

受精能 獲得의 間接 檢定과 透明帶 除去 Hamster 卵자의 利用

金 正 翊

江原大學校 農科大學

The use of zona-free hamster eggs as a test-system for the assessment of sperm fertilizing ability

C. I. Kim

College of Agriculture, Kangwon National University

I. 緒 言

정자가 난자의 透明帶(zona pellucida)을 통과하고 卵細胞質內에 침입하여 수정을 완성하는 데 필요한 形態的 機能的 變化를 受精能獲得(capacitation)이라 한다. 이와같은 사실이 1951年 Austin과 Chang의 토끼를 이용한 독립 시험에서 밝혀진 이래 포유 동물의 體外受精에 관한 많은 연구가 진행되어 mouse(Iwamatsu & Chang, 1969, 1970 ; Niwa et al., 1980), rat (Toyoda & Chang, 1968), hamster(Yanagimachi & Chang, 1963, 1964) guinea pig(Yanagimachi, 1972a), 토끼(Brackett & Oliphant, 1975)와 같은 실험 동물은 체외 수정율이 확립되었으나 실험 동물 이외의 가축에서는 수정능획득 인자에 관한 결정적인 보고가 없는 실정에 있다.

精자가 수정에 앞서 필수적으로 거쳐야 하는 수정능획득의 가부를 검정하는 완전한 방법은 동일종의 成熟 卵자와 수정시켜 卵子內에 精자의 침입과 發育像을 관경하는 것이 되겠으나 실험 동물과는 달리 가축은 다량의 성숙 난자를 손쉽게 구할 수 없을 뿐 아니라 막대한 실험비를 요하므로 체외 수정에 관한 연구를 지연시키는 요인으로 지적되고 있다. 精자의 수정능획득을 검토하는 간접 방법에는 呼吸能測定法(Iritani et al., 1975)과 螢光側定法(Ericsson, 1976) 등이 보고되어 있으나 실험 방법이 복잡하고 정확한 측정이 곤란하여 실용화에는 문제점이 있다.

近年에 hamster 卵자의 투명대를 제거하면 수정의 種特異性이 소실되어 수정능을 획득한 異種 精자의 침

입을 받아 卵자의 活性化(Activation)가 일어나는 사실이 guinea pig (Yanagimachi, 1972b; Barros & Herrera, 1977) mouse와 rat (Hanada & Chang, 1972, 1976), 사람(Yanagimachi et al., 1976) 돼지(Imai et al., 1977, 1980) 및 산양(Kim et al., 1980 ; Kim, 1981) 정자의 실험에서 보고되어 精자의 수정능획득을 검정하는 간접적 방법의 가능성이 입증되고 있다.

Yanagimachi(1972)는 guinea pig의 실험에서 무처리와 신선한 정소상체 정자는 hamster의 투명대를 제거하지 않은 난자(Intact egg)와 투명대를 제거한 난자(Zona-free egg)에 침입하지 못하나 BWW배양액(Biggers, Whitten & Whittingham, 1971)내에서 일정 기간 전배양하면 투명대 제거 hamster의 卵子內에 침입하여 두부의 팽대(Enlarged sperm head)와 雄性前核(male pronucleus)이 形成되었고, 受精의 種特異性(Species-Specificity)은 투명대에 起因하는 것이라 하였다. Yanagimachi등 (1976)은 사람 정자의 실험에서 정자의 전배양 시간과 수정후 배양시간의 증가에 따라 卵子內 精자의 침입율이 높아지는 사실로 보아 투명대 제거 hamster의 卵子內에 정자침입은 수정능획득이 선결 요건이라 하였다.

