

Golden Hamster 胎盤形成에 있어서 Autoradiography에 의한 分裂細胞의 消長

李 且 秀

慶北大學校 農科大學

緒 論

有胎盤哺乳動物의 胎膜은 卵黃囊, 尿膜, 羊膜, 絨毛膜 등으로 이루어지고 이와같은 胎膜은 胎盤의 形成에 單獨 혹은 相互癒合해서 動物種類에 따라 絨毛膜胎盤, 卵黃囊胎盤 또는 絨毛尿膜胎盤 등을 形成하게 된다.

golden hamster에 있어서는 受精卵이 着床할때까지의 卵의 크기와 發生過程 그리고 子宮의 變化 등이 報告된 바 있고,⁸⁻¹⁰⁾ 李 등¹³⁾은 golden hamster의 妊娠期間을 確認해서 妊娠日齡에 따른 胎兒의 正常發育成長과 胎盤을 含有한 胎兒小室의 크기, 變動 등을 調査했다. 그리고 李¹¹⁾는 妊娠日齡에 수반된 golden hamster의 胎盤形成의 經時的 變化를 追究하여 絨毛尿膜胎盤形成過程을 光學顯微鏡의 으로 觀察한 바 있다.

本 研究에서는 妊娠日齡에 따른 golden hamster의 胎盤의 構造와 機能을 究明할 目的으로 ³H-thymidine autoradiography에 의한 DNA合成時 細胞核의 標識과 標識된 細胞의 消長을 觀察하고 胎盤形成의 完了時期 및 胎盤을 構成하는 胎膜의 各種細胞의 相互關係 등을 檢討한 바 그 結果를 報告하는 바 이다.

材料 및 方法

本 實驗에 供試한 27마리의 hamster의 種類와 妊娠日齡의 算定은 李^{11,12)}가 이미 報告한 바와 같고, 妊娠日齡 8일부터 分娩時까지 各 妊娠日齡의 hamster에 體重 0.5g 당 ³H-thymidine(Spec, Act, 5.0Ci/mM) 1.0 μ Ci를 腹腔內에 投與하고 投與後 2~4時間後에 妊娠子宮을 切取해서 一部는 acetone과 dry ice混合液(-78°C)으로 冷却시킨 isopentone液中에 凍結하고 一部는 Carnoy液 및 Bouin液으로 固定했다. 凍結시킨 材料는 cryostat凍結切片器로 5~7 μ m의 切片을 만들어 30% 酢酸 ethanol로 10分間 固定한 후 2% perchloric acid로 4°C에서 40分間 處理하여 DNA合成時에 利用되지 않았던 ³H-thymidine을 除去하였다. 그리고 증류수로 充分

히 洗滌하여 乾燥시킨다음 dipping의 操作을 하였다. 한편 Carnoy液 및 Bouin液으로 固定한 組織은 파라핀으로 包埋하여 5 μ m의 切片을 만들어 autoradiogram을 作成하였고, 一部는 組織學的 檢索을 위해 hematoxylin-eosin(H-E)染色을 실시하였다. dipping은 Sakura NR-M₂를 原液 乃至 1.5倍로 稀釋한 emulsion으로 행하여 2~8週間 露出시킨 후 Konidol-X로 20°C에서 5分間 現象하고 다시 Fuji Fix로 10分間 定着시켜 autoradiogram을 製作하여 水洗 후 H-E 혹은 Rawitz's carmalum染色을 행하여 檢索했다.

各 妊娠日齡에 따른 ³H-thymidine의 標識指數는 1, 000個 以上の 細胞集團中 標識細胞의 比率을 百分率로 表示했다.

結 果

hamster의 受精卵은 交尾後 5일에 着床이 일어나기 始作하고 着床된 受精卵은 妊娠日齡이 進行됨에 따라 胚外膜을 形成하여 妊娠 8日에는 尿膜이 絨毛膜에 癒合해서 絨毛尿膜胎盤 形成이 始作된다.¹¹⁾ 이와같이 絨毛尿膜胎盤 形成이 始作되는 妊娠 8일부터 分娩時까지의 各 妊娠日齡에 따른 ³H-thymidine으로 標識된 細胞의 消長을 卵黃囊內胚葉細胞, labyrinth層과 trophospongium層의 trophoblast細胞 및 巨大細胞 등에 對해서 檢索하였다(Figs. 1, 2). 이들 細胞들은 全體의 으로 볼 때 妊娠 8일부터 9일까지는 壁側卵黃囊의 內胚葉細胞를 除外한 모든 細胞들은 70%以上 86%以下の 標識指數를 나타내었다. 그런데 壁側卵黃囊의 內胚葉細胞는 妊娠 8日에는 他細胞에 비하여 낮은 73%, 妊娠 9日에는 65%의 標識된 細胞로 各各 나타났다. 그리고 妊娠 8日의 labyrinth層과 trophospongium層은 區別이 되지 않기 때문에 巨大細胞를 除外한 胎盤外膜圓錐의 全 trophoblast를 檢索해서 77%의 標識指數를 얻었으며 이 數值를 妊娠 8日의 labyrinth層과 trophospongium

