

Medium Control for In-Vitro Fertilization and Culture of Mammalian Embryos

강원대학교 농과대학

김 정 익

정영채 : 발표해주실 연사를 소개드리겠습니다. 김정익교수는 1965년 춘천농과대학 축산학과를 졸업하고 1967~1969년에 CANADA 정부 초청 축산기술연수, 1973년에 강원대학 대학원을 졸업하였으며, 1977년 농일 경도대학 대학원에서 포유동물의 체외수정에 관한 연구를 수행하여 1981년에 산양의 체외수정에 관한 연구로 학위를 취득후에 귀국하여 현재 강원대학교 농과대학 축산학과 부교수로 재직하고 있습니다.

그리고 가축번식연구회의 이사로 있으면서 가축의 수정란이식과 관련분야인 수정란의 동결보존, 수정란이식법에 의한 소의 쌍태유기와 조기배의 융합에 의한 인공chimera의 작출등에 관한 연구를 하고 있습니다. 좋은 말씀이 있으리라 생각합니다. 30~40분간 발표후에 10분간 질의해 주시면 감사하겠습니다. 말씀해 주실 제목은 "Medium control for Invitro Fertilization and Culture of Mammalian Embryo"가 되겠습니다. 감사합니다.

김정익 : 강원대학 김정익입니다.

오늘 귀중한 시간을 할애하여 주신데 대하여 본인인 영광으로 생각하고 있습니다. 근간에 건강상의 개인적인 일들로 인하여 충분한 준비를 하지 못한채 이자리에 서게된 것을 사과드립니다. 연제에 앞서, 실험소동물을 중심으로 한 체외수정의 현황과 기술과정을 설명드리고 체외수정의 배양조건을 말씀드리도록 하겠습니다.

Slide 1; 체외수정은 아시는 바와 같이 체내에서 일어나는 수정의 과정을 인위적으로 체외에서 재현시키는 것을 말합니다. 체외수정이 갖는 의의를 살펴보면, 첫째, 현미경으로 경시적 관찰이 가능하므로 수정의 초기과정을 해명할 수 있으며 둘째, 다양한 배양조건을 검토함으로써 수정에 필요한 요인과 저해하는 요인을 분석하게 됨으로써, 셋째, 불임의 치료와 피임법의 개발에 기여할 수 있다고 생각됩니다.

Slide 2; 1954년 Thibault 등에 의한 토끼실험에서

체외수정의 정확한 세포학적 관찰이 확인된 이래 포유동물에서 체외수정에 성공한 보고는 사람을 포함하여 20여종에 이르고 있으며, 표에서 보시는 바와 같이 토끼, 생쥐, 사람, 흰쥐, 소와 돼지, 산양의 경우에는 체외수정란을 이식하여 신생자의 출산에 성공하고 있습니다.

Slide 3; 동물별 외수정의 현황을 살펴보면, 연구자에 따라 기준이 다르다고 하겠으나, 사람과 실험소동물의 경우는 완전한 체외수정술이 확립되어 체외수정란의 체외배양과 이식후에 신생자의 출산이 가능하게 되었으나, 현단계에서 가축의 경우는 체외수정과 체외수정란의 배양 및 이식후에 출산에 보고되어 있으나 보고수가 많지 않으므로 추가검토의 여지가 남아 있다고 하겠으며, 기타의 동물중에서는 수정란의 체외배양과 출산에의 보고가 없습니다.

Slide 4; 체외수정의 과정을 모식적으로 그린 그림이 되겠습니다. 난자와 정자가 체외의 조건에서 수정후 발육된 수정란을 이식시키는 과정이 포함되어 있습니다.

Slide 5; 여우와 개를 제외한 대부분의 포유동물의 난자는 제 1극체를 방출하는 제 2성숙분열의 중기(metaphase II)에 배란되어 정자의 침입을 받아 수정이 완료됩니다. 따라서 체외수정에 사용되는 난자는 배란전후의 성숙난자가 이상적이고 적어도 제 1성숙분열중기(metaphase II) 이후의 난자에 한하여 정자의 침입을 받게됩니다.