이와같은 사실은 돼지(Imai et al., 1977)와 산양(Kim et al., 1980) 및 소(Hanada & Nagase 1980) 정자의 실험에서도 입증되었다. 한편 투명대 제거 hamster 卵子內에 침입한 정자와 동일한 조건하에서 전처리한 精자의 두부는 수정능획득의 形態的 變化로 특징되어지는 선체반응(Acrosome reaction)(Imai et al., 1980 ; Kim, 1981)과 體外 培養된 同一種의 투명대 부착(Iritani et al., 1978) 및 제거 卵胞卵(Kim, 1981)과의 體外수정 실험

Table 1. Chronology of zona-free hamster egg work for analysis of foreign sperm fertilizing ability

Investigator	Sperm source	Sperm preparation	Preparation of zona free hamster eggs
Yanagimachi, 1972	Guinear pig, Cauda epididymis	Incubated with BWW medium for 14—18 hr at 37°C in CO ₂ incubator(5% CO ₂ in air)	Superovulated eggs in cumulus; 0.2% hyaluronidase to disperse cumulus cells, 0.2% pronase to dissolve zona pellucida for 3 min.
Hanada & Chang, 1972	Mouse, cauda epididymis; rat, vas deferens & cauda	Incubated for 1—12 hr in Tyrode's medium with body fluid in CO ₂ incubator	Superovulated eggs in cumulus; 0.1% hyaluronidase, 0.1% trypsin for 2—5 min.
Hanada & Chang, 1976	Rat & Mouse, cauda epididymis	Incubated for 1—9 hr with m-KRB medium in CO ₂ incubator	Superovulated eggs in cumulus; 0.1% hyaluronidase, 0.1% trypsin for 4—6 min.
Yanagimachi et al, 1976	Human, ejaculated spermatozoa	Washed three times, incubated for up to 7.5 hr with BWB medium in either air or 5% CO ₂ in air.	Superovulated eggs in cumulus; 0.1% hyaluronidase, 0.1% trypsin for 2—3 min
Barros & Herrera, 1977	Guinea pig, cauda epididymis		Superovulated eggs in cumulus; 0.1% hyaluronidase, 0.1% trypsin in BMOC-2 medium.
Imai et al, 1977	Boar, ejaculated spermatozoa	Washed twice, incubated for 4—10 hr with m-KRB in CO ₂ incubator or uterus and oviduct isolated from maturing gilt.	Superovulated eggs in cumulus; 0.1% hyaluronidase, 0.1% trypsin for 2—5 min.
Imai et al, 1980	Boar, ejaculated spermatozoa	Incubated for 5 hr with m-KRB medium in CO ₂ incubator or uterus isolated from maturing gilt.	Superovulated eggs in cumulus; 0.1% hyaluronidase, 0.1% trypsin for 2—5 min
Hanada & Nagase, 1980	Bull & Boar, ejaculated	Washed twice, incubated for 4.5 hr with BWB in CO ₂ incubator or 1—6 hr uterus isolated from maturing rabbit.	
Kim et al, 1980	Goat, ejaculated spermatozoa	Washed twice, incubated for 5 hr with m-KRB in CO ₂ incubator or uterus and oviduct isolated from maturing gilt	Superovulated eggs in cumulus; 0.1% hyaluronidase, 0.1% trypsin for 2—5 min.
Kim, 1981	Goat, ejaculated spermatozoa	Incubated for 5 hr in uterus isolated from maturing rabbit	Superovulated eggs in cumulus; 0.1% hyaluronidase, 0.1% trypsin for 2—5 min

힘에서 정자 침입이 확인되었다.

本稿에서는 수정능 획득을 검토하기 위한 간접수단으로 실시된 異種 精子와 투명대제거 hamster 卵자를 채취수정한 연구보고(표 1)를 中心으로 實驗方法을 要約하였다.

II. 實驗 方法의 概要

투명대제거 hamster 卵자의 준비, 수정 및 卵자의 검사에 이르는 실험방법의 개요를 그림 1에 模式的으로 표시하였다. 실험에 앞서 培養液(표 2)은 2시간 전에 멸균된 배양접시에 Paraffin oil로 被覆하여 탄산가스 배양기(CO₂ incubator; 37°C, 5% CO₂ in air) 내에서 온도 및 氣象을 平衡시킨 후에 사용한다.

