韓國家畜繁殖學會誌 22(3) : 213~219(1998)
Korean J. Animal Reprod.

소 체외성숙 난자의 세포질내 정자주입에 의한 수정율 향상에 관한 연구

유상식 · 김용섭 · 이봉구* · 김상근
충남대학교 수의과대학

Studies on the Improvement of Fertilization Rates Using Intracytoplasmic Sperm Injection with *In Vitro* Matured Oocytes

Yoo, S. S., Y. S. Kim, B. K. Lee* and S. K. Kim
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate on the improvement of fertilizing ability of *in vitro* matured oocytes from sperm density, motility and polyvinylpyrrolidine (PVP) concentration, by intracytoplasmic sperm injection(ICSI) into the bovine oocytes.

1. The *in vitro* fertilization and cleavage rates of oocytes from 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 ($\times 10^6$/ml) sperm concentration by IVF and ICSI of bovine oocytes were 45.0%~65.0%, 65.0%~90.0% and 10.0%~30.0%, 35.0%~70.0%, respectively.
2. The *in vitro* fertilization and cleavage rates of oocytes from 20, 40, 60, 80% of sperm motility by IVF and ICSI of bovine oocytes were 47.8%~75.0%, 78.3%~90.0% and 8.7%~25.0%, 34.8%~70.0%, respectively.
3. The *in vitro* fertilization and cleavage rates of oocytes from 0.01, 0.02, 0.03, 0.05% of PVP concentration by microinjection of single sperm into the bovine oocytes were 72.7%, 90.9%, 83.3%, 76.9% and 45.5%, 72.7%, 58.3%, 61.5%, respectively. and these values of 0.02% addition of PVP were higher than other concentrations of PVP.
4. The *in vitro* fertilization and developmental rates of oocytes by IVF and ICSI methods were 63.3%~64.6%, 26.7%~29.2% and 88.2%, 47.1%, rspectively. This ICSI method was improved high fertilization rates of bovine oocytes.

(Key words : Bovine, IVM oocytes, Sperm injection, Fertilization rates)

I. 서 론

난자의 세포질내 단일정자 주입(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 관한 연구는 불임증 해결을 위해 인간을 대상으로 주로 연구되어 왔다(Trounson 등, 1994; Knezevich 등, 1995; Lacham Kaplan과 Trounson, 1995; Ahmadi 등, 1996; Motoishi 등, 1996; Catt와 Rhodes, 1995; Novero 등, 1997).

Trounson 등(1994)은 사람 난자의 세포질내 정자주입에 의해 평균 34%의 수태율을 나타냈다고 보고하

* 중앙대학교 대학원(Graduate School, Jung-ang University)

