

# 家畜의 改良 및 繁殖效率 增進에 관한 研究

## I. 토끼에 있어서 體外受精能獲得 精子에 의한 體外受精 및 受精卵 移植에 관한 研究

鄭英彩 · 金昌根 · 朱日永\* · 鄭吉生\*\*李揆丞\*\*\*

中央大學校 畜產學科

## Studies on the Improvement of Performance and Reproductive Efficiency in Farm Animals

### I. In vitro fertilization by in vitro capacitated sperm and transfer of in vitro fertilized embryos in rabbits

Chung, Y. C., C. K. Kim, I. Y. Choo,\* K. S. Chung\*\* and K. S. Lee\*\*\*

Dept. of Anim. Sci., Chung-Ang University

#### Summary

Two experiments in this study were designed to compare the potential for in vitro capacitation and in vitro fertilization of ejaculated sperm among individual rabbit bucks. In experiment 1, for in vitro capacitation, the ejaculated sperm were preincubated in DM for 12 hr or 18 hr after HIS treatment, then 12 hr - or 18 hr - preincubated sperm were incubated with superovulated rabbit ova in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for 36 hr at 38°C, and a part of cleaved ova was transferred to the recipient does for implantation of embryo. In experiment 2, effect of lysolecithin addition to preincubation medium on induction of accelerated in vitro capacitation and in vitro fertilization of individual rabbit sperm was studied.

#### Experiment 1;

1. Percent acrosome reaction of sperm, noted after staining, after 12 hr or 18 hr preincubation ranged from 52.5 to 76.0% and from 67.5 to 90.0%, respectively and sperm motility index of these sperm ranged from 20.0 to 47.5 for 12 hr - preincubated sperm and from 15.0 to 37.5 for 18 hr - preincubated sperm. There was no a certain relation between percent acrosome reaction and sperm motility index.
2. In vitro fertilization rate (cleavage rate) of in vitro capacitated sperm varied widely among individual bucks, ranging from 0 to 47.8% for 12 hr - preincubated sperm and from 0 to 60.9% for 18 hr - preincubated sperm. Cleavage rate of 18 hr - preincubated sperm was higher and faster than that of 12 hr - preincubated sperm.
3. Eight of 44 in vitro fertilized embryos transferred into 6 recipients were implanted in 4 recipients (66.7%) up to day 15 and implantation rate was 18.2%.

#### Experiment 2;

1. The percent acrosome reaction of sperm before and after 4 hr preincubation in DM without lysolecithin varied significantly among individual bucks, ranging from 0.4 to 18.4% and from 1.7 to 37.4%, respectively and percent acrosome reaction of sperm at 30 min after addition of 60 µg/ml lysolecithin also was significantly different among bucks, ranging from 19.2 to 67.1%.

---

\*中央大學校 生物學科 Dept. of Biol., Chung-Ang Univ.

\*\*建國大學校 畜產學科 Dept. of Anim. Sci., Kon-Kuk Univ.

\*\*\*忠南大學校 畜產學科 Dept. of Anim. Sci., Chungnam National Univ.

2. Effect of accelerated acrosome reaction following lysolecithin addition was more considerable in the individuals showed less percent acrosome reaction before and after 4 hr preincubation. Percentage of motile sperm and motility score showed a tendency towards a decrease with increase of preincubation time and time after lysolecithin addition.
3. In vitro fertilization rate (cleavage rate) at 24 hr postinsemination with pooled sperm were treated to 60  $\mu\text{g/ml}$  lysolecithin for 30 min after 4 hr preincubation was 24.6%, a higher rate than 13.2% for control. While 80  $\mu\text{g/ml}$  lysolecithin-added sperm showed a lower cleavage than control and 60  $\mu\text{g/ml}$ -added sperm at both 24 hr and 48 hr postinsemination.

These results from 2 experiments suggest that more useful preincubation time for the in vitro capacitation of ejaculated rabbit sperm is 18 hr in DM after HIS treatment, although there is wide variation in in vitro capacitation and in vitro fertilization rate among individual bucks, and lysolecithin addition to at least 4 hr - preincubated sperm in DM can result in almost same in vitro fertilization rate as that of 18 hr - preincubated sperm in the experiment 1.

## I. 緒 論

Austin(1951)과 Chang(1951)에 의하여 토끼精子가 암컷 生殖器道内에서 受精能獲得이 先行되어야 卵子와 受精될 수 있다는 사실이 보고된 이후로 30여년이 지난 지금까지도 精子의 受精能獲得 내지는 尖體反應의 機轉이 잘 설명되지 못하고 있다. 그러나 이러한 문제는 體外受精技術의 開發과 活用을 위하여 究明되어야 할 중요한 연구과제 중의 하나이다.

토끼精子의 體外受精能獲得을 위하여 여러가지 方法들이 보고되어 왔다. Kirton과 Hafs(1965), Hall과 Brackett(1976)는 amylase로, Kirton과 Hafs(1965), Brackett 등(1972), Hall과 Brackett(1976)는 子宮液으로서, Ericsson(1969)은 노새의 eosinophils, Ericsson 등(1971)은 Sendai virus로, Ogawa 등(1972)과 Okinaga 등(1974)은 複合培養液으로, Rosado 등(1974)은 cAMP와 사람卵巢의 卵胞液을 이용하여 정자의 體外受精能獲得의 誘起를 시도하였다. 그러나 이들 방법에서 완전한 결과는 얻지 못하였다.

한편, Brackett와 Oliphant(1975)는 高張培養液(380mOsm/kg)과 等張培養液(290mOsm/kg)으로 射出된 토끼 精子를 20分間 前培養한 다음 體外受精시켜 얻어진 受精卵을 移植하여 최초로 正常子兔를 생산한 바 있다. 그후 이 方法을 기초로 하여 Brackett 등(1978, 1982b), Rogers(1978), Brackett(1979 a b, 1981), Akruk 등(1979), Hosoi 등(1981), Viriyapanich와 Bedford(1981), Niwa 등(1983) 및 La-

mbert 등(1984)이 토끼의 體外受精에 관한 結果를 보고하였다. 이들 報告에서 體外受精能獲得에 필요한 정자의 前培養時間이 Brackett와 Oliphant(1975)가 제시한 시간보다도 길어야 한다는 것이 공통된 주장이었다. 射出精子의 경우 Akruk 등(1979)과 Viriyapanich와 Bedford(1981)는 12시간의 前培養에서, Brackett 등(1982b)은 12~22시간, Lambert 등(1984)은 2~18시간 前培養에서 體外受精率이 向上됨을 보고하였다. 한편 精巢上體精子의 경우도 Hosoi 등(1981)과 Niwa 등(1983)은 약 10시간 前培養에서 높은 體外受精率을 얻을 수 있었다.

