韓國家畜繁殖學會誌 17(1) : 57~68(1993)
Korean J. Animal Reprod.

體外受精 및 微細操作에 의한 家畜胚의 生産과 效率的 利用에 관한 硏究
Ⅰ. 體外成熟·體外受精된 토끼 및 소 胚의 移植과 凍結

金昌根 · 鄭英彩 · 李根常* · 金熙錫** · 鄭鎭泰 · 尹鍾澤 · 崔善昊 · 李章熙 · 金光植
中央大學校 産業大學

Studies on Production and Efficient Utilization of Livestock Embryos by *In Vitro* Fertilization and Micromanipulation
Ⅰ. Transfer and Freezing of *In Vitro* Fertilized Rabbit and Bovine Oocytes Matured *In Vitro*

Kim, C.K., Y.C. Chung, K.S. Lee*, H.S. Kim, J.T. Chung,**
J.T. Yoon, S.H. Choi, J.H. Lee and K.S. Kim
College of Industrial Studies, Chung-Ang University

SUMMARY

This study was carried out to find a reliable method for the production of *in vitro* fertilized embryos having more excellent development capacity and freezability in the rabbit and cattle. The greatest number of rabbit oocytes was recovered 6hrs after HCG injection($P<0.05$). The maturation rate *in vitro* was slightly higher in the oocytes(6-h-oocytes) from 6h than those (8-h-oocytes)from 8 hrs after HCG injection and the beneficial effect of FSH during oocyte maturation was significantly great in the oocytes from large follicles. The cleavage rate into 2-to 6-cell stage was not differ between the 6-h-oocytes and 8h-oocytes, but the cleavage of these oocytes was greatly promoted by FSH addition to maturation medium and the cleavge of 8-h-oocytes matured without FSH was significantly low. The embryo development into 16-cell to morula was not promoted by the co-culture with rabbit oviduct epithelial cells. The freezability by embryo stages was obviously high at 4-cell and morula stage in 6-h-oocytes and the viability of 16-cell embryos from 8h-oocytes was similar to that of morula stage. The implantation sites after surgical tranfer of fresh rabbit embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization were very few and the frozen-thawed embryos were not implanted. In bovine experiment, the *in vitro* development into 16-cell and morula after *in vitro* maturation and fertilization in the follicular oocytes was slightly improved by the co-culture with granulosa cells compared to that with oviduct epithelial cells and the frozen-thawed viability rate of these embryos ranged from 14 to 40%. The excellent fresh embryos were transferred nonsurgically to 6 recipients, but were not pregnant.

"이 論文은 1990年度 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음"
* 農村振興廳 畜産試驗場(Livestock Experiment Station, RDA)
** 濟州大學校 農科大學(College of Agriculture, Che ju National University)

Ⅰ. 緖 論

소 受精卵移植技術과 그와 관련된 첨단유전공학기술의 개발을 보다 효율적이고 경제적으로 수행토록 하는데 있어서 가장 시급하고 중요한 문제중에 하나가 卵子나 受精卵을 보다 저렴하게 多量供給할 수 있는 생산공급체계의 확립이다. 최근 未成熟卵胞卵의 體外成熟과 體外受精 및 移植할 수 있는 단계까지 體外培養된 胚의 生産利用이 가능해 지고 있으나 아직도 體外成熟 體外受精卵胞卵의 체외발생능이 낮을 뿐만 아니라 이식후 受胎率이 극히 낮기 때문에 卵胞卵의 생산이용체계가 확립되었다고 할 수 없으며 生産利用效率을 더욱 증대 시키기 위해서는 이들 卵子나 胚의 凍結保存技術의 개발도 병행되어야 할 것이다.

토끼에서의 體外受精과 胚의 凍結實驗結果들을 보면, 卵胞卵의 體外成熟率이 채란된 卵胞의 크기(Smith 등, 1987)에 따라 차이가 있으며 LH surge 후의 채란시간(Yamazaki 등, 1990)및 성숙배양액에 호르몬첨가방법(정 등, 1988)에 따라 다르며 체외수정후 胚發生能에 미치는 體細胞와의 共同培養效果가 소와 토끼간에 차이가 있는 것으로 보고되어 있다(Eyestone과 First, 1989; Carney 등, 1990). 또한 體外受精卵은 체외배양시 發生이 지연되고 體內發生만큼 충실한 상태에 미치지 못하고 있다(Carney 와 Foote, 1990).

토끼 受精卵의 凍結生存性은 발생단계에따라 차이가 있으며(Tsunoda 등, 1979; Smorag 등, 1989; 김 등, 1990b) 이식후의 姙娠率과 分娩率에 있어서도 동결, 융해 및 이식조건에 따라 차이가 많다(Tsunoda 등, 1979; Techakumphu 등, 1987; Kobayashi 등, 1990).

최근 體外成熟·體外受精으로부터 생산된 胚의 동결에 관한 관심도 높아지고 있다. 또한 vitrification에 의한 체외수정란의 동결이 흰쥐(Kono 등, 1990) 그리고 자연배란 수정란의 동결이 토끼(Kobayashi 등, 1990), 생쥐(Rall 등, 1987) 및 소(Massip 등, 1987)에서 보고되었다.

소에서 體外成熟 體外受精卵의 發生能을 보면 성숙배양액에 발정혈청 첨가에서 성숙율과 수정율이 향상되며, 體細胞와의 共同培養에서 胚發生能이 향상되는 것으로 알려져 있다(Lu 등, 1988; Fukui 와 Ono, 1988; 김 등, 1990a). 한편 Fukuda 등(1990)은 이들 수정란의 동결로부터 송아지를 생산한 바 있다.