Slide 6; 한편 산출된 정자는 정장내에 부유되어 있는 decapacitation factor (DCF) 또는 acrosome stabilizing factor (ASF)로 불리우는 수정능획득억제인자에 의하여 피복되어 있으며, 자궁과 난관을 통과하는 과정에서 정자피복항원(sperm coating antigen)이 제거되어 수정능력을 획득(capacitation)하고 수정능력을 획득한 정자는 난관상단부의 난자부근에서 선체반응(acrosome reaction)이 일어납니다.

Slide 7; 앞에서 말씀드린 바와 같이 정자는 수정

Slide 1. Mammalian fertilization in vitro

1. Direct observation of early process of fertilization
2. Assay system of fertilization under different conditions
3. Therapeutic use for male and female sterility

에 앞서서 반드시 수정능획득의 과정을 거치게 되므로 체외수정의 제 1의 과정은 수정능을 획득한 정자의 준비가 되겠습니다. 체외수정에 병용되는 생식세포의 준비중 정자의 준비를 말씀드리면, 동물의 종류에 따라서 산출(사람, 대가축) 또는 정소상체(실험소동물)의 정자를 1) 생체 또는 적출자궁내에서 배양하거나, 2) 난포액과 혈청등의 체액이 첨

Slide 2. First reported in-vitro fertilizations of mammals

Species	
Rabbit*	Thibault et al, 1954(Chang, 1959)
Hamster	Yanagimachi & Chang, 1963
Rat*	Toyoda & Chang, 1968(Toyoda & Chang, 1974)
Mouse*	Iwamatsu & Chang, 1969(Hope & Pitts, 1973)
Chinese	Pickworth & Chang, 1969
Human*	Edward et al, 1969(Stepoe & Edward, 1978)
Cat	Hamner et al, 1970
Guinea pig	Yanagimachi, 1972
Mongolian gerbil	Noske, 1972
Monkey	Gould et al, 1973
Dog	Mahi & Yanagimachi, 1976
Cattle*	Iritani & Niwa, 1977(Brackett et al, 1982)
Swine*	Iritani et al, 1978(Chen & Polge, 1983)
Deer mouse	Hanada & Chang, 1978)
Sheep	Dalhausen et al, 1980)
Goat*	Kim, 1981(Hanada et al, 1984)

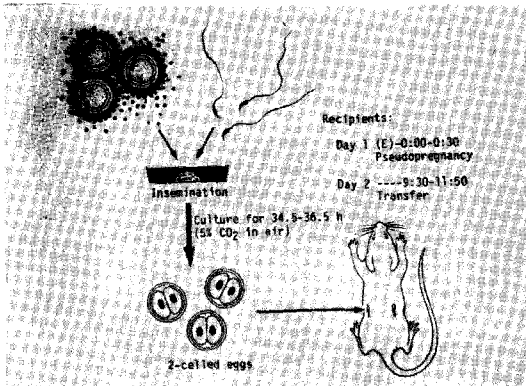
* (): Young birth after transferring embryo fertilized in vitro

