

## 體外培養한 소卵胞卵과 햄스터摘出子宮에서 前培養한 소 精子的 體外受精에 관한 研究

宋 海 範  
大邱大學校 農科大學

### *In Vitro* Fertilization of Bovine Follicular Oocytes Matured in Culture with Bull Spermatozoa Preincubated in the Uteri Isolated from Hamsters

Song, H. B.

College of Agriculture, Taegu University

#### Summary

The present studies were conducted to investigate the possibility of capacitation of bull spermatozoa in the uteri isolated from estrous hamsters and to investigate the possibility of *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured in culture, using ejaculated spermatozoa preincubated in the uteri isolated from estrous hamsters.

The follicular oocytes matured in culture were not fertilized after insemination with spermatozoa preincubated for 3 and 5.5-7 h in the uteri isolated from estrous hamsters, but 5, 77, 85 and 50-67% of those oocytes were fertilized by spermatozoa preincubated for 3.5, 4, 4.5 and 5 h in those uteri, respectively.

#### I. 緒 論

포유동물의 體外受精은 1951년 Austin과 Chang에 의해 정자의 受精能獲得 현상이 발견된 이래 1954년 Thibault 등이 토끼에서 성공례를 보고하고, 1959년 Chang이 토끼의 體外受精卵자를 이식해서 産仔를 생산하므로써 1960년대 후반부터 급속히 각종 동물에서 연구가 진행되었다(Wright와 Bondioli, 1981; Brackett, 1983; Niwa, 1983).

소의 체외수정에 대한 최초의 성공례는 Iritani 등(1977)에 의해 보고되었는데, 사출정자를 발정한 암소의 자궁에서 4-5시간 前培養, 또는 토끼의 자궁에서 12시간 前배양해서 受精能獲得을 유지시킨 후, 체외에서 성숙시킨 卵胞卵에 授精해서 20-30%의 受精率을 얻었다. Iritani 등(1984)은 소의 위생식기를 이용하지 않고 순수한 人工合成培養液(m-KRB액) 내에서 정자의 수정능획득을 유지시켜 70

-80%의 수정율을 얻을 수 있는 體外受精系를 확립하였는데 이 방법은 射出精子를 세척하지 않고 고농도로 반염기조건하에서 20°C에 15-20시간 보존한 후 1회 세척하여 CO<sub>2</sub>배양기 내에서 6시간 前배양하여 수정능획득을 유지시켰다. 또 난포란은 도살장에서 적출한 난소로부터 卵核胞期の 난포란을 채집해서 28-29시간 m-KRB액 중에서 第二成熟分裂中期까지 성숙시킨 것을 사용하였다. Fukui 등(1983)도 도살장에서 채취한 소의 난포란을 Ham's F-12배양액에서 27시간 배양하여 토끼난관에서 수정능획득을 유지시킨 정자와 체외수정하여 최고 38%까지의 수정율을 얻었다고 보고한 바 있다. Brackett 등(1980, 1982)은 修正 Tyrode液(380-390 mOsm/kg)으로 수정능획득을 유지시킨 정자와 배란난자를 체외수정시켜 36.7-62.9%의 수정율을 얻었으며 4 세포기로 분할된 수정란을 이식하여 産仔 1두를 생산했다고 보고했다. 또한 Sirard 등(1985)

Perrish 등(1986)과 Hanada 등(1986)은 미성숙 난포란을 체외성숙시켜 체외수정된 후 토끼난관에서 발생을 유기하여 암소에 이식한 결과 체외수정 송아지를 생산할 수 있었다고 보고한 바 있다. 이상과 같이 소에서의 체외수정계는 산자생산까지 가능했다는 보고는 있으나 그 재현성은 아직 문제점이 있는 것으로 많은 연구자들에 의해 지적되고 있는 실정이다(Wright와 Bondioli, 1981; Brackett, 1983; Niwa, 1983; Iritani, 1984).

한편 Kato 등(1984)은 발정 햄스터 및 마우스의 적출자궁에서 수정능획득을 유기시킨 소정자의 수정능획득 여부를 透明帶除去 햄스터 난자를 이용해서 검정한 결과, 발정 햄스터 및 마우스의 적출자궁에서 수정능획득을 유기시킨 정자가 비교적 안정된 높은 침입율을 보였다고 보고한 바 있다. Tamura 등(1985)도 발정 햄스터의 적출자궁에서 소정자의 수정능획득 가능성을 투명대제거 햄스터 난자를 이용해서 검정할 수 있다고 보고한 바 있다.