최근 體外受精能獲得에 필요한 所要時間의 단축 또는 수정능획득의 同期化가 phospholipids의 前處理 또는 phospholipids와의 前培養에서 가능하다는 사실을 Fleming과 Yanagimachi(1981), Yanagimachi와 Suzuki(1985)가 guinea pig精子에서, Ohzu와 Yanagimachi(1982)는 hamster精子에서 각각 보고하였는데 이러한 가능성은 이미 Brackett 등(1972)도 토끼에서 제시한 바 있다.

哺乳動物에서 체외수정능획득 소요시간과 受精能獲得率에 영향을 미치는 要因에 관하여 아직 不明한 상태이지만 중요한 要因으로서 Bedford(1970)는 수컷의 生理狀態, Rogers와 Yanagimachi(1975)는 精子培養液의 조성과 添加劑의 종류에 따라 차이가 있음을 보고 하였고 특히 수컷간의 個體差異가 주된 要因이라고 주장한 報告例가 많이 있다. 토끼에서는 Brackett와 Oliphant(1975), Akruk 등(1979), Brackett 등(1982b), Lambert 등(1984)의 보고가 있으며, 소에서도 體外受精率에 대한 수컷간의 個體差異

에 관하여 Brackett 등(1982a), Lambert 등(1984), Sirard와 Lambert(1985)이 보고하였다. 이러한 결과들은 體外受精實驗에 있어서 사용된 精子에 따라 體外受精率의 變異가 크다는 것을 암시해 주는 결과라 하겠다.

현재 體外受精能獲得 및 體外受精과 관련된 또 한 가지의 문제는 體外受精시킨 受精卵의 移植結果가 아직 극히 저조한 點이다. 토끼의 경우 Brackett와 Oliphant(1975)는 176個의 수정란이식에서 단지 13.1%의 着床과 3首의 子兔生産에 불과했고, 그후 Brackett 등(1982)은 39個의 受精卵移植에서 18%인 7首의 子兔를 生産하였을 뿐이다.

本研究은 이상과 같은 문제점을 調査하기 위하여 두가지 實驗이 수행되었다. 實驗1은 토끼개체별 射出精子의 前培養時間에 따른 精子의 體外受精能力을 調査하기 위하여 體外에서의 受精能獲得과 體外受精을 시험하고 동시에 體外受精된 受精卵의 移植 후 着床(妊娠)率을 調査하여 子兔의 分娩 可能性을 보았으며, 實驗2는 精子의 前培養時 lysolecithin의 添加가 精子의 體外受精能獲得 소요시간에 미치는 影響을 수토끼 個體別로 비교하고 이들 정자의 體外受精能力을 調査코저 시도하였다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 供試動物

實驗1과 2에서 精液採取用으로 사용된 수토끼는 體重 3.5~4.0kg의 New Zealand white種 23首였으며 採卵用으로 사용된 未經産 암토끼는 體重 2.5~3.0kg의 New Zealand white種과 California種을 供試하였다. 實驗1에서 受卵兔는 1~2産의 體重 3.5~4.0kg인 New Zealand white種과 California種 암토끼였다.

### 2. 供試動物의 管理

1日 200~250g의 토끼용 pellet 사료를 2回로 나누어 급여하였고 물은 자유급수시켰다. 明暗時間은 14:10으로 조정하였으며 암토끼는 偽妊娠을 막기 위하여 供試하기 25日前부터 개별사육관리하였다.

### 3. 精液採取

精液採取 간격은 週2回로 하였고 採取前에 假乘 駕를 몇 차례시킨 후 人工腔과 teaser를 이용하여

採取하였다. 精液은 채취직후 38℃ 항온실로 옮겨 수토끼 個體別로 精子活力과 精子濃度를 檢査한 후 일정수준치 이상의 精液性狀을 가진 것만 使用하였다.

## 4. 精子處理와 前培養

1) 實驗1: 수토끼의 개체별 體外受精能獲得을 誘起시키기 위하여 그림1과 같이 Brackett와 Oliphant(1975)의 方法을 약간 변형한 과정으로 射出精子를 처리한 후 12시간 또는 18시간 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 前培養하였다. 前培養液은 高張培養液 (high ionic strength-defined medium, HIS-DM)과 等張培養液 (isotonic defined medium, DM)이었고 두 배양액의 組成은 表1과 같다.

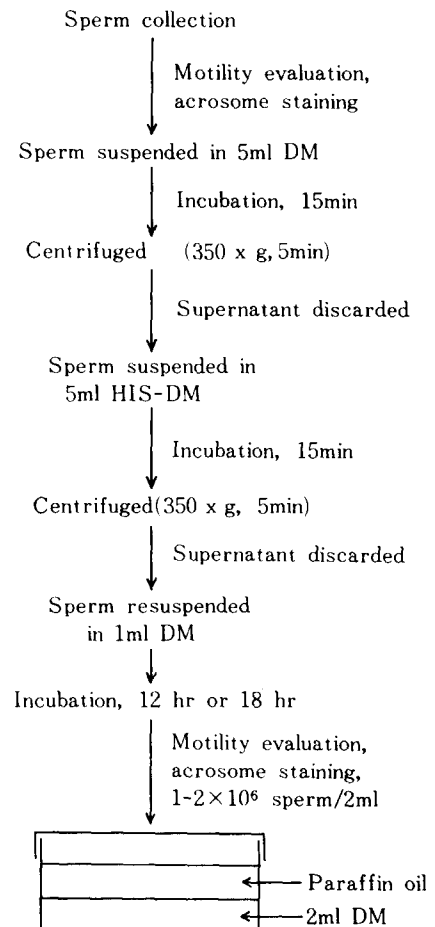


Fig. 1. Process of sperm treatment after sperm collection. Sperm maintained at 38℃ throughout.

