

# H-Y 抗體活性的 最適條件과 種間交叉反應

高正在 · 沈巽燮 · 金鍾培 · 朴弘陽 · 鄭吉生

建國大學校 畜産大學

## Optimal Condition and Interspecific Cross-Reaction of H-Y Antibody Activity

Ko, J. J., H. S. Shim, J. B. Kim, H. Y. Park and K. S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

### Summary

These experiments were carried out to clarify the optimal conditions and interspecific cross reaction of H-Y antibody activity. H-Y antiserum was prepared in inbred SD female rats and Balb/c female mice by repeated immunization of rat newborn testis homogenate, rat and mouse spleen cells obtained from males of same strain. The activity of H-Y antibody in antiserum was tested by ELISA and biological tests. The cross reactivity of H-Y antibody was confirmed by culturing mouse and rabbit embryos in medium containing H-Y antibody and complement obtained from rat and guinea pig, respectively. The optimal condition for the activity of H-Y antibody was also investigated by culturing embryos in medium with different pH and complement concentration. The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. The formation rates of H-Y antibody in rats immunized with newborn testis and spleen cell were 40.0 and 50.0% respectively, and that in mouse immunized with spleen cell was 48.4%.
2. The activity of H-Y antibody was not affected by pH in range of 6.5 to 8.0, and the same was true for the relative concentration of complement to the H-Y antibody.
3. Minimum time needed for the activity of H-Y antibody was confirmed to be 0.5 to 1 hour and 24 to 48 hours respectively for the zona free embryos and intact embryos.
4. When mouse and rabbit embryos were treated with H-Y antibody obtained from rat, 46.4 and 54.8% of embryos were retarded or destroyed. From these results it could be said that H-Y antibody had strong interspecific cross reactivity.

### I. 緒 論

Eichwald와 Silmsler (1955)가 생쥐의 皮膚移植實驗에서 組織適合性-Y抗原(histocompatibility-Y antigen; H-Y antigen)을 發見한 以來, 이 分野에 있어서 많은 研究가 수행되어왔다. Goldberg 등(1971)은 精子細胞障害活性試驗(sperm cytotoxicity test)을 통하여 血清學的으로 H-Y抗原의 存在를 確認하였고 Koo 등(1973)은 電子螢光顯微鏡檢査法(immunoelectron microscopy)에 의하여 H-Y抗原이 精子의 尖體(acrosome)에 集中되어 있다는 사실을

發見하였으며 Ohno 등(1976)은 소의 freemartin gonad를 사용, H-Y抗原이 精巢로의 發達을 決定한다는 것을 證明하였다.

한편, Krco와 Goldberg(1976)는 C57BL系 생쥐의 受精卵을 H-Y抗血清의 存在下에서 培養하였던 바 8~16細胞期 受精卵의 약 半數가 變性하였다고 報告하였다. 또 Epstein 등(1980)은 ICR系 생쥐의 8細胞期 受精卵을 H-Y抗血清 存在下에서 培養한 후 正常的으로 發達한 것만을 골라 染色體分析을 실시한 결과 그중 92%가 雌性이었다고 報告하였다. White 등(1982)은 8~16細胞期の C57BL/6系 생

註) 본 연구는 韓國科學財團의 지원에 의하여 수행되었음

취受精卵을 H-Y抗血清과 補體의 存在下에서 培養하고 그중 生存한 受精卵만을 移植한 결과 태어난 産子의 86%가 雌性이었다고 報告하였다. 또한 White 등(1983, 1984)은 생쥐 및 소에 있어서 間接螢光抗體法(indirect fluorescent method)에 의해 雌雄受精卵을 判別할 수 있는 可能性을 제시하였고 Wachtel(1984)은 同一한 方法으로 雌雄이 判別된 소의 受精卵을 移植한 결과 태어난 7마리의 産子中 6마리가 豫見한 性이었다고 報告하였다.

最近의 研究에 의하면 H-Y抗原은 高度의 交叉反應(cross reaction)을 가지는 것으로 생각되어 主目되고 있다. 즉, Silvers와 Yang(1973)은 생쥐와 흰쥐의 H-Y抗原間에 交叉反應이 存在한다는 것을 證明하였고 이어 Wachtel 등(1974)에 의하여 생쥐, 家兔, guinea pig 및 human 사이에도 交叉反應이 存在한다는 사실이 確認되었다.