따라서 본 실험은 소정자의 수정능획득을 위해 비교적 저렴하게 또 용이하게 구할 수 있는 햄스터 적출자궁의 이용가능성을 검토함과 동시에 보다 안정되고 높은 수정율을 얻을 수 있는 소의 체외수정계를 확립하고자 실시하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 卵子 採取

난소는 마장동 도축장(성창산업)에서 한우 암소를 임의로 채취하므로 연령, 체중 및 번식기록 등은 미상이나 정상생식기를 갖고 발정휴지기에 있는 난소만을 도살후 30분 이내에 적출하여 0.9% 생리식염수에 침지하고 보온병(35-37℃)에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하고, 난소표면에 부착된 혈액등을 제거하고 0.1% 소혈청알부민(BSA)을 첨가한 修正 Krebs-Ringer bicarbonate solution (m-KRB액)으로 세척한 후 실체 현미경 하에서 직경 2-5mm의 난포를 파쇄하여 顆粒膜細胞가 치밀하게 부착된 난자만을 pipette으로 채란했다.

### 2. 精液 採取

축산업협동조합 산하 유우개량사업소(경기도 원

당)에서 실험일에 채취한 한우원정액을 공급받아 채취후 보온병(35-37℃)에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였으며 정자의 활력과 생존율이 75% 이상인 것만을 실험에 사용하였다.

### 3. 培養液

Toyoda와 Chang(1974)이 흰쥐의 체외수정에 사용한 Ringer's액을 약간 수정한 수정 Krebs-Ringer bicarbonate solution (m-KRB액)을 제조하여 난자 채취용 및 정자의 수정능획득용은 소혈청알부민(BSA; Fraction V. Sigma, 미국) 0.1%를 첨가하여 0.2 μm millipore filter로 여과한 다음 사용하였고, 난자배양 및 수정용은 소혈청알부민 0.4%를 첨가하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. Composition of modified Krebs-Ringer bicarbonate solution

Component	mM
NaCl	94.60
KCL	4.78
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.71
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.19
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
Glucose	5.56
Na-pyruvate	0.50
Na-lactate	21.58
Streptomycin	50 μg/ml
Penicillin	75 μg/ml
BSA	*
Phenol red	2 μg/ml

\* Crystalline bovine serum albumin (BSA) was supplemented 1 mg/ml for sperm washing and preincubation, and 4mg/ml for oocyte culture and fertilization.

### 4. 卵胞卵의 成熟培養

顆粒膜細胞에 둘러싸인 난포란을 m-KRB액(0.1% BSA)으로 2회 세척한후 11×35mm 배양접시(Nuclo, 덴마크)에 0.4ml 배양액 소적을 3개 형성하고 파라핀오일로 엮게 덮고 각각의 소적에 약 10

개의 난포란을 주입하고 37°C, 99% 습도가 유지되는 CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>)에서 26~28시간 배양하여 제 2 성숙분열 중기까지 성숙시켰다.

### 5. 精자의 受精能獲得

채취한 정액은 정자의 수정능획득 억제인자를 제거하기 위해 정액과 배양액을 1 : 2 - 4의 비율로 혼합한 후 실온에서 2회 원심분리(500g, 10분) 하여 정장을 제거하고 남은 精子塊에 2 - 3ml 배양액(1% BSA 첨가)을 첨가하여 정자농도를 10 - 15 × 10<sup>6</sup> 마리/ml로 조절하였다.

정자의 수정능획득을 위해 발정휴지기의 햄스터에 25IU PMSG (Serotropin; Teikoku-Zoki CO., 일본)를 주사하여 48-52시간후 발정을 유기시킨 후 25IU h CG (Puberogen; Sankyo-Zoki Co., 일본)를 주사하고 10~12시간후 자궁을 적출하여 난관자궁접합부와 자궁경을 절찰하고 정자부유액 0.03ml를 주입한후 10ml 시험관에 넣고 0.9% 생리적식염수에 침지한후 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C)에서 1시간 간격으로 3, 4, 5, 6 및 7시간 동안 전배양하고, 또 30분 간격으로 3.5, 4, 4.5, 5 및 5.5시간 동안 전배양하였다.