**Table 1. Composition of HIS-DM for in vitro capacitation and of DM for in vitro fertilization and early development of embryo**

Component	mM	g/l
Defined Medium(DM)		
NaCl	112.00	6.500
KCl	4.02	0.300
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.25	0.330
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.83	0.113
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.52	0.106
NaHCO <sub>3</sub>	37.00	3.104
Glucose	13.90	2.500
Pyruvic acid(anhydrate)		0.137
BSA		3.000
Penicillin, sodium salt		0.031
Distilled water to 100ml, pH 7.8		
High Ionic Strength Medium(HIS-DM)		
34mg NaCl/10ml of DM, approximately 380mOsm/kg		

2) 實驗 2: Lysolecithin(LC)處理에 따른 수토끼 개체별 精子的 體外受精能獲得率을 비교하기 위하여 사용된 精子處理 및 前培養液의 DM組成은 역시 表1과 같다. 먼저 射出精液中 gel을 제거한 후 8~10ml의 DM으로 희석하고 350g으로 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 신선한 受精能獲得用 배양액(DM)으로 精子濃도가  $1.0 \times 10^7$ /ml이 되게 재부유하였다. 이 정자부유액 0.4ml를 뚜껑이 있는 plastic tube(12×55mm)에 취한 후 5% CO<sub>2</sub> air로 충분히 bubbling시킨 다음 38℃, CO<sub>2</sub>배양기에서 4시간 前培養하였다. 4시간 전배양직후 미리 준비된 lysolecithin(lysophosphatidyl-choline, Type I, Sigma)용액(2 mg/ml)을 정자부유액 내에 60µg/ml의 첨가농도가 되도록 서서히 첨가한 후 다시 30분간 前培養하였다.

## 5. 尖體反應과 精子活力 調査

1) 實驗 1: 精液採取 직후, 12시간과 18시간 前培養한 정자부유액을 각각 Wells와 Awa(1970)의 방법에 따라 slide glass위에 염색액과 同量을 취하여 30초간 加溫한 후 잘 混合하여 塗沫染色하여 건조시킨 후 cover glass로 봉인하고 600倍下에서 尖體消失精자를 尖體反應精자로 하여 百分率을 구하였다. 精子活力은 HIS처리직전, 前培養 12시간과 18시간 후에 각각 150倍下에서 檢査하였으며 精子生存性과 運動性으로 精子活力指數를 구하여 비교하였다.

2) 實驗 2: 精子前培養 직전, 4시간 전배양 및 lysolecithin첨가후 30분배의 尖體反應은 Bryan과 Akruk(1977)의 방법에 따라 정자부유액의 塗沫標本을 만든 후 位相差 현미경하에서 尖體消失精자의 百分率을 구하였으며 染色後 頭部頂點부위가 cherry-red로, 頭部の 背面과 下面이 pink色인 尖體를 갖지 않은 精자를 尖體反應-精자로 계수하였다. 精子活力은 運動性을 가진 精子比率(0~90%)과 전진운동속도(0~5)로서 비교하였다. 운동속도 5는 가장 빠른 속도를 의미한다.

## 6. 體外受精

1) 實驗 1: (1) 卵子採卵: 供卵兔의 過排卵誘起는 FSH(Burns-Biotec. Lab, Inc., USA) 0.5mg을 1日 12시간 간격으로 2回 3日間 총 3.0mg을 皮下注射하고 최종 FSH注射後 24시간에 HCG(Corter-Glogau Lab, Inc., USA) 200IU를 耳靜脈內로 주사함과 동시에 직경 5mm 유리봉으로 交尾刺戟을 주었다. 採卵은 HCG주사후 13~14시간에 도살하여 배어낸 난관을 38℃ 항온실로 옮겨 여과지로 주위혈액을 제거한 다음 上向式採卵法으로 採卵하였다. 채란된 卵子는 培養液으로 2~3회 세척후 사용하였다. 供卵兔의 排卵數와 採卵率은 表2에서 보는 바와 같으며 首當 平均排卵數는 37個였고 採卵率은 71.5%였다. (2) 培養液: 사용된 體外受精用 培養液은

**Table 2. Number of ovulation points and eggs recovered in superovulated rabbits**

No. of donors	No. of donors superovulated		No. of ovulation points(A)		No. of eggs recovered(B)		Recovery rate (B/A, %)
	No.	%	Total	Mean±SE	Total	Mean±SE	
18	18	100	672	37.3±3.8	503	27.9±4.1	71.5±5.2

DM이었으며 매 실험때마다 제조하였고 사용전에 38℃ 항온실에서 5% CO<sub>2</sub> air로 충분히 bubbling 한 후 0.22μm millipore filter로 여과 멸균시킨 후 사용하였다. (3) 精子 및 卵子注入과 受精判定: 35×10mm petri dish(Falcon plastics # 1006)에 2ml의 培養液을 채운 뒤 dish內에 10~20個 卵子를 넣었고 여기에 12시간 또는 18시간 前培養한 정자부유액의 精子濃도가 體外受精培養液 2ml內에 1~2×10<sup>6</sup>이 되도록 조정하여 注入하고 미리 5% CO<sub>2</sub> air로 bubbling된 paraffin oil로 덮고 dish cover를 덮은 다음 알미늄호일로 싸서 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 36시간 培養하였다. 受精與否는 卵割된 난자만을 受精卵으로 判定하였다.