Slide 3. Present situation of in vitro fertilization in mammals

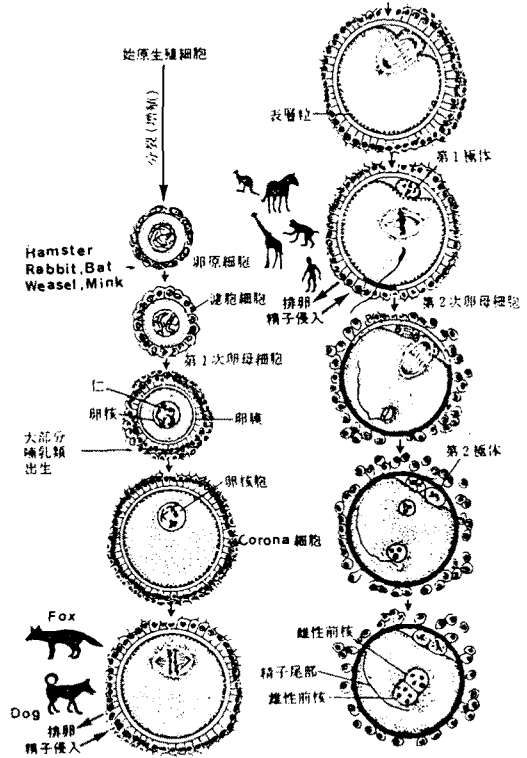
Species	Fertilization criteria	Embryo cleavage	Young birth after transferring embryo fertilized in vitro
Rabbit			
Mouse	0	0	0
Rat			
Human			
Cattle			
Swine	Δ	Δ	Δ
Goat			
Sheep			
Cat	Δ	Δ	X
Mongolian gerbil			
Monkey			
Hamster			
Guinea pig	0	X	X
Dog			
Deer mouse	Δ	X	X
Horse	X	X	X

0; Complete Δ; incomplete X; imposible or no report

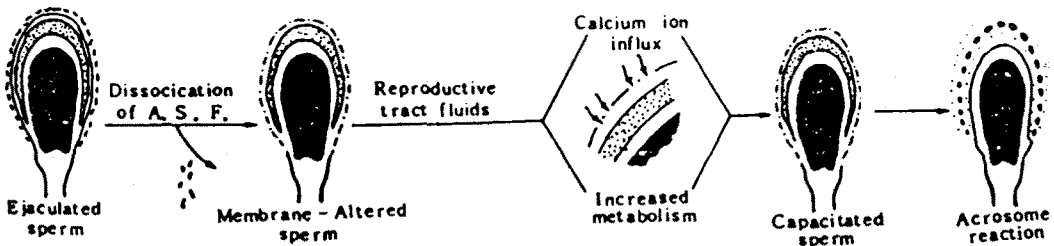
가된 배양액, 또는 3) 완전한 인공합성배양액 내에서 일정시간 배양하여 수정능을 획득시킨정자를 준비합니다. 한편 난자의 준비는 1) 배란전후의 성숙난자를 이용하는 것이 이상적이 되겠으나 2) 성숙과정에 있는 제1성숙 분열중기 이후에 있는 난자, 또는 3) 체외에서 성숙시킨 난포난자가 이용되고 있으며, 특히 성숙한 자연배란 난자의 입수가 어려운 대동물의 경우는 체외에서 성숙시킨 체외성숙난자가 이용되기도 합니다. 따라서 난자의 체외배양에는 수정란의 배양과 미성숙난포란의 배양이 포함되겠으나, 체외수정에 대한 배양액의 조건에 대한 말



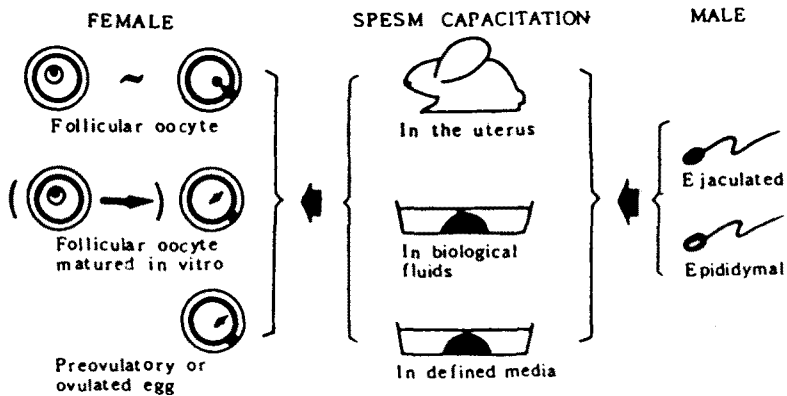
Slide 4. Experimental procedures of I.V.F.