本 硏究는 토끼를 實驗모델로 하여 體外發生能과 凍結性이 우수한 受精卵을 생산하기 위하여 未成熟卵胞卵의 체외성숙과 체외배양방법 및 vitrification에 의한 受精卵의 凍結方法을 개발하는데 일차 목적이 있으며, 소 體外成熟 體外受精卵의 생산과 이식 및 수정란의 동결기술개발의 기초자료를 얻고자 시도하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 토끼卵胞卵의 體外受精, 凍結 및 移植實驗

1) 供試動物과 管理

실험에 공시된 토끼는 체중 2.5~3.0kg의 미경산 뉴질랜드 화이트종이었고 200~250g의 농후사료를 1일 2회로 나누어 급여하였으며 물은 자유급수하였다. 하루 14시간 조명하였으며 위임신을 방지하기 위하여 개별사육하였다.

2) 卵胞卵의 採卵

채란하기전 4, 6, 8시간에 각각 HCG 100 IU를 이정맥에 주사한 후 도살하여 난소를 적출한 다음 BO액(Brackett과 Oliphant, 1975)에 세척하고 26게이지 주사침으로 가시난포의 크기별로 파열시켜 채란하였다.

3) 體外成熟과 體外受精

(1) 성숙배양액: BO액에 D-glucose, BSA, $NaHCO_3$, Na-pyruvate 및 10%토끼혈청(RS, rabbit serum)을 첨가하였다.

(2) 體外成熟과 判定: 성숙배양액을 4-well dish에 0.5ml씩 분주하고 각 dish에 10~15개의 卵胞卵을 넣고 멸균파라핀 오일로 피복한 다음 5% CO_2, 100% 습도, 95% 공기, 37℃항온기에서 12~18시간 배양하였다. 난포란의 성숙판정은 Hensleigh와 Hunter(1985)의 방법에 따라 卵丘細胞의 膨化 정도를 위상차 현미경에서 관찰하여(0, +, ++)로 구분하였으며 ++를 완전팽화(성숙)로 간주하였다.

(3) 精子의 受精能獲得: 체중 4kg 정도의 뉴질랜드 화이트종 수토끼로부터 인공질법을 이용하여 정액을

채취한 다음 Brackett 등(1982)의 방법에 따라 세척용 DM(-BSA) 4ml로 희석하고, 2,500 rpm에서 5분간 원심분리로 2회 반복 세척한 후 DM(+BSA)으로 정자농도를 2.0×10^6/ml로 조정한 다음 10시간 전배양하였다.

(4) **體外受精**: 전배양한 정자를 swim-up법으로 DM 0.2ml에 생존정자가 1.0×10^6/ml되게 조정한 후 petri dish에 小滴을 만든 다음 멸균파라핀 오일로 피복하고 그 안에 난구세포가 팽화된 난자 10~15개를 넣은 다음 위의 incubator조건에서 24시간 수정시켰다.

4) 體外受精卵의 體外培養

수정후 24시간에 卵割상태로 체외수정율을 조사한 다음 Ham's F10배양액에 옮겨 72시간 배양하였고, 매 48시간마다 신선배양액으로 교환하였다. 토끼난관상피와의 공동배양을 위한 상피세포의 준비는 Gandolfi와 Moor(1987)의 방법에 준하였다.

5) 受精卵의 凍結과 融解

(1) 凍結(vitrification): 발달단계별로 4, 8, 16세포기 및 상실배기의 수정란을 Kobayashi 등(1990)의 방법에 따라 동결하였다. 수정란을 20℃하에서 3ml VS-1액(20% 1, 2-propanediol, 10% glycerol, 16% FCS/ml PBS)에 10분간 침적시켜 1차 탈수시킨 다음 미리 제조하여 4℃에 보관해두었던 straw내 VS-2액(25% 1,2-propanediol, 25% glycerol, 16% FCS/ml PBS의 double bubble 층)에 주입하고 봉인한 후 액체질소내로 침적하여 동결하였다.

(2) **融解**: 동결된 straw를 20℃항온조에서 약 10초간 융해한 후 2-step으로 희석하였다. 먼저 straw내 수정란을 VS-2 층과 1M sucrose 층을 함께 petri dish내 쏟아 10분간 정치하여 1단계 희석후 0.25M sucrose 소적으로 옮겨 5분간 정치한 다음 수정란내의 잔여 耐凍劑를 제거하면서 3회이상 세척하였다.

6) 동결융해난자의 生死判定

생사판정은 FDA 검사로 하였다. FDA 염색액은 actone 1ml에 FDA 5mg을 녹여 stock solution을 만든 후 필요시 마다 mPBS액 10ml에 FDA stock solution 5㎕를 분주하여 최종농도가 2.5 ㎍/ml로 조정한 후 사용하였다. 염색은 37℃로 가온된 FDA염색액 100~200㎕를 silicon으로 피복된 slide위에 떨어뜨린 후 염색액내에 수정란을 넣고 1~1.5분간 배양하였고, 배양후에 염색액을 완전 제거하고 수정란배양액으로 3회 세척후 Schilling 등(1982)의 방법에 따라 염색상태를 4단계로 구분하였다.