이에 本 研究에서는 Balb/c系 생쥐 및 SD種 흰쥐에서 生産된 H-Y抗體를 ICR系 생쥐 및 New Zealand White種 家兔의 受精卵에 處理하여 H-Y抗體의 種間交叉反應을 檢査함과 동시에 H-Y抗體가 活性을 가질 수 있는 最適條件을 調査하기 위하여 H-Y抗體의 處理時間과 H-Y抗體를 含有한 培養液의 最適pH 및 補體의 最適濃度를 조사하였는 바 그 결과를 報告한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 試驗材料

#### 1) 供試動物

H-Y抗血清을 生産하기 위하여 近交系 SD種 흰쥐 및 Balb/c系 생쥐를 供試하였다. 이들의 年齡은 각각 8~10週齡과 4~5週齡이었고 體重은 각각 150~200g과 13~20g이었다. 또 採卵을 위해서는 ICR系 생쥐 및 New Zealand White種 家兔를 供試하였는데 이들의 年齡은 각각 4~5週齡과 6~8週齡이었으며 體重은 13~20g과 1.5~2.0kg이었다. 또한 補體(complement)를 生産하기 위하여 體重 700~800g의 English種 guinea pig를 供試하였다.

#### 2) 供試受精卵

ICR系 생쥐 및 New Zealand White種 家兔에게 常法에 準하여 PMSG(Pregnant Mare's Serum Gonadotropin; Follicon, Invert, Holland)와 HCG(Human Chorionic Gonadotropin; Choculan, Invert,

Holland)를 投與하여 多排卵을 透起하고, 雄性個體와 1對1로 合舍하여 授精시킨 후, 각각 2½일 및 1½일 후에 卵管과 子宮을 灌流하여 受精卵을 回收, 供試하였다.

#### 3) 培養液

採卵 및 回收된 受精卵을 培養하기 위하여 생쥐에 있어서는 Hoppe & Pitts(1973)의 培養液을, 家兔에 있어서는 modified Ham's F10(Seidel 등, 1976)을 使用하였고 이들의 pH는 각각 7.3 및 7.5, 滲透壓은 300 및 310mosm이었다. 培養液은 公히 使用直前에 0.2µm의 Millipore Filter(German Science Inc., U. S. A)를 使用하여 濾過시킴으로서 細菌을 除去하였다.

## 2. 試驗方法

本 試驗의 概要는 Fig. 1에서 보는 바와 같았다.

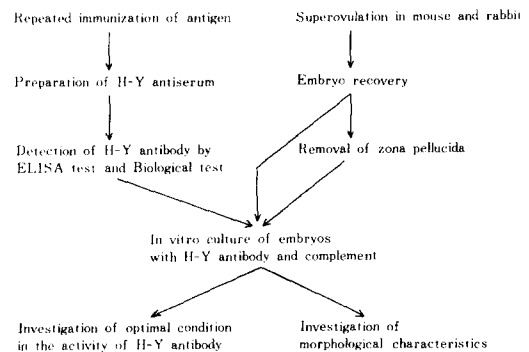


Fig. 1. Experimental procedure

#### 1) H-Y抗血清의 製造

H-Y抗原으로서 近交系 SD種 흰쥐의 newborn testis와 脾臟細胞 및 Balb/c系 생쥐의 脾臟細胞를 使用하였다.

出生後 3時間以內에 摘出한 SD種 흰쥐의 newborn testis를 PBS(Phosphate Buffered Saline)에 沈漬시킨 후 均質器(Nihon Seiki Kaisha Ltd., Japan)로서 均質化시키고 遠心分離에 의해 脂肪 및 結合組織을 除去한 上層液을 H-Y抗原으로 하여 adjuvant(Gibco)와 1對1로 混合하고 1週 1回, 6週 동안 同種의 雌性흰쥐 腹腔內에 注射하였다. 마지막 booster注射를 실시한 후 7日째에 採血, 血清을 分離하였다.

同種 雄性 흰쥐의 脾臟細胞를 抗原으로 使用한 경우는 脾臟을 摘出하여 PBS에 沈漬, 細胞를 分離하

여 1ml當 細胞數가  $7 \times 10^7$ 個가 되도록 調整하고 이렇게 調整된 抗原 1ml을 腹腔內에 注射하여 newborn testis와 同一한 方法으로 H-Y抗血清을 製造하였다.