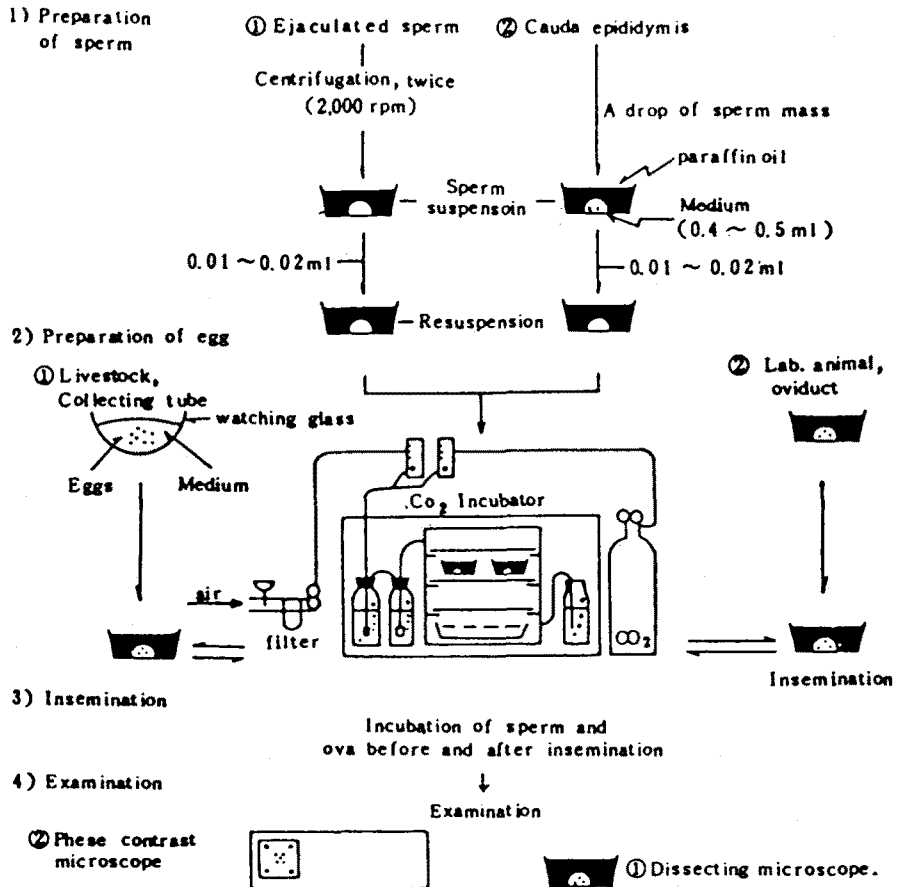
Slide 5. 난자의 형성과 수정과정의 모식도.



Slide 6. Sequence of events required to capacitate sperm (Oliphant & Eng, 1981).



Slide 7. Gametes used for in vitro fertilization in mammals.



Slide 8. Experimental procedure for in vitro fertilization in mammals.

Slide 9. Factors involved in the fertilization of mammalian eggs in vitro

1. Composition of the medium
2. Volume of the medium
3. Follicular cells
4. Sperm concentration
5. Age of eggs
6. Strain of animals
7. Others

씀을 드리고저 합니다.

Slide 8; 체외수정의 실험조작은 일반적으로 정자 및 난자의 준비와 수정과 배양 및 수정의 판정과정으로 구분됩니다.

Slide 9; 체외수정을 성공적으로 수행하기 위해서는 1) 배양액의 조성, 2) 액량, 3) 과립막 세포의 유무, 4) 수정시 정자부유액의 농도, 5) 배란후 난자의 신선도 및 6) 실험에 공용되는 동물계류등의 요인에 지배를 받게 되겠으나, 이 중에서 medium의

조건이 중요한 요인이 되겠습니다.