7) 受精卵의 移植

受卵兎는 HCG주사후 정관수술 토끼와 교배시켜 배란을 유기시킨 다음 위임신 2~4일째에 受精卵을 발생단계별로 구별하여 한쪽 난관(2~16세포기)또는 자궁(상실배)에 5~6개씩 외과적으로 이식하였고 이식후 12~20일에 도살 또는 복부촉진으로 임신여부를 확인하였다.

2. 소 卵胞卵의 體外受精, 凍結 및 移植實驗

1) 供試卵子와 採卵

도살 직후 韓牛卵巢를 분리하여 2시간 이내에 실험실로 옮긴 다음 직경 2~6mm의 정상난포에서 20게이지 주사침으로 난포액을 흡입 채란하였으며 세포질이 정상이고 卵丘細胞가 충실한 난자만을 공시하였다.

2) 體外成熟과 體外培養

체외성숙은 기본배양액 TCM 199에 10% FCS 또는 10% 소발정혈청을 첨가하였으며 과립층세포(granulosa cells)와 공동배양하였다. 과립층세포의 준비와 배양은 Racowsky와 McGaughey(1982)의 방법에 준하였다.

3) 體外受精

정자의 체외수정능획득은 2個體의 한우정액 straw를 융해 혼합한 후 Niwa와 Ohgoda(1988)의 방법에 따라 정자를 처리하였다. 정자부유액에 caffeine과 heparin의 최종농도가 각각 5mM와 10㎍/ml되게 하였고, 생존정자 1.0×10^6/ml의 정자 부유액에 한 dish당 10여개의 체외성숙卵胞卵을 넣고 5% CO_2, 95% 공기, 100% 습도, 39℃ incubator에서 18시간 체외수정시켰다.

4) 體外受精卵의 體外培養

체외수정시킨 다음 TCM 199으로 옮겼으며 체외배양 조건은 과립층세포(GC)로 계속 공동배양하는 區와 소난관상피세포(BOEC)와 공동배양하는 구로 구

분하였으며 과립층세포의 준비는 이미 언급한 바와 같으며 소난관상피세포의 준비와 배양은 Gandolfi와 Moor(1987)의 방법에 준하였다.

5) 體外培養卵의 凍結과 生死判定

체외배양된 16세포기와 桑實胚를 Lehn-Jensen (1984)의 동결기 이용법과 Massip 등(1987)의 vitrification 방법에 따라 각각 동결후 생존성을 비교하였으며 동결융해란의 생사판정은 앞의 FDA 방법과 같았다.

6) 體外培養 非凍結受精卵의 移植

1~3회의 정상발정주기를 보인 미경산우 6두(한우 3두, 홀스타인 3두)를 선정한 후 자연 발정주기 5~6일에 맞게 미리 16세포기 또는 상실배기의 수정란을 준비하였다가 비외과적 방법으로 자궁내에 1~2개의 수정란을 이식하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 토끼 卵胞卵의 體外受精, 凍結 및 移植

1) 卵胞卵의 體外成熟

採卵率과 成熟率이 높은 卵胞卵을 얻기 위하여 시도된 실험결과는 Table 1과 2에서 보는 바와 같다. 採卵數는 개체당 평균 34개였으며 HCG주사후 6시간에서 채란수가 많았고($P<0.05$) 卵子의 76%가 小卵胞에서 채란되었다. 한편 4와 8시간에서는 中 大卵胞에서의 채란비율이 증가하였다. HCG주사후 6시간에 채란된 卵胞卵에서 성숙배양후 卵丘細胞의 平均膨化率이 FSH의 첨가에서는 뚜렷하지 않았으나 큰 난포의 卵子에 FSH첨가에서 膨化率이 현저히 높았다($P<0.05$).

한편 HCG주사후 8시간에 채란된 卵胞卵에서는 두 성숙배양액에서 모두 큰 난포란의 난자가 膨化率이 현저히 높았으며($P<0.05$) 역시 FSH의 첨가효과는 나타나지 않았다. 그리고 HCG주사후 8시간의 卵子에서 膨化率이 6시간보다 다소 낮았다.

본 實驗에서 HCG주사후 6시간에 채란수가 53개로 가장 좋았던 결과는 鄭등(1988)이 과배란시킨 이후에 채란한 수와 같았으나 채란수로 본 난포크기의 分布는 Osteen과 Mills(1980)가 정상교미 토끼에서 큰 난포 비율이 약 60%라고 한 것과는 차이가 있었다. 따라서 보다 많은 卵胞卵을 얻기 위해서는 채란기술의 숙달이 필요하며 HCG주사시기가 중요함을 알 수 있었다. 1 mm이상의 卵胞卵에서 성숙배양후 膨化率이 대체로 높았던 것은 Smith 등(1978)이 큰 난포란일 수록 成熟率이 높았다는 報告와 유사한 결과였다.