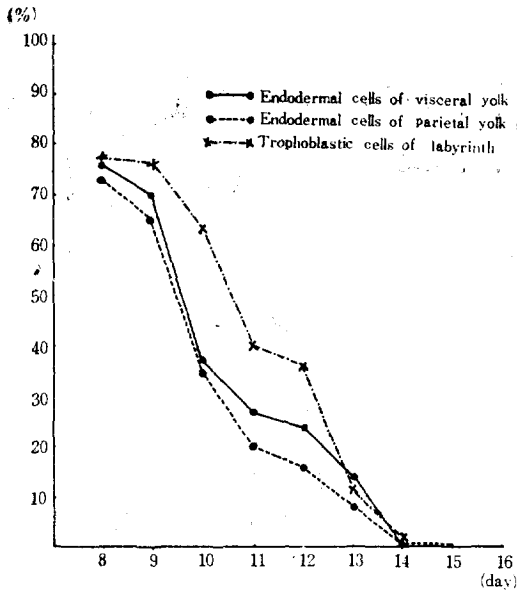


Fig. 1. Radioactive indices

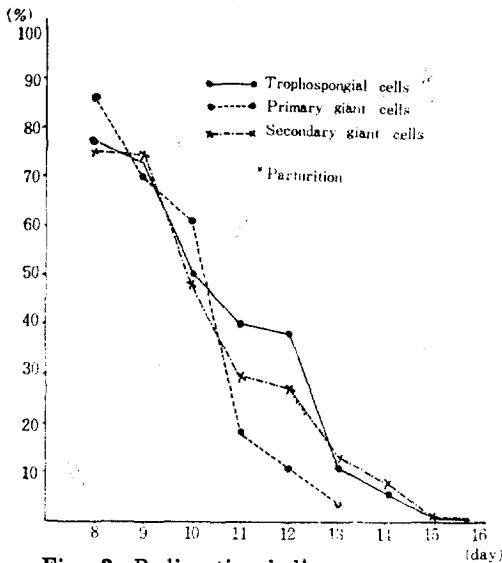


Fig. 2. Radioactive indices

層的 兩者에 對한 基本值로 하였다. 妊娠日齡이 增加함에 따라 各種細胞의 標識指數는 점차 減少해서 妊娠 13日에는 primary giant cell이 4%로 最低值였고, 臟側卵黃囊의 內胚葉細胞가 14%로 最高의 標識指數로 나타났다. 妊娠 14日에는 primary giant cell에 있어서는 標識된 것이 나타나지 않았고 壁側卵黃囊의 內胚葉細胞에 있어서는 少數의 出現을 볼 수 있었다. 反面에 secondary giant cell은 가장 높은 8%의 標識指數를 나타내었다. 妊娠 15日에도 壁側卵黃囊의 內胚葉細胞에서

標識된 것을 볼 수 있었으나 分娩時까지 標識된 細胞를 볼 수 있었던 것은 trophospongium層의 trophoblast細胞와 secondary giant cell이었으며 그 數는 極히 少數로 出現하였다.