면서 체외성숙 난자의 수정율 향상방안으로써 이 방법을 소개하였다. Allan과 Cotman(1997)은 needle puncture에 의한 정세관내 정자를 회수하여 동결하고 이를 이용하여 ICSI를 통해 수정에 성공하였다고 보고하였으며, Knezevich 등(1995)은 4~11mm의 난포로부터 회수한 6개의 미숙난자를 회수하여 46~50시간 배양한 난자와 황체기에 Gn-RH agonist HMG를 처리후 36시간에 HCG를 주사하여 회수한 21개의 난자를 Mezonezo's B_2 배양액으로 2~6시간 배양한 난자에 각각 세포질내 정자를 주입후 수정율을 조사하였는 바, 79.4%(100/126)와 90.9%(30/33)로서 자극시킨 난자에서 높은 수정율을 얻었으며 polyspermy율은 유의한 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다. Lacham Kaplan과 Trounson(1995)은 mouse에 있어서 ICSI전에 정자를 Ca inophore로 처리하여 첨체반응을 유기(acrosome-free 정자율 28~58%)한 intact oocytes의 전핵 형성율은 60%(59~62%)였으며, 전핵 형성 난자는 수정후 이식하였을 때 배반포까지 발생되었다고 보고하였다. Motoishi 등(1996)은 난자의 ICSI시 정자의 micropipette내 흡입시 PVP(polyvinylpyrrolidone)를 함유한 배양액내 난자에 정자주입시 정상수정, 발생율 및 세포수에 있어서 해를 주지 않았으며, 난자의 ICSI시 동물이나 사람에 있어서 배 발생이나 배 세포질에 있어서 나쁜 영향을 주지 않았다고 보고하였다. 한편, Catt와 Rhodes(1995)는 주요 가축의 체외성숙 난자에 대해 정자주입을 시험하고 이것을 사람의 것과 비교하였는데 양, 소, 돼지 난자에 정자 주입 전, 후에 외인적으로 활성화시키지 않은채 수정과 발생 여부를 시험하였을 때 돼지는 배 발생 및 수정시에 온도에 민감하고, 양은 정자 존재여부에 관계없이 주입후 활성화되는 경향이 있다고 보고하였다. 또한, Ahmadi 등(1996)은 햄스타 난자를 이용하여 사람의 정자를 ICSI법에 의해 수정시키는 방법으로 수정능력을 검정할 수 있다고 보고하였다. 그러나 가축난자의 세포질내 단일정자의 주입에 관한 연구와, 난자의 세포질에 정자주입시 정자수, 활력 및 PVP 농도 등이 수정율에 미치는 영향에 관한 보고는 접할 수 없었다. 특히, 소형 개나 고양이 등 고가의 애완동물은 고단백사료로 사육하면서도 운동량이 적어 수태가 잘 안되는 불임증에 가까운 개체가 많아 이의 해결이 요구되고 있다.

이에, 본 연구는 고가이면서 저정자증 또는 불임 소형개의 수태율을 증진과 불임해결에 적용할 목적으로, 일차적으로 소 정자의 농도별, 활력별, PVP 농도별로 체외수정과 현미 조작에 의해 난자의 세포질내 단일정자의 주입에 의한 수정율과 분할율 및 체외발생율을 조사하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 난포란의 회수와 배양

도살 한우의 난소를 적출하여, 100IU/ml의 penicillin G와 100μg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 난포액을 흡입하여 실체현미경(20~40×)하에서 난포란을 회수하여 10%(v/v)의 FCS(Sigma, USA)와 1μg/ml의 FSH(Sigma, USA), 2IU/ml의 HCG(Sigma,USA), 1μg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100μg/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199 (Whittaker, USA) 배양액으로 배양하였다.

2. 방 법

1) 난자의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 배양액 50μl의 drop을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간전에 CO_2 배양기내(5% CO_2, 95% air, 38.5℃)에서 5~6시간 평형시킨 후 drop내에 5개의 난포란을 주입하여 24~30시간 성숙배양하였다.

2) 정자의 수정능획득처리

시험관내에서 BO액 1ml에 융해한 정액 0.2ml를 혼합하여 CO_2 배양기에서 swim-up 처리후, 상층액을 배양액으로 1,000rpm으로 10분간 원심분리하여 세척하고 정자괴를 동량의 100μg/ml의 heparin(Sigma, USA)과 희석하여 15분간 CO_2 배양기에서 수정능획득을 유기하였다.

3) 체외수정

체외성숙이 끝난 난포란을 45㎕의 배양액 소적에 5개의 난포란과 수정능획득 유기 정자부유액 2㎕(1~5×10⁶ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 다음 6~7시간의 매정으로 수정시켰다.

4) PVP액 준비

Micropipette내에 정자의 장진을 용이하게 하기 위해 시험관내에 PVP 0.1g과 3차 증류수 1ml을 넣어 vortex mixer로 용해시킨 후 0.2㎛ filter syringe로 여과한 다음 냉장 보관하면서 사용전날부터 preincubation한 PVP액을 이용하였다.

