

## 생쥐胚 分割球의 試驗管内 培養

盧 煥 喆 · 鄭 吉 生

建國大學校畜產大學

### In Vitro Culture of Blastomere Separated from Mouse Embryo

Hwan Cheol Rho. Kil Saeng Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

#### Summary

These experiments were carried out to obtain basic information necessary for the success of in vitro culture of blastomeres separated from mouse embryo.

Total 446 single blastomeres separated from 2-, 4- and 8-cell mouse embryos by protease treatment (0.5% in Whittingham's medium), were cultured under the gas phase of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C. Whittingham's medium was used for culture of blastomeres.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. Of total 446 blastomeres cultured, 127(87.0%), 134(73.2%) and 77(65.8%) blastomeres separated respectively from 2-, 4- and 8-cell embryos were developed to morula or blastular stages.
2. The numbers of blastomeres, being separated from 2-, 4- and 8-cell embryos and developing to blastocysts containing inner cell mass, were 97(76.4%), 86(64.2%) and 33(42.9%) respectively.
3. After in vitro culture of the blastomeres, the incidence of trophoblastic vesicles increased with the development of the cell stage of embryo. In case of blastomeres separated from 8-cell embryos, 50.6% of blastomeres that developed to blastular stage was trophoblastic vesicles.

#### I. 緒 論

Nicholas와 Hall(1942)이 흰쥐의 2細胞期胚 分割球의 發生에 關하여 研究한 以來, 哺乳動物胚 分割球의 着床前 發達에 關한 研究가 多數의 研究者들에 의하여 試圖되어 왔다. Tarkowski(1959 a, b)는 생쥐의 2, 4細胞期胚의 分割球를 各各 1個씩 破壞시킨 受精卵(1/2, 3/4 分割球 胚)을 移植하여 正常分娩에 成功하였으며, Seidel(1960)은 토끼를 使用하여 생쥐와 同一한 實驗을 實施하였다. Tarkowski(1959 a, b)와 Seidel(1960)의 報告에 의하면 2細胞期胚 分割球의 大部分이 正常的인

胚盤胞로 發達하였으며 一部分이 內部細胞塊를 缺如한 營養小胞로 發達하였다. 또 生産된 產仔는 生理的으로 正常이었다고 한다.

Minz(1962)는 酵素, 즉 Pronase 處理에 의하여 透明帶를 除去하므로써 생쥐胚의 모든 發達段階에서 分割球를 分離하는데 成功하였다. Tarkowski와 Wroblewska(1967)는 Pronase를 使用하여 透明帶를 除去한 2, 4, 8細胞期 생쥐胚의 分割球를 分離, 體外培養을 實施하여 分割球의 發生에 關한 詳細한 檢討를 實施하였다. 또 透明帶의 有無가 分割球의 發達에 미치는 影響도 各種動物 즉, 생쥐(Bronson과 McLaren, 1970; Modlinski, 1970; Kelly, 1978), 토끼(Edwards, 1964), 돼지

(Moore 等, 1969) 및 램스터와 소(Hoppe와 Bavister, 1983)에서檢討되었다.

最近에는 宿主透明帶(host zona pellucida)와 Agar Coating을 利用한 單一分割球의 移植이 緬羊과 같은 家畜에서 活潑히 研究되고 있다(Willadsen, 1979, 1980, 1981; Willadsen과 Polge, 1981; Willadsen等, 1981). 이와같은 研究의 大部分은 優秀한 家畜의 受精卵에서 分離한 分割球를 培養, 移植하므로써 家畜의 改良과 增殖에 기여하기 위한 基礎知識과 技術開發에 그 目的을 두고 있다. 그러나 分割球의 培養에 關한 國內의 研究報告는 全無한 實情이다. 本試驗은 試驗動物의 受精卵에서 分離한 單一分割球를 試驗管內에서 培養시켜 봄으로써 家畜受精卵 分割球의 成功의 培養에 필요한 基礎知識을 얻고자 試圖하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物

實驗動物로는 inbred ICR系統의 생쥐를 供試하였으며, 이들의 年齡은 4~10週, 體重은 16~25g이었다.