한편 FSH첨가에서 평균팽화율의 증가가 없었던 것은 牛(Hensleigh와 Hunter,1985)의 결과와는 달랐고 鄭등(1988)에서 오히려 성숙율이 낮았던 것과도 차이가 있었다. 또한 HCG주사후 8시간에 채란된 卵胞卵의 膨化(成熟)率은 Yoshida등(1986)과 같았으며 HCG주사후 큰 난포란의 卵子에서 성숙율이 높았던 결과도 Wiesak등(1990)과 같았다. 그러나 HCG주사후 6시간의 卵子보다 성숙율이 다소 낮았던 결과는 Zhang과 Armstrong(1989)이 성선자극호르몬 주사가 난자성숙에 영향이 없다고 한 것과는 다소 차이가 있었다. 따라서 보다 성숙율이 높은 卵胞卵의 生産

Table 1. Number of rabbit oocytes collected at various times after HCG from visible follicles of diffrent sizes

Time after HCG(h)	No.of rabbits	No.of oocytes collected		% of oocytes collected		
		Total	Per head	Small*	Medium	Large
4	5	118	24[a]	57.6[a]	28.8[b]	13.6[a]
6	5	264	53[b]	76.1[b]	14.1[a]	9.8[a]
8	5	121	24[a]	56.1[a]	24.4[b]	17.5[a]
Total, mean	15	503	34	67.0	20.5	12.5

*Small follicle : <1.0mm in diameter; medium foll.:1.0~1.4mm; large foll.: >1.5mm

[a,b] Means and percentages with different superscripts in each column differ($P<0.05$).

Table 2. Degree of cumulus cell expansion after 12-h culture of follicular oocytes collected at 6 h and 8 h after HCG

Collection after HCG	Maturation medium	Follicle size (mm)	No. of oocytes cultured	% of oocytes showed cumulus expansion*		
				0	+	++
6 hr	DM+10%RS	<1.0	310	9.9	7.9	82.2
		≥1.0	41	4.6	6.7	88.5
		Total	351	7.3	7.4	85.3
	DM+10%RS +FSH(1μg/ml)	<1.0	364	10.8	8.0	81.1[a]
		≥1.0	47	1.9	6.7	91.4[b]
		Total	411	6.4	7.4	86.3
8 hr	DM+10%RS	<1.0	226	11.1	12.4	76.5[a]
		≥1.0	77	2.6	7.8	89.6[b]
		Total	303	8.9	10.2	79.9
	DM+10%RS +FSH(1μg/ml)	<1.0	187	15.5	11.8	72.7[A]
		≥1.0	71	7.0	8.5	84.5[B]
		Total	258	13.2	10.9	76.0

*O: oocytes with<20% of cells expanded.

+: with 21 to 60% of cells expanded.

++: with 61 to 100% of cells expanded(corresponds to normal expansion at time of ovulation).

[a,b;A,B] Percentage with different superscripts differs($P<0.05$).

利用을 위해서는 HCG와 FSH에대한 반응효과를 더욱 검토할 필요가 있는 것으로 사료되었다.

2) 體外受精과 胚發生

HCG주사후 6시간과 8시간에 채란된 체외성숙 卵胞卵을 난포크기의 구분없이 체외수정시킨 결과는 Table 3과 같으며 체외수정후 72시간까지의 胚發生能은 Table 4와 같다. Table 3에서 HCG후 6시간에 채란 성숙된 卵子에서 體外受精후 24시간에서 평균 49%의 卵割을 보였으며 성숙배양시 FSH 무첨가와 첨가간에는 74와 50%로 첨가구에서 卵割率이 다소 높았으나 유의성은 없었다. 한편 HCG주사후 8시간에 채란 성숙된 卵子는 평균 41%였고 FSH첨가에서 卵割率이 현저히 높았다. 4~6세포기의 난자수를 보면 HCG 6시간과 8시간의 卵子에서 모두 FSH첨가 배양액에서 성숙시킬 때 많아 난할 속도가 다소 빠른 경향이 있었다. 그리고 HCG후 채란시간에 따른 영향은 나타나지 않았다.

본 실험에서 24시간까지의 난할율은 토끼에서 체외성숙란의 체외수정에서 浜田등(1987)이 25.9%라고 한 것보다는 높으나 Motlik와 Fulka(1981)가 HCG 주사후 3시간 이후의 난포란에서 체내이식후 20시간에 85%가 정상 2~4세포기로의 발생을 보고한 것보다는 현저히 낮았다. 한편 자연배란 토끼卵子와의 체외수정에서 보고된 Brackett와 Oliphant(1975)의 30%보다는 높았다.

본 결과에서 HCG후 8시간의 卵子를 FSH첨가로 성숙시킬 때 卵割率이 높았던 것은 Zhang과 Armstrong(1989)과 같았고 한편 HCG후 6시간의 卵子에서 FSH효과가 없었던 것은 Fukushima와 Fukui(1985)의 결과와는 달랐다.

또한 HCG후 6시간과 8시간의 난자간에 卵割率에 차이가 없었던 결과는 Yamazaki등(1990)이 HCG후 채란시기에 따라 난할율에 차이가 있었던 것과는 차이가 있었다. 생쥐에서 Yamazaki등(1990)은 HCG주사후 4~12시간에 채란된 난포란의 體外成熟이 성숙배양에 FCS의 존재하에서는 채란시기에 차이가 없으나 FCS무첨가구에서는 4시간 채란에서 卵割率이 크게 저하되기 때문에 HCG의 주사시기 및 체외성숙배양액 FCS의 첨가여부가 卵割率에 크게 영향함을 보

Table 3. Effect of maturation medium and collection time on cleavage(24-h postinsemination)of rabbit oocytes fertilized *in vitro*

Collection after HCG	Maturation medium	No. of oocytes inseminated	No.(%)of oocytes cleaved to				
			Uncleaved	2-cell	4-cell	≥6-cell	Total, cleaved
6 hr	DM+10%RS	465	247	137	73	8	218(46.9)
	DM+10%RS +FSH(1㎍/ml)	635	315	146	139	35	320(50.4)
	Total	1,100	562 (51.1)	283 (25.7)	212 (19.3)	43 (3.9)	538 (48.9)
8 hr	DM+10%RS	259	172	64	21	2	87(33.6)[A]
	DM+10%RS +FSH(1㎍/ml)	230	115	66	46	3	115(50.0)[B]
	Total	489	287 (58.7)	130 (26.6)	67 (13.7)	5 (1.0)	202 (41.3)

[A,B] Significant difference between two media($P<0.05$).