2) 實驗 2: (1) 卵子採卵: 供卵兔의 過排卵誘起는 FSH(Burns-Biotec, Lab., USA) 0.5mg을 1일 12시간 간격으로 2회, 3日間 총 3.0mg을 피하주사하고, 최종 FSH주사후 12시간에 LH(Burns-Biotec, Lab., USA) 2.5mg을 주사한 다음 12~15시간 후에 마취시켜 개복후 卵管으로부터 上向式으로 採卵하였다. (2) 培養液: 體外受精을 위하여는 DM에서 24시간 培養하였고 受精卵의 계속 발달을 위하여 그후 24시간(정자주입후 24~28시간)은 BS M-II(Kane과 Foote, 1970)로 옮겨 계속 배양하였다. (3) 精子 및 卵子 注入과 受精判定: 注入된 精子의 體外受精能獲得은 무작위로 3~4 首로부터 채취한 정자를 혼합하여 DM에서 BSA를 빼고 대신 토끼 血清을 20% 첨가한 BSA-free DM +20% rabbit serum(Akruk 등, 1979)에서 4시간 前培養시킨 후 losylecithin 60μg/ml 또는 80μg/ml을

첨가하고 다시 30分 배양하였다. 體外受精培養液을 petri dish內에 0.25ml의 droplet를 만들고 한 droplet당 4~6個의 卵子를 넣은 다음 위의 方法대로 제조된 混合 前培養정자부유액을 배양액 내의 精子濃도가 1.0×10<sup>6</sup>/ml되게 조정하여 droplet내로 주입하였다. 注入後 24시간과 48시간에 각각 卵割狀態를 근거로 受精率을 조사하였다.

### 7. 受精卵의 移植과 着床率調査

實驗 1에서 體外受精後 4~8細胞期에 도달된 受精卵을 同期化된 受精兔의 卵管漏斗部에 micropipette로 移植하였으며, 受卵兔의 同期化는 供卵兔에 HCG投與後 6時間 때에 GnRH 1μg을 皮下注射하였으며, 30~33時間뒤에 腹正中線을 절개하여 子宮狀態와 排卵點을 확인하고 受精卵을 移植하였다. 이식된 受精卵은 體外受精率이 높은 A, D, E 수토끼의 수정란만을 사용하였으며, 移植後 15日에 開腹하여 着床(妊娠) 여부를 調査하였다.

### III. 實驗成績 및 考察

實驗 1. 12時間과 18時間 前培養後 個體別 精子의 體外受精能獲得, 體外受精 및 受精卵移植

#### 1. 個體別 精子의 體外受精能獲得과 精子活力

수토끼 7 首로부터 個體別로 채취한 精液을 HIS 處理後 12시간과 18시간 DM에서 전배양한 뒤의 個體別 尖體反應率과 精子活力指數의 變化는 表 3과 같다. 12시간과 18시간 前培養後의 尖體反應率은 각각 52.5~76.0%와 67.5~90.0%로서 개체간에 차

Table 3. Percent acrosome reaction and sperm motility index of ejaculated spermatozoa before and after 12hr-or 18hr- preincubation in 7 different bucks

Sperm from each buck	No. of replicates	Before preincubation		12 hr preincubation		18 hr preincubation	
		%AR <sup>1)</sup>	SMI <sup>2)</sup>	%AR	SMI	%AR	SMI
A	2	10.0±1.0	77.5±2.5	56.5±3.5	20.0±2.5	68.5±1.5	15.0±0.0 <sup>3)</sup>
B	2	9.0±1.0	87.5±2.5	63.5±2.5	47.5±2.5	67.5±2.5	37.5±2.5
C	2	11.5±1.5	82.5±2.5	54.0±2.0	32.5±2.5	70.0±3.0	29.6±0.6
D	2	11.5±2.0	75.0±2.5	56.0±3.0	40.0±0.0	68.5±1.5	25.9±6.5
E	2	9.0±2.0	72.5±2.5	52.5±1.5	47.5±2.5	67.5±3.5	26.9±6.5
F	2	14.5±1.5	97.5±2.5	76.0±7.0	37.5±2.5	90.0±2.0	25.0±0.0
G	2	11.0±2.0	72.5±2.5	58.0±2.0	45.9±4.2	72.0±1.0	31.3±2.1

Spermatozoa without acrosomal caps after staining were expressed as acrosome-reacted spermatozoa. 1) Acrosome reaction(AR), 2) Sperm motility index(SMI), 3) Mean±SE.

이가 컸고 前培養以前의 尖體消失精자의 比率 9.0~14.5%에 비하여 각각 5.5와 6.6배로 증가되었으며 18시간 前培養때가 12시간 배양때보다 약 20% 더 증가되었다. 個體間에는 특히 F개체의 정자가 월등히 높았고 그의 6首間에는 차이가 없었다. 精子活力指數는 12시간과 18시간 전배양에서 각각 20.0~47.5와 15.0~37.5의 범위로서 시간 경과에 따라 活力指數가 크게 낮아졌다. 개체간에는 12시간 전배양에서 B, D, G개체의 정자가 다소 높았고 18시간에서는 B와 G의 정자가 역시 높았으며, A개체의 정자는 12시간과 18시간 전배양에서 모두 낮았다. 前培養時間의 비교에서 尖體反應率이 높아짐에 따라 精子活力指數는 낮아짐을 알 수 있었으나, 같은 전배양 시간내에 있어서는 이들 두 調査值間에는 이와 같은 관계가 분명치 않았다.

本實驗에서 染色方法에 의한 尖體消失精자의 比率이 시간경과에 따라 증가됨을 확인할 수는 있었으나 전체적으로 높게 측정되었을 뿐만 아니라 또한 개체간에 큰 차이가 나타나지 않았던 것은 염색 방법이 牛精子方法이었기 때문에 다소 측정오차에 기인된 것으로 추측된다. 12시간 前培養後에 특히 개체간에 精子活力指數의 차이가 있었던 結果는 Hosoi 등(1981)이 HIS처리후 10시간 배양후 운동성정자비율의 범위가 5~60%로 개체차이가 크다고 한 報告 및 Brackett 등(1982b)이 12~14시간 前培養後에 정자활력에 개체차이가 있었다는 報告와 程度差는 다소 있었으나 같은 경향이었다. 한편 시간 경과에 따라 活力指數가 저하된 것은 Brackett 등(1982b)이 12시간과 22시간間에 일부개체에서 확인한 것과 일치하였다. 그러나 尖體反應程度와 정자 활력지수간에 일정한 관계를 관찰할 수 없었던 점은

Foote 등(1985)이 尖體消失精자比率의 상승과 活力低下間에 역관계를 보여준 결과와는 다르다.

