

## 생쥐 體外受精卵의 超急速凍結 및 移植에 關한 研究

### I. pH, 滲透壓 및 精子 前培養處理가 생쥐 體外受精率에 미치는 影響

張奎泰 · 閔觀植 · 吳錫斗\* · 姜大珍 · 尹昌鉉†

慶尙大學校 農科大學

## Studies on Transfer of *In Vitro* Fertilized Mouse Embryos Following Ultrarapid Freezing

### I. Effect of Treatment of pH, Osmolality and Sperm Preincubation on *In Vitro* Fertilization Rate of Mouse Embryos

Chang, K. T., K. S. Min, S. D. Oh\*, D. J. Kang and C. H. Yun

College of Agriculture, Gyeongsang National University

#### SUMMARY

These studies were carried out to investigate optimal physiological conditions for *in vitro* fertilization (IVF) of mouse ova. The unfertilized ova were obtained by superovulation from ICR mice of 4 to 6 weeks old. Tyrode's 280 solution was used as basal media, and pH and osmolality of basal media were adjusted with the supplementation of sodium bicarbonate and sodium chloride, respectively. The optimal pH, and osmolality of culture media and the optimum period of sperm preincubation were examined in fertilization *in vitro* of mouse ova and the subsequent culture *in vitro* of embryos. The pH range of media examined was designed from 6.5 to 7.5 with 0.2 interval and the range of osmolality from 250 to 370 mOsm with 20 interval, and the period of sperm preincubation examined was 30, 60, 120, and 180 minutes. The ova developed to 2-cell embryos after 26 hrs. of incubation with preincubated sperm were evaluated as *in vitro* fertilized ones.

The results obtained were summarized as follows:

1. The percentage of *in vitro* fertilized ova was highest (64.7%) in media of pH 7.1 and lowest (38.0%) in pH 6.7. No significant difference in % fertilized ova was found from the media of pH 7.1 to 7.5. Compared with the result from pH 7.1 medium, the polyspermy was increased significantly ( $p < 0.05$ ) in the media of pH over 7.5 and below 6.9, and the % degenerated ova was significantly ( $p < 0.05$ ) increased in the media of pH below 6.9.
2. The percentage of *in vitro* fertilized ova was highest (69.4%) in media of osmolality 330 mOsm and lowest (47.9%) in osmolality 250 mOsm. No significant difference in % fertilized ova was found from the media of osmolality 310 to 350 mOsm. Compared with the result from osmolality 330 mOsm in medium, the polyspermy was increased significantly ( $p < 0.05$ ) in the media of osmolality over 350 mosmol and below 290 mOsm, and the % degenerated ova was significantly ( $P < 0.05$ ) increased in the media of osmolality below 290 mOsm.

\*晉州農林專門大學(Chinju Nat'l Agriculture & Forestry Junior College)

3. The percentage of *in vitro* fertilized ova was highest (62.7%) in media of period sperm preincubation 180 min. and lowest (40.4%) in sperm preincubation 30 minutes. No significant difference in % fertilized ova was found from the media of sperm preincubation 120 to 180 minutes. Compared with the result from sperm preincubation 180 minutes in medium, the polyspermy was low differ no significantly( $P < 0.05$ ) in the media of period sperm preincubation, and the % degenerated ova was significantly( $P < 0.05$ ) increased in the media of sperm presincubation below 60 minutes.

(Key words: Mouse ova, IVF, pH, osmolality, sperm preincubation)

## I. 緒 論

Iwamatsu와 Chang(1969)이 최초로 精巢上體 尾部的 精子를 利用하여 생쥐 卵자의 試驗管内 受精을 成功시킨 後 哺乳動物의 受精生理와 初期胚 發達에 關한 理解를 可能케 하는 等 家畜의 體外受精에 應用할 수 있는 基礎知識으로서 많은 研究가 進行되고 있다 (Cummins와 Yanagimachi, 1982; Cherr 等, 1984; Cherr 等, 1984; Cross, 1988, Lawitts와 Biggers, 1991a). 哺乳動物의 體外受精에 있어서는 精子의 受精能獲得이 先決 되어져야 하는데, 受精能獲得에 影響을 미치는 要因에 關하여는 아직 不透明한 狀態이지만 (Bedford, 1970) 報告 되어진 바에 의하면 多數의 因子들이 關聯되는 것으로 알려져 있다. 즉, 培養液內의 助成分의 種類에 따라 研究 報告되어진 結果를 考察해 보면  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $k^{+}$ , bicarbonate, GAGs (glycosaminoglycans), phospholipids 및 albumin 等과 環境要因으로 pH와 滲透壓 等이 關聯되는 것으로 알려져 있다.

體外受精時에 있어 關聯 主要 環境으로 培地內의 pH는 精子의 受精能獲得 및 尖體反應에 아주 重要한 影響을 미친다고 하며 (Mahi와 Yanagimachi, 1973; Hyne과 Garber, 1981; Murphy와 Yanagimachi, 1984, Fraser, 1987), 雌性 生殖器道內에서의 pH 水準보다 높은 pH 水準이 體外 受精에 있어서는 尖體反應을 誘發시키는데 效果의이며, 이러한 結果는 또한 受精能獲得 時間도 短縮시킬 수 있다고 한다. 또한 體外受精時 精子의 受精能獲得에 있어서 尖體反應을 일으킬 때는 精子의 pH의 약간 낮게 (pH 5) 維持되어 있는데 反하여 (Working과 Meizel, 1981), 精子는 中性인 精漿 環境에서 生存性을 維持하고 있다고 한다.

