도를 나타냈으며, 個體間 變異는 比較的 낮은 分布를 보이고있다. 이 事實은 Davidson *et al.* (1958) 이 調査한것 보다 거의 2倍의 頻도를 보이고 있다.

本實驗을 通하여 얻어진 所見으로서는 性染色質인 drumstick에 依한 家兎의 性別率은 100%라 보고 있다.

Sessile nodule型에 있어서도 雌性이 平均 3.35%이며 雄性은 最高가 2%로 이것 역시 性別이 可能하다고 본다.

2. 葉數分化에 따른 性染色質의 出現頻度

雌性 全個體(14頭)의 14,000個의 好中性白血球核을 Arneth氏 分類法을 適用하여 葉數 1葉에서 6葉까지 分離算定하고 好中性白血球의 葉數에 따른 drumstick과 sessile nodule의 出現頻도를 조사했다. 그 結果는 Table 3과 같다.

葉型에 따르는 好中性白血球의 分布는 決定的으로 3, 4葉에 置重되어 있으나 葉數에 對한 性染色質의 出現頻度は 葉數가 增加함에 따라 增加한다.

Chi-square test 結果 各葉間에 모두 $P < 0.05$ 로서 有意 差를 認定 할 수 있으며 graph로 表示하면 Fig. 1과 같다. 따라서 drumstick의 發見의 好適葉數는 平均 葉數算定(Table 3)에 依하면 3, 4葉이 最適으로 認定된다. 各 葉型變化에 따르는 drumstick의 出現頻度は Davidson *et al.* (1958), Briggs and Kupperman (1956), Kim and Kim (1964) 등이 人類에서 調査한 바와 비슷하게 家兎에 시도 各各 有意한 頻度の 增加를 나타내었다.

此 葉型 研究에서 必隨되는 趨移(shift) 問題와 性染色質性 drumstick의 出現 問題는 同一個體의 正常範圍

내趨移變化和 個體間 葉數分布 差에서 일어나는 正常趨移 範圍內에서는 drumstick 頻度變化를 認定할 수 없으나 만일 葉數가 2葉 以下로 趨移가 左轉할경우(shift to

left)는 그 頻度가 減少되어 1葉 以下の 骨髓性桿核球로 轉向할 경우에는 平均 0.75%로 激減되어 性別에 支障이 있을것이 확실하다.

Table 3. The frequency of sex chromatin vs. lobe count of neutrophils.

Sex chromatin	Lobe types						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
Number of cell	397	1,959	5,250	4,544	1,554	296	14,000
%	2.25	13.99	37.50	32.17	11.10	2.11	99.42
Number of drumstick	3	94	453	491	187	46	1,274
%	0.75	4.79	8.62	10.81	12.33	15.31	9.00
Number of sessile nodule	4	66	178	143	64	12	467
%	1.01	3.37	3.39	3.15	4.11	4.05	3.35

Remark: The drumstick frequency increases significantly with increasing lobe count, as determined by Arneht's classification for neutrophils.

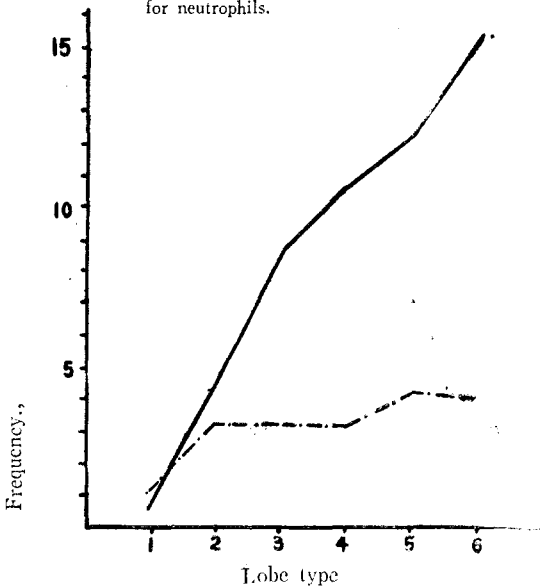


Fig 1. Sex chromatin frequency vs. lobe types

— Frequency of drumsticks
 - - - Frequency of sessile nodules

3. X線 照射와 性染色質

正常頻도가 調査된 雌性兎 No. 1, 4, 8, 三頭에 對하여 100 r, 300 r, 500 r의 單一 全身照射後 10日까지의 drumstick 과 sessile nodule의 頻度 變化는 Table 4와 같고 葉數에 따른 頻度는 Table 5와 같다.