Table 4. Effect of maturation medium and *in vitro* culture system on *in vitro* development(16-cell to morula)of embryos after *in vitro* fertilization

Maturation medium	Culture system*	No. of oocytes inseminated	Time after IVF	
			24 hr (2-to 6-cell)	72 hr (16-cell to morula)
DM+10% RS	Ham's F_{10}	120	35 (29.2%)	15 (12.5%)
	Ham's F_{10} +ROEC	96	36 (37.5%)	16 (16.6%)
DM+10%RS +FSH(㎍/ml)	Ham's F_{10}	115	81 (70.4%)	29 (25.2%)

*ROEC: rabbit oviduct epithelial cells.

고한 바 있다.

體外受精후 胚發生能을 더욱 향상시키기 위하여 체외배양시 토끼난관상피세포와 72시간 공동 배양한 결과는 16세포기와 桑實胚로의 발생이 16.6%로 유의성은 없었으나 대조구의 12.5%보다 다소 향상되었다. 그러나 FSH첨가에서 성숙된 卵胞卵의 체외수정후 胚發生能이 25.2%로 무첨가보다 향상되었다.

본 실험에서 난관상피세포와의 공동배양결과는 소에서 보고된 결과(Eyestone과 First, 1989; 김등; 1990a)처럼 현저하지 않았다.

특히 Carney등(1990)도 소와는 다르게 토끼에서는 난관상피세포와의 공동배양에서 胚發生의 향상이 없다고 보고한 바 있다. FSH첨가 성숙배양에서 胚發生이 향상된 결과는 Yoshimura등(1989)이 LH, FSH, E_2첨가에서 初期卵割에는 차이가 없으나 桑實胚와 胚盤胞의 발생이16%로 증가됨을 보고한 것과 유사한 결과였다.

체외수정란의 경우 자연배란된 수정란보다 상실배까지의 발생이 지연되며(Minato와 Toyoda, 1983; Yamazaki등, 1990), 또한 자연배란수정란 일찌라도 체외배양에서 발생이 지연되는 것으로 토끼(Carney와 Foote, 1990)에서 보고된 점으로 보아 FSH의 첨가는 체외성숙 체외수정란의 胚發生向上에 유효하게 작용하는 것으로 사료되었다.

3) 體外受精卵의 凍結

卵胞卵의 채란시기와 발생단계가 다른 조건에서 수정란의 凍結후 FDA로 조사된 융해후 生存率은 Table 5와 같다. HCG주사후 6시간에 채란된 수정란의 4, 8, 16細胞期 및 桑實胚의 FDA양성율은 각각 50, 7, 10, 및 48%였고 부분형광-1까지를 포함시킬 때는 64, 27, 50 및 66%였다. 한편 음성 즉, 죽은 수정란은 23, 40, 30 및 14%였고 여기에 역시 부분형광 -2를 포함시킬 때는 36, 73, 50 및 30%였다. 4細胞期와 桑實胚期의 동결에서 생존성이 다른 시기보다 높았다. 한편 HCG 주사후 8시간에 채란된 수정란의 경우는 8, 16세포기에서도 생존성이 증가되는 경향이 있었다.

이러한 발생단계별의 차이를 자연배란 受精卵의 동결성적과 비교해 보면 Tsunoda등(1979)은 8세포기와 상실배에서 생존성이 높다고 하였고 김등(1990b)은 4~16세포기 80%, 상실배 90%의 생존성을 보고하였다. 본 실험에서 8~16세포기의 생존성이 낮은 결과가 체외수정란과 관계된 것인지에 대한 여부는 더욱 조사되어야할 부분이다.

그러나 Smorag등(1989)도 8~16세포기의 동결생존성이 동결방법에 따라 23~93%로 변이폭이 큰 것으로 보고한 바 있다. 한편 4세포기에서 생존성이 높았던 것은 Wilson과 Quinn(1989)이 1~2세포기의 生存性이 70~80%로 높게 보고한 것과 유사한 결과였다.

4) 體外培養受精卵의 移植

Table 5. Flurescent light intensity of vitrified-thawed rabbit embryos after exposure to FDA

Cell stage at freezing	No. of embryos evaluated	No.(%)of embryos*			
		Positive	Partial-1	Partial-2	Negative
(Oocytes collected 6 hr after HCG)					
4	22	11 (50.0)	3 (13.6)	3 (13.6)	5 (22.7)
8	15	1 (6.7)	3 (20.0)	5 (33.3)	6 (40.0)
16	10	1 (10.0)	4 (40.0)	2 (20.0)	3 (30.0)
Morula	20	10 (47.6)	4 (19.0)	3 (15.0)	3 (14.3)
Total	67	23 (34.3)	14 (20.9)	13 (19.4)	17 (25.4)
(Oocytes collected 8 hr after HCG)					
8	9	0 (0)	4 (44.4)	5 (55.6)	0 (0)
16	17	4 (23.5)	8 (47.0)	4 (23.5)	1 (5.9)
Morula	16	7 (43.8)	3 (18.8)	5 (31.3)	1 (6.3)
Total	42	11 (26.2)	15 (35.7)	14 (33.3)	2 (4.2)

* FDA-Positive: very bright and uniform fluorescence within cells.
Negative: no fluorcence visible.
Partial-1: brigjt and uniform fluorescence.
Partial-2: pale and uniform or patchy fluorescence.