5) ICSI

체외성숙 난자의 세포질내 정자의 주입은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 petri dish내에 사용전날 preincubation한 PVP액 drop중에 수정능획득 정자를 넣어 운동성을 저하시킨 다음 micropipette에 정자를 장진시켜 보정용 pipette으로 흡인 고정한 체외성숙난자내에 현미조작에 의해 주입하였다.

6) 생존성 및 체외발생율의 검사

IVF 및 ICSI후 초기배를 배양액으로 3회 세척후 10% FCS+TCM-199 배양액으로 배양하면서 배의 발생상태를 관찰하거나, FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 생존성과 체외발생율을 판정하였다(Schilling, 1982).

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 정자의 농도별 IVF 및 ICSI시 수정율 및 분할율

소 난자의 수정시 정자의 농도별로 IVF 및 ICSI후 배양하였을 때 수정율 및 분할율은 Table 1과 같다.

소 난자의 수정시 정자를 1.0, 2.0, 3.0, 5.0(×10⁶/ml)의 농도별로 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율은 각각 45.0~65.0% 및 65.0~90.0%였으며, 분할율은 10.0~30.0% 및 35.0~70.0%로서, 정자 농도별 수정시 IVF에 비해 ICSI법에서 수정율과 분할율이 높게 나타났다.

이러한 결과는, 소 난포란의 체외수정에 비해 체외수정율과 분할율이 높게 나타났다고 보고한 Trounson 등(1994)의 보고와 일치하였다. 한편, Knezevich 등(1995)은 6개의 미숙 난자와 황체기에 Gn-RH agonist HMG와 HCG로 자극시킨 21개의 난자를 세포질내 단일정자를 주입하였을 때 전체수정율은 90.9%로서 자극난자의 79.4%에 비해 높았으며, 다정자 침입율은 유의한 차이를 나타내지 않았으며 체외성숙 난자의 손상율은 낮았다고 보고하였다. 또한, Lacham Kaplan과 Trounson(1995)은 mouse에 있어서 intracytoplasmic sperm injection (ICSI)전에 정자를 Ca inophore로 처리하여 첨체반응을 유기(acrosome-free 정자율 28~58%)한 intact oocytes의 전핵형성율은 60%(59~62%)였으며, 전핵형성 난자는 수정후 이식하였을 때 배반포까지 발생되었다고 보고하였다.

2. 정자의 활력별 ICSI에 의한 수정 및 분할율

소 난자의 수정시 정자의 활력별로 IVF 및 ICSI후 배양하였을 때 수정율 및 분할율은 Table 2와 같다.

소 난자의 수정시 정자를 20, 40, 60, 80%의 활력별로 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율은 각각 47.8~75.0%와 78.3~90.0%였으며 분할율은 각각 8.

Table 1. Results of fertilization and cleavage rates on sperm density of IVF and ICSI of bovine oocytes

Density of sperm(×10⁶/ml)	No. of oocytes examined	No. of oocytes(IVF)		No. of oocytes(ICSI)*	
		Fertilized(%)	Cleavaged(%)	Fertilized(%)	Cleavaged(%)
1.0	20	9(45.0)	2(10.0)	13(65.0)	7(35.0)
2.0	19	10(52.6)	3(15.8)	15(78.9)	12(63.2)
3.0	21	13(61.9)	5(23.8)	18(85.7)	13(61.9)
5.0	20	13(65.0)	6(30.0)	18(90.0)	14(70.0)

* ICSI(intracytoplasmic sperm injection)

Table 2. Results of fertilization and cleavage rates on sperm motility of IVF and ICSI of bovine oocytes

Motility of sperm(%)	No. of oocytes examined	No. of oocytes(IVF)		No. of oocytes(ICSI)	
		Fertilized(%)	Cleavaged(%)	Fertilized(%)	Cleavaged(%)
20	23	11(47.8)	2(8.7)	18(78.3)	8(34.8)
40	19	12(63.2)	3(15.8)	16(84.2)	11(57.9)
60	21	14(66.7)	4(19.0)	18(85.7)	14(66.7)
80	20	15(75.0)	5(25.0)	18(90.0)	14(70.0)

7~25.0%와 34.8~70.0%였다. 정자의 활력별 수정시 IVF에 비해 ICSI법에서 수정율과 분할율이 높게 나타났다.