Yanagimachi等(1976)은 pH와 關聯한 受精能獲得 및 尖體反應에 있어서 精子의 尖體膜에 影響을 미치는 데, 精子의 尖體膜에는  $Ca^{2+}$ 의 阻害性 및  $Mg^{2+}$ 의 依存性 ATPase가 있어 이때 칼슘이 이러한 酵素(依存性 ATPase)를 除去하게 되면 尖體內膜으로  $H_2O$ 가 流入 되어져 精子頭部가 膨脹되어 尖體反應을 誘發하게 된다고 하였고, 未受精能 獲得 精子의 尖體膜外에 있는 ATPase가 精子細胞 內外의 pH를 維持하는데 아주 重要한 役割을 擔當하며, 이때 이 酵素의 活性化를 阻害하면서 同時에 尖體性  $\Delta pH$ 가 消滅되어 受精能을 獲得한 精子가 尖體反應을 일으킬 수 있다고 하였다 (Johnson과 Scarpa, 1976; Niwa等, 1980; Murphy와 Yanagimachi, 1984. 또한 培養液內 滲透壓의 境遇는 보다 높은 受精率을 얻기 위한 目的으로 NaCl를 任意로 變更 調節 使用하는데 그 範圍는 250 ~ 380 mOsmol로서 대단히 넓은 分布에서 受精이 加能하지만 體外受精時는 雌性 生殖器道內의 滲透壓 보다 약간 높은 水準이 尖體反應에 큰 도움을 줄 수 있다고 한다 (Miyamoto와 Chang, 1973; Brackett等, 1978; Bavister, 1981).

한편 이렇게 體外受精되어진 受精卵을 培養液에서 體外 培養시킬 때의 環境은 胚發育 程度에 따라 粗成分에 달라지게 되는데, 이러한 現狀은 受精卵 自體도 成熟 및 分裂等の 過程을 거치면서 여러 가지 重要한 生物學的變化를 隨伴하기 때문이라 報告하였다 (Farrell과 Bavister, 1984). 따라서 體外 培養에 必要한 培養液의 粗成分이나 環境條件은 胚發育 程度에 따라 달라져야 하는데 이러한 原因은 初期胚일 境遇는 卵胞液 및 卵胞液內의 助成分 電解質이 거의 같게 助成되어져야만 發育이 可能할 뿐 아니라 主 代謝源인 乳酸(lactic acid), 피루부산(pyruvic acid) 및 葡萄

糖이 포함 되어져야만 계속적인 發育을 할 수 있다고 한다(Biggers와 Mastroianni, 1985, Quinne等, 1985).

따라서 本 實驗은 ICR系統 생쥐를 利用하여 過排卵 處理를 한 다음 卵管膨帶部로부터 回收한 未受精卵의 體外受精時 精子 前培養處理時間, 受精液의 pH, 滲透壓의 調節 및 精子 前培養 處理가 體外受精率에 어느 정도 影響을 미치는지를 檢討코져 本 實驗 修行하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物

本 實驗에 使用된 供試動物은 ICR系統 F<sub>1</sub> 생쥐로써 供卵 생쥐는 4~6週齡의(體重 15~20g), 受卵 생쥐는 10~12週齡(體重 25~35g), 爲妊娠用 수컷 생쥐는 10~12週齡(體重 30~35g)의 생쥐를 供試 하였다. 飼育管理는 一般慣行法(溫度: 21~24℃, 點燈: 14時間, 消燈: 10時間)에 따라 管理하였으며 飼料와 물은 自由 給食시켰다.

### 2. 過排卵 誘起 및 卵자의 回收

過排卵 誘起는 Parkenin等(1977)의 方法에 따라 午後 6時이 PMSG(Serotropin, 帝國臟器製藥, 日本) 5IU를 腹腔內 注射하고 48時間後 hCG(Sigma Chem, 美國) 5IU를 同一한 方法으로 注射하여 過排卵을 誘起 시켰다. 한편 卵자의 回收는 hCG를 投與한 後 16時間째 頸椎脫骨法으로 屠殺後 卵管을 卵管綫와 子宮-卵管 接續部位를 分離한 後 卵管은 plastic petri dish에 옮겨 實體 顯微鏡下(ASA TOKYO, 日本)의 40倍 倍率下에서 끝이 무딘 30 1/2gauge needle을 1ml의 注射器에 附着 시키고 卵管影에 注入하여 觀流液은 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, 日本製藥, 日本)에 3mg/ml의 BSA (Sigma Chem, 美國)를 添加하여 使用하였다. 回收한 卵자는 D-PBS(3mg/ml BSA 包含, 以下 培養液)로 3~4回 洗滌한 다음 正常的인 卵자만을 選別하여 供試하였다.

### 3. 受精液의 製造

受精液은 TYH 280(Kasai等, 1978)을 調劑 使用 하였으며 그 組成은 Table 1에서 보는 바와 같다. 그리고 受精液은 pH 및 滲透壓을 각각 다르게 調節하여 實驗에 使用하였는데 pH의 調節은 培養液의 組成中에서 NaHCO<sub>3</sub>로, 滲透壓은 NaCl로써 調節하였다. pH는 pH meter(HANNA Instrument, 美國)에 의하여, 그리고 滲透壓은 Osmometer(Precision systems INC, Model #5002, 美國)를 使用하여 3回 反復 測定하였으며 使用하기 直前 sterile acrodise 0.2 $\mu$ m syringe filter(Gelman Sci., 美國)로써 濾過 滅菌한 後, 受精液은 滅菌되어진 培養用 petri dish (田村, 日本)에 한 區當 0.4ml씩 넣은 다음 그 위에 濾過 滅菌 되어진 liquid paraffin oil을 부어 CO<sub>2</sub> 培養器(5% CO<sub>2</sub> in air, 37℃)내에서 充分히 平衡을 實施한 後 使用하였다.