Table 6. Result in transfer of rabbit embryos derived from oocytes matured *in vitro* and fertilized *in vitro*

Condition of embryos		No. of recipients	No. of embryos transferred	No. of implantation sites*
Freezing	Cell stage			
Fresh	2-6	3	25	−
	8-16	4	28	2(1 recipents)
	Morula	2	9	1
Frozen	8-16	2	11	−
	Morula	2	8	−

* Autopsy at 12-d after transfer.

체외배양후 非凍結 또는 동결조건에서의 移植結果는 Table 6과 같다.비동결 수정란의 경우 8~16細胞期와 桑實胚를 이식한 2개체에서 3개의 着床点을 확인할 수 있었다. 그러나 동결수정란에서는 모두 착상되지 않았다.

토끼에서 체외성숙난포란을 체외수정시켜 이식한 후 임신의 예는 보고된 바가 없으나 생쥐에서 Minato와 Toyoda(1983)는 비동결란의 이식에서 12.3%의 새끼를, Schroeder등(1990)은 2세포기의 동결수정란을 이식하여 26%의 분만율을 보고하였으며, 한편 Al-Hasani등(1989)은 자연배란토끼 미수정란을 체외수정시킨 후 4~8세포기에서 동결융해한 수정란을 이식하여 7.5%의 자토를 최초로 생산한 결과로 보아 동결이용의 가능성을 찾을 수 있었다.

토끼에서 수정란의 이식후 임신결과를 보면 채란직후의 이식에서 着床率이 40~50%(Techakumphu등, 1987; Kobayashi등, 1990), 채란후 體外培養에서는 24%(Smorag등, 1989)로 보고되었고 채란직후 동결융해후에서는 동결시의 발생단계에 따라 차이가 있었다(Tsunoda등, 1979). 8세포기~상실배의 동결후 착상율과 분만율은 14~83%와 0.3~33%로서 보고자들간에 차이가 많았다(Tsunoda등, 1978; 1979).

한편 상실배와 배반포까지 체외배양후 비동결 또는 동결후 이식에서는 着床率이 14~27%로 낮게 보고되었다(Smorag등, 1989; Techakumphu등, 1987). 특히 vitrification에 의한 토끼수정란의 채란직후 동결이식에서 착상율을 보면 생쥐의 60~80%(Rall등, 1987; Kono등, 1988)보다도 현저히 낮았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 體外受精卵의 培養과 移植 및 凍結保存을 위해서는 더욱 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료되었다.

2. 소 體外受精 卵胞卵의 體外培養, 凍結 및 移植

1) 體外培養 發生能과 凍結

卵胞卵으로부터의 이식 가능한 體外受精卵을 얻기 위하여 시도된 체외배양 발생능을 보면 Table 7과 같으며 16세포기와 상실배기의 동결후 생존성은 Table 8과 같다.

성숙배양액에 FCS보다는 발정혈청첨가에서 그리고 체외배양에서는 난관상피세포보다는 과립층세포와의 공동배양에서 胚發生能이 다소 향상되었다. 동결실험결과는 비록 공시 수정란은 적었으나 두가지 동결법 모두에서 동결이 가능함을 보여주었다.

FCS보다 발정혈청 첨가에서 胚發生能이 다소 우수했던 결과는 발정혈청이 체외성숙율과 初期胚發生에 이롭게 작용한다는 보고(Lu 등, 1988)와 일치된 결과였다. 한편 Fukui와 Ono(1989)는 성숙시 발정혈청의 첨가가 FCS보다 성숙율과 체외수정율은 다소 떨어지나 多精子侵入率이 훨씬 감소됨을 보고하였다. 과립층세포와의 공동배양에서 胚發生能이 다소 우수했던 결과는 과립층세포가 배발생 촉진효과를 나타낸다는 보고(Fukui와 Ono, 1988)와 유사한 결과였다.

특히 Fukui와 Ono(1988)는 FCS와 발정혈청 첨가배양에서 모두 과립층세포의 유무에 따라 胚發生에 상당한 차이가 있음을 보고하였다. 과립층세포의 공동배양효과는 웅성전핵형성의 촉진과 난할율을 높여준다는 사실이 토끼(Motlik과 Fulka, 1981)에서도 보고

Table 7. Effect of co-culture system during maturation of bovine oocytes and development of embryos on *in vitro* development to 16-cell stage and morula

Co-culture system*		No. of oocytes cultured	No.(%)of oocytes develop to		
Maturation	Development		16-cell	Morula	Total(%)
TCM 199+	TCM 199+BOEC	163	6	13	19(12)
10%ECS+GC	TCM 199+GC	162	19	14	33(20)
TCM 199+	TCM 199+BOEC	216	7	15	22(19)
10%FCS+GC	TCM 199+GC	130	17	8	25(15)

* GC: granulosa cells. BOEC: bovine oviduct epithelial cells.