### 2. 多排卵 誘起

午後 1시에 首當 5IU의 PMSG (Folligon, Intervet, Holland)를 1回 腹腔에 注射하였으며, 48時間後에 同一한 方法으로 5IU의 HCG (Chorulon, Intervet, Holland)를 注射하였다. 授精을 위하여 HCG注射後 12~15時間에 1:1의 比率로 雄性 생쥐를 ผสม시켰다. 이어 翌日 아침 陰腔의 有無를 確認하여 陰腔이 없는 個體는 採卵에서 除外시켰다.

### 3. 培養液

受精卵의 灌流 및 培養에 使用된 溶液은 Whittingham培養液(1971)으로 pH 7.2~7.5, 滲透壓은 270~290mOsm로 調整하였으며 使用하기 直前에 0.2 $\mu$ m의 Millipore filter (Gelman Sciences, Inc, U.S.A)를 使用하여 濾過 除菌하였다.

### 4. 受精卵의 回收

交尾後 適切한 時間(陰腔 發見: 1日, 2細胞期 受精卵: 2日, 4細胞期 受精卵: 3日, 8細胞期 受精卵: 3 $\frac{1}{2}$ 日)에 屠殺, 外科의 方法으로 卵管을 積出하여 實體顯微鏡(Kyowa optical Co. Japan)下에서 上記 媒液으로 灌流하였다. 이때 micro needle을 附着한 2ml들이 注射器가 使用되었다.

### 5. 透明帶 除去와 分割球 分離

形態的으로 正常的인 受精卵만 골라 0.5%의 Protase (Streptomyces griseus, Sigma, U.S.A)溶液에 3~5分間 露出시켰다. 實體顯微鏡下에서 觀察하면서 透明帶가 軟化되었을 때에 다른 깨끗한 溶液으로 옮겨가며 3回 反復하여 洗滌하였다. 이때 透明帶를 完全히 除去하지 않은 것은 分割球에 대한 酵素의 直接的인 影響을 피하기 위함이었다. 洗滌時 pipetting操作을 약간 강하게 하므로써 殘存 透明帶를 完全히 除去하였으며, 상당數의 受精卵에서 分割球가 個別的으로 分離되었다. 서로 분리되지 않은 分割球에 대해서는 10 $\mu$ m 以下の 微細硝子棒을 割球 사이에 놓아 物理的으로 分離하였다.

受精卵回收부터 培養前까지의 모든 操作은 室溫下에서 實施하였다.

### 6. 分割球 培養

組織培養用 plastic petridish (Falcon plastics, #1006, U.S.A)에 10~13ml의 液體 paraffin(比重: 0.855)을 넣은 다음, 하나의 petridish에 40 $\mu$ l의 培養液 小滴 4個를 넣어 petridish 低面에 부착시켰으며, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Air, 37°C의 CO<sub>2</sub> 培養器에서 2時間동안 平衡을 實施하였다. 培養液 小滴當 3個씩 分割球를 넣어 上記와 同一한 條件下에서 36~48時間동안 培養하면서 分割球의 發達狀態를 觀察하였다.

### 7. 調查項目

培養中の 分割球를 400倍로 擴大한 位相差顯微鏡(Ernst Leitz Co. W-Germany)下에서 觀察하면서 다음 事項을 調查하였다.

(1) 退化胚: 培養 開始前의 狀態에서 더 이상의 發達이 없거나, 2細胞期胚의 分割球와 4細胞期胚의 分割球의 경우 分割이 各各 3回와 2回 以上 進行하지 않은 것도 退化群에 포함시켰다.

(2) 桑實胚: 8細胞期 以上으로 發達한 것으로 아주 작은 胞胚腔이 形成된 것도 이에 포함시켰다.

(3) 營養小胞: 形態的으로는 胚盤胞까지 發達하였으나 內部細胞塊가 缺如되고 모든 細胞가 小胞의 壁을 構成하고 있는 胚는 營養小胞로 分類하였다.

(4) 胚盤胞: 內部細胞塊가 얇은 營養細胞로 싸여있는 전형적인 胚를 胚盤胞로 分類하였다.