이러한 결과는 이와 유사한 보고가 없어 비교할 수는 없지만 IVF에 비해 높은 수정율을 나타냈으며 또한, 사람의 저활력 또는 희소정액의 단일정자를 세포질내 주입에 의해 높은 수정율과 산자율을 보고한 여러 연구결과와 유사한 경향이었다(Trounson 등, 1994; Knezevich 등, 1995; Motoishi 등, 1996). 한편, Novero 등(1997)은 ICSI시 FSH와 정상정자, 정자농도, 활력, 형태, 수정, 분할, 임신 등과의 관계를 조사하였을 때 정자농도와 총활력과는 역상관관계, 전진활력 및 형태와는 무관하였고, ICSI시 FSH와 수정, 분할, 임신, 착상율과는 무관하다고 보고하였다. 또한, Catt와 Rhodes(1995)는 주요 가축의 체외성숙 난자에 대해 정자주입을 시험하고 그것을 사람의 그것과 비교하였는데 양, 소, 돼지 난자에 정자 주입전, 후에 외인적으로 활성화시키지 않은채 수정과 발생 여부를 시험하였을 때 돼지는 배 발생 및 수정시에 온도에 민감하고, 양은 정자 존재 여부에 관계없이 주입후 활성화되는 경향이 있다고 보고하였다.

3. PVP농도별 수정율, 분할율

소 난자의 ICSI시 정자의 micropipette흡입시 PVP 농도별로 함유한 배양액으로 흡입하여 세포질내 주입후 배양하였을 때 수정율과 분할율은 Table 3과 같다.

소 난자의 ICSI시 PVP 농도를 0.01, 0.02, 0.03, 0.05%별로 micropipette내에 흡입하여 세포질내 주입하였을 때 수정율과 분할율은 각각 72.7~90.9% 및 45.5~72.7%로서 0.02% 농도에서 비교적 높은 수정율과 분할율을 나타냈다. 특히 PVP 용액의 이용은 활력을 가진 단일정자를 micropipette내에 흡입하는 것이 용이해지고 또한 다정자침입의 폐해를 막을 수 있는 좋은 방법으로 생각된다.

이러한 결과는 Motoishi 등(1996)이 ICSI시 정자의 micropipett내 흡입시 PVP를 함유한 배양액내 난자에 정자주입시 정상수정, 발생율 및 세포수에 있어서 해를 주지 않았으며, ICSI는 동물이나 사람에 있어서 배 발생이나 배 세포 질에 있어서 나쁜 영향을 주지 않았다는 보고와 일치하였다.

4. 체외수정 및 ICSI의 수정율 및 체외발생율

소 난자의 체외수정과 ICSI시의 수정율 및 체외발생율을 비교하기 위하여 체외성숙 난자를 각각 체외수정과 ICSI법에 의해 수정시켰을 때 수정율과 체외발

Table 3. Results of fertilization and cleavage rates on PVP concenetration of ICSI into the bovine oocytes

Concentration PVP(%)	No. of oocytes			
	Injected	Cultured	Fertilized(%)	Cleavage(%)
0.01	11	11	8(72.7)	5(45.5)
0.02	11	11	10(90.9)	8(72.7)
0.03	12	12	10(83.3)	7(58.3)
0.05	13	12	10(76.9)	8(61.5)

Table 4. Results of *in vitro* fertilization and developmental rates of IVF and ICSI of bovine oocytes

Doner	No. of oocytes		
	Examined	Fertilized(%)	Developed(%)*
IVF Ⅰ	60	38(63.3)	16(26.7)
Ⅱ	65	42(64.6)	19(29.2)
ICSI Ⅰ	34	30(88.2)	18(52.9)
Ⅱ	40	36(90.0)	27(67.5)

* : Blastocysts developed *in vitro*

생율은 Table 4와 같다.