Table 8. Fluorescent light intensity of frozen-thawed bovine 16-cell and morula co-cultured *in vitro* with BOEC or GC

Method		No. of oocytes evaluated	No.(%)of embryos*			
Freezing	Co-culture		Positive	Partial-1	Partial-2	Nagative
Lehn-Jensen	BOEC	5	2(40.0)	1	1	1
(1984)	GC	7	1(14.3)	3	1	2
Masssip et al.	BOEC	6	2(33.3)	0	2	2
(1987)	GC	7	1(28.6)	2	1	2

* See footnotes to Table 5 and 7.

Table 9. Result in non-surgical transfer of unfrozen bovine embryos *in vitro* fertilized and cultured after maturation *in vitro*

Recipients		Natural embryos		Pregnancy	Extended estrus
No.	Estrus cycles investigated	Culture	Cell stage		
K1	2×	A	16, M	−	38 days
K2	2×	B	16, M	−	−
K3	3×	A	16	−	−
H1	2×	B	16, M	−	29 days
H2	2×	B	16	−	−
H3	2×	B	M	−	−

* See to Table 7.

A: matured in TCM 199+10%ECS+GC and cultured in TCM 199+BOEC.

B: matured in TCM 199+10%ECS+GC and cultured in TCM 199+GC.

된 바 있다. 현재 체외성숙 체외수정란의 동결로 송아지가 태어난 예들이 있고 성숙된 자연배란 체내수정란에서 이미 vitrification 동결방법이 성공되고 있기 때문에 卵胞卵의 體外受精후 vitrification에 의한 본 실험의 결과에서도 동결가능성을 찾을 수 있었다.

2) 體外受精卵의 移植

2~3회 정상발정주기를 갖는 한우와 홀스타인종 미경산우 6두에 체외배양한 비동결수정란을 이식한 결과는 Table 9와 같으며 임신에는 성공하지 못하였고 다만 이식후 정기발정주기를 넘긴 개체가 2두 있을 뿐이

었다. 이들이 임신중지에 따른 것인지는 확인할 수 없었다.

임신실패의 가장 큰 원인이 受精卵의 질적 평가문제와 수정란과 受卵牛의 同期化문제에 기인된 것으로 판단되며 임신성공을 위해서 아직도 많은 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

Ⅳ. 摘 要

體外發生能과 凍結性이 우수한 體外受精卵을 얻기 위하여 시도된 본 연구 결과에서 토끼 卵胞卵의 採卵率은 HCG주사후 6시간때의 채란에서 가장 높았다 ($P<0.01$). 體外成熟率이 HCG 주사후 8시간때보다 6시간의 卵子에서 다소 높았으며 체외성숙 배양액에 FSH첨가효과는 큰 卵胞의 卵子에서 유의적으로 높았다($P<0.05$). 체외수정후 6細胞期까지의 卵割率은 HCG주사후 6시간과 8시간의 卵胞卵간에 차이가 없었으나 성숙시 FSH첨가로 더욱 촉진되었다. HCG주사후 8시간때의 卵胞卵에서 성숙배양액에 FSH무첨가시 난할율이 현저히 낮았다($P<0.05$). 토끼난관상피세포와 공동배양에서 16세포기~桑實胚까지의 胚發生의 向上效果는 나타나지 않았다. Vitrification에 의한 수정란의 발생단계별 凍結性는 HCG후 6시간의 난포란에서 4세포기와 상실배에서 높았고 8~16세포기에서는 낮았으며, 한편 HCG후 8시간의 난포란에서는 16세포기에서도 동결성이 상실배와 같았다. 토끼에서 體外成熟 體外受精된 비동결 및 동결수정란의 이식후 着床率은 매우 낮았다. 소 卵胞卵의 체외성숙과 체외발생중 體細胞와의 공동배양에서 16細胞期와 桑實胚로의 發生이 난관상피세포보다 과립층세포에서 다소 높았다. 소의 체외성숙 체외수정란의 동결융해후 FDA양성율은 14~40%였다. 소 卵胞卵의 체외성숙 체외수정시킨 후 체외배양한 수정란의 이식결과 임신에 성공하지 못하였다.

Ⅴ. 引用文獻

1. Al-Hasani, S., J. Kirsch, K. Diedrich, S. Blanke, H. Ven der Ven and D. Krebs. 1989. Successful embryo transfer of cryopreserved and *in-vitro* fertilized rabbit oocytes. Human Reprod. 4:77-79.
2. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12:260-274.
3. Brackett, B.G., D. Bousquet and M.A. Dressel. 1982. *In vitro* sperm capacitation and vitro fertilization with normal development in the rabbit. J.Androl. 3:402-411.
4. Carney, E.W. and R.H. Foote. 1990. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos *in vivo* and vitro. J. Reprod, Fert. 89:543-551.
5. Carney, E.W., C. Tobback, J.E. Ellington and R.H. Foote. 1990. Co-culture of rabbit-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells. Mol. Reprod. Devel. 27:209-215.
6. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert. 85:715-720.
7. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth to normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 42:114-119.
8. Fukushima,M. and Y. Fukui. 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular ovine oocyte matured *in vitro*. Anim. Reprod. Sci. 9:323-332.
9. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in-vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert. 86:501-506.
10. Gandolfi, F. and R.M. Moor. 1987. Stimulation of early embryonic development in the

sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert. 81:23-28.