## III. 結果 및 考察

**Table 1.** Over all results of in vitro culture of blastomeres separated from 2-, 4- and 8-cell mouse embryos.

Blastomere separated from	No. of blastomeres cultured	No. of blastomeres degenerated (%)	No. of blastomeres developed to morula or blastocyst (%)
2-cell embryo	146	19 (13.0)	127 (87.0)
4-cell embryo	183	49 (26.8)	134 (73.2)
8-cell embryo	117	40 (34.2)	77 (65.8)
Total or mean	446	108 (24.2)	338 (75.8)

**Table 2.** Developmental stages of blastomeres separated from 2-, 4- and 8-cell mouse embryos.

Blastomere separated from	No. of blastomeres developed to			Total (%)
	Morula (%)	Trophoblastic vesicle (%)	Normal blastocyst (%)	
2-cell embryo	12 (9.4)	18 (14.2)	97 (76.4)	127 (100.0)
4-cell embryo	19 (14.2)	29 (21.6)	86 (64.2)	134 (100.0)
8-cell embryo	5 (6.5)	39 (50.6)	33 (42.9)	77 (100.0)
Total or mean	96 (10.7)	86 (25.4)	216 (63.9)	338 (100.0)

2~8細胞期胚에서 分離된 分割球의 培養 結果를 Table 1에 提示하였다. 이 Table 1에 의하여 알 수 있는 바와 같이 培養에 供試된 2細胞期, 4細胞期 및 8細胞期 分割球의 87.0%, 73.2% 및 65.8%가 各各 順調로운 發達을 보여 平均 75.8%가 桑實胚期 以上으로 發達하였다. 이러한 結果는 哺乳動物 受精卵의 分割球가 in vitro 培養에 의해 着上前 段階까지 正常的으로 發達한다는 지금까지의 여러 報告들(Nichalas와 Hall, 1942; Seidel, 1952; Tarkowski, 1959; Minz, 1962; Tarkowski와 Wroblewska, 1967 等)의 結果와 一致하는 成績이었다. 本試驗의 경우, 4細胞期胚의 分割球가 2細胞期胚의 分割球보다, 또 8細胞期胚의 分割球가 4細胞期胚의 分割球보다 退化率이 더 높았는데, 그 原因은 受精卵의 分割이 進行될수록 分割球의 크기가 작아져 分割球의 分離操作時 많은 損傷을 주었기 때문일 것이라고 思料된다. 이러한 傾向도 Moore等 (1968)의 報告와 一致하는 것이었다.

發生이 開始된 分割球의 發達段階別 分類는 Table 2와 Fig. 1에서 보는 바와 같았다. 2, 4 및 8細胞期胚의 分割球에서 發達된 胚盤胞의 比率는 各各 76.4%, 64.

2% 및 42.9%로 平均은 63.9%였다. 胚盤胞로 發達한 比率이 가장 높은 것은 2細胞期에서 分離된 分割球였으며 胚의 發達段階가 進行된 것일수록 즉, 單一分割球의 容積이 적어진 것일수록 胚盤胞까지 發達하는 比率이 低下되었다. 이와는 달리 2, 4 및 8細胞期胚에서 分離된 分割球中에서 發達한 것의 比率는 各各 14.2% 21.6% 및 50.6%로 分割球의 크기가 작아질수록 增加하는 傾向을 보였다. 이러한 結果는 4細胞期胚와 8細胞期胚에서 分離된 分割球가 胚盤胞까지 發達하는 比率이 40%와 15%였다고 報告한 Tarkowski와 Wroblewska(1967)의 成績보다는 良好한 것이었는데 이는 發達한 分割球를 分類하는 基準과 培養方法의 差異에서 온 것으로 생각된다. 그러나 細胞期가 進行된 胚에서 얻어진 分割球일수록 胚盤胞로 發達하는 比率이 低下되고 榮養小胞로 發達하는 比率이 높아지는 傾向은 Tarkowski와 Wroblewska(1967)의 報告와 一致하는 것이었다. 도끼에서도 榮養小胞로 發達하는 分割球의 比率는 2細胞期胚보다 4細胞期胚에서 얻은 分割球가 더 높다고 하였다(Seidel, 1956, 1960). 특히 4細胞期胚의 分割球보다 8細胞期胚의 分割球가 榮養小胞로 發達