## 2. 個體別 精자의 體外受精率과 受精卵의 卵割

HIS處理後 12시간과 18시간 DM에서 前培養한 精자로 體外受精시킨 精자의 受精率은 表 4와 5에서 보는 바와 같으며 受精卵의 卵割程度의 分布는 表 6과 같다. 表 4에서 보는 바와 같이 12시간 前培養한 정자에서, 注入後 36시간 때의 受精率은 0~47.8% 범위로서 개체간에 큰 차이가 있었으며 특히 C와 F개체에 의하여는 受精이 전혀 불가능하였고 B개체는 극히 낮았으며, A, D와 E개체는 월등히 높았다. 한편 表 5의 18시간 前培養한 정자주입에서는 C개체에서는 역시 전혀 受精卵를 얻을 수 없었고 B개체는 12시간의 경우와 같았고 A와 D개체는 크게 높았으며 F와 G개체에서는 배양 시간의 연장으로 受精率이 다소 向上되었다. 이상의 結果에서 수토끼 7首中 A, D, E개체는 12시간 전배양에서도 40%이상의 受精率을 보인 반면에 F와 G개체는 18시간 전배양에서 20%이상 그리고 B, C, F개체는 體外受精率이 극히 저조한 점으로 보아 體外受精率에 대한 個體차이가 受精率을 좌우하는 중요한 要因이 됨을 알 수 있었다. 한편 體外受精率(表 4, 5)과 尖體反應率(表 3)간의 관계를 비교해 보았을 때 일정한 상관관계를 얻을 수는 없었다. 表 6에서는 體外受精率이 12시간 전배양보다 18시간에서 다소 높을 뿐만 아니라 受精卵의 卵割도 다소 빠름을 나타내 주고 있다.

體外受精率에 대한 個體差異에 관해서는 토끼에서의 卵割率이 Brackett와 Oliphant(1975)는 0~69%, Akruk등(1979)은 0~50%, Brackett등(1982b)

Table 4. In vitro fertilization rate of sperm preincubated for 12 hrs after HIS treatment

Sperm from each buck	No. of replicates	No. of ova inseminated	No. of ova cleaved <sup>1)</sup>	% Normal cleavage
A	4	55	23	41.5±1.1 <sup>2)</sup>
B	2	19	1	4.2±4.2
C	2	27	0	0
D	3	53	26	47.8±4.9
E	2	24	10	41.7±8.3
F	2	30	0	0
G	2	30	7	27.5±12.5

1) Ova were examined 36 hr after sperm insemination, 2) Mean ± SE.

Table 5. In vitro fertilization rate of sperm preincubated for 18 hr after HIS treatment

Sperm from each buck	No. of replicates	No. of ova inseminated	No. of ova cleaved <sup>1)</sup>	% Normal cleavage
A	4	60	31	52.3±3.2 <sup>2)</sup>
B	2	31	2	6.6±1.1
C	2	26	0	0
D	3	37	23	60.9±7.8
E	3	48	24	48.0±4.1
F	2	25	5	19.9±3.2
G	2	38	15	38.9±11.1

1) Ova were examined 36 hr after sperm insemination, 2) Mean ± SE.

Table 6. Number of cleaved ova and distribution of cell stage 36 hr postinsemination by preincubation time

Preincubation time	No. of ova inseminated	Total	2-cell	4-cell	8-cell	16-cell
12 hr	238	67(28.2%)	14	35	17	1
18 hr	265	100(37.7%)	9	67	21	3

은 12시간 前培養에서 0~40%, 18시간에서는 0~61%라고 하였는데 이는 本實驗結果와 모두 일치된 것이었다. 소에서도 개체차이가 심하여 Lambert 등(1984)은 14~46%, Sirard와 Lambert(1985)는 14~55%로 보고한 바 있다. 18시간 前培養精자의 注入에서 4~8細胞期の 分割卵이 많았던 결과는 Brackett 등(1982b)과 아주 일치된 결과였다.

이와 같은 體外受精率의 개체차이의 原因으로서 Brackett와 Oliphant(1975), Wolf와 Inoue(1976)는 個體精子間에 受精能獲得所要時間의 차이에 기인된 것이라고 설명한 바 있다. 精子活力과 體外受精率과의 관계에서는 Hosoi 등(1981)이 活力이 良好한 정자에서 대체로 體外受精率이 높았다는 결과를 분 실험에서는 확인되지 않았다. 그러나 Sirard와 Lambert(1985)는 소에서 體外受精卵의 卵割率이 精子活力과 일치되지 않음을 보고한 바 있다.

### 3. 體外受精卵의 移植과 着床

體外受精된 受精卵 44個를 同期화된 6首의 受卵兔에 移植한 결과는 表7과 같다. 즉, 受精卵 移植後 15일에 受卵兔 6首中 4首에서 着床 하였으며 (66.7%), 移植된 44個의 受精卵中 8개가 着床하여 18.2%의 着床(妊娠)率을 나타냈다. Brackett와 Oliphant(1975)는 2細胞期の 受精卵 176개를 19首

에 移植하여 6首에서 24個가 着床되어 13.1%의 着床率을 보고하였으며, Brackett 등(1982b)은 4細胞期の 受精卵 39個를 3首에 移植하여 7마리의 子兔(17.9%) 생산을 보고한 바 있다. 이들 성적을 본 성적과 비교해 볼 때 着床率에 있어서는 유사한 결과라고 생각되며 子兔의 생산에 있어서는 실험이 더욱 진전되어야 비교할 수 있을 것 같다.

### 實驗 2. Lysolecithin 添加에 따른 個體別精자의 體外受精能獲得과 體外受精

#### 1. 個體別 精자의 體外受精能獲得과 精子活力

16首의 수토끼 精자를 DM內에서 4시간 前培養한 다음 lysolecithin 60µg/ml을 첨가후 30분간 다시 배양시킨 個體別 精자의 尖體反應과 精子活力의 變化는 表8 및 9과 같다. 表8에서 세정정자의 前培養 以前과 4시간 배양적후 尖體反應率의 범위는 각각 0.4~18.4%와 1.7~37.4%였다. 이는 實驗1에서 12시간과 18시간 前培養精자의 경우보다 더욱 현저하게 個體차이를 보여주고 있다. 4시간 前培養後의 尖體反應에서는 個體間 反應程度의 高低에 따라 16首의 수토끼를 3~4群으로 區分할 수가 있었다. 尖體反應誘起에 대한 lysolecithin의 添加效果를 보면 4시간 前培養에서 尖體反應이 높은 個體에서는 2~3倍로 增加되는데 비하여 5%미만을 보