### 6. 体外受精

체외수정용으로 준비한 0.4% BSA를 첨가한 m-KRB액 0.4ml 소적에 26~28시간 체외배양한 난포란 약 10개씩을 분주하고, 햄스터 적출자궁에서 수정능획득을 유기시킨 정자는 정자농도가 약 1 - 2 × 10<sup>6</sup> 마리/ml가 되도록 授精하고 CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 18-20시간 배양하였다.

### 7. 受精與否의 判定

授精한 난포란은 18-20시간 배양한 후 실험현미경하에서 난자주위의 과립막세포는 pipetting을 반복하여 제거하고 25% glacial acetic acid에 2-3일간 고정하고, 1% aceto-orcein으로 염색하고 acetoglycerol로 세척한 후 위상차현미경으로 검경하였다. 수정여부는 Iritani 등(1984)의 기준에 따라 난자내의 정자두부의 팽화정도, 정자머부의 유무, 제 2극체의 방출유무 및 자성전핵과 응성전핵의 형성여부에 따라 판정하였다(plate, a-d).

## III. 結果 및 考察

햄스터 적출자궁에서 수정능획득을 유기시킨 정자와 26-28시간 체외배양시킨 난포란을 체외수정했을 때 Table 2~3에서 보는 바와 같이 공시란의 60~84%가 제 2 성숙분열중기(plate, a)까지 성숙되었으나 햄스터 적출자궁에서 3, 5.5, 6 및 7시간 전배양한 정자는 전혀 수정이 되지 않았으나, 3.5시간 전배양한 정자는 거의 수정되지 않았고(5%), 4시간 전배양한 정자는 공시란 73개중 제 2 성숙분열중기까지 성숙한 52개의 77%인 40개, 4.5시간 전배양한 정자는 공시란 31개중 제 2 성숙분열중기까지 성숙한 26개의 85%인 22개, 5시간 전배양한 정자는 공시란 81개중 제 2 성숙분열중기까지 성숙한 56개의 50~67(57%)인 32개에서 정자침입을 확인할 수 있었다(Plate, b-d). 햄스터적출자궁으로 정자의 수정능획득을 유기시키는데는 4시간 30분 전배양하는 것이 가장 수정율(85%)이 좋은 것으로 나타났다.

소난포란의 체외배양을 위해 배양액으로 m-KRB액을 사용한 본실험의 결과는 Sato 등(1978)과 Fukui 등(1982)이 m-KRB액으로 난포란을 체외배양한 결과보다 제 2 성숙분열중기까지 성숙한 난자가 비교적 많았던 것은 상기 연구자들은 난포란을 채란할 때 난포의 직경이 12mm이하인 것을 모두 채란하여 난포의 직경이 2mm이하인 것도 포함되었을 가능성이 있으나 본실험에서는 난포의 직경이 2~5mm인 것만을 채란했기 때문인 것으로 생각된다. 한편 Iritani 등(1984)도 도축상에서 채취한 난소로부터 직경 2~5mm인 난포란을 채란하여 체외수정 실험에 사용하기 위해 m-KRB액으로 28시간 동안 체외배양하고 체외수정하여 15~18시간 추가배양한 후 고정하였을 때 72~90%가 제 2 성숙분열중기까지 성숙되었다고 보고한 바 있다.

Iritani와 Niwa(1977)가 소의 적출난관과 자궁에서 3~4시간 수정능획득을 유기시킨 정자와 20~24시간 체외배양한 난포란과의 체외수정에서 각각 20.7%와 18.5%의 수정율을 얻고, 토끼의 적출자궁에서 12~14시간 전배양한 정자에서는 21.3%의 수정율을 얻어 同種 또는 異種의 적출난관 및 자궁을 소정자의 수정능획득 환경으로 이용할 수 있는 가능성을 처음으로 보고한 이후 Fukui 등(1983)은 토끼의 자궁에서 2~3시간 간격으로 2~12시간 수

**Table 2. *In vitro* fertilization of cattle follicular oocytes with bull spermatozoa preincubated for 3, 4, 5, 6 and 7h in the uteri isolated from estrous hamsters\***

Duration of preincubation (h)	No. of oocytes		No. of oocytes fertilized			No. of poly-spermic oocytes
	examined	maturing to M-II (%)**	with enlarged sperm head	with both pronuclei	total with evidence of fertilization (%)***	
3.5	26	21(81)	1		1 (5)	0
4	39	30(77)	8	15	23(77)	2
4.5	31	26(84)	1	21	22(85)	5
5	41	32(78)	2	14	16(50)	2
5.5	29	24(83)			0	0

\* The isolated uteri were immersed in physiological saline and kept in a CO<sub>2</sub> incubator.