尿膜이 絨毛膜에 附着하여 絨毛尿膜胎盤을 形成하기 始作하는 妊娠 8日에는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 胚外體腔에 接한 胎盤外膜圓錐의 trophoblast에서 많은 有絲核分裂像이 보이고 ^3H -thymidine에 의하여 標識된 核의 銀粒子는 子宮間膜側의 trophoblast의 銀粒子數에 비하여 적었다(Fig. 4). 그리고 絨毛尿膜胎盤에 있어서 胎兒의 血管形成이 일어나기 始作하는 時點의 胎兒血管側 內側의 trophoblast는 胚外體腔에 接한 trophoblast와 같이 標識된 銀粒子數는 적으나 母體血管腔側의 trophoblast와 앞으로 trophospongium層이 될 子宮間膜側의 trophoblast에서는 標識된 核의 銀粒子數는 거의 同一하고 多數였다(Fig.5). 妊娠 9日에는 絨毛尿膜胎盤의 labyrinth層과 trophospongium層이 區別되나 妊娠 8日에 比較하여 標識된 細胞의 數는 크게 變動이 일어나지 않았다. 그러나 primary giant cell, secondary giant cell 및 tertiary giant cell 등은 ^3H -thymidine에 의해 多數 標識되어 있었다(Figs.6-8). 妊娠 10日以後의 labyrinth層과 trophospongium層의 trophoblast細胞는 他 組織에 比하여 標識指數가 徐徐히 減少했고, 特히 妊娠 11日과 12日 사이에는 弱한 減少를 나타내었으며 約 40%內외의 標識指數를 볼 수 있었다(Figs. 1, 2, 9-11). 妊娠 13日에는 妊娠 12日에 比하여 標識指數가 約 3分の 1로 甚한 減少를 보였다. 한편 母體의 中心血管腔을 構成하고 있는 trophoblast(endovascular cell)도 多數 標識되어 있었고(Fig.10), 妊娠 日齡의 增加에 따라 labyrinth層과 trophospongium層과의 境界部에 있는 trophoblast도 多數 標識되었다(Figs. 11, 12).

卵黃囊의 內胚葉細胞에 있어서는 壁側 및 臟側卵黃囊 兩者 共히 妊娠 9日과 10日 사이에 標識指數가 급격히 減少했고, 妊娠 14日에는 0.5%以下로 減少했다(Fig.1). 이와같은 標識細胞의 算定은 臟側卵黃囊의 絨毛가 發達한 部分의 內胚葉上皮細胞와 絨毛尿膜胎盤을 被覆하고 있는 壁側卵黃囊의 內胚葉上皮細胞를 主로 했으며 그 數値는 子宮間膜附着部 反對側의 것에 比하여 多數로 出現하였다(Figs. 13, 14).

巨大細胞에 있어서는 絨毛尿膜胎盤側의 primary giant cell이 多數 標識되어 있었고(Fig.6), 이 primary giant cell은 妊娠 8日에 標識指數(約86%)가 最高值에 達했으나 妊娠 11日에는 급격히 減少하였으며 妊娠 13日以後에는 標識된 細胞가 거의 出現하지 않았다(Fig.

2). secondary giant cell은 妊娠日齡의 增加에 따라 卵黃囊의 內胚葉上皮細胞에서 볼 수 있었던 것과 類似的 減少傾向을 나타내었으나 標識된 細胞가 分娩時까지 認定되었다. 그리고 tertiary giant cell은 出現하는 細胞의 絕對數가 少數이기 때문에 算定하지 않았으나 妊娠 9日과 10日에 標識된 細胞가 多數 認定되었다(Fig. 8).

考 察

胎盤에 있어서 autoradiography에 의한 各種細胞의 分裂能을 檢索한 것은 rat²⁾ 및 mouse⁶⁾에서 찾아 볼 수 있으며 Jollie²⁾는 rat의 胎盤에 있어서 胎盤形成初期에 어떤 細胞도 ³H-thymidine에 의한 標識를 볼 수 없었고 labyrinth層의 trophoblast는 全 妊娠期間을 통해 標識되지 않았다고 하였다. 그러나 Saccoman⁶⁾은 mouse의 胎盤에 있어서 胎盤形成初期(妊娠 8日)부터 標識된 細胞가 出現하기 始作하여 妊娠 10日과 12日에 標識가 最高에 達했다고 하였다. 그리고 巨大細胞에 있어서는 胎盤形成初期(妊娠 8日)에 높은 標識指數를 나타내나 妊娠日齡의 增加에 따라 점차로 減少했다고 報告하였다.

著者が 檢索한 hamster의 胎盤에 있어서 各種細胞의 ³H-thymidine에 의한 標識結果는 本 實驗을 試圖한 妊娠 8日에 이미 全 細胞가 標識되었고, 標識된 細胞도 妊娠 8日에 最高에 達하였으며 妊娠日齡의 增加에 따라 점차 減少하는 傾向이었다. 이와같은 結果는 Saccoman⁶⁾이 觀察한 巨大細胞의 標識指數의 變動과 大體로 一致하였으며, 巨大細胞에 있어서는 銀粒子를 많이 가지고 있었기 때문에 他 細胞에 比하여 觀察하기가 容易하였다. 위에서 言及한 rat²⁾ 및 mouse⁶⁾의 胎盤에 있어서의 結果는 Bouin液으로 固定하여 파라핀切片을 만들어 檢索한 것이 있으나 著者は Bouin液 및 Carnoy液으로 固定한 파라핀切片과 cryostat에 의한 凍結切片을 併用하여 檢索했다. 그 結果 Bouin液으로 固定한 切片보다 Carnoy液으로 固定한 切片이 좋은 成績을 나타내었고 標識指數도 높았다. 그러나 cryostat에 의한 凍結切片方法이 가장 좋았고 標識된 細胞의 算定에도 有用하였다.