100 r 照射된 雌性에 있어서는 正常頻度 9.3%에서 照射後 8時間 以內 5.4%로 減少되었으며 그후 次次 增加하여 第二日째 一次 原狀回復을 하였으며 그 後에는 頻度의 高低가 甚하게 變하여 第十日째 까지의 總頻度는 7.57%로 減少하였다.

300r 照射된 雌性에 있어서는 正常頻度 13.4%에서 第十日째 까지 總頻度 4.71%로 減少 하였고 역시 2~3日 에는 약간의 增加를 보이나 原狀回復을 하지 못하고 그 後는 甚한 變化를 나타내었다. 500 r 照射된 雌性에는 역시 第二日째 부터 問題視되었으나 雌雄共히 致死하였다. 100 r 照射한 雄性에 있어서는 아무런 變化가 없었고 葉數에 依한 性染色質의 出現頻度는 正常頻도와 같이 3, 4葉에 高率로 나타났다 (Table 5). 以上과 같이 照射後性染色質의 出現頻도에 多少 變異를 보이나 一定한 傾向과 有意性은 찾지 못했고 또한 形態의 變異를 볼수 없었다.

Table 4. The sex chromatin frequency after irradiation.

Each material	Time after irradiation	Time after irradiation												Average
		8 hr.	16 hr.	24 hr.	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days	8 days	9 days	10 days	
100r. Mat. No. 1	D %	5.4	6.4	6.8	9.9	5.8	6.2	10.0	5.6	9.2	3.8	7.4	9.4	7.57
	S %	4.0	1.8	1.4	2.6	2.0	1.4	0.6	0.6	1.6	1.6	0.6	1.4	1.63
300r. Mat. No. 4	D %	5.6	5.4	4.8	7.6	6.0	2.2	3.2	4.4	2.8	5.8	3.2	5.6	4.71
	S %	3.8	1.8	2.0	3.8	3.0	1.0	0.4	1.2	1.4	1.4	1.0	0.6	1.78
500r. Mat. No. 8	D %	2.8	0.6	2.2	7.6									3.30
	S %	2.6	0.4	0.8	2.2									1.50

Remark: Material No. 1 : Normal and frequency control is 9.3%.
 Material No. 4 : Normal and frequency control is 13.4%.
 Material No. 8 : Normal and frequency control is 3.2%, died after two days of irradiation to 500r.

Table 5. The sex chromatin frequency by lobe type after irradiation.

Lobe type		I	II	III	IV	V	VI	VII	Total (%)
Each Material									
100r.	No. of cell	138	645	1,990	2,127	871	178	51	6,000
Mat. No. 1	No. of drum.		20	154	173	86	20	11	464(7.73%)
	No. of sessil.	1	4	40	37	4	2		88(1.46%)
300r.	No. of cell	243	758	1,952	1,843	793	298	113	6,000
Mat. No. 4	No. of drum.		8	86	124	58	43	9	328(5.46%)
	No. of sessil.		7		37	14	4	11	73(1.21%)
500r.	No. of cell	155	508	793	636	194	78	136	2,500
Mat. No. 8	No. of drum.		2	19	26	11	3	5	66(2.64%)
	No. of sessil.		3	12	13	1	1		30(1.20%)

다만 照射後 2日부터 3個體 共히 好中性多核細胞 (7葉以上)와 巨核細胞가 增加했는데 (Table 6), 이 細胞中 에는 核附隨體(nuclear satellite)가 3個까지 나타나는 것 을 보았는데 其中 1個만이 形態의 典型的인 性染色 質性 附隨體(satellite)였고, 또한 正常 性染色質 drumstick

의 形態와 別差 없었으나 其外 2個는 minor lobe로서 骨髓母細胞分裂時 X線에 依하여 誘發된 染色體異狀으로 온 것이 아닌가 生覺된다. 이들 細胞에 出現하는 性染 色質의 頻度는 照射 前에는 全無 하던것이 상당한 頻度 로 出現한 事實은 注目할만하다.

Table 6. The sex chromatin frequency vs. P.M.N. leukocyte (above 7 lobes) and megakaryocyte appeared after X-irradiation.

Time after irradiation		8 hr.	16 hr.	24 hr.	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days	8 days	9 days	10 days
Each material													
100r.	No. of cell			1	6	29	8	1	2		2		2
Mat. No. 1	No. of drum.				4	6					1		
	No. of sessil.					6			1		2		
300r.	No. of cell				23	70	3	10	3	3			1
Mat. No. 4	No. of drum.				4	5							
	No. of sessil.				1								
500r.	No. of cell			1	35								
Mat. No. 8	No. of drum.				5								
	No. of sessil.												