\*\* Oocytes were fixed after culture for 26-28 h and additional culture with spermatozoa for 18-20h.

\*\*\* Percentages of the number of oocytes maturing to the second metaphase.

**Table 3. *In vitro* fertilization of cattle follicular oocytes with bull spermatozoa preincubated for 3.5, 4, 4.5, 5 and 5.5h in the uteri isolated from estrous hamsters\***

Duration of preincubation (h)	No. of oocytes		No. of oocytes fertilized			No. of poly-spermic oocytes
	examined	maturing to M-II (%)**	with enlarged sperm head	with both pronuclei	total with evidence of fertilization (%)***	
3	29	24(83)			0	
4	34	22(65)	4	13	17(77)	1
5	40	24(60)		16	16(67)	0
6	43	29(67)			0	
7	22	15(68)			0	

\* The isolated uteri were immersed in physiological saline and kept in a CO<sub>2</sub> incubator.

\*\* Oocytes were fixed after culture for 26-28 h and additional culture with spermatozoa for 18-20h.

\*\*\* Percentages of the number of oocytes maturing to the second metaphase.

정능획득을 유기시킨 냉동정자를 27~30시간 체외 배양한 난포란과 토끼의 자궁 또는 난관에서 체외 수정했을 때 2시간 : 29%, 4시간 : 38%, 6시간 : 18%, 9시간 : 8% 및 12시간 : 6%의 수정율을 얻었다고 보고한 바 있으나 본 실험의 결과보다 수정율이 나쁜 것은 Iritani와 Niwa(1977)는 난포란의 체외배양 시간이 짧았고 Fukui 등(1983)은 냉동정액을 사용했으나 본 실험에서는 신선한 원정액을 사용했기 때문인 것으로 생각된다.

한편 소정자의 수정능획득 환경으로 햄스터 적출 자궁의 사용은 Kato 등(1984)이 발정햄스터 및 마우

스의 적출자궁에서 수정능획득을 유기시킨 소정자의 수정능획득 여부를 투명대제거 햄스터난자를 이용하여 검증한 결과 햄스터의 적출자궁에서 4~6시간 전배양한 정자가 60~100%의 침입율을 보였다고 보고했고, Tamura 등(1985)도 발정햄스터의 적출자궁에서 소정자의 수정능획득 가능성을 투명대제거 햄스터난자를 이용해서 검증한 결과 햄스터의 적출자궁에서 3~4시간 전배양한 정자는 4~7%의 침입율을 보였지만 6시간 전배양한 정자는 89%의 침입율을 보였다고 보고한 바 있는데 이러한 결과는 본 실험에서 햄스터의 적출자궁에서 4.5시간

전배양한 정자가 수정율이 가장 좋았던 것과는 차이가 있으나 본실험에서는 체외배양한 소의 난포란에 대한 수정율이었으므로 투명대제거 햄스터난자에 침입할 수 있는 정자는 尖體反應을 일으킨 후의 정자이고 소의 난포란에 침입할 수 있는 정자는 침체반응을 일으키기 전단계로 수정능획득만한 정자인 것에 기인된 것으로 추측되는데 이러한 사실은 Song과 Iritani (1985, 1988)가 山羊 정자와 투명대제거 햄스터난자 및 체외배양한 산양난포란의 체외수정실험에서 이미 추론한 것과 비슷한 경향이었다.