胎盤形成의 完了時期에 關해서는 rat는 妊娠日齡 16日²⁾, mouse는 妊娠日齡 14日⁶⁾이라고 記載하고 있다. 그리고 Meisser 및 Leblond⁴⁾는 ³H-thymidine을 投與한 rat 및 mouse의 各種細胞에 對해서 標識指數의 算定으로 static cell, expanding cell 및 renewing cell 등으로 分類하고 있다. 本 hamster의 胎盤에 있어서는 絨毛尿膜胎盤 形成이 始作되는 妊娠 8日에는 各種細胞의 標識指數가 73%乃至 86%이었으나 妊娠 13日에는

4%乃至 14%로 減少했다. 그리고 妊娠 14日에는 secondary giant cell 및 trophospongial cell 以外는 0%乃至 1.6%로 減少했다. 이와같이 hamster의 胎盤形成은 妊娠 13日에 거의 完了되고 그 後에 나타나는 少數의 標識된 細胞는 Meisser 및 Leblond⁴⁾의 分類에 따라 細胞의 世代交替에 相當하는 것으로 思料되었다.

分裂細胞에 編入된 ³H-thymidine은 分裂이 계속되어도 DNA中에 包含된 ³H-thymidine量이 半減될 뿐 細胞가 파괴되어 死滅하지 않는 限 없어지지 않는다고 한다.⁵⁾ 本 hamster에 있어서 妊娠 8日 및 8.5日에 絨毛尿膜胎盤의 形成時 胚外體腔側의 trophoblast 및 胎兒血管側 內側의 trophoblast는 他 trophoblast에 比해서 標識된 細胞의 銀粒子數가 적고 일반 H-E染色標本에서도 細胞의 分裂像이 多數 觀察되었다. 이와같은 點으로 미루어 볼 때 胎盤形成이 始作되는 時點에서의 胚外體腔側의 trophoblast 및 胎兒血管側의 內層의 trophoblast는 母體血管側의 外層 trophoblast에 比하여 分裂이 旺盛하기 때문에 標識된 細胞의 銀粒子가 少數로 나타났다고 생각된다. 또한 妊娠 8日의 胚外體腔에 接한 trophoblast와 妊娠 8.5日의 胎兒血管側의 內層 trophoblast는 標識된 細胞의 銀粒子數가 거의 一致했다. 따라서 이들 trophoblast는 同一한 細胞起源 即 純粹한 絨毛膜細胞 由來하고 思料되었다.

巨大細胞는 胎盤外膜圓錐 및 trophospongium層 등의 trophoblast細胞에서 由來하고 巨大細胞가 자리잡고 있는 位置에 따라 primary giant cell, secondary giant cell 및 tertiary giant cell 등으로 區分하여 呼稱하고 있다.⁵⁾ 本 實驗에서는 多數 出現하는 primary giant cell 및 secondary giant cell에 關해서 그의 消長을 檢討한 바 primary giant cell은 妊娠 13日以後에서는 標識된 細胞가 出現하지 않았다. 이와같은 事實은 妊娠 13日에 Reichert膜의 離斷과 一致했다. 따라서 그以後의 胎盤에서는 機能的인 面에서 볼 때 primary giant cell의 生成을 必要로 하지 않는 것으로 생각되었다. secondary giant cell은 分娩時까지 標識된 細胞가 極少數로 觀察되었고 同時에 trophospongial cell에서도 標識된 細胞가 出現하는 것은 trophospongial cell의 分化能이 分娩時까지 維持되고 또한 이들 細胞가 巨大細胞로 分化될 수 있다고 하는 可能性을 內包하고 있다고 본다. 그리고 labyrinth層과 trophospongium層과의 境界部에 trophoblast細胞가 多數 標識되어 있다고 하는 點은 trophospongium層의 trophoblast細胞는 labyrinth層의 附加의 成長에도 關與하기 때문이라고 본다.