Slide 10; 체외수정에 사용되고 있는 기초배양액의 조성중 무기염류의 조성은 Krebs-Ringer's bicarbonate(KRB)와 Tyrode액과 같으며, 연구자에 따라서 energy 원과 단백질 및 항생물질등이 조정첨가됩니다.

Slide 11; 배양액의 조성중 무기염류의 비율은 다음에 말씀드리겠지만, 혈중무기염류의 조성비와 같으며 동물종에 따라서 1) Energy 원으로 glucose, pyruvate와 nalactate, 2) 단백질원으로 편혈청 albumin(BSA), 3) 항생물질로 streptomycin과 penicillin 등이 첨가되며, pH의 값은 7.4~7.8로 조정된 배양액이 사용됩니다. 이때에 배양액의 삼투압은 약 308mOsM의 혈청과 동등이고, 토끼, 소와같은 동물종에서는 연구자에 따라서 NaCl의 첨가량을 증가시킨 고장액(407 mOsM)이 사용되기도 합니다.

Slide 12; 동물별 혈중 무기염류의 조성 중에서 Na⁺/K⁺와 Ca²⁺/Mg²⁺의 비율을 참고로 살펴보면,

Slide 10. Simple culture media used for in vitro fertilization (Bavister, 1981)

Species	Culture medium	Investigators
Mouse	Toyoda ^a	Toyoda et al. (1971)
	Cross-Brinster ^a	Oliphant and Brackett (1973)
	Whitten ^a	Hoppe and Pitts (1973)
	Whittingham ^a	Fraser and Drury (1975)
Rat	Brinster ^a	Wolf et al. (1976)
	Toyoda ^a	Toyoda and Chang (1976 a)
Guinea pig	Shalgi ^a	Shalgi et al. (1980)
	BWW ^a	Rogers and Yanagimachi (1975)
	MCM	Rogers and Yanagimachi (1975)
Rabbit	Toyoda ^a	Rogers and Yanagimachi (1975)
Dog	Brackett	Brackett and Oliphant (1975)
	BWW ^a	Mahi and Yanagimachi (1976)
Hamster	CCM	Mahi and Yanagimachi (1978)
	Tyrode	Yanagimachi and Chang (1964)
	Bavister ^b	Bavister (1969)
	Toyoda ^a	Parkening and Chang (1976)
Human	TALP ^a	Bavister and Yanagimachi (1977)
	Bavister ^{b,c}	Edwards et al. (1969)
	Lopata	Loptat et al. (1978)

^a Modification of KRB. ^b Modification of Tyrode's solution. ^c Modified from original medium.

Slide 11. 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	25.07	25.07	37.00	25.07
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

1 가이온(Na/K)의 경우는 24~34.4의 비율이 되겠으며, Ca와 Mg의 2 가이온의 비율은 1.5에서 4.8의 범위가 되겠습니다.

Slide 13; 지금까지 발표된 배양액(Slide 10)의 조성을 종합하여 살펴보면, 무기염류의 경우는 대체적으로 Na과 K 및 Ca과 Mg의 비율이 혈중농도와 비슷함을 알 수 있습니다.

다음은 energy원으로 glucose, pyruvate, lactate가 각각 5.6, 10~25, 0.1~1.6mM이 첨가되고 있으며, glucose의 첨가는 단독보다는 lactate와 pyruvate를 병용첨가시에 정자의 선체반응과 수정율이 향상되는 경향이 있으며, 이와같은 사실은 체외 수정용 배양액에서 glucose의 역할은 energy원 보다는 정자쪽의 선체반응의 유발 내지는 배양액의 완충작용에 효과가 있는 것으로 추측됩니다. 한편 대부분의 동물에서 혈청단백은 체외수정에 필수적인

Slide 12. Ionic composition of mammalian blood serum (Altman, 1961)

Species	Component			
	Na ⁺ /K ⁺	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃
Mouse	NR	3.8	NR	NR
Rabbit	25.6	1.5	105	28
Rat	25.7	4.8	118	21
Monkey	33.4	NR	115	NR
Human	34.4	2.7	103	26
Sheep	28.9	3.0	116	NR
Pig	24.0	4.3	NR	NR
Bull	24.6	3.25	NR	NR

NR; not reported.