1. 透明帶 除去 hamster 卵자의 準備

hamster는 4일의 규칙바른 성주기를 반복하여 발정

후기(Postestrus; 2日째 午前中)에 外陰部 주위를 가볍게 누르면 흰색의 불투명하고 점성이 강한 腔垢物質(Postestrus discharge)을 분비하는 특징을 갖는다(Orsini, 1961)

1) 過排卵의 處理

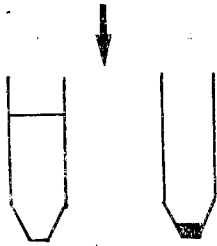
hamster는 平均 15個 內외의 卵자를 排卵하는 自然排卵 動物이나 PMS와 HCG 등의 性腺刺戟 hormone劑를 腸腔內에 주사하면 30~50개의 過排卵이 誘起될 뿐 아니라 hormone의 주사 시기를 변경하여 편리한 시기에 실험을 수행할 수 있는 利點이 있다. 特別한 目的 이외의 실험에는 과배란한 卵자를 利用할 效果의 이다.

postestrus discharge가 분비되는 날 오후에 PMS를 주사하고 48~52시간 간격으로 HCG를 주사하면 多數의 成熟 卵자를 採取할 수 있다. (Hanada & Chang, 1972; Imai et al., 1977; Kim et al., 1980)

Sperm processing



1. Collect sperm and determine volume



2. Wash 2X by suspension in 10ml m-KRB and centrifugation at 500g for 10 min



3. Resuspend sediment in 1-2ml m-KRB

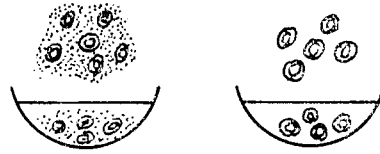


4. Incubate for 5 hr in genital tract isolated from rabbit, gilt and heifer at 37°C with in saline solution

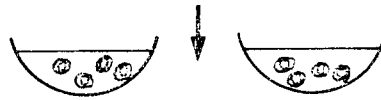


5. Flushout, wash and resuspend sperm with m-KRB

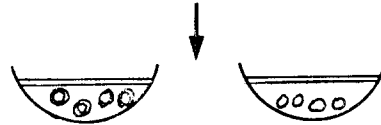
Egg processing



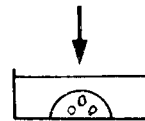
1. Superovulate by injecting PMS (25 iu) on day 1, HCG (25 iu) on day 3
Collect eggs in cumulus from oviduct 15-17 hr after HCG treatment and disperse in hyaluronidase (5-10 min)



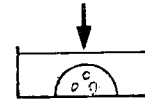
2. Wash eggs by transfer in medium



3. Remove zona pellucida with trypsin (2-3 min) and wash as before



4. Transfer zona-free eggs to dish with medium under oil for fertilization



5. Inseminate with sperm and incubate for 2-5 hr in CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂ in air)



6. Examine eggs on a slide at 400X for swelling sperm head and pronucleus in ooplasm

Fig. 1. Analysis of goat sperm fertilizing ability.

PMS와 HCG의 주사량은 보고자에 따라 20IU(Yanagimachi, 1969), 25IU (Imai et al, 1977; Kim et al, 1980) 및 30IU (Barros & Herrera, 1977)을 투여하고 있으나 필자의 경험으로는 25IU로 안전하게 過排卵의 効果를 얻을 수 있었다.

PMS와 HCG를 처리한 성숙 hamster(60~120g)는 HCG주사후 약 15~17시간에 屠殺하여 採卵한다.

2) 透明帶의 除去

顆粒膜細胞(cumulus cell)에 둘러 쌓인 卵子塊는 hyaluronidase (0.1~0.2%)가 첨가된 배양액내로 도입하여 (3~5分) 卵子 주위의 과립막 세포를 분리 제거하고 단백분해효소(proteolytic enzyme)제가 첨가된 배양액내로 옮겨 투명대를 融解 제거한다. 효소액내로 옮기기 전에 배양액 내에서 卵子 주위의 잔여 과립막 세포를 제거하고, 지나치게 왜소하거나 비대한 卵子와 기형등의 異狀卵子를 선별하여 제거하는 일단계작업을 거치면 정확한 수정율을 측정할 수 있다.