소 체외성숙 난자와 수정능획득 정자를 체외수정한 경우와 체외성숙 난자에 ICSI법에 의해 수정시켰을 때 각각 수정율과 체외발생율은 63.3~64.6%와 26.7~29.2% 및 88.2~90.0%와 52.9~67.5%로서 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율이 크게 향상되었으나, 고가의 가자재와 숙련된 기술을 필요로 하는 단점이 있다. 그러나 ICSI법은 고가이면서 저정자증 또는 불임증의 소형개의 수태율 증진과 불임해결에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

이러한 결과는, 세포질내 정자 주입기술은 체외성숙 난자의 수정율은 증가시킬 수 있다고 보고한 Trounson 등(1994), ICSI전에 정자를 Ca inophore로 처리하여 첨체반응을 유기(acrosome-free 정자율 28~58%)한 intact oocytes의 전핵형성율은 60%(59~62%)였으며, 전핵형성 난자는 수정후 이식하였을 때 높은 배반포 발생율을 나타냈다는 Lacham Kaplan과 Trounson(1995)의 보고와 일치되는 경향이었다.

Ⅳ. 적 요

본 연구는 고가의 저정자증 또는 불임 소형개의 수태율 증진과 불임해결에 적용할 목적으로, 일차적으로 소 정자의 농도별, 활력별, PVP농도별로 IVF 및 ICSI에 의해 수정시켰을 때 수정율과 분할율 및 체외발생율을 조사하였다.

1. 소 난자의 수정시 정자를 1.0, 2.0, 3.0, 5.0(×10^6/ml)의 농도별로 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율은 각각 45.0~65.0% 및 65.0~90.0%였으며, 분할율은 10.0~30.0% 및 35.0~70.0%였다.
2. 소 난자의 수정시 정자를 20, 40, 60, 80%의 활력별로 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율은 각각 47.8~75.0% 및 78.3~90.0%였으며 분할율은 각각 8.7~25.0% 및 34.8~70.0%였다.
3. 소 난자의 ICSI시 PVP 농도를 0.01, 0.02, 0.03, 0.05%별로 micropipette내에 흡입하여 세포질내 주입하였을 때 수정율과 분할율은 각각 72.7~90.9% 및 45.5~72.7%로서 0.02% 농도에서 비교적 높은 수정율과 분할율을 나타냈다.
4. 소 난자의 체외수정과 체외성숙 난자에 ICSI법에 의해 수정시켰을 때 각각 수정율과 체외발생율은 63.3~64.6%와 26.7~29.2% 및 88.2~90.0%와 52.9~67.5%로서 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율이 크게 향상되었다.

Ⅴ. 인용문헌

1. Ahmadi, A. and A. Bongso. 1996. Intracytoplasmic injection of human sperm into the hamster oocyte(hamster ICSI assay) as a test for fertilizing capacity of the male-factor sperm. J. Assist Reprod. Genet. 13(8):647-651.
2. Allan, J.A. and A.S. Cotman. 1997. A new method for freezing testicular biopsy sperm: three pregnancies with sperm extracted from cryopreserved sections of seminiferous tubule. Fertil. Steril., 68(4):741-744.
3. Bar Hava, I., J. Ashkenazi, M. Shelef, A. Schwartz, M. Brengauz, D. Feldberg, R. Orvieto and Z. Ben Raael. 1977. Morphology and clinical outcome of embryos after *in vitro*

fertilization are superior to those after intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 68(4):653-657.