**Table 1. Composition of TYH 280 solution for *in vitro* fertilization of ICR mouse eggs**

Components	mg / 100ml
NaCl	421.5*
KCl	35.6
Ca-lactate · 5H <sub>2</sub> O	34.6
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	21.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.2
NaHCO <sub>3</sub>	210.6*
Glucose	100.0
Na-pyruvate	3.3
Na-lactate	0.51ml
Penicillin G	10,000IU
Streptomycin	5
BSA	3mg / ml
Penol red	0.2

\* Each pH and osmolality contain concentrations in adjusted NaHCO<sub>3</sub> and NaCl in a TYH280

### 4. 精자의 準備와 受精能獲得

頸椎脫骨法으로 屠殺되어진 생쥐의 精巢上體 尾部를 外科的인 方法으로 採取하여 受精液 50 $\mu$ l를 注入하여 精管으로 連結된 部位쪽에서 精巢上體 尾部로부터 精子塊가 밀려 나오게 한 後 그 위에 濾過 滅菌되어진

liquid paraffin oil을 被覆하여 5分間 CO<sub>2</sub> 培養器內에서 靜置後 精子塊가 雲集해 있는 部分을 取하여 受精液(0.4ml)으로 다시 옮겨 精子的 濃度(1.6~2.0×10<sup>6</sup> 個/ml)를 調節하고 受精能 獲得을 爲한 前培養處理를 實驗區別로 CO<sub>2</sub> 培養器內(5%CO<sub>2</sub>, 95% air 및 37℃)에서 實施 하였으며, 前培養 處理가 끝난 精子는 micropipette을 利用하여 20μl를 取하여 卵子가 들어 있는 受精用 petri dish에 옮겼다.

### 5. 體外受精 및 受精卵의 判定

前培養處理에 의하여 受精能을 獲得하고 精子濃度를 調節한 精子浮遊液을 liquid paraffin oil로 被覆한 다음 생쥐의 卵자를 pastuer pipette으로한 區當

5~10個씩 옮겨 담아 體外受精을 實施하였다. 이로부터 6時間 동안 CO<sub>2</sub> 培養區內에서 培養한 다음 卵자를 新鮮한 培養液(D-PBS+3mg/ml BSA)으로 3回 洗滌하여, EDTA(Sigama Chem. 美國)가 添加된 小適(0.4ml)의 培養液(50μM EDTA-2Na 包含)에 5個 以上의 卵자를 넣어 이로부터 20時間 培養을 實施한 後 Inverted microscope(Olympus, Japan 400x)下에서 2細胞期로 發生한 卵자를 受精卵으로 判定하였고, 多精子 侵入卵 및 老化되어진 卵을 識別 測定하였다.

### 7. 統計學的 分析

體外受精에 있어서 pH, 滲透壓 및 精子 前培養處

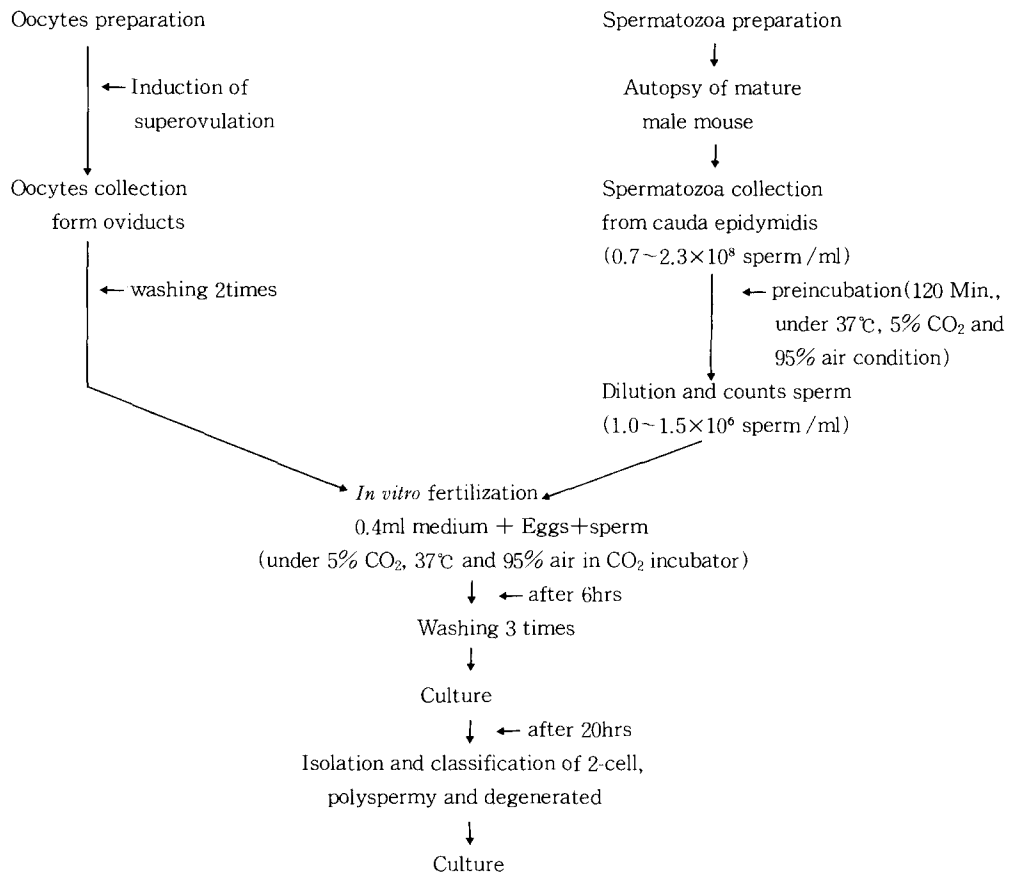


Fig. 1. Composite diagram for culture and fertilization *in vitro* embryos of ICR mouse.