11. Hensleigh, H.C. and A.G. Hunter, 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. J. Dairy Dci. 68:1456-1470.
12. Kono, T., O.K. Kwon and t. Nakahara. 1991. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. Cryobiology 28:50-54.
13. Kono, T., O. Suzuki and Y. Tsunoda. 1988. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. Cryobiology 25:170-173.
14. Kobayashi, K., N Nagashima, H. Yamkawa, Y. Kato and S. Ogawa. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. Theriogenology 33:777-788.
15. Kojima, T., Y. Tsunoda, N. Oguri, T. Soma and T. Sugie, 1984. Survival of forzen thawed rabbit morulae in the presence of ethylene glycol. Jpn. J. Anim. Reprod. 30:50-53.
16. Lehn-Jensen, H. 1984. Deep freezing of cattle embryos. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. AI. Vol. Ⅳ. Ⅱ.1-12.
17. Lu, K.H., I. Gordon, H.B. Chen, M. Gallagher and H. McGovern, 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. Vet. Rec. 122:539-540.
18. Massip, A., P. Van Der Zwalman and F. Ectors. 1987. Progress in Cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology 27:69-79.
19. Minato, Y. and Y. Toyoda, 1983. Development to normal young of mouse oocytes matured and fertilized *in vitro*. Jpn. J. Zootech Sci. 54:387-391.
20. Motlik. J. and J. Fulka, 1981. Fertilization of rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. J. Reprod. Fert. 63:425-429.
21. Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in-vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology 30:733-741.
22. Osteen, K.Gg. and T.M. Mills. 1980. Changes in the size, distribution and steroid content of rabbit ovarian follicles during early pregnancy. Biol, Reprod, 22:1040.
23. Racowsky, C. and R. W. McGaughey. 1982. Futher studies of effects of follicular fluid and membrana granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocytes. J. Reprod. Fert. 66:503-512.
24. Rall W.F., M.J. Wood, C. Kirby and D.S. Whittingham. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. J. Reprod, Fert, 80:499-504.
25. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evalution of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy, In Vitro Fertilization and Embryor Transfer, Ed. E.S.E.Hafez and K. Semm, MTP Press, Lancaster, England, pp.349-355.
26. Schroeder, A.C., A.K. Champlin, L.E. Moboraaten and J.J. Eppig. 1990. Deveropmental capacity of mouse cryopreserved before and after maturation *in vitro*. J. Reprod. Fert. 89:43-50.
27. Smith, D.M., J.P.P. Tyler and G.F. Erckson. 1978. Effects of medium composition and progesterone on maturation *in vitro* of rabbit oocytes from Graafian follicles of different sizes. J. Reprod, Fert. 54:393-400.
28. Smorag, Z., B. Gajda, B. Wieczorek and J. Jura, 1989, Stage-devendent viability of vitrified rabbit empryos. Theriogenology 31:1227-1231.
29. Techakumphu, M., S. Wintenberge-Torres, C. Sevellec and Y. Menezo, 1987, Survival of rabbit embryos after culture or culture /freezing. Anim, Reprod, Sci. 13:221-228.

30. Tsunoda, Y., T. Soms and T. Sugie, 1978. Survival of rabbit fertilized eggs after long term storage in liquid nitrogen. Jpn. J. Anim.Reprod. 24:157-160.
31. Tsunoda, Y., Y. Shimohora, K. Izumi, T. Soma and T. Sugie, 1979. The survival of rabbit eggs stored in liquid nitrogen at different developing stages. Jpn. J. Anim, Reprod. 25:189-193.
32. Wiesak, T., M.G. Hunter and G.R. Foxcroft. 1990. Differences in follicular morphology, steroidogenesis and oocyte maturation in naturally cyclic and PMSG / hCG-treated prepubertal gilts. J. Reprod-Fert. 89:633-641.
33. Wilson. L. and P. Quinn, 1989, Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. Human Reprod. 4:86-90.
34. Yamazaki, Y., I. Ishibashi, Y. Fukuda and K. Naito, 1990. *In vitro* developmental capaity of mouse follicalar oocytes recovered at various times after hCG injection and matured *in vitro*. Anim. Reprod. Sci. 23:253-261.
35. Yoshimura, Y. Y. Hosoi, A. Iritani, Y. Nakamura, S.J. Atlas and E.E. Wallach, 1989. Developmental potential of rabbit oocytes matured *in vitro* : the possible contribution of prolaction. Biol. Reprod. 40:26-33.
36. Zhang, X. and D.T. Armstrong. 1989. . Effects of follicle-stimulating hormone and ovarian steroids during *in vitro* meiotic maturation on fertilization of rat oocytes. Gamete Res. 23:269-277.
37. 김창근, 정영채, 윤종택, 최선호, 류범용, 정광조, 김홍율, 송해범, 1990a. 소의 체외성숙 난포란의 체외수정과 발생에 관한연구, 한축지 32:27-36.
38. 김희석, 양보석, 오성종, 이근상, 1990b. Vitrification에 의한 동결보존이 토끼수정란의 생존성에 미치는 영향. 한번식지 145:43-49.
39. 兵田千百秋, 服部祐治, 大田洋子,提議雄, 前田照夫, 1987. 姙娠家兎卵胞卵さ 體外受精 に關する研究, 日本家畜繁殖誌 秋季學術講演要旨.
40. 정영채, 김창근, 윤종택, 박재원, 1988. 가축의 개량 및 번식효율 증진에 관한 연구. Ⅲ. 과배란처리 토끼에 있어서 난포란의 체외성숙과 수정능력에 관한 연구, 한번식지 19:211-217.