또한 近交系 Balb/c系 생쥐의 雄性脾臟細胞를 分離하여 PBS 0.2ml當 細胞數가  $3 \times 10^7$ 個가 되도록 調整하여 抗原으로 使用하였다. 抗原0.2ml을 同種의 雌性생쥐 腹腔內에 1週 1回, 3週동안 注射하고 마지막 booster注射를 실시한 후 5日째에 採血하여 血清을 分離하였다.

## 2) H-Y抗體의 確認

흰쥐의 newborn testis homogenate를 H-Y抗原으로 使用한 경우에는 Farber (1984)의 方法에 따라 ELISA test에 의하여, 생쥐 및 흰쥐의 雄性脾臟細胞를 抗原으로 使用한 경우에는 受精卵의 培養을 통한 biological test에 의하여 H-Y抗體를 確認하였다.

## 3) 受精卵의 培養

BSA가 含有되어 있지않은 Hoppe & Pitts培養液에 H-Y抗血清 (10%, v/v)과 補體 (normal guinea pig serum; 10%, v/v)를 混合한 培養液 50 $\mu$ l의 小滴을 組織培養用 petridish에 滴下시킨 후 paraffin oil로 덮고 5%CO<sub>2</sub>, 95%air, 37°C條件의 CO<sub>2</sub>培養器內에서 4時間以上 平衡을 實施하였다. 이어 8~16細胞期의 生쥐受精卵을 培養液에 넣고 24~48時間동안 培養하면서 位相差顯微鏡(Ernst Leitz Co., W-Germany)하에서 形態學的 特性을 觀察하였다. 또 同一한 方法으로 modified Ham's F10 培養液을 使用하여 家兔의 受精卵을 培養하였다.

한편 H-Y抗體活性的 最適條件을 調查하기 위하여 H-Y抗體와 補體를 含有한 培養液을 1N NaOH溶液과 0.1N HCl溶液을 使用하여 pH를 6.0부터 8.5까지 그 範圍를 調整하여 각각의 pH에 있어서 생쥐 受精卵을 培養하였으며, H-Y抗體와 補體의

稀釋比率를 1:0.25에서 double dilution하여 1:4의 比率까지 變化시켜 生쥐受精卵을 培養하였다.

또한 H-Y抗體의 處理時間을 短縮하기 위하여 0.5% protease 溶液으로 생쥐 및 家兔의 16細胞期 受精卵의 透明帶를 除去한 후 H-Y抗血清 및 補體가 含有된 培養液으로 옮겨 30分~1時間동안 培養하고 前述한 것과 同一한 方法으로 形態學的 特性을 觀察하였다.

# III. 結果 및 考察

## 1. H-Y抗體의 確認

흰쥐의 newborn testis homogenate를 H-Y抗原으로 使用한 경우, ELISA test에 의해 H-Y抗體의 生成을 確認한 結果, 抗原을 注射한 5마리의 個體중 2마리에서 H-Y抗體가 確認되었으며, 흰쥐의 脾臟細胞 및 생쥐의 脾臟細胞를 H-Y抗原으로 使用한 경우에는 biological test에 의해 각각 4마리의 個體중 2마리, 31마리의 個體중 15마리에서 H-Y抗體가 確認되었다(Table 1). 서로 다른 세 가지의 抗原을 使用하여 동일한 H-Y抗體를 얻은 本研究의 結果는 흰쥐와 생쥐의 H-Y抗原은 同類體(homologue)라고 한 Silvers와 Yang(1973)의 報告와 一致하는 것이었으며 지금까지의 研究에서 H-Y抗原으로 주로 使用되어왔던 雌性脾臟細胞 이외에 흰쥐의 newborn testis homogenate도 H-Y抗原으로 使用할 수 있다고 한 Wachtel(1975)과 Utsumi(1982)의 報告를 再確認하는 것이었다.

## 2. H-Y抗體活性的 最適條件

試驗管內에서 H-Y抗體가 活性을 나타내기 위한 最適條件을 調查한 結果는 Fig. 2, 3, 4와 5 및 table 2. 3에서 보는 바와 같았다.

Table 1. Detection of H-Y antibody.