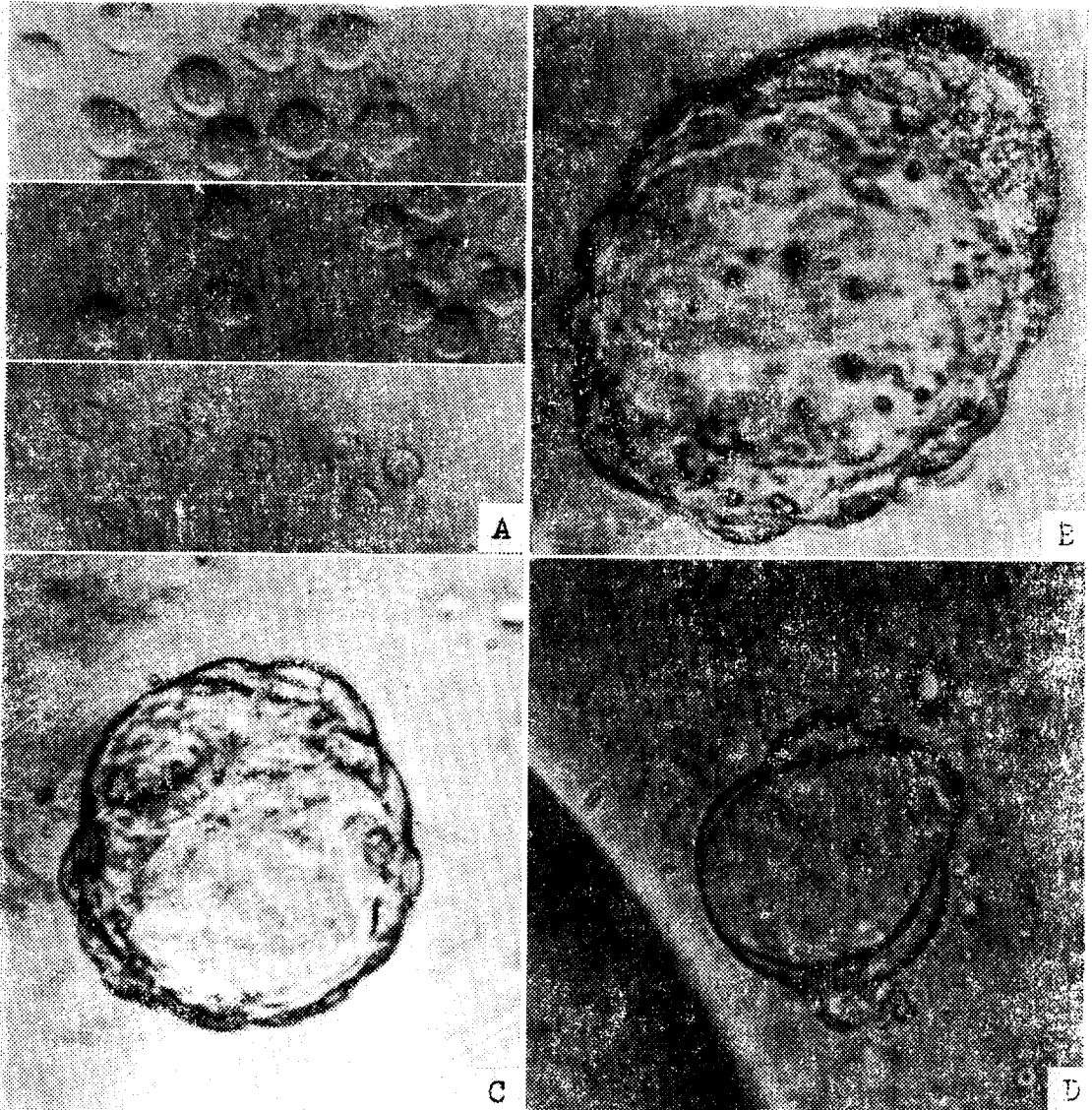


Fig. 1. Blastomeres separated from mouse embryos of different developmental stage and blastocysts developed from blastomeres.

- A. Blastomeres separated from 2-cell (upper), 4-cell (middle) and 8-cell (bottom) mouse embryos (X100).
- B. Blastocyst developed from blastomere of 2-cell mouse embryo (X 400).
- C. Blastocyst developed from blastomere of 4-cell mouse embryo (X 400).
- D. Blastocyst developed from blastomere of 8-cell mouse embryo (X 400).

하는 比率은 約 30%나 더 높았는데 이는 Tarkowski와 Wroblewska(1967)의 報告에 나타난 10%보다 훨씬 높은 것이었다. 그러나 이러한 差異의 原因은 確認되지 않았다.