0.1% trypsin(Hanada & Chang, 1972) 또는 0.2% pronase (Yanagimachi, 1972)液內에 옮겨진 hamster 卵子는 투명대가 완전히 용해되기 직전에 배양액내로 2~3회 옮기며 모세유리관으로 pipetting을 반복하여 卵子 주위에 느슨하게 붙어있는 투명대와 효소물질을 완전히 제거하여 배양접시내의 정자부유액내로 옮겨 수정에 공용한다.

2. 精子의 준비

hamster 卵子의 투명대 除去操作에 앞서 精子는 動物種에 따라 적절한 전처리과정을 거친 후에 수정에 공용한다.

hamster, rat, mouse, 토끼 및 사람의 精子는 人工培養液(Chemically defined medium; table 2) 또는 卵胞液이나 혈청등의 체액이 첨가된 배양액내에서 일정 시간 배양함으로써 수정능력을 획득시킬 수 있으나 소(牛)의 一例(Blacket et al, 1980)를 제외한 대부분의 가축 정자는 현 단계에서 단순한 인공배양액만으로는 수정능획득이 불가능하므로 同一 또는 異種의 摘出生殖器道내에서 전배양으로 수정능획득 과정을 거친 후에 투명대제거 hamster 卵子와 媒精하여 CO₂배양기 내에서 배양 후 固定染色하여 位相差顯微鏡 (phase-contrast microscope)하에서 精子의 侵入과 卵子의 活性化를 檢査하여 수정능획득의 可否를 判定한다.

3. 卵子의 檢査

1) 固定과 染色

hamster의 卵子는 新鮮한 狀態로 精子侵入 後에 形成되는 雌雄前核(male & female pronucleus)을 위상차 현미경으로 관찰할 수 있으나 精子의 侵入 직후에 일어나는 두부의 膨化過程을 관찰하기 어렵고 後日(6個

Table 2. Chemically defined media used fertilization in vitro

Component	Biggers, Whitten & Whittingham (1971)	Toyoda, Yokoyama & Hoshi (1971)	Bracket (1970)	Toyoda & Chang (1974)
NaCl	95.59mM	119.37mM	112.00mM	94.6mM
KCl	4.78	4.78	4.02	4.78
CaCl ₂	1.71	1.71	2.25	1.71
KH ₂ PO ₄	1.19	1.19	—	1.19
NaH ₂ PO ₄	—	—	0.83	—
MgSO ₄	1.19	1.19	—	1.19
MgCl ₂	—	—	0.52	—
NaHCO ₃	25.07	25.07	37.00	25.07
Glucose	5.56	5.56	13.90	5.56
Na pyruvate	0.25	1.00	—	0.55
Na lactate	21.58	20.00	—	21.58
BSA	3mg/ml	10mg/ml	3mg/ml	4mg/ml
Penicillin	100unit/ml	75ug/ml	31ug/ml	75ug/ml
Streptomycin	—	50ug/ml	—	50ug/ml
pH	7.4—7.5	7.4—7.5	7.8	7.4—7.6
Animal	Guinea Pig	Mouse	Rabbit	Rat

月以內) 再檢査의 目的으로 深色標本의 준비가 필요하다.

卵자의 固定은 中性 Formalin(40% Formaldehyde 100ml, 증류수 900ml, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.0g, Na_2HPO_4 6.5g)內에 4~6시간 침적하거나 실험 사정에 따라 5°C의 냉장고 내에서 1晝夜 보존해도 무방하다(Niwa et al., 1976).

고정후 난자는 흐르는 물에 간단히 씻어낸 후에 95% Alcohol로 脫水하여 곧바로 0.25% 酢酸 Lacmoid液으로 염색한다.