巨大細胞에 있어서 典型的인 分裂像은 認定될 수 없지만 ³H-thymidine이 編入되어 標識되었다고 하는 所

見에 對해서 Dickson 및 Bulmer¹⁾와 Jollie²⁾는 核分裂만 일어나기 때문이라고 하였고, Saccoman 등⁶⁾은 2核性 巨大細胞는 DNA合成中에 있는 隣接한 巨大細胞가 癒合함으로써 일어난 것이라고 추측하고 있다. 그런데 이들 巨大細胞에 있어서 核란이 分裂해서 혹은 隣接한 細胞의 癒合에 의해서 大(多)核性 및 2核性 巨大細胞가 되는지에 對해서는 斷言할 수 없으나 本 hamster의 胎盤에 있어서 trophospongium層 가까이 있는 primary giant cell은 子宮間膜側 反對側에 있는 primary giant cell에 比하여 多數 標識되어 있고 2核性 tertiary giant cell의 形態 등으로 볼 때 隣接한 細胞가 癒合해서 일어난 것보다는 核란이 分裂해서 大(多)核性(poly-ploidy) 巨大細胞가 생길 可能性이 크다고 思料되었다.

結 論

golden hamster(*Mesocricetus auratus*)의 胎盤에 있

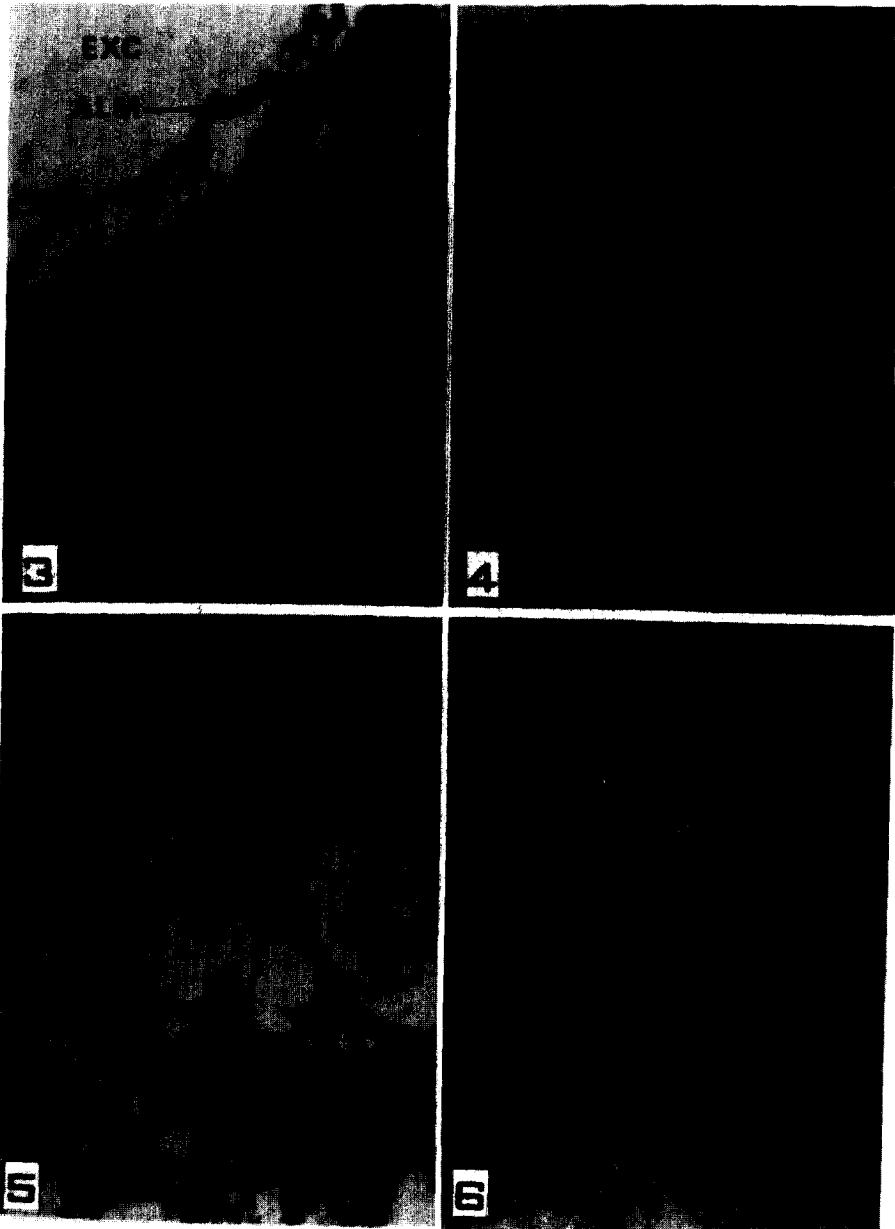
어서 妊娠日齡 8日부터 分娩時까지 胎盤을 構成하는 各種細胞에 對해 ³H-thymidine autoradiography에 의한 DNA合成時 細胞核의 標識와 標識된 細胞의 消長을 觀察하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