리에 따른 體外 發生率 等에 관한 모든 處理群들의 data는 Minitab Computer Statistical Program Package를 利用하여  $\chi^2$ -Test에 의한 有意性( $P < 0.05$ )을 檢定하였다.

### III. 結果 및 考察

#### 1. 受精液의 pH에 따른 體外受精率

體外 受精液의 pH는 Bicarbonate( $\text{NaHCO}_3$ )濃度を 調節하여 0.2間隔으로 調節하여 使用 하였는데, 이때의 滲透壓은 310 mOsm이 되도록 하고, 精子 前培養 處理時間은 120分으로 하였다. pH에 따른 體外 受精率은 Table 2에서 보는 바와 같이 pH를 6.5, 6.7, 6.9, 7.1, 7.3, 7.5 및 7.7로 하였을 때 受精率은 各 40.7, 38.0, 45.3, 64.7, 61.7, 56.0% 및 50.9%로 pH

6.9~7.5사이의 範圍에서 比較的 높은 受精率을 얻을 수 있었으며, pH 7.1에서 가장 높은 受精率(64.7%)을 나타내었고 pH群間에 有意差( $P < 0.05$ )가 認定되었다. 또한 多精子 侵入卵의 境遇에 있어서는 pH 7.7일때 34.5%의 發生率로 가장 높았고 反面 7.1일때 13.7%로 가장 낮아 pH가 높을수록 多精子 侵入卵의 發生率이 높은 傾向으로 나타났으며 退化卵의 境遇는 pH 6.5일때 33.4%로 가장 높고 pH 7.7일때 14.6%로 가장 낮았다. 이러한 成績은 全과 鄭(1984)의 pH 7.1~7.5 範圍에서 60~80%의 體外受精率(2細胞胚까지의 發達率)을 얻었다는 結果보다는 多少 낮은 成績이었는데, 이러한 結果는 供試動物의 系統과 既存 培養液의 組成 및 實驗方法의 差異에 依한 것으로 思料된다.

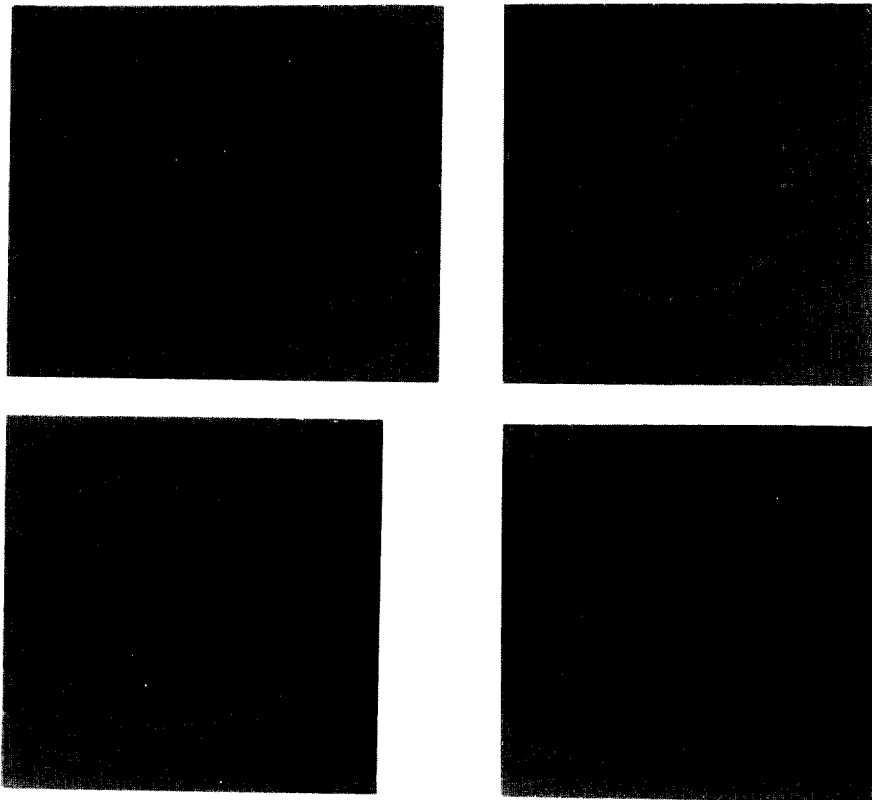


Fig. 1. A) An unfertilized eggs collected 16 hrs after hCG injection, B, C, D) 2-cell embryos, degenerated and polyspermy eggs after fertilization and culture *in vitro* for 24 hrs(A,B, C and D  $\times 200$ ).