Species	Antigen	Heads immunized	Heads Ab* detected	Percent Ab* detected(%)	Detecting method
SD rat	newborn testis	5	2	40.0	ELISA test
SD rat	spleen cell	4	2	50.0	biological test
Balb/c mouse	spleen cell	31	15	48.4	biological test

\* Ab: antibody.

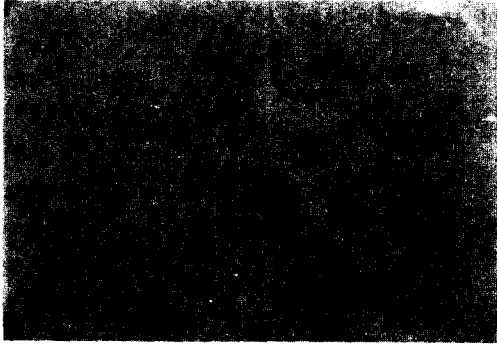


Fig. 2. Mouse embryos after incubation for 24 hours in medium containing H-Y antibody and complement.



Fig. 3. Zona-free mouse embryos treated with H-Y antibody and complement.



Fig. 4. Zona-free rabbit embryos.



Fig. 5. Zona-free rabbit embryos treated with H-Y antibody and complement.

Table 2. Effect of pH on the activity of H-Y antibody.

pH range of medium	No. of embryos examined	No. of embryos affected	Percent affected(%)
6.0	100	85	85.0 <sup>a</sup>
6.5	80	45	56.3 <sup>b</sup>
7.0	190	80	42.1 <sup>b</sup>
7.5	200	100	50.0 <sup>b</sup>
8.0	105	45	42.9 <sup>b</sup>
8.5	75	65	86.7 <sup>a</sup>

Means with different superscripts are different ( $P < 0.002$ ).

1) 培養時間

H-Y抗體가 效果를 나타내는데 소요되는 時間은 培養하는 受精卵의 透明帶의 有無에 따라 크게 달랐다.

Fig. 2는 H-Y抗體와 補體를 含有한 培養液내에

서 8細胞期 생쥐受精卵를 24時間 培養했을 때의 狀態로서 中央 3個와 右下段 1個의 受精卵은 H-Y抗體와 補體의 作用에 의하여 細胞가 破壞되었으며, 나머지 5個의 受精卵은 모두 正常的인 發達을 보여 주고 있다. 또 Fig. 3과 4 및 5는 0.5% protease 용

Table 3. Optimal concentration of complement for the activity of H-Y antibody.

H-Y antibody /complement(v/v)	No. of embryos examined	No. of embryos affected	Percent affected
1 : 0.25	100	45	45.0
1 : 0.5	80	35	43.8
1 : 1	260	115	44.2
1 : 2	135	60	44.4
1 : 4	90	50	55.6

液으로 透明帶를 除去한 생쥐 및 家兔의 受精卵을 H-Y抗體와 補體의 存在下에 1時間동안 培養했을 때의 狀態를 보여주고 있다. 생쥐受精卵에 있어서는 6個가 家兔受精卵에 있어서는 下段 兩側 2個와 下段 左側 1個가 分割球의 破壞를 보여주고 있다.

以上の 試驗에 의해 H-Y抗體處理의 效果가 나타나는데 소요되는 時間은 透明帶가 存在하는 경우에는 24時間以後(White 등, 1982), 透明帶가 除去된 受精卵에 있어서는 30分~1時間정도 되는 것을 알 수 있다. 또 透明帶가 除去된 受精卵에 있어서는 H-Y抗體가 活性을 나타내는 것으로 보아 H-Y抗原은 雄性胚의 分割球의 細胞膜特異抗原인 것으로 생각된다. 이러한 結果는 Wachtel 등(1975, 1976)의 研究結果와도 一致하는 것이었다.

### 2) 수소이온농도

수소이온농도(pH)가 H-Y抗體의 活性에 미치는 영향은 table 2와 같았다. 이 표에 의하면 H-Y抗體 및 補體를 含有한 培養液의 pH가 6.5~8.0의 範圍內에 있어서는 pH에 따른 有意差가 없이 약 半數의 受精卵에서 變性이 일어났다. 그러나 pH6.0 및 8.5에서 培養한 受精卵은 각각 85.0%와 86.7%에서 變性이 나타났다. 이러한 結果는 H-Y抗體와 補體의 作用에 대하여 pH가 영향을 미치기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 그 외에도 극단으로 높거나 낮은 pH가 受精卵의 生存性 자체를 低下시키기 때문

에 나타난 結果일수도 있을 것이다. 이 점에 관해서는 今後 再檢討되어야 하겠으나 H-Y抗體의 活性을 調査할 때 使用하는 培養液의 pH範圍는 6.0~8.0을 벗어나지 않는 것이 바람직하다고 하겠다.