Slide 13. Analysis of culture media used for in vitro fertilization (Bavister, 1981)

	Component	Range	Mean ± S.E.M.
Ions	Na ⁺ /K ⁺ ratio	20-53	29.3 ± 2.9
	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ ratio	1.4-5.6	2.76 ± 0.42
	Chloride concn	77-138	110.0 ± 5.2
	Bicarbonate concn	11-38	25.5 ± 2.1
Energy sources	Glucose	5.6mM	
	Lactate	10-25mM	
	Pyruvate	0.1-1.25mM	
Other	Osmotic pressure	285-310 mOsm	
	pH	7.2-7.8	
	Protein(bovine serum albumin)	1-5mg/ml	

Ranges and media for ions from concentration in meq/liter

Slide 14. Percentage Penetration of Zona-free Hamster Eggs Mixed with Guinea Pig Spermatozoa Preincubated in Albumin-Free BMOC-2

Sperm preincubation time	Culture medium	Total number of eggs	Egg mixed with spermatozoa	
			Penetrated	
			Number	Percent
15h	BMOC-2	92	88	95.7
	Albumin-free BMOC-2	108	22	20.4
10min	BMOC-2	47	47	100.0
	Albumin-free BMOC-2	20	14	70.0
None	BMOC-2	63	0	0
	Albumin-free BMOC-2	47	0	0

From Barros et al. (1973)

것으로 알려져 있으며, 편혈청 albumin(BSA)이 배양액의 1ml당 1~5mg이 첨가되고 있습니다. 그러나 배란시 난관분비액의 단백질량은 1ml당 3~14mg이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있는 점으로 보아, 체외수정용 배양액에 첨가되고 있는 BSA의량은 부족한 감이 있다고 하겠으나, BSA의량을 증가시키면 배양액의 pH의 값이 증가하는 문제점이 있으므로 앞으로 배양액내에 단백질원으로서 BSA의 첨가량은 재검토할 필요가 있다고 생각됩니다. BSA는 배양액의 단백질원의 역할외에 난자의 manipulation 과정에서 glass pipette에 난자가 흡착되어 망실되는 것을 방지하는 또 하나의 목적이 추가됩니다. 이밖에 배양액의 삼투압과 수소이온 농도가 체외수정에서 중요한 요인으로 지적되고 있습니다. 일반적으로 배양액의 삼투압은 혈청과 등장인 285~310mOsm이 상용되고 있으나, Brackett 등은 토끼와 소정자의 수정능획득을 위하여 등장액에 NaCl을 증가시킨 410mOsm 안팎의 고장액이 사용되기도 합니다. 배양액의 적정수소이온 농도는 동물종에

Slide 15. Effect of sperm concentration at insemination on penetration in vitro of pig follicular oocytes* (Nagai et al., 1983)

Sperm concentration ($\times 10^6/ml$)	n Oocytes	
	Inseminated	Penetrated (%)
2	135	102 (76)
1	61	45 (74)
0.1	119	57 (48)
0.05	103	48 (47)
0.01	147	8 (5)

*Epididymal sperm were preincubated for 4h in the isolated uterus of a maturing gilt.