**Table 2. Effect of various pH values on *in vitro* fertilization of mouse eggs<sup>1)</sup>**

pH value	No. of eggs examined	No. of eggs recovered	No. of eggs fertilized <sup>2)</sup>	No. of eggs polyspermy	No. of eggs degenerated
6.5	59	54(91.5)	22(40.7) <sup>a</sup>	14(25.9) <sup>bc</sup>	18(33.4) <sup>c</sup>
6.7	56	50(89.3)	19(38.0) <sup>a</sup>	13(26.0) <sup>bc</sup>	18(36.0) <sup>c</sup>
6.9	60	53(88.3)	24(45.3) <sup>ab</sup>	13(24.5) <sup>b</sup>	16(30.2) <sup>c</sup>
7.1	52	51(98.1)	33(64.7) <sup>c</sup>	7(13.7) <sup>a</sup>	11(12.6) <sup>ab</sup>
7.3	55	47(85.5)	29(61.7) <sup>c</sup>	7(14.9) <sup>a</sup>	11(23.4) <sup>bc</sup>
7.5	56	50(89.3)	28(56.0) <sup>bc</sup>	13(26.0) <sup>bc</sup>	9(18.0) <sup>a</sup>
7.7	60	55(91.7)	28(50.9) <sup>b</sup>	19(34.5) <sup>c</sup>	8(14.6) <sup>a</sup>

( ) : Percentage.

1) Osmolality 310, sperm preincubation time 120min.

2) Number of 2-cell developed *in vitro* / number of recovery eggs×100, Eggs were incubated after removing spermatozoa for 20hrs.

Figures in columns with different superscripts were significantly different (P<0.05)

本實驗의 pH 7.1~7.3에서 가장 높은 體外受精率을 얻을 수 있었는데 이러한 결과는 Davidson等(1988)이 생쥐 體外受精時 培養液의 pH 最適 範圍되는 傾向이었다. 또한 體外受精時 受精液의 pH의 受精率뿐만 아니라 多精子 侵入과 退化卵의 發生에도 아주 密接한 關係를 가지고 있다 하였고, 그러한 原因으로 Mahi와 Yanagimachi(1973)는 精子의 尖體反應이 體外受精時 退化卵의 發生에 決定的 影響을 미치게 된다고 하였다. Hyne과 Garbes(1981)은 體外受精時 pH가 높아지면 精子의 生存 延長과 活力에 影響을 미쳐 이는 곧 精子의 尖體反應 및 最大 開始 時期가 빨라짐으로서 多精子 侵入卵이 많이 發生 된다고 하였다. 또한 pH가 7.4~10.5까지 높아짐에 따라 尖體反應時期가 短縮된다고 報告하였으며 이는 精子의 瞬間的 活力으로 말미암아 多精子 侵入卵의 發生이 많아진다고 하였고 그렇기 때문에 pH 8.5以上에서는 多精子 侵入卵의 過多 發生으로 正常的인 2細胞 受精卵의 確報가 어렵다고 하였다. Hoppe와 Pitts(1973)는 pH가 너무 높으면 瞬間적으로 精子의 活力은 좋으나 壽命이 短縮되어 受精率이 오히려 떨어지고, 相對적으로 退化卵의 發生率이 높아진다고 하였다. 한편 Hyne(1984, b; 1985)과 Murphy等(1986)은 受精液의 pH는 精子의 受精能獲得과 尖體反應에 決定적으로 影響을 미친다고 하였으며, pH가 높아질수록 水素 이온(ion) 濃

度가 有意하게 增加 되어지므로 結果적으로 受精能獲得 및 尖體反應에 影響을 주어 多精子 侵入卵의 發生率이 pH에 依存 된다고 하였다. Fraser(1983)는 體外受精時 pH가 너무 낮으면 退化卵의 發生率이 높고 너무 높으면 多精子 侵入卵의 發生率이 顯著하게 增加 되었다고 하였다. 그러한 理由로 體外受精時 pH는 供試動物種의 雌性 生殖器道內 受精 場所인 卵管膨大部의 分泌液의 pH를 기준보다 若干 낮게(0.1~0.2) 調節 되어지는 쪽이 多精子 侵入 및 退化卵의 發生率을 줄일 수 있다고 하였다. 本實驗의 結果에서도 pH가 높아짐에 따라 多精子 侵入卵의 發生率이 增加되어지는 傾向으로 나타났으며, 退化卵의 發生率은 減少 되어지는 結果로 나타났는데 이는 pH가 精子의 活力 및 尖體反應에 影響을 주기 때문인것으로 思科되어진다.

## 2. 受精液의 滲透壓에 따른 體外受精率

受精液의 滲透壓(osmolality)은 NaCl로서 調節하였는데 20 mOsm間隔으로 調節하여 사용하였는데 이때의 pH는 7.1, 精子 前培養 處理時間은 120분으로 하였다. 滲透壓別에 따른 體外受精率은 Table 3에서 보는 바와같이 滲透壓을 250, 270, 290, 310, 330, 350 mOsm 및 370 mOsm로 調節하였을때 受精率은 各各 47.9, 52.0, 55.1, 64.7, 69.4, 63.6% 및 54.8%로 나타났다. 受精液의 滲透壓 310~350 mOsm의 範圍 內에