염색 시간은 10分 이내로 하고 酢酸 Glycerol液으로 염색액을 씻어낸 다음 여성용 manicure(nail varnish)로 封入하여 卵자 標本의 製作을 마친다.

2) 受精의 判定 基準

卵자의 成熟分裂과 排卵은 下垂體 前葉에서 分泌되는 性腺刺戟hormone의 作用에 의하여 일어난다.

LH의 放出 또는 外因性 hormone에 의해 卵胞卵內에 存在하는 卵核胞의 崩壞(geminal vesicle breakdown)가 일어나고 계속해서 成熟分裂 中期(metaphase I)에서 잠시 머물다가 배란 직전에 제 1극체(1st polar body)을 방출하고 제 2성숙분열의 중기(metaphase II)의 段階로 배란된다(Donahue, 1972). 배란된 성숙난자의 세포질내에 침입한 정자의 두부는 팽대하여 雄性前核으로 발견된다.

정자의 침입을 받은 난자의 염색질은 제 2성숙분열의 후기(anaphase II) 및 終期(telophase II)의 단계를 거쳐 제 2극체(2nd polar body)을 방출하고 雌性前核을 形成한다.

수정의 판정은 세포질내에 침입하여 팽대한 정자의 두부, 雌雄前核의 形成 및 제 2극체의 방출 여부를 확인하여 판정한다. 제외수정의 경우 난자는 정자의 침입을 받지 않은 未受精卵이 活性化되어 자성 유래의 전핵이 1개 또는 2개가 발생하는 單爲生殖(parthenogenesis)의 경우가 있으므로 정자 미부의 동반여부를 확인하여 수정의 증거로 삼는다.

이밖에도 포유동물의 卵자는 排卵期에 表層粒(cortical granules)이 生成되어 存在하고 정자의 침입을 받으면 消失되는 특징이 있으므로(Suzuki, 1972) 受精 判定의 보조수단으로 利用된다.

III. 結 言

수정능획득의 여부를 판정하는 완전한 方法은 同一種의 成熟卵자와 수정시켜 卵子內에 정자의 침입과 卵자의 活性化를 檢討하는 것이나 가축을 포함한 大動物

은 多數의 成熟卵자를 손쉽게 구하기 어렵고 막대한 연구비를 要하는 문제점이 있다.

hamster 卵자의 투명대를 제거시키면 용이하게 異種精자의 침입을 받아 卵자의 活性化가 일어나므로 成熟卵胞의 구입이 어려운 動物種의 수정능획득의 검정수단으로 투명대제거 hamster 卵자를 代用코져 하는 노력이 시도되고 있다.

현 단계에서 투명대제거 hamster 卵子內에 침입한 精자의 수정능획득 정도가 同種의 卵子 침입에 充分한 것인지는 動物種 別로 검토할 여지가 남아 있으나 정자의 전처리과정에서 미침입 정자와 구별되는 生理的 및 形態의 變化를 얻은 精子만이 투명대제거 hamster 的 卵子內에 침입할 수 있으며 소수 동물종에서 同一種의 卵子 內에 정자 침입이 가능한 점 등으로 보아 수정능획득의 검정수단으로 투명대제거 hamster 卵자의 代用이 可能하다고 생각된다.

引 用 文 獻

1. Austin, C.R. 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. B4 : 581—589.
2. Barros, C and Herrera, E.1977. Ultrastructural observations of the incorporation of guinea-pig spermatozoa into zona-free hamster oocytes. J. Reprod. Fert. 49 : 47—50.
3. Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham, D.G. 1971. The culture of mouse embryos in vitro. In: Methods in mammalian embryology., p.101. Table 6—5 Ed. J.C.
4. Brackett, B.G. 1971. Recent progress in investigation of fertilization in vitro. In Blandau, R.J. (ed): Biology of Blastocyst. p. 329—348. Univ. of Chicago Press, Chicago.
5. Brackett, B.G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 12 : 260—274.
6. Brackett, B.G., OH, Y.K. Evans, J.F. and Donawick, W.J. 1980. Fertilization and early development of cow ova. Biol. Reprod. 23 : 189—205.
7. Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature (London) 168 : 697—698.
8. Donahue, R.P. 1972. The relation of oocyte maturation to ovulation in mammals. In: Oog-