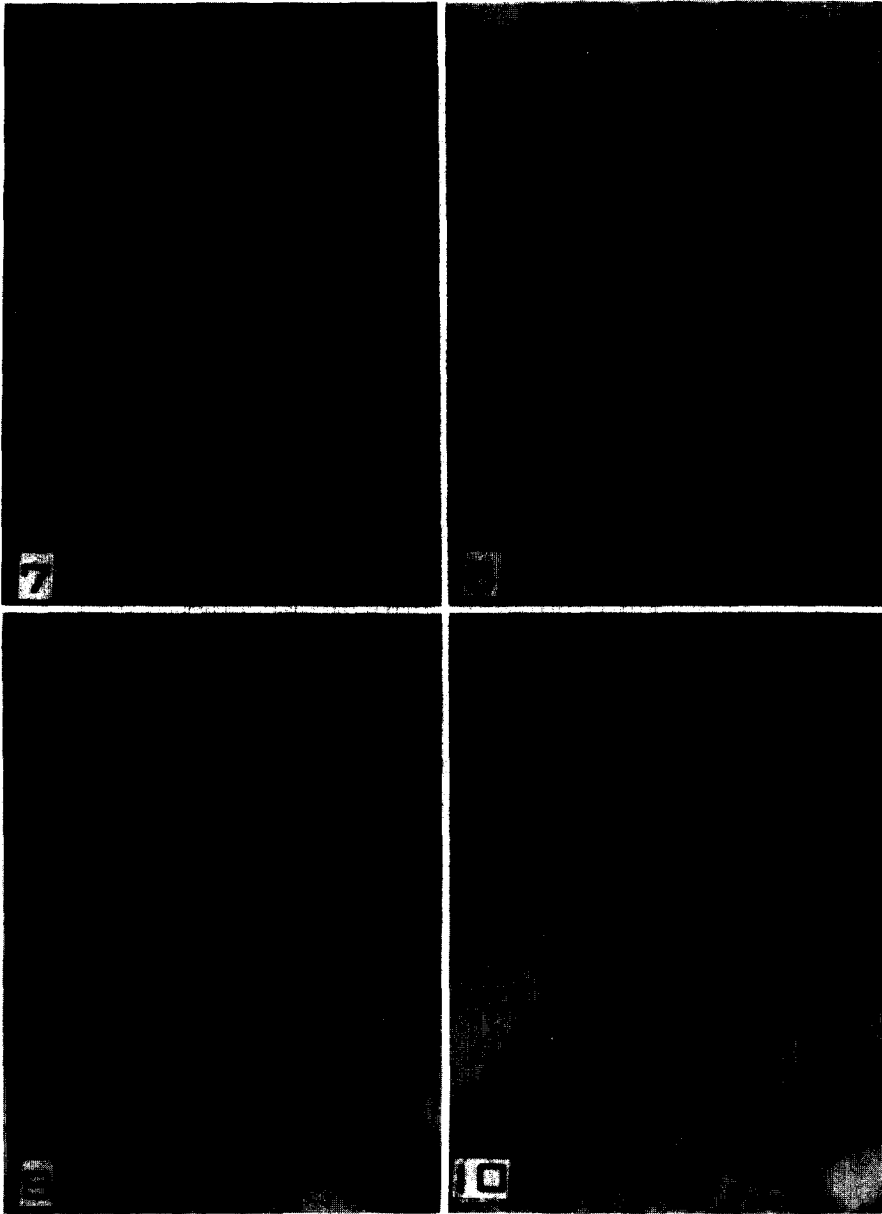
卵黃囊(臟側 및 壁側)의 內胚葉上皮細胞, labyrinth層과 trophospongium層의 trophoblast細胞 그리고 巨大細胞 등의 分裂能은 妊娠日齡의 增加에 따라 점차 減少하였으며 胎盤形成은 妊娠日齡 13日에 거의 完了되었다. trophospongium層의 trophoblast細胞는 labyrinth層의 附加的成長에도 關與하였으며, labyrinth層의 胎兒血管側 內層 trophoblast細胞는 純粹한 絨毛膜細胞由來로 看做되었다. 한편 各種細胞의 相互關係 및 巨大細胞의 多核性에 關해서 檢討되었다.