**Table 3. Effect attendants upon various osmolality on *in vitro* fertilization of mouse eggs<sup>1)</sup>**

Osmolality (mOsm)	No. of eggs examined	No. of eggs recovered	No. of eggs fertilized <sup>2)</sup>	No. of eggs polyspermy	No. of eggs degenerated
250	55	48(87.3)	23(47.9) <sup>a</sup>	9(18.8) <sup>ab</sup>	16(33.3) <sup>c</sup>
270	54	50(92.6)	26(52.0) <sup>ab</sup>	9(18.0) <sup>ab</sup>	15(30.0) <sup>bc</sup>
290	57	49(85.9)	27(55.1) <sup>b</sup>	10(20.4) <sup>ab</sup>	12(24.5) <sup>b</sup>
310	52	51(98.1)	33(64.7) <sup>c</sup>	7(13.7) <sup>a</sup>	11(21.6) <sup>a</sup>
330	53	49(92.5)	34(69.4) <sup>c</sup>	7(14.3) <sup>a</sup>	8(16.3) <sup>a</sup>
350	50	44(88.0)	28(63.6) <sup>c</sup>	9(20.5) <sup>a</sup>	7(15.9) <sup>a</sup>
370	54	53(98.1)	29(54.8) <sup>b</sup>	12(22.6) <sup>b</sup>	12(22.6) <sup>ab</sup>

( ): Percentage

1) pH 7.1, sperm preincubation time 120min.

2) Number of 2-cell developed *in vitro* / number of recovered eggs × 100, Eggs were incubated after removing spermatozoa for 20 hrs.

Figure in columns with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

서 60% 이상의 體外受精率(2細胞期까지)을 얻을 수 있었고 多精子 侵入卵의 發生率에는 滲透壓의 影響이 크게 미치지 않는 것으로 나타났으나, 退化卵의 發生率에 있어서는 250 mOsm에서 33.3%의 가장 높은 發生率을, 350 mOsm 일 때는 15.9%로서 가장 낮아 有意的( $P < 0.05$ )으로 認定되었다. 이러한 結果는 Miyamoto와 Chang(1973)이 CD-1系統 생쥐 卵자를 體外受精 시킬 때 滲透壓을 調節하여 85% 이상의 受精率을 報告한 結果보다는 多少 낮은 成績이었는데, 이러한 差異는 本實驗에서는 2細胞胚까지 正常的으로 發達되어진 受精卵만을 受精率로 計算한 反面 Miyamoto와 Chang(1973)은 생쥐 卵자를 體外受精 시킨 後 5~6時間 培養後 卵자를 染色 固定하여 卵子內 精子 頭部の swelling, 前後의 形成 및 精子 尾部的 存在를 顯微鏡으로 觀察하여 受精率을 決定 하였기 때문이며, 이러한 觀點은 實驗方法과 觀察하여 受精率의 判定方法의 差異에서 비롯되어진 結果 精子가 卵자의 透明帶內 侵入하여 精子 頭部가 팽대되고 前核이 形成 되었다고 해서 반드시 2細胞胚까지 發達이 繼續 進行 되는 것은 아니기 때문이다.

滲透壓의 境遇에 있어서도 너무 낮은 境遇는 精子의 活力에 影響을 미쳐 精子의 生存은 길어지나 充分한 尖體反應을 일으키지 못하고, 또한 너무 높은 滲透壓

은 精子의 尖體膜의 解離 作用으로 인한 精子의 生存이 짧아져서 同時에 尖體反應에도 影響을 미쳐 退化卵의 發生率을 높일 수 있는 原因이 될 수 있다고 報告 하였다(Fraser, 1983; Hyne, 1984b). 本實驗에서 使用되어진 受精液의 滲透壓 間隔은 受精率 및 多精子 侵入의 發生率에는 큰 影響을 미치지 않았으나 退化卵의 發生率에는 有意的이었다. 즉 너무 낮은 滲透壓은 退化卵의 發生率을 增加시켰는데, 滲透壓이 精子의 活力 및 尖體反應에 關聯 되어 退化卵의 發生率이 높은 것으로 思料 되어진다.

### 3. 精子 前培養 處理에 따른 體外受精率

受精液의 精子 前培養 處理는 30, 60, 120分 및 180分으로 調節하여 使用하였는데, 이때의 pH는 7.1이 되도록 하고, 滲透壓은 310 mOsm로 하였다. 精子 前培養 處理時間에 따른 體外 發生率은 Table 4에서 보는바와 같이 40.4, 52.0, 61.1% 및 62.7%로서 前培養 處理時間이 增加함에 따라 體外受精率은 有意的( $P < 0.05$ )으로 增加하였는데 前培養 處理時間을 180分으로 하였을 때 62.7%로 가장 높은 體外受精率을 얻을 수 있었다. 退化卵의 發生率은 前培養 處理時間이 짧음에 따라 發生率이 有意的( $P < 0.05$ )으로 높았다. 이러한 結果는 精巢上體 尾部로부터

**Table 4. Effect of attendants upon various sperm preincubation on *in vitro* fertilization of mouse eggs<sup>1)</sup>**

Spermpre incubation <sup>2)</sup>	No. of eggs examined	No. of eggs recovered	No. of eggs fertilized <sup>3)</sup>	No. of eggs polyspermy	No. of eggs degenerated
30	62	57(91.9)	23(40.4) <sup>a</sup>	10(17.5)	24(42.1) <sup>c</sup>
60	57	50(87.7)	26(52.0) <sup>b</sup>	9(18.0)	15(30.0) <sup>b</sup>
120	52	54(98.1)	33(61.1) <sup>c</sup>	9(16.7)	12(22.2) <sup>a</sup>
180	64	59(92.2)	37(62.7) <sup>c</sup>	8(13.6)	14(23.7) <sup>ab</sup>

( ): Percentage.