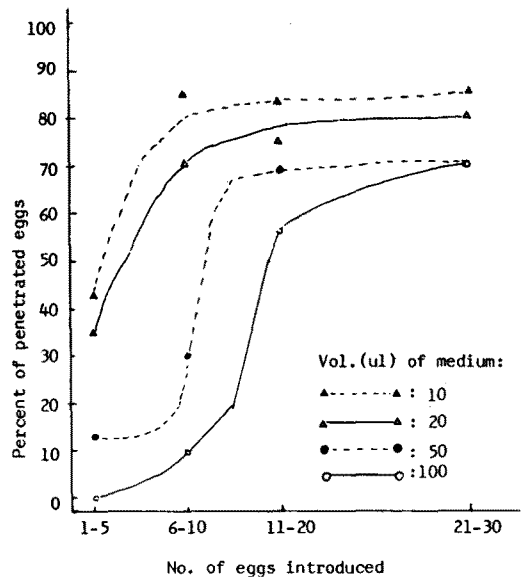
Slide 17. In vitro fertilization of mammalian eggs using M-KRB solution (Rat medium)

Species	Penetration capacitation	Reference rate(%)	
Rat	+	82-95	Niwa & Chang, 1974
Mouse	+	84-96	Niwa et al., 1980
Hamster	-	84-88	Niwa et al., 1980
Cattle	-	19-21	Iritani & Niwa, 1977
Pit	-	10-26	Iritani et al., 1978
Human	+(?)	25-75	Nishimoto et al., 1982
Rabbit	+(?)	10-100	Niwa et al., unpublished

따라서 다소의 차이가 있겠으나 7.2~7.8이 사용되고 있으며, 이 범위내에서 수소이온농도를 7.6~7.8로 증가시키면 동일난자내에 여러마리의 정자가 침입하는 polyspermy의 발생빈도가 증가하는 경향이 있습니다.

Slide 14; 다음은 guinea pig 정자의 수정능획득과 albumin의 관계를 검토하기 위하여 투명체를 제거한 hamster의 난자를 사용한 실험예가 되겠습니다. 보시는 바와같이 albumin이 첨가된 배양액내에서 전배양한 정자의 hamster 난자내에 침입율이 높은 사실을 알 수 있으며, albumin은 guinea pig 정자의 수정능획득과 선체반응을 촉진시킨다는 사실을 입증하고 있습니다.

Slide 15; 이밖에 체외수정의 성립에는 정자부유액의 농도가 중요한 요인으로 지적되고 있습니다.



Slide 16. Fertilization in vitro of hamster eggs with follicular cells in the rat medium(Niwa et al., 1980).

돼지의 정자농도가 수정율에 미치는 영향을 검토하기 위하여 경도대학의 Nagai, Iritani와 Niwa 등이 1983년에 보고한 결과를 살펴보면, 정자의 농도를 100~200($1 \sim 2 \times 10^6$)만으로 유지시키면 74~76%의 높은 수정율을 얻는데 반하여, 정자의 농도를 10만 이하로 하면 수정율이 급격히 떨어지는 결과를 보고하고 있습니다. 체외수정시에 정자의 농도는 지나치게 희석하게 되면 희석 충격에 의하여 정자의 활력이 떨어지고 정자의 수가 증가되면 polyspermy의 발생율이 증가되며, 지나치게 되면 수정이 일어나지 않으므로 체외수정시 정자부유액의 농도는 정자의 활력이 떨어지지 않는 범위내에서 정자수를 조정할 필요가 있습니다.

Slide 16; 체외수정에서 또하나의 중요한 요인으로 지적되고 있는 과립막세포와 정자의 난자내 침입율과의 관계를 조사한 결과입니다. Niwa등은 과립막세포(follicular cell)가 hamster 난자의 체외수정율에 미치는 영향을 검토하기 위하여 10, 20, 50 및 100 μ l의 rat medium(modified KRB) 내에 과립막세포가 포함된 배란직후의 난자수를 달리하여 체외수정율을 조사한 결과, 배양액의 액량은 적고 첨가된 난자수가 증가될수록 수정율이 향상되는 결과를 얻고있습니다. 이와같은 현상은 동일한 배양액 내에 난자수가 증가됨에 따라 첨가되는 과립막세포와 기질물질이 증가되고, 결과적으로 정자의 수정능 획득을 촉진시킨 것으로 추측되고 있습니다.