### 3) 補體의 濃度

補體의 濃度가 H-Y抗體의 活性에 미치는 영향은 Table 3에서 보는 바와 같았다. 이 표에 의하면 補體의 濃度가 H-Y抗體의 活性에 미치는 영향은 그다지 크지 않은 것을 알 수 있다. 즉 H-Y抗體에 대한 補體의 濃度比를 0.25에서 4.0까지 높여도 變性受精卵의 發生率에는 有意差가 없었다. 다만 補體가 H-Y抗體와 結合하여 細胞를 破壞시키게 되므로(Krcso Goldberg, 1976 ; White 등, 1982) 그 存在는 H-Y抗體의 作用을 위하여 必須의일 것으로 思考된다.

### 3. H-Y抗體의 種間交叉反應

흰쥐에서 生産된 H-Y抗體의 種間交叉反應을 調査하기 위하여 생쥐 및 家兔受精卵을 H-Y抗體 및 補體의 存在下에서 處理하였는 바 그 結果는 table 4에서 보는 바와 같았다.

이 표에서 보는 바와 같이 H-Y抗體와 補體의 處理를 받은 8~16細胞期의 생쥐 및 家兔의 受精卵 중 각각 53.6%와 45.2%에 해당하는 受精卵이 正當의으로 發達하였고 나머지 46.4%와 54.8%에 해

Table 4. Interspecific cross reaction of H-Y antibody.

Embryos of	No. of embryos treated	No. of embryos developed(%)	No. of embryos arrested or destroyed(%)
ICR mouse	248	133(53.6)	115(46.4)
New Zealand White rabbit	42	19(45.2)	23(54.8)

당하는 受精卵은 破壞되거나 發達이 停止되었다. 이러한 結果는 흰쥐에서 生産된 H-Y抗體가 생쥐 및 家兔의 受精卵에 대해서도 活性을 나타내는 것을 입증하는 것으로 즉 흰쥐의 H-Y抗體가 생쥐 및 家兔의 受精卵에 대하여 種間交叉反應을 가진다는 證據로 解釋된다. 本試驗의 이러한 結果는 Silvers와 Yang(1973) 및 Wachtel 등(1974)의 研究結果를 뒷받침하는 것이다.

이러한 점을 綜合하여 考察할 때 흰쥐에서 얻은 H-Y抗體를 利用하면 異種의 受精卵의 性도 判別이 可能할 것으로 생각된다.

#### IV. 摘要

本試驗은 H-Y抗體의 活性에 필요한 培養液의 最適pH水準과, 抗體와 補體의 最適混合比率을 調査함과 동시에 이 抗體의 種間交叉反應을 調査할 目的으로 實施하였다.

近交系 SD種 흰쥐의 newborn testis homogenate, 脾臟細胞 및 Balb/c系 생쥐의 脾臟細胞를 抗原으로 使用하여 H-Y抗體를 製造하고 이렇게 제조한 H-Y抗體에 補體를 첨가한 培養液에 생쥐 및 家兔의 受精卵을 培養함과 H-Y抗體의 種間交叉反應을 檢討함과 동시에 培養液의 pH 및 補體의 濃도가 H-Y抗體活性에 미치는 影響을 調査하였다. 또 H-Y抗體의 기능발휘에 소요되는 處理時間도 調査하였다.

本試驗에서 얻은 結果를 요약하면 다음과 같다.

1. 抗原으로서 흰쥐의 newborn testis homogenate, 脾臟細胞 및 생쥐의 脾臟細胞를 同種의 雌性 個體에 投與한 후 ELISA test 및 biological test에 의하여 H-Y抗體의 形成여부를 確認한 結果, 각각 40.0, 50.0 및 48.4%의 個體에서 H-Y抗體의 生成이 確認되었다.