Remark: drum, Drustick. sessil, Sessile nodule.

摘 要

家兔를 材料로 好中性白血球에 나타나는 性染色質의 正常頻度와 X線 照射後의 影響을 比較 檢討한 結果는 다음과 같다.

1. 雌性家兔의 drumstick 正常狀態頻度는 9.0%, 雄性은 0.1%로 好中性白血球의 性染色質에 依한 性別은 명확하다. 또한 sessile nodule에 依한 (雌性 3.35%, 雄性 0.9%) 性別도 可能하다.

2. 好中性白血球 葉數發生과 drumstick 出現頻度는 好中性白血球 分離算定法으로 行한 結果 低葉性에서 高葉性으로 갈에 따라서 出現頻도가 增加한다. $P < 0.05$.

3. X線 照射된 個體의 好中性白血球中 性染色質의 出現頻度는 거의 半減되는 變異를 보이나 一定한 傾向과 有意性을 찾지 못했고, 또한 形態的인 變異를 볼수 없었다. 故로 性染色質은 X線照射에 對한 安定性이 있음을 認定 할 수 있다.

4. 照射後 由來된 好中性多核白血球(7葉以上)와 巨核細胞에 性染色質性 核附隨體(nuclear satellite)가 상당

高率로 認知된다.

文 獻

Barr, M.L. and E.G. Bertram, 1949. A morphological difference between neurons of the male and female and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 103, 676.

Briggs, D.K. and H.S. Kupperman, 1956. Sex differentiation by leukocyte morphology. *Jour. Clin. End.* 16, 1163—1179.

Cruikshank, D.B., 1955. Sex of mediastinal teratoma. *Lancet* 268, 253.

Davidson, W.M. and D.R. Smith, 1954. A morphological sex difference in the P.M.N. leukocyte. *Brist. Med. Jour.* 2, 6.

Davidson, W.M. and D.R. Smith, 1956. Nuclei and sex. *Postgrad. Med. Jour.* 32, 578—583.

Davidson, W.M., and F.F. John and D.R. Smith, 1958. Sexing the neutrophil leukocytes in natural and arti-

- facial blood chimaeras. *Brit. Med. Jour. of Haemt.* 4, 3.
- Grumbach, M.M., J.J. Vanwyk and Willkins, 1955. Chromosomal sex in gonadal dysgenesis (ovarian agenesis). *Jour. of Clin. Endo. & Metab.* 15, 1161.
- Hunter and Lennox, 1954. The sex of teratomata. *Lancet* 267, 253.
- Hyden, H., 1952. *Acta. Physi. Secand.* 6, suppl. 17 (cited Davidson *et al.* 1956).
- Jacobson, L.O., E.K. Mark, L.E. Simmon, C.W. Hagen and R.E. Zirkle, 1947. Effects of X-ray on rabbit (cited Hollaender 1954, *Radiation Biology*. McGraw-Hill Book Co., New York. 1029—1082).
- Kang, Y.S. and S.D. Park, 1961. Cytological studies of sex chromatin in mammalia. *Kor. Jour. Zool.* 4 : 2, 59.
- Kim, M.Y. and J.H. Kim, 1964. On the studies of drumstick sex chromatin. *New Med. Jour.* 7 : 2, 89—94.
- Luers, T., 1956. *Blut.* 2, 81 (cited Davidson *et al.* 1956).
- Melander, Y., 1962. Chromosome behaviour during the origin of sex chromatin in the rabbit. *Hereditas* 49 : 4, 645—661.
- Moor, K.L. and M.L. Barr, 1955. Smear from the oral mucosa in the detection of chromosomal sex. *Lancet* 2, 57.
- Moor, K.L., M.A. Graham and M.L. Barr, 1951. Nuclear morphology, according to sex, in nerver cell of several species and in the various organ of the cat. *Anat. Rec.* 109, 403.
- Smith, D.R. and W.M. Davidson, 1954. Further observation on the genetical sex differences in neutrophil leukocytes. *Path. Soc. of Great Brit. and Ireland Meeting, Edinburgh* (cited Davidson *et al.* 1958).
- Sohval, Gaines and Gabrilove, 1955. Clinical experiences with the skin biopsy method of detecting chromosomal sex. *Amer. Jour. of Obst. & Gym.* 70, 1074.