Table 7. Implantation rate at day 15 after transfer of in vitro fertilized embryos

Recipient No.	No. of embryos transferred	No. of fetus implanted	Implantation rate(%)
1	8	2	25.0
2	8	3	37.5
3	8	2	25.0
4	8	0	0
5	8	0	0
6	4	1	25.0
Total	44	8	18.2

Table 8. Individual variation in percent acrosome-reacted sperm among 16 bucks before preincubation and following 4-hr preincubation and lysolecithin exposure (60 μg/ml) in DM

Buck No.	Before preincubation	At the end of 4hr-preincubation	At 30 min. after lysolecithin addition
1	8.5±4.5 <sup>ab</sup>	37.4±14.9 <sup>a</sup>	57.5±10.3 <sup>ab</sup>
2	18.4±7.5 <sup>a</sup>	34.4±5.4 <sup>a</sup>	51.5±10.1 <sup>abc</sup>
3	13.7±5.8 <sup>ab</sup>	33.3±14.7 <sup>a</sup>	67.1±15.1 <sup>a</sup>
4	7.0±3.4 <sup>bcd</sup>	28.2±12.6 <sup>ab</sup>	54.7±11.2 <sup>abc</sup>
5	7.5±4.7 <sup>bcd</sup>	17.1±9.7 <sup>bc</sup>	27.5±2.6 <sup>bcd</sup>
6	6.6±1.9 <sup>bcd</sup>	13.8±1.4 <sup>bc</sup>	54.5±14.4 <sup>abc</sup>
7	7.6±5.1 <sup>bcd</sup>	13.6±7.8 <sup>bc</sup>	31.2±9.8 <sup>bcd</sup>
8	8.2±2.6 <sup>abc</sup>	13.3±1.7 <sup>bc</sup>	43.6±11.2 <sup>abcd</sup>
9	0.4±0.2 <sup>e</sup>	11.8±7.9 <sup>cd</sup>	19.2±2.5 <sup>d</sup>
10	1.8±0.9 <sup>cde</sup>	8.6±5.6 <sup>cd</sup>	30.2±3.2 <sup>bcd</sup>
11	1.1±0.6 <sup>de</sup>	8.4±6.3 <sup>cd</sup>	20.9±5.4 <sup>d</sup>
12	5.2±0.8 <sup>bcd</sup>	7.8±0.8 <sup>cd</sup>	19.3±0.8 <sup>d</sup>
13	3.4±1.1 <sup>cde</sup>	6.0±3.0 <sup>cd</sup>	27.5±13.0 <sup>bcd</sup>
14	3.0±1.3 <sup>cde</sup>	5.3±1.6 <sup>cd</sup>	29.4±3.2 <sup>bcd</sup>
15	1.7±0.3 <sup>cde</sup>	1.8±1.0 <sup>d</sup>	37.5±10.3 <sup>bcd</sup>
16	1.6±0.9 <sup>cde</sup>	1.7±0.2 <sup>d</sup>	21.0±2.2 <sup>cd</sup>
Mean±SE	6.0±1.2	15.1±2.9	37.0±3.9

Tabular values are expressed as means ± SE from 4 replicates per buck.

a, b, c, d, e Means within a column with different superscripts differ (P < 0.05).

였던 個體에서는 약10배의 증가됨과 동시에 lysolecithin 첨가에 대한 反應도 역시 개체간에 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한 lysolecithin 첨가의 반응정도가 前培養前後와의 尖體反應率과 서로 높은 相關關係가 있었다 (r=0.85, 0.89). 表 9에서는 前培養時間경과와 尖體反應率이 높아짐에 따라 運動性精자의 比率이 감소되고 운동속도도 다소 低下

됨을 보여주고 있다.

이상의 결과를 實驗 1 과 비교해 볼 때 前培養以前에 있어서 HIS처리보다 DM만의 處理에서 다소 尖體反應이 낮음을 알 수 있었고 한편 DM처리후 4시간 前培養에서 精子活力이 저하되는 個體가 있음을 알 수 있었다. 또한 DM처리후 4시간 정도의 前培養에서도 尖體反應이 12시간 前培養에서보다 현



Table 9. Individual variation in percent motile sperm and motility score among 16 bucks before preincubation and following 4hr- preincubation and lysolecithin exposure (60  $\mu$ g/ml) in DM

Buck No.	Before preincubation		At the end of 4hr- preincubation		At 30 min after lysolecithin addition	
	% motile	Score	% Motile	Score	% Motile	Score
1	8.38	5.0	51.3	2.6	36.3	2.0
2	83.3	4.3	57.3	2.7	46.7	1.7
3	56.7	3.0	56.7	2.8	49.0	2.3
4	86.3	4.6	62.5	2.9	60.0	3.3
5	85.0	4.5	78.3	3.5	62.5	2.8
6	83.8	4.0	63.8	3.5	65.0	3.1
7	85.0	5.0	82.5	3.8	61.3	2.8
8	82.5	3.1	73.8	2.5	75.5	3.5
9	86.7	5.0	81.7	3.5	76.7	2.9
10	85.0	4.9	80.0	3.8	73.8	2.8
11	87.5	5.0	75.0	3.0	68.8	2.8
12	80.0	3.7	81.7	3.7	78.3	3.7
13	86.3	5.0	82.5	4.1	68.8	3.3
14	85.0	4.7	80.7	2.8	56.0	2.5
15	90.0	5.0	66.7	3.5	71.7	3.5
16	88.3	4.7	63.3	2.8	60.0	2.8
Mean $\pm$ SE	83.6 $\pm$ 1.9	4.5 $\pm$ 0.2	71.1 $\pm$ 2.7	3.2 $\pm$ 0.1	63.2 $\pm$ 2.9	2.9 $\pm$ 0.1

Tabular values are expressed as means from 4 replicater per buck.

저히 낮음을 알 수 있다.

本 實驗에서 lysolecithin 첨가에 따른 尖體反應의 誘起效果는 Fleming과 Yanagimachi(1981), Yanagimachi와 Suzuki(1985)가 guinea pig에서, Ohzu와 Yanagimachi(1982)가 hamster에서 보고한 결과와 유사하나 效果程度가 그들 결과에는 미치지 못하였다. 이는 Ahkong 등(1972)이 보고한 것처럼 lysolecithin에 대한 反應이 species간의 차이에서 기인된 것 같다.