分割球가 胚盤胞로 發達하는 比率이 가장 높은 것은 2細胞期胚에서 分離된 分割球였다. 그러나 多數의 移植用 卵子를 確保한다는 側面에서 볼 때에는 發達段階

가 進行된 受精卵에서 얻은 分割球의 發達比率을 높여야 할 것이다. 이 目的을 위해서는 分割球의 發達에 關한 細胞學的 또는 發生學的 檢討과 微細分離技術의 熟練 및 多角的인 培養條件의 改善이 先行되어야 할 것으로 思料된다.

#### IV. 摘 要

本試驗은 생쥐의 受精卵에서 分離된 分割球의 試驗 管内 培養에 必要한 基礎知識을 얻기 위하여 實施하였다. 생쥐의 2, 4 및 8細胞期 受精卵을 0.5% protease 溶液에서 標化, 分離시켰으며, 이리하여 얻은 총 446개의 分割球를 0.5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C에서 Whittingham 培養液을 使用하여 培養하였다. 本試驗에서 얻어진 結果는 다음과 같다.

1. 供試된 總分割球 446個中 2細胞期胚에서 分離된 分割球 127個(87.0%), 4細胞期胚에서 分離된 分割球 134個(73.2%) 및 8細胞期에서 分離된 分割球 77個(65.8%)가 桑實胚나 胚盤胞로 發達하였다.

2. 發達이 確認된 338개의 分割球中 内部細胞塊를 含有한 正常胚盤胞로 發達한 것은 2細胞期胚의 分割球 97個(76.4%), 4細胞期胚의 分割球 86個(64.2%) 및 8細胞期胚의 分割球 33個(42.9%)였다.

3. 細胞期가 發達된 胚의 分割球일수록 榮養小胞의 出現率이 높았으며, 특히 8細胞期胚에서 分離된 分割球의 경우는 發達이 確認된 分割球의 50.6%가 榮養小胞였다.

#### 引用 文 獻

1. Bronson, R.A. and A. McLaren. 1970. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.*, 22 : 129—137.
2. Edwards, R.G. 1964. Cleavage of one-and two-celled rabbit eggs in vitro after removal of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.*, 7 : 413—415.
3. Hoppe, R.W. and B.D. Bavister. 1983. Effect of removing the zona pellucida on development of hamster and bovine embryos in vitro and in vivo. *Theriogenology*, 19 : 391—404.
4. Kelly, S.J., J.G. Mulnard and C.E. Graham. 1978. Cell division and cell allocation in early mouse development. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 48 : 37—51.
5. Minz, B. 1962. Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida. *Science*, 138 : 594—595.
6. Modlinski, J.A. 1970. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 23(3) : 539—457.
7. Moore, N.W., G.E. Adams and L.E.A. Rowson. 1968. Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J. Reprod. Fert.*, 17 : 527—531.

8. Moore, N.W., C. Polge and L.E.A. Rowson. 1969. The survival of single blastomeres of pig eggs transferred to recipient gilts. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22 : 979.
9. Nicholas, J.S. and B.V. Hall. 1942. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. *J. Exp. Zool.*, 90 : 441—549.
10. Seidel, F. 1952. Die Entwicklungspotenzen einer isolierten blastomere des Zweizellenstadiums in Säugetierei. *Naturwissenschaften*, 39 : 355—356.
11. Seidel, F. Die Entwicklungsfähigkeiten isolierter Furchungszellen aus dem Ei des Kaninchens, *Oryctolagus cuniculus*. *Wilhelm Roux. Arch., Entw. Mech. Org.*, 152 : 43—130.
12. Tarkowski, A.K. 1959 a. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature, London*, 184 : 1286—1287.
13. Tarkowski, A.K. 1959 b. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Acta. Theriologica*, 3 : 191—267.
14. Tarkowski, A.K. and J. Wroblewska. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 18 : 155—180.
15. Trounson, A.O. and N.W. Moore. 1974. The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.*, 41 : 97—105.
16. Whittingham, D.G. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil., Suppl.*, 14 : 7—21.
17. Willadsen, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature (London)*, 277 : 298—300.
18. Willadsen, S.M. 1980. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 59 : 357—362.
19. Willadsen, S.M. 1981. The developmental capacity of blastomeres from four- and eight-cell sheep embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 65 : 165—

172.

20. Willadsen, S.M. and C. Polge. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Record.*, 108 : 211.
21. Willadsen, S.M., H. Lehn-Jensen, C.B. Fehill and

R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of nonsurgically collected cow embryos. *Theriogenology*, 15 : 23.