2. H-Y抗體活性의 最適pH는 6.5~8.0 이었고 補體의 濃도는 抗體의 0.25~4.0배까지의 範圍내에서는 별다른 影響을 미치지 않았다.

3. H-Y抗體의 기능발휘에 필요한 最小時間은 透明帶의 存在하에서는 24時間 以上이 필요한데 비하여 透明帶를 除去했을 때에는 30分~1時間으로 충분하였다.

4. 흰쥐에서 生産된 H-Y抗體는 생쥐 및 家兔의 受精卵에 대하여 種間交叉反應을 보였다.

#### V. 引用文献

1. Billingham, R.E. and I.M. Hings. 1981. The H-Y antigen and its role in natural transplantation. *Hum. Genet.*, 58: 9-17.
2. Eichwald, E.J. and C.R. Silmsler. 1955. United communication. *Transplant. Bull.*, 2: 148-149.
3. Farber, C.M., D. Liebenthal, S.S. Wachtel, C.C. Rundles. 1984. Detection of H-Y in the enzyme-linked immunosorbent assay. *Hum. Genet.*, 65: 278-279.
4. Goldberg, E.H., E.A. Boyse, D. Bennett, M. Sheid and E.A. Carswell. 1971. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature*, 232: 478-480.
5. Hoppe, P.C. and S. Pitts. 1973. Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol. Reprod.*, 8: 420-426.
6. Koo, G.C. 1981. Serology of H-Y antigen. *Hum. Genet.*, 58: 18-20.
7. Koo, G.C., C.W. Stackpole, E.A. Boyse, U. Hammerling and M.P. Lardis. 1973. Topographical location of H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectronmicroscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70: 1502-1505.
8. Krco, C.J. and E.H. Goldberg. 1976. Detection of H-Y (male) antigen on 8-cell mouse embryos. *Science*, 193: 1134-1135.
9. Mittwoch, U. 1977. H-Y antigen and the growth of the dominant gonad. *J. Med. Genet.*, 14: 334-338.
10. Ohno, S. 1983. Sex control in mammals. *Proceedings of the International Symposium on Beef Production*. pp. 263-273.
11. Ohno, S., L.C. Christian, S.S. Wachtel and G.C. Koo. 1976. Hormone like role of H-Y antigen in bovine freemartin gonad. *Nature*, 261: 597-599.
12. Seidel, G.C., R.A. Bowen and M.T. Kane. 1976. In vitro fertilization, culture and transfer of rabbit ova. *Fertil. Steril.*, 27: 861-870.
13. Shelton, J.A. and E.H. Goldberg. 1984. Male-restricted expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Transplantation*, 37: 7-8.
14. Silvers, W.K. and S.L. Yang. 1973. Male-specific

- antigen: its homology in mice and rats. *Science*, 180: 570-572.
15. Utsumi, K., E. Satoh and M. Yuhara. 1983. Sexing of mammalian embryos exposed to H-Y antisera. *J. Reprod. Immunol., Supplement*, pp. 59.
  16. Wachtel, S.S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenol.*, 21: 18-28.
  17. Wachtel, S.S., G.C. Koo, E.E. Zuckerman, U. Hammerling, W.P. Scheid and E.A. Boyse. 1974. Serological crossreactivity between H-Y (male) antigens of mouse and man. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 1215-1218.
  18. Wachtel, S.S., G.C. Koo and E.A. Boyse. 1975. Evolutionary conservation of H-Y (male) antigen. *Nature*, 254: 270-272.
  19. Wachtel, S.S., S. Ohno, G.C. Koo and E.A. Boyse. 1975. Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*, 257: 235-236.
  20. Wachtel, G.M., S.S. Wachtel, D. Nakamura, C.A. Moreirafilho, M. Bruner and G.C. Koo. 1984. H-Y antibodies recognize the H-Y transplantation antigen. *Transplantation*, 37: 8-13.
  21. White, K.L., G.M. Linder, G.B. Anderson and R.H. BonDurant. 1982. Survival after transfer of 'sexed' mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theriogenol.*, 18: 655-662.
  22. White, K.L., G.M. Linder, G.B. Anderson and R.H. BonDurant. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenol.*, 19: 701-705.
  23. White, K.L., M.W. Bradbury, G.B. Anderson and R.H. BonDurant. 1984. Immunofluorescent detection of a male-specific factor on preimplantation bovine embryos. *Theriogenol.*, 21: 275.