#### 2 個體別精자의 體外受精率과 受精卵의 卵割

4 시간 前培養 精자에 lysolecithin 添加로 尖體反應이 誘起됨을 근거로 每실험 때마다 수토끼 3~4首를 무작위로 선택하여 채취된 混合精자를 BSA-free DM+20% rabbit serum에서 前培養하고 lysolecithin을 첨가한 精자로 體外受精시킨 결과는 表10과 같다. 여기서 정자의 4 시간 전배양액을 DM 대신 BSA-free DM+20% 토끼혈청을 사용한 것에 비실험에서 lysolecithin 첨가에 의한 정자활력의

저하가 DM보다 적었기 때문이다.

精子注入後 24시간까지의 卵割率이 60  $\mu$ g/ml의 lysolecithin을 첨가한 정자에서 높았고 한편 80  $\mu$ g/ml을 첨가한 정자에서는 특히 48시간까지의 卵割率이 현저히 낮았다. 이로서 4 시간 前培養後 體外受精能獲得 誘起를 위하여 60~80  $\mu$ g/ml의 lysolecithin添加로 可能性을 알 수 있었다. 本 實驗에서 60  $\mu$ g/ml 첨가수준의 효과는 hamster에서 Ohzu와 Yanagimachi(1982)의 50  $\mu$ g/ml, Llanos와 Meizel(1983)의 75  $\mu$ g/ml, guinea pig에서 Yanagimachi와 Suzuki(1985)의 75  $\mu$ g/ml 수준에서 얻어진 결과와 일치하였다. 또한 80  $\mu$ g/ml 수준에서 卵割率이 낮아졌던 결과는 Crose등(1971)이 120  $\mu$ g/ml첨가에서 95%의 정자가 運動性을 상실케 된다는 결과와 비교해 볼 때 높은 수준의 첨가가 정자수정율에 영향을 주었던 것으로 추측된다.

#### IV. 摘 要

本 研究는 家畜의 改良과 繁殖效率 增進을 위한

**Table 10. In vitro fertilizing ability of acrosome-reacted sperm from LC addition in BSA-free DM + 20% rabbit serum medium**

LC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Normal cleavage of ova									
	By 24 hrs postinsemination in DM						From 24 to 48 hrs postinsemination in BSM-II			
	No. of ova (trials)	Not cleaved of fragmented	2-cell	4-cell	8-cell	% cleaved	No. of ova (trials)	Not cleaved or fragmented	% cleaved	
0	67(4)	58	3	3	3	13.4	33(2)	16	51.5	
60	61(3)	46	7	6	2	24.6	32(2)	17	46.9	
80	54(3)	48	1	3	2	11.1	14(1)	10	28.5	
Parthenogenetic activation in DM	0	18(2)	17	-	1	-	5.9	15(2)	14	6.7

연구의 제 1 단계 실험으로 토끼를 실험동물로 수토끼 個體別 射出精자의 體外受精能獲得과 體外受精能力을 比較하기 위하여 두 가지 實驗이 수행되었다. 實驗 1에서는 射出精자의 體外受精能獲得을 위하여 HIS處理後 12時間 또는 18時間 DM에서 前培養한 다음 38°C의 5% CO<sub>2</sub> 培養器內에서 36時間 동안 過排卵 처리에 의하여 채취된 卵子和 體外受精시켰으며 卵割卵의 一部는 着床率을 보기 위하여 受卵兔에 移植하였다. 實驗 2에서는 前培養後에 lys-olecithin의 添加가 수토끼 個體別 精자의 體外受精能獲得 所要時間의 단축과 體外受精에 미치는 영향을 조사하였다.

**實驗 1 :**

1. 12時間과 18時間 前培養後 염색하여 조사된 精자의 尖體反應率이 각각 52.5~76.0%와 67.5~90.0%였으며 이들 精자의 精子活力指數는 각각 20.0~47.5와 15.0~37.5였고 尖體反應率과 精子活力指數間에 一定한 關係는 없었다.

2. 體外受精能獲得 精자의 體外受精率(卵割率)은 수토끼 個體間에 差異가 컸으며 그 範圍는 각각 0~47.8%와 0~60.9%였으며 18時間 前培養精자의 卵割率이 12時間 前培養精자보다 높고 빨랐다.

3. 體外受精된 44개의 受精卵을 6首의 受卵兔에 移植한 결과 移植後 15일에 4首에서 8개가 着床되어 18.2%의 着床率을 얻어 子兔의 分娩可能性을 확인하였다.

**實驗 2 :**

1. DM에서 4時間 前培養 前과 後의 尖體反應率은 個體間에 차이가 컸으며 그 範圍는 각각 0.4~18.4%와 1.7~37.4%였다. 前培養液에 60  $\mu\text{g/ml}$

의 lysolecithin을 添加하고 30分間 배양한 후에도 尖體反應率은 역시 개체간에 차이가 커서 19.2~67.1% 범위였다.

2. Lysolecithin添加後의 尖體反應의 促進效果는 4時間 前培養 前後에 尖體反應이 낮았던 個體에서 더욱 현저했으며 運動精자의 比率과 運動의 強度는 前배양시간과 lysolecithin添加後 시간 經過에 따라 감소되었다.

3. 4時間 前培養後 60  $\mu\text{g/ml}$ 의 lysolecithin으로 30分間 處理한 精자를 注入하고 24時間 배양한 후의 體外受精率(卵割率)은 24.6%로서 對照區의 13.4%보다 높았으나, 80  $\mu\text{g/ml}$  添加時에는 精子注入後 24時間과 48時間 배양에서 모두 對照區와 60  $\mu\text{g/ml}$  添加區의 精子보다 卵割率이 낮았다.