4. Barros, A., M. Sousa, C. Oliveira, J. Silva, V. Almeida and J. Beires. 1997. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm recovered from the ejaculate. Fertil. Steril., 67(6) :1091-1094.
5. Catt, J.W. and S.L. Rhodes. 1995. Comparative intracytoplamic sperm injection (ICSI) in human ans domestic species. Reprod. Fertil. Dev.,7(2):161-166.
6. Gordon, A.C., R.F. Harrison, A. McMahon and M. Fawzy. 1997. Estabilishing an intracytoplasmic injection(ICSI) programme for the treatment of male factor infertility in Ireland. Ir. J. Med. Sci.,166(2):65-69.
7. Holden, C.A., G.F. Fuscaldo, P. Jackson, A. Cato, G.J. Southwick, R. Hauser, P.D. Temple Smith and R.I. McLachlan. 1977. Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 67(1):81-87.
8. Hoover, L., A. Baker, J.H. Check, D. Lurie and D. Summers. 1997. Clinical outcome of crypreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 67(4):621-624.
9. Jimenez, C., G. Grizard, J.L. Pouly and D. Boucher. 1997. Birth after combination of cryopreservation of sperm recovered from urine and intracytoplasmic sperm injection in a case of complete retrograde ejaculation. Fetil. Steril., 68(3) :542-544.
10. Jun, J.H., C.K. Lim, Y.S. Park, Y.S. Lee, J. T. Seo, I.P. Son, H.J. Lee and I.S. Kang. 1997. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection(ICSI) treatment in the immunological infertile patients. Am. J. Rerpod. Immunol., 37(4):310-314.
11. Kanezvich, K.M., J.B. Russell, J.A. Dickson, K.F. Fabian and K.J. Cunningham. 1995. High fertilization rates usng intracytoplasmic sperm injection with unstimulated *in vitro* matured oocytes. A.S.R.M.
12. Lacham Kaplan, O. and A. Trounson. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in mice : increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. Hum. Reprod., 10(10):2642-2649.
13. Motoishi, M., K. Koto, K. Tomita, S. Ookutsu and Y. Nakanishi. 1996. Examination of the safety of intracytoplasmic injection procedures by using bovine zygotes. Hum. Reprod., 11(3):618-620.
14. Novero, V., M. Camus, H. Tourmaye, J. Smitz, G. Verheyen, H. Joris, M.P. Derde, A.C. Van Steirteghem and P. Devroey. 1997. Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 12(1):59-63.
15. Palemo, G.D., J. Cohen and Z. Rosenwaks. 1996. Intracytoplasmic sperm injection : a powerful tool to overcome fertilization failure. Fertil. Steril, 65(5):899-908.
16. Palemo, G.D., J. Cohen, M. Alikami, A. Adler and Z. Rosenwaks. 1995. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection(ICSI). 1995. Reprod. Fertil., 7 (2):211-218.
17. Polcz, T.E., D.L. Olive and E.E. Jones. 1997. Improving the intracytoplasmic sperm injection technique by transmembrane electric potential monitoring. Fertil. Steril., 68(4) :735-738.
18. Ruiz, A., Remohj, Y. Minguez, P.P. Guanes, C. Sim, A. Pellicer. 1997. The role of *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexpained infertility

after failed intrauterine insemination. Fertil. Steril., 68(1):171-173.

19. Schilling, E., H. Niemann and D. Schmidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology. 15:245-248.
20. Staessen, C. and A.C. Van Steirteghem. 1997. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. Hum. Reprod., 12(2): 321-327.
21. Turcker, M.J., P.C. Morton, G. Wright, P. E. Ingargiola, C.L. Sweitzer, C.W. Mitchell, D.E. Leef and J.B. Massey. 1996. Enhancement of outcome from intracytopasmic sperm injection does co-culture or assisted hatching improve implantation rates. Hum. Reprod., 11(11):2434-2437.

(접수일자 : 1998. 6. 1. /채택일자 : 1998. 7. 20.)