1) pH 7.1, Osmolality 310.

2) Minute.

3) Number of 2-cell developed *in vitro* / number of recoved eggs × 100. Eggs were incubated after removing spermatozoa for 120 hrs.

Figures in columns with different superscripts were significantly different (P < 0.05).

회수한 精子가 受精能은 獲得하였지만 充分한 尖體反應을 일으키지 못함으로서 退化卵의 發生率이 높은 것으로 推測되며, 受精液의 pH 및 滲透壓도 作用하였기 때문인 것으로 思料된다. 體外受精時 精子의 前培養 處理에 關한 報告로서, Fraser(1983)는 體外受精時 退化卵의 發生率을 줄이려면 精子를 phospholipids의 前處理 및 前培養은 必需的이라고 하였다. Fraser(1987)는 精子의 前培養時 受精能獲得에 있어서 受精液 Ca<sup>2+</sup>의 濃度を 調節함으로서 受精能 獲得에 도움을 줄 수 있었다고 하였다. 한편, Ohzu와 Yanagimachi(1982)는 lysolecithin과 精子의 前培養 또는 前處理에 있어서 精子의 受精能獲得 및 尖體反應을 刺戟하지만 高濃度の lysolecithin은 Ca<sup>2+</sup>의 流入과 尖體膜의 變化를 妨害하여 退化卵의 發生을 增加시켰다고 하였다. Murphy등(1986)과 Fraser(1983)은 Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>과 더불어 精子의 受精能獲得에 있어 도움을 줄수 있는데 반면, Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>이 缺乏된 培地에는 精子의 受精能獲得이 어렵다고 하였다. 이러한 變化는 Ca<sup>2+</sup> / Na<sup>+</sup>의 交換을 刺戟하여 尖體膜의 細胞內 Na<sup>+</sup>을 蓄積함으로써 尖體反應이 促進된다고 한 理由에서 起因되며 이때 Ca<sup>2+</sup> / Na<sup>+</sup>의 刺戟의 交換 時間이 100分 程度에서 가장 活性化 되어진다고 하였다. 한편 이때의 K<sup>+</sup>의 濃度は 20~30mM 程度이며, K<sup>+</sup>의 作用은 尖體反應을 持續的으로 有志하는데 큰 도움을 준다고 하였다.

Murphy等(1986)과 Fraser(1983)는 體外受精時 精子 前培養 處理時間이 100分 程度가 適當하다는 報告는 本 實驗의 成績은 거의 類似 傾向으로 나타났다.

#### IV. 摘 要

本 研究는 4~6週齡의 ICR系統 생쥐로부터 過排卵을 誘起한 後 未受精卵을 回收하여 體外受精을 實施할 때 最適의 生理的 條件을 究明하는데 그 目的이 있다. 體外 受精液의 基本 培養液은 TYH 280液을 使用하였고 이때 NaHCO<sub>3</sub>와 NaCl로서 pH와 滲透壓을 調節하였으며, 體外 受精後 胚發育 過程에 있어서 最適의 pH, 滲透壓 및 精子 前培養 處理에 따른 그 效果를 提高하였다. 이때 pH의 調節 範圍는 0.2 間隔으로 6.5부터 7.5까지, 滲透壓은 20mOsm 間격으로 250부터 370mOsm까지, 精子 前培養 處理은 각각 30, 60, 120 및 180分으로 처리한 後 體外 受精을 實施하여 胚盤胞 胚까지 發育에 어느 정도 影響을 미치지지를 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 體外 受精液의 pH를 0.2 間隔으로 調節하여 體外 受精後 24時間 培養한 結果 正常的으로 2細胞胚까지 體外 發生된 體外受精率은 pH 7.1일때 64.7%로 가장 높았고, pH 6.7일때 38.0%로 가장 낮았다. 한편 pH 7.1과 7.5 區間에서는 有意差(P > 0.05)가 認定되지



않았으며, 多精子 侵入卵의 發生率에 있어서는 受精液의 pH가 7.5 以上 그리고 6.9 以下일 때 有意的( $P < 0.05$ )으로 增加 되어졌고, 또한 退化卵의 發生率은 pH 6.9以下에서 增加되어 有意味差( $P < 0.05$ )가 認定되었다.

2. 體外 受精液의 滲透壓은 20 mOsm 間隔으로 調節하여 體外受精後 24時間 培養한 結果 正常的으로 2細胞胚까지 體外 發生된 體外受精率은 滲透壓 330 mOsm일때 69.6%로 가장 높았고, 滲透壓 250 mOsm 일때 47.9%로 가장 낮았다. 한편 滲透壓 310과 350 mOsm 區間에서는 有意味差( $P < 0.05$ )가 認定되지 않았으며, 多精子 侵入卵의 發生率에 있어서는 受精液의 滲透壓 350 mOsm 以上 그리고 290 mOsm 以下일때 有意味差( $P < 0.05$ )가 增加되어졌고, 또한 退化卵의 發生率은 滲透壓 290 mosmol 以下에서 增加되어 有意味差( $P < 0.05$ )가 認定되었다.

3. 精子를 前培養 處理하여 體外受精에 利用한 結果 體外受精後 24時間 培養한 結果 正常的으로 2細胞胚까지 體外 發生된 體外受精率은 精子 前培養 處理 時間 180分일때 62.7%로 가장 높았고, 30分일때 40.4%로 가장 낮았다. 한편 精子 前培養 處理 時間 120分과 180分 사이에서는 有意味差( $P > 0.05$ )가 認定되지 않았으며, 多精子 侵入卵의 發生率에 있어서는 30, 60, 120 및 180分의 全 區間에서 大 差異가 無었으나, 反面 退化卵의 發生率은 60分 以下에서 增加되어 有意味差( $P < 0.05$ )가 認定되었다.