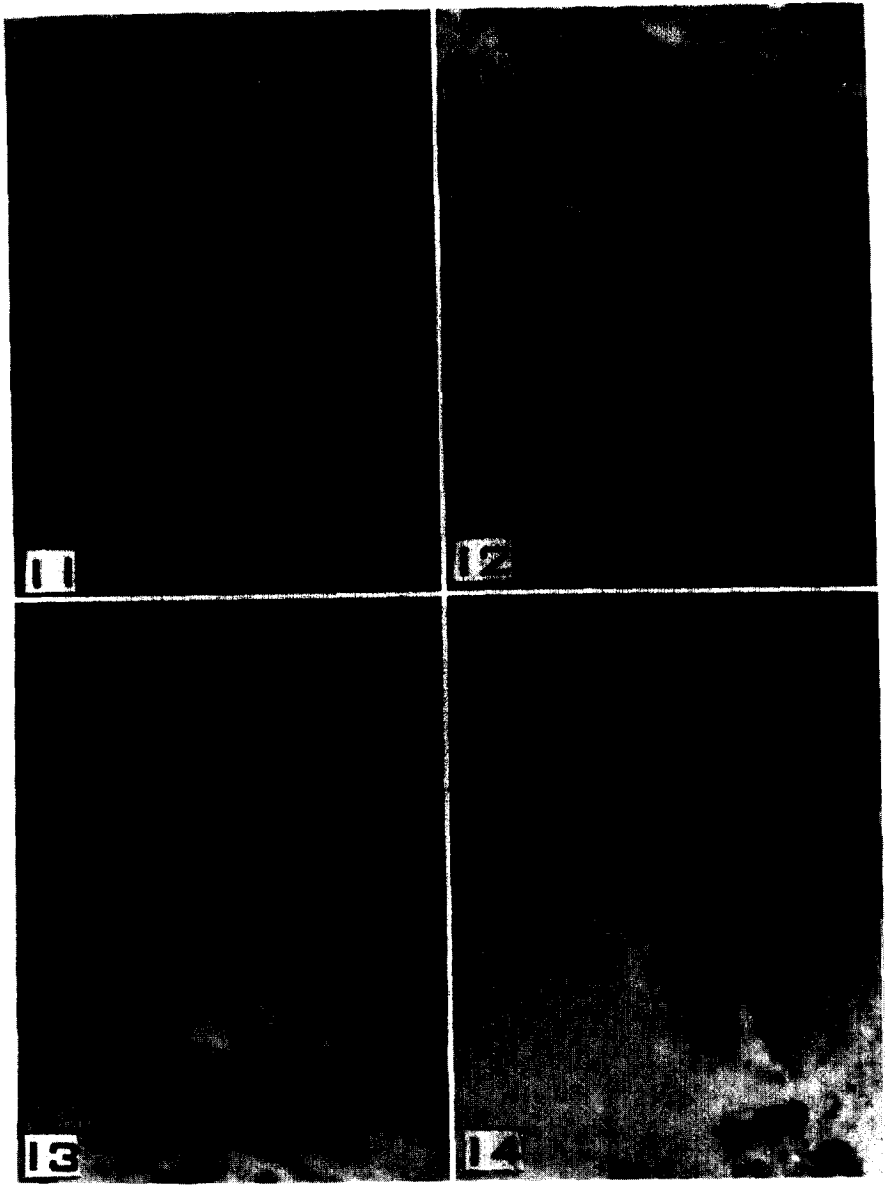
謝 辭: 本 研究를 行함에 있어서 始終 指導해 주신 日本 東京大學 農學部 教授 望月公子 博士님과 助教授 西田隆雄 博士님께 深心한 感謝의 뜻을 表하는 바이다.