#### IV. 要 約

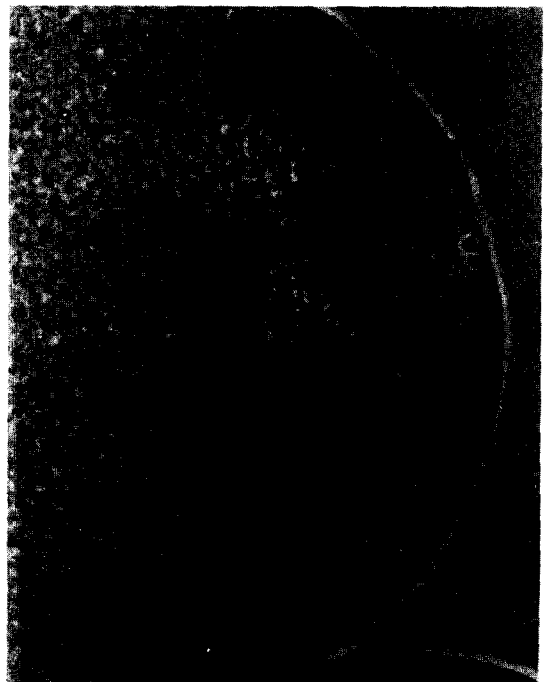
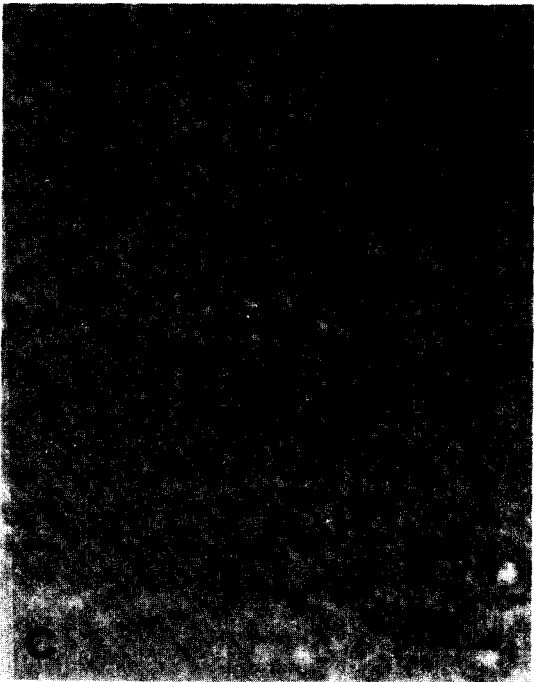
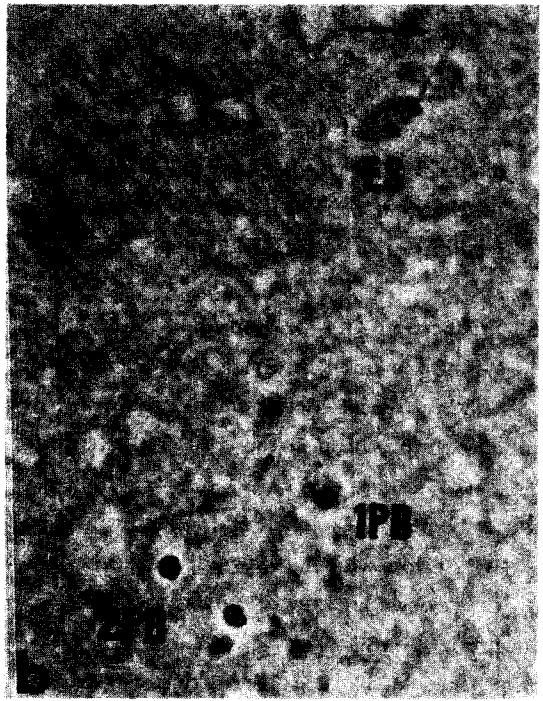
본실험은 소의 體外受精系를 확립하고자 도축장에서 채란한 小卵胞卵을 體外培養하고 精子의 受精能獲得 환경으로 햄스터 적출자궁의 이용가능성을 검토하고 햄스터 적출자궁에서의 適正前培養시간을 알기위해 體外受精을 실시하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

精子의 受精能獲得을 햄스터 적출자궁에서 유지시켰을 때 3시간 및 5.5~7시간 前培養한 精子는 전혀 受精이 되지 않았으나 3.5~5시간 前培養한 精子는 3.5시간: 5%, 4시간: 77%, 4.5시간: 85% 및 5시간: 50~67%가 受精이 되었으며, 특히 4.5시간 前培養한 精子는 85%로 최고의 受精率을 얻을 수 있었다.