## V. 引用文獻

1. Bavister, B.D. 1981. Fertilization and embryonic development *in vitro*; Analysis of culture media for *in vitro* fertilization and criteria for success. Plenum press, New York. 41-48.
2. Bedford, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol. Reprod (supple). 2:128-148.
3. Biggers, J. and L. Mastroianni. 1985. Fertilization and embryonic development *in vitro*; *In vitro* culture of zygotic and embryos.

Plenum press, New York. 66-69.

4. Brackett, B.G., Y.K. Oh, J.F. Evans and W. J. Donawick. 1978. *In vitro* fertilization of cow ova. Theriogenol. 9:89.
5. Brackett, B.G., Y.K. Oh, J.F. Evans and W. J. Donawick. 1980. Fertilization and early development of cow ova. Biol. Reprod. 23: 189-205.
6. Cherr, G.N., H. Lambert and D.F. Katz. 1984. Completion of the hamster sperm acrosome reaction on the zona pellucida *in vitro*. J. Cell. Biol. 99:261.
7. Cross, N.L., P. Morales, J.W. Overstreet and F.W. Hanson. 1988. Induction of acrosome reaction by the human zona pellucida. Biol. Reprod. 38:235-244.
8. cummins, J.M. and R. Yanagimachi. 1982. Sperm-egg rations and the site of the acrosome reaction during *in vivo* fertilization in the hamster. Gametes Res. 5:239-256.
9. Davidson, A., M. Vermersh, R.A. Lobo and R.J. Paulson. 1988. Mouse embryo culture for human *in vitro* fertilization: The one-cell versus the two-cell model. Fertil Steril. 49(3) :516-521.
10. Farrell, P.S. and B.D. Bavister. 1984. Shorten exposure of two-cell hamster embryos to collection in detrimmented to viability. Biol. Reprod. 31:109-114.
11. Fraser, L.R. 1983. Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility *in vitro*. J. Reprod. Fert. 69: 539-553.
12. Fraser, L.R. 1987. Minimum and maximum extracellular  $Ca^{2+}$  requirement during mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. J. Reprod. Fert. 81:77-89.
13. Hoppe, P.C. and S. Pitts. 1973. Fertilization *in vitro* and development of mouse ova. Biol.

- Reprod. 8:420.
14. Hyne, R.V. 1984a. A bicarbonate and calcium induction of rapid guinea-pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. A.B.A. 53:416(No. 3130).
  15. Hyne, R.V. 1984b. Bicarbonate and calcium-dependant induction of rapid guinea pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. Biol. Reprod. 31:312-323.
  16. Hyne, R.V. and D.L. Garbers. 1981. Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in buffered medium below pH 7.8. Biol. Reprod. 24:257-266.
  17. Iwamatsu, T. and M.C. Chang. 1969. *In vitro* fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. Nature. 224:919.
  18. Johnson, M.H. and A. Scarpa. 1976. Internal pH of isolated chromaffin vesicle. J. Biol. Chem. 251:2189-2191.
  19. Kasai, K., Y. Minato and Y. Toyoda. 1978. Fertilization and development *in vitro* of mouse eggs from inbred strains and F<sub>1</sub> hybrids. Japan J. Anim. Reprod. 24:19-22.
  20. Lawitts, J.A. and J.D. Biggers. 1991a. Optimization of mouse block by modifying standard components in a mouse embryos culture medium. Biol. Reprod. 45:245-251.
  21. Mahi, C.A. and R. Yanagimachi. 1973. The effect of temperature, osmolality and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of spermatozoa. J. Reprod. Fert. 35:55-66.
  22. Miyamoto, H. and M.C. Chang. 1973. The importance of serum albumin metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs *in vitro*. J. Reprod. Fert. 32:193-205.
  23. Murphy, S.J. and R. Yanagimachi. 1984. The pH dependence of motility and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. Gamete Res. 10:1-8.
  24. Murphy, S.J., E.R.S. Roldan and R. Yanagimachi. 1986. Effects of extracellular cations and energy substrates on the acrosome reaction of precapacitated guinea pig spermatozoa. Gamete Res. 14:1-10.
  25. Niwa, K., H.I. Imai, C.I. Kim and A. Iritani. 1980. Fertilization *in vitro* of hamster and mouse eggs in a chemically defined medium. J. Reprod. Fert. 58:109-114.
  26. Ohzu, E. and R. Yanagimachi. 1982. Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysolecithin. J. Exp. Zool. 224:259-263.
  27. Parkening, T.A. and M.C. Chang. 1977. Effects of cooling rate and maturity of the animal on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs. Biol. Reprod. 17:527-531.
  28. Quinn, P., J.F. Kerin and G.M. Warnes. 1985. Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril. 44(4):493-498.
  29. Working, P.K. and S. Meizel. 1981. Evidence that an ATPase functions in the maintenance of the acidic pH of the hamster acrosome. J. Biol. Chem. 256:4708-4711.
  30. Yanagimachi, R., H. Yanagimachi and B.J. Rogers. 1976. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 15:471-476.
  31. 全承宰·鄭吉生. 1984. 생쥐卵자의 시험관내受精과 발달. 韓國家畜繁殖學會. 8(2):110-115.