Legends for Figures

- Fig. 3.** A portion of the ectoplacental cone on 8th day. Abundant mitoses are evidently seen in the trophoblastic cells adjacent to allantoic mesoderm. EXC; exocoelom, ALM; allantoic mesoderm. H-E. ×200.
- Fig. 4.** Labeled trophoblastic cells of the ectoplacental cone on 8th day. A little silver grains are seen at trophoblastic cell adjacent to exocoelom, however, much silver grains in a trophoblastic cell mesometrially. Frozen section. EXC; exocoelom. H-E. ×400.
- Fig. 5.** Autoradiograph of the chorioallantoic placenta on 8.5th day. Abundant silver grains(arrow) are seen in the trophoblastic cells on the side of maternal blood spaces against fetal blood vessels and too mesometrial trophoblastic cells. FBV; fetal blood vessel, TS; trophospongium. H-E. ×200.
- Fig. 6.** Labeled primary giant cells (arrow) trophoblastic cells of trophospongium on 9th day. TS; trophospongium. Carmalum. ×200.
- Fig. 7.** Labeled secondary giant cells (arrow) and trophoblastic cells of the trophospongium on 9th day. TS; trophospongium, DB; decidua basalis. Carmalum. ×200.
- Fig. 8.** Binucleated tertiary giant cell was labeled with tritium on 9th day. Carmalum. ×200.
- Fig. 9.** Labeled trophoblastic cells of the labyrinth on 11th day. Carmalum. ×400.
- Fig. 10.** Trophoblastic cells(endovascular cells) lines the maternal arterial space were labeled with tritium on 11th day. MBS; maternal blood space. Carmalum. ×200.
- Fig. 11.** Labeled trophoblastic cells on the placenta. Trophoblastic cells of the trophospongium-labyrinth boundary were evidently labeled. LB; labyrinth, TS; trophospongium. Carmalum. ×400.
- Fig. 12.** Labeled trophospongial cells of the trophospongium-labyrinth boundary on 14th day. LB; labyrinth, TS; trophospongium. H-E. ×400.
- Fig. 13.** Labeled endodermal cells of the parietal yolk sac (arrow) and labyrinthine trophoblastic cells on 12th day. LB; labyrinth. Carmalum. ×400.
- Fig. 14.** Labeled endodermal cells of the visceral yolk sac on 12th day. Frozen section. Carmalum. ×400.







参 考 文 献

1. Dickson, A.D. and Bulmer, D.: Observations on the placental giant cells of the rat. *J. Anat.* (1960) 94: 418.
2. Jollie, W.P.: Radioautographic observations on variations in desoxyribonucleic acid synthesis in rat placenta with increasing gestational age. *Am. J. Anat.* (1964) 114: 161.
3. Matsuzawa, T.: Radioautograph. Asakura Co., Tokyo (1970) p.130.
4. Meisser, B. and Leblond, C.P.: Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine- H^3 into male rat and mice. *Am. J. Anat.* (1960) 106: 247.
5. Orsini, M.W.: The trophoblastic giant cells and endovascular cells associated with pregnancy in the hamster, *Cricetus auratus*. *Am. J. Anat.* (1954) 94: 273.
6. Saccoman, F.M., Morgan, C.F. and Wells, L.J.: Radioautographic studies of DNA synthesis in the developing extraembryonic membranes of the mouse. *Anat. Rec.* (1967) 158: 197.
7. Steel, G.G.: The turnover of tritiated thymidine as a source of information on the kinetics of cell populations. In cell proliferation, ed. by Lamerton, L.F. and Fry, R.J. M., Oxford, Blackwell Scientific Publications. (1963) p.37.
8. Venable, J.H.: Pre-implantation stages in the golden hamster (*Cricetus*). *Anat. Rec.* (1946) 94: 105.
9. Venable, J.H.: Volume changes in the early development of the golden hamster. *Anat. Rec.* (1946) 94: 129.
10. Ward, M.C.: The early development and implantation of the golden hamster, *Cricetus*, and the associated endometrial changes. *Am. J. Anat.* (1948) 82: 231.
11. 李且秀: Golden hamster (*Mesocricetus auratus*)의 胎盤形成에 관한 形態學的 研究. 大韓獸醫學會誌. (1973) 13: 111.
12. 李且秀: Golden hamster胎盤의 glycogen 및 alkaline phosphatase의 組織化學的 分布. 大韓獸醫學會誌. (1975) 15: 233.
13. 李且秀, 西田隆雄, 望月公子: ハムスタ胎子の正常發育と成長. *Exp. Anim.* (1974) 24: 53.

Autoradiographic Observations on Variation of DNA Synthesis in the Developing Extraembryonic Membranes of the Golden Hamster

Cha-Soo Lee, D.V.M., M.S., Ph.D.

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Gyeongbuk National University

Abstract

The purpose of the present study is to determine variations in synthesis of DNA in the nuclei of various elements of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) placenta with increasing gestational age from the eighth day post coitum to parturition. The method employed for such determination was autoradiography following injection of pregnant animals with tritiated thymidine.

From the results reported, the following points are concluded.

The mitotic activities of the endodermal cells of the visceral yolk sac and of the parietal yolk sac, the trophoblastic cells of the labyrinth and the trophospongium and the giant cells were decreased with increasing gestational age. The placentation was nearly completed by day 13 of pregnancy and the increase in size of labyrinth was by appositional growth from the trophospongial cells. It was considered that the inner trophoblastic cells in the vicinity of the fetal blood vessels were originated from the pure chorion.

The interrelation among the various cells and the polyploidal giant cells in the placenta were discussed.