#### Explanation of plates

Cow follicular oocytes matured in culture were inseminated with bull spermatozoa preincubated in the uteri isolated from estrous hamsters, fixed after 18-20 h insemination, stained, and photographed under a phase-contrast microscope (X400).

- a) An oocyte at the second metaphase fixed after 28 h of culture. The first polar body (PB) can be seen in association with a metaphase plate of chromosomes.
- b) An oocyte inseminated with spermatozoa preincubated for 4.5 h in the uterus isolated from estrous hamster. The 1st (1PB) and 2nd (2PB) polar bodies, and enlarged sperm head (ES) with corresponding sperm tail (arrow) can be seen. Female pronucleus is out of focus.
- c) An oocyte inseminated with spermatozoa preincubated for 4.5 h in the uterus isolated from estrous hamster. Female (FP) and male (MP) pronuclei, sperm tail (arrow) and 1st (1PB) and 2nd (2PB) polar bodies can be seen.
- d) An oocyte inseminated with spermatozoa preincubated for 5 h in the uterus isolated from estrous hamster. Female (FP) and male (MP) pronuclei, and 2nd polar body (PB) can be seen. Sperm tail and 1st polar body are out of focus.



## V. 引用文献

1. Austin, G.R. 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.*, B4:581-589.
2. Brackett, B.G. 1983. A review of bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, 19:1-15.
3. Brackett, B.G., D. Bousquet, M.I. Boice, W.J. Donawick, J.E. Evans and M.A. Dressel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27:147-158.
4. Brackett, B.G., Y.K. Oh, J.E. Evans and W.J. Donawick. 1980. Fertilization and early development of cow ova. *Biol. Reprod.*, 23:189-205.
5. Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168:697-698.
6. Chang, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature*, 184:466-467.
7. Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono. 1983. Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 226:137-142.
8. Fukui, Y., M. Fukushima, Y. Terawaki and H. Ono. 1982. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 18:161-175.
9. Hanada, A., Y. Enya and T. Suzuki. 1986. Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. *Proc. 78th Jap. Soc. Zootech. Sci.*, pp.79 (abstr.).
10. Iritani, A. 1984. *In vitro* fertilization and embryo transfer in domestic animals. *Cell Technology (Japan)*. 3(7):585-594.
11. Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa and H.B. Song. 1984. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 70:487-492.
12. Iritani, A. and K. Niwa. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 50:119-121.
13. Kato, S., H. Kusunoki, N. Miyake, T. Yasui and J. Karita. 1984. Utility of isolated hamster uterus as the capacitation environment of goat spermatozoa. *Proc. 75th Jap. Soc. Zootech. Sci.*, pp.114 (Abstr.).
14. Niwa, K. 1983. Mammalian fertilization *in vitro*. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 54:1-17.
15. Perrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Crister, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
16. Sato, E., A. Iritani and Y. Nishikawa. 1978. Maturation and activation of cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 49:236-242.
17. Sirard, M.A., R.D. Lambart, D.P. Menard and M. Bedoya. 1985. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes matured outside the follicular. *J. Reprod. Fert.*, 75:551.
18. Song, H.B. and A. Iritani. 1985. Indirect assessment of sperm capacitation using zona-free hamster eggs in the goat. I. Penetration into zona-free hamster eggs by goat spermatozoa preincubated in the uteri isolated from hamsters and rats. *Korean J. Anim. Reprod.*, 9:148-152.
19. Song, H.B. and A. Iritani. 1988. *In vitro* fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa. *Korean J. Anim.*

- Sci., 30:656-642.
20. Tamura, S., K. Niwa, H.B. Song, M. Miyaka and A. Iritani. 1985. Penetration into zona-free hamster eggs by bull spermatozoa preincubated in the uteri isolated from hamsters. Proc. 77th Jap. Soc. Zootech. Sci., pp.74. (Abstr.).
  21. Thibault, C., L. Dautier and S. Winterberger. 1954. Etude cytologique de la fécondation *in vitro* de l'oeuf de la Lapine. C.R. Soc. Biol., Paris, 148:789-790.
  22. Toyoda, Y. and M.C. Chang. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of such eggs following transfer. J. Reprod. Fert., 36:9-22.
  23. Wright, R.W. and K.R. Bondioli. 1981. Aspect of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci., 53:702-729.