- enesis, ed. Biggers, J.D. and Schuetz, A.W. p.413—438.
9. Ericsson, R.J. 1967. A fluorometric method for measurement of sperm capacitation. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 125 : 115—118.
 10. Handad, A. and Chang, M.C. 1972. Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol. Reprod.* 6 : 300—309.
 11. Hanada, A and Chang, M.C. 1976. Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J. Reprod. Fert.* 46 : 239—241.
 12. Imai, H., Niwa, K. and Iritani, A. 1977. Penetration in vitro of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 51 : 495—497.
 13. Imai, H., Niwa, K. and Iritani, A. 1979. Time requirement for capacitation of boar spermatozoa assessed by their ability to penetrate the zona-free hamster egg. *J. Reprod. Fert.* 56 : 489—492.
 14. Imai, H., Niwa, K. and Iritani, A. 1980. Ultrastructural observations of boar spermatozoa penetrating zona-free hamster eggs. *Biol. Reprod.* 23 : 481—486.
 15. Iritani, A., Tsunoda, Y., Miyake, M. and Nishikawa, Y. 1975. Enhanced respiration and reduction of tetracycline binding of boar and bull spermatozoa following incubation in the female genital tract. *Jap. Zoot. Sci.* 46 : 531—537.
 16. Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. 1978. Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.* 54 : 379—383.
 17. Iwamatsu, T. and Chang, M.C. 1969. In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature (London)* 224 : 919—920.
 18. Iwamatsu, T. and Chang, M.C. 1970. Further investigation of capacitation of sperm and fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Exp. Zool.* 175 : 271—281.
 19. Kim, C.I., Niwa, K., Imai, H. and Iritani, A. 1980. Penetration of zona-free hamster eggs in vitro by goat spermatozoa preincubated in the reproductive tract isolated from a maturing gilt. *J. Exp. Zool.* 213 : 181—183.
 20. Kim, C.I. 1981. In vitro fertilization of goat oocytes with capacitated spermatozoa. Doctoral Dissertation, Kyoto University, Kyoto, Japan.
 21. Niwa, K., Miyake, M., Iritani, A. and Nishikawa, Y. 1976. In vitro fertilization of rat eggs. *Hormone and Clinic.* 24 : 75—81. (in JPN).
 22. Niwa, K., Imai, H., Kim, C.I. and Iritani, A. 1980. Fertilization in vitro of hamster and mouse eggs in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.* 58 : 109—114.
 23. Orsini, M.W. 1961. The external vaginal phenomena characterizing the states of the estrous cycle, pregnancy, pseudopregnancy, lactation and the anestrous hamster, *Mesocricetus Auratus* waterhouse. *Proc. Anim. Care Panel.* 11 : 193—206.
 24. Suzuki, S. 1972. Morphology and metabolism of the mammalian ova. 4 : 2—12.
 25. Toyoda, Y. and Chang, M.C. 1968. Sperm penetration of rat eggs in vitro after dissolution of zona pellucida by chymotrypsin. *Nature (London)* 220 : 589—591.
 26. Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hoshi, M. 1971. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jap. J. Anim. Reprod.* 16 : 147—151.
 27. Toyoda, Y. and Chang, M.C. 1974. Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of the eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.* 36 : 9—22.
 28. Yanagimachi, R. and Chang, M.C. 1963. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature (London)* 200 : 281—282.
 29. Yanagimachi, R. and Chang, M.C. 1964. In vitro fertilization of golden hamster ova. *J. Exp. Zool.* 156 : 361—376.
 30. Yanagimachi, R. 1972a. Fertilization of guinea pig eggs in vitro. *Anat. Rec.* 174 : 9—20.
 31. Yanagimachi, R. 1972b. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 28 : 477—480.
 32. Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B.J. 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.