以上 두 實驗結果에서 토끼射出精자의 보다 効果的인 前培養時間은 個體間에 차이는 있으나 HIS處理後 DM에서 18時間이며 또한 DM에서 적어도 4時間 前培養한 精자에 lysolecithin 添加로 實驗 1에서 18時間 前培養精자와 거의 같은 수준의 體外受精率(卵割率)을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

**VI. 引用文獻**

- Ahkong, Q.F., F.C. Cramy, D. Fisher, J.I. Howell and J.A. Lucy. 1972. Studies on chemically induced cell fusion. *J. Cell Sci.*, 10: 769-787.
- Akruk S.R., W.J. Humphreys and W.L. Williams. 1979. In vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. *Differentiation*, 12: 125-131.
- Austin, C.R. 1951. Observations on the penetra-

- tion of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B.*, 4: 581-596.
4. Bedford, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. (Suppl)*, 2: 128-258.
  5. Brackett, B.G. 1979a. In Vitro fertilization and its assessment with embryo culture. In: Beltsville Sgmosia in Agricultural Research III. Animal Reproduction. Montclair: Allanheld, Osmun and Co., 171-193.
  6. Brackett, B.G. 1979b. In vitro assessment of sperm fertilizing ability. In: Alexander N.J., ed. *Animal Models for Research on Contraception and Fertility*. Hagerstown: Haper and Row, 254-268.
  7. Brackett, B.G. 1981. Applications of in vitro fertilization. In: Brackett, B.G., G.E. Seidel Jr. and S. M. Seidel, eds. *New technologies in Animal Breeding*. New York, Academic Press, pp. 141-16.
  8. Brackett, B.G., D. Mousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A. Dressel. 1982a. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27: 147-158.
  9. Brackett, B.G., K. Bousquet and M.A. Dressel. 1982b. In vitro sperm capacitation and in vitro fertilization with normal development in the rabbit. *J. androl.*, 3: 402-411.
  10. Brackett, B.G., J.L. Hall and Y.K. Oh. 1978. In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal and ejaculated rabbit sperm. *Fertil. Steril.*, 29: 571-582.
  11. Brackett, B.G., J.A. Mills, G. Oliphant, H.M. Seitz, G.G. Jeitles and L. Mastroianni, Jr. 1972. Preliminary efforts to capacitate rabbit sperm in vitro. *Int. J. Fertil.*, 17: 86-92.
  12. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12: 260-274.
  13. Bryan, J.H.D. and S.R. Akruk, 1977. A naphthol yellow S and erythrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *Stain Technol.*, 52: 47-50.
  14. Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature, Lond.*, 163: 167.
  15. Croce, C., W. Sawicki, D. Kritchevsky and H. Koprowiski. 1971. Induction of homokaryocyte, heterokaryocyte and hybrid formation by lysolecithin. *Exptl Cell Res.*, 67: 427-435.
  16. Ericsson, R.J. 1969. Capacitation in vitro of rabbit sperm with mule eosinophils. *Nature*, 221: 568-569.
  17. Ericsson, R.J., D.A. Buthala and J.F. Norland. 1971. Fertilization of rabbit ova in vitro by sperm with adsorbed sendai virus. *Science.*, 173: 54-55.
  18. Fleming, A.A. and R. Yanagimachi. 1981. Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res.*, 4: 253-273.
  19. Foote, R.H., J.K. Graham and P.A. Oltenacu. 1985. Controlled laboratory tests for ranking bulls on the basis of fertility. Progress report, unpublished.
  20. Hall, J.L. and B.G. Brackett. 1976. Enzymatic capacitation of ejaculated rabbit sperm in vitro. Presented at Society for the Study of Reproduction Meeting. Philadelphia, Pa. Abst. 10: 20.
  21. Hosoi, Y.K. Niwa, S. Hatanaka and A. Iritani. 1981. Fertilization in vitro of rabbit eggs by epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 24: 637-642.
  22. Kane, M.T. and R.H. Foote, 1970. Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 133: 912-915.
  23. Korton, K.T. and H.D. Hafs. 1965. Sperm capacitation by uterine fluid or beta-amylase in vitro. *Science*, 150: 618-619.
  24. Lambert, R.D., M.A. Sirard and R. Beland. 1984. The fertilization performance in vitro of bovine and rabbit spermatozoa capacitated in vitro. *Proc. 10th Congr. Anim. Reprod. AI. 111.*, Vol. III, pp. 392-394.
  25. Llanos, M.N. and S. Meizel. 1973. Phospholipid methylation increased during golden hamster Merm capacitation in vitro. *Biol. Reprod.*, 28: 1043-1051.

26. Niwa, K., Y. Hosoi, K. Ohara and A. Iritani. 1983. Fertilization in vitro of rabbit eggs with or without follicular cells by epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *Anim. Reprod. Sci.*, 6: 143-149.
27. Ogawa, S., K. Satoh, M. Hamada and H. Hashimoto. 1972. In vitro culture of rabbit ova fertilized by epididymal sperms in chemically defined media. *Nature*, 238: 270-271.
28. Ohzu, E. and R. Yanagimachi. 1982. Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysolecithin. *J. Exp. Zool.*, 224: 259-263.
29. Okinaga, Y., A.I. Waki and M. Hayashi. 1974. In vitro fertilization of rabbit tubal ova. *Asian Med. J.*, 17: 5-32.
30. Rogers, B.J. 1978. Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro: a critique of methodology. *Gamete Res.*, 1: 165-223.
31. Rogers, B.J. and R. Yanagimachi. 1975. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose. The possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, 13: 568-575.
32. Rosado, A., J.J. Hicks, A. Reyes and I. Blanco. 1974. Capacitation in vitro of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine monophosphate and human follicular fluid. *Fertil. Steril.*, 25: 821-824.
33. Sirard, M.A. and R.D. Lambert. 1985. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.*, 33: 487-494.
34. Viriyapanich P. and J.M. Bedford. 1981. The fertilization performance in vivo of rabbit spermatozoa capacitated in vitro. *J. Exp. Zool.*, 216: 169-174.
35. Wells, M.E. and O.A. Awa. 1970. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 53: 227-232.
36. Wolf, O.P. and M. Inoue. 1976. Sperm concentration dependency in the penetration, fertilization and zonabinding properties of mouse eggs insemination in vitro. *J. Exp. Zool.*, 196: 27-38.
37. Yanagimachi, R. and F. Suzuki. 1985. A further study of lysolecithin-mediated acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res.*, 11: 29-40.