Slide 17; 지금까지 체외수정에 이용되고 있는 배양액은 동물종에 따라 rat는 modified KRB액, hamster의 경우는 m-Tyrode액등으로 구별되었으나, Niwa, Iritani, Nishimoto 등의 실험 결과에 따르면 rat medium으로 알려진 m-KRB액의 동일한 배양액의 조건에서 mouse, hamster, 소, 돼지, 사람, 토끼의 체외수정에 성공하고 있습니다. 물론 소와 돼지같은 대동물의 경우는 수정율이 다소 떨어지는 차이가 있으나, 대체적으로 동일한 배양액내에서 체외수정이 가능하다는 사실은 이상에서 말씀드린 체외수정의 성립에 영향을 주는 요인들 외에 체외수정술의 숙련도가 관여된다는 사실을 시사해 주는 것으로 보입니다.

이상에서 slide를 통하여 체외수정의 기술개요와 배양액의 조건을 말씀드렸습니다. 다음은 수정란의 배양조건을 말씀드리겠습니다. 유인물의 초록중 초기배의 배양부분을 참고해주시기 바랍니다.

생체내의 난자는 발육단계에 따라 난관과 자궁등의 난자주위의 환경이 변화되므로 배양액의 성분도

발육시기별로 변화시키는 것이 합리적이 되겠습니다. 그러나 생식기관의 분비액은 내분비상태와 채취방법에 따라 물리화학적 조건이 변동하게 되므로 완벽한 배양성분의 조정이 어렵습니다.

첫째, 수정 초기배의 발육에 필요한 ion에 대한 검토는 체외수정에 비하여 부진한 상태이고, 원칙적으로 혈중농도에 준하고 있습니다. Ion 중 Ca^{2+} 는 포배의 발육과 8세포기의 compactation 현상에 관여하는 것으로 알려져 있습니다.

둘째, Energy 원으로 mouse 종의 초기배의 경우를 살펴보면, 1~2세포기는 pyruvate만으로 발육이 유지되나 2~8세포기에는 lactate가 추가되고, 8~배반포기에는 glucose, fructose, citrate 및 수산 등이 이용되며 초기배 배양의 실제에는 pyruvate, lactate 및 glucose가 필수적으로 첨가되고 있습니다.

셋째, 단백질의 경우는 mouse 종에서 초기배의 단백질량이 1세포~상실배기 사이에는 감소하고 포배기에 증가하는 것으로 보아 수정란의 발육초기에는 내인성의 amino 산에 의존하는 것으로 보이며, 후기배반포기에 필수amino 산이, trophoblast와 내세포피의 발육에 혈청단백이 요구됩니다. 한편 토끼의 경우는 1~4세포기에 methionine 이 배반포 발육에 필수적이며 glycine이 부족하면 발생이 지연됩니다.

넷째, 배양액의 pH는 bicarbonate의 첨가량과 기상 조건의 CO_2 농도에 따라서 결정되나, 5% CO_2 의 기상조건에서 mouse는 7.3~7.4, 토끼는 6.8~8.0의 범위이고 사람의 경우는 7.2가 적당한 것으로 알려져 있습니다.

다섯째, 끝으로 삼투압이 되겠습니다만 mouse의 2세포기 난자의 배양액의 최적삼투압은 277~307 mOsM로써 혈청의 310 mOsM에 비하여 다소 낮은 삼투압이 적당한 것으로 알려져 있습니다.

이상입니다.

정영채: 이상의 발표내용중 의문사항이 있으시면 질의해 주시기 바랍니다.

질의자(?): 발표내용에 다소 벗어난 질문이 되겠으나 돼지정액의 정자농도는 얼마가 되는지 말씀해 주시면 합니다.

김정의: 돼지의 경우에 1회 사정량은 평균 250 ml이고 1ml 당 평균 정자수는 약 1억으로 기억하고 있습니다.

정영채: 다른 질문이 없으면 이상으로 발표를 마치겠습니다. 감사합니다.