

# 생쥐에 있어서 兩分分割球 移植에 의한 새끼生産에 관한 研究

徐泰光 · 朴恒均

慶北大學校 農科大學 酪農學科

## Studies on Offspring Production by Transfer of Bisected Demi-Embryos in Mice

Suh, Tae Kwang · Park, Hang Kyun

Dept. of Dairy Science, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

### Summary

This study was conducted to investigate the effect of embryo stage on bisection rates of embryos, on development of separated demi-embryos and on subsequent development to full term following transfer of demi-embryos to recipients. The results obtained in this study are summarized as follows.

The 2-, 4-, 8-cell and morula embryos were mostly obtained at 36-42, 48-54, 62-66 and 72-78 hours after injection of hCG, respectively, and the average number of embryos recovered per head was 17.0. The bisection rate of 8-cell embryos was 83.6%, which was significantly higher than that of morula embryos, 65.5%. But the development of morula demi-embryos to blastocyst after in-vitro culture was better than that of 8-cell demi-embryos and the rate was 76.5% and 60.9%, respectively. When the 2, 10 and 15 cultured demi-embryos or intact embryos were transferred to each recipient mouse, respectively, the highest pregnancy rate was obtained when 15 embryos were transferred. And the overall offspring production rate of intact embryos was higher than that of demi-embryos.

### 緒 論

受精卵의 分割球에 대한 研究는 1942年 Nicholas 와 Hall 이래 受精卵 移植에 대한 研究와 더불어 상당한 진전이 이루어져 오늘날에는 發生工學的手法으로 인위적인 一卵性 雙仔 또는 多仔의 生産에 까지 이르고 있다. 이러한 受精卵에 대한 研究는 家畜에 있어 인위적 一卵性 雙仔 또는 多仔 生産으로 인한 우량 가축의 빠른 증식과 유전적으로 同一한 個體들에 대한 특정형질의 研究를 가능케하여 가축 개량상 크게 이용될 수 있으며 同一한 受精卵에서 얻어진 多數의 分割球中 하나에 대한 핵형 분석으로 性의 判별도 가능케 하여 인위적인 性의 조절도 가능케 한다. 또

한 發生, 生理, 免疫, 醫學的 측면에서의 研究등에도 여러가지로 이용된다.

한편 受精卵 分割球의 研究는 受精卵의 分割을 기초로 하여 분리된 割球의 발달을 주로 研究하는바 그 研究方法에 있어서 초기에는 laser beam 또는 미세유리침 등으로 한쪽의 割球를 사멸시킨 후 나머지 割球의 發達을 研究하고자 하였다.(Nicholas 와 Hall, 1942; Seidel, 1952; Tarkowski, 1959). 그러나 現在에는 技術 및 지식의 發達과 더불어 透明帶를 物理, 化學的 方法으로 除去後 또는 除去치 않은 상태로 미세조작에 의해 受精卵을 분리하여 그 分割球의 發達을 研究하고 있다.(Warfield 등, 1986; Willadsen, 1979, 1980, 1981). 이러한 受精卵의 미세조작 및 分割球의

發達에 대한 지식과 技術의 축적을 바탕으로 分割球의 移植 등에 의해 생쥐와 같은 實驗小動物에서 뿐만 아니라 (Moustafa 와 Hahn, 1987; Tsunoda 와 McLaren, 1983; Nagashima 等 1984; Kim 等, 1986) 소 (Willadsen 과 Polge, 1981; Willadsen 等, 1981; Ozil 等, 1982; Lambeth 等, 1983; McEvoy 와 Sreenan, 1987), 말 (Allen 과 Pashen, 1984), 땃양 (Gatica 等, 1984; Tsunoda 와 Sugie, 1984; Tsunoda 等, 1985) 等の 家畜에서도 인위적인 一卵性 雙仔 또는 多仔生産 등이 이루어졌다.

그러나, 現在까지의 受精卵 分割球에 대한 研究는 주로 一卵性의 새끼生産 또는 分割球의 발달 가능성에 대한 研究에 그쳤을뿐 分割球가 作出된 受精卵의 細胞期에 따른 分割球의 體外發達 및 移植後 受胎率, 産仔率등에 관한 研究는 家畜은 물론 實驗小動物에서도 광범위하게 이루어지지 않은 실정이며 또한 研究者에 따라 相異한 結果가 보고되고 있다.

實驗小動物인 생쥐에 있어서의 이러한 研究들에 대한 동향을 보면 供試用 受精卵의 回收에 있어 Fowler 와 Edwards (1957)는 생쥐에 대해 過排卵 처리後 20~30個, Gates(1971)는 89.5個, Spindle 과 Goldstein (1975)은 29.8個의 卵子를 회수하였다고 보고하여 研究者에 따라 相異한 차이를 나타내었다.

受精卵의 兩分에 있어서는 Yang 等 (1985)은 供試한 생쥐의 4細胞期 受精卵의 96.0%, Kim 等 (1986)은 供試한 생쥐 桑實胚의 39.2%가 兩分되었으며 Oh 等 (1983)은 受精卵의 分化가 진행될수록 割球 분리가 어렵다고 보고한 반면 Nagashima 等 (1984)은 供試한 생쥐 桑實胚의 80.4%가 兩分되었다고 보고하여 研究者에 따라 相異한 結果를 보고하고 있다.

分割球의 發達에 있어서 Rho 와 Chung (1983)은 8細胞期 受精卵에서 얻어진 分割球의 65.8%가 體外培養後 桑實胚期이상으로 發達하였으며 受精卵의 細胞期가 진행될수록 분리 할구의 발생 가능성이 저하된다고 보고하였으나 Kim 等 (1986)은 생쥐의 桑實胚를 兩分後 얻어진 分割球를 體外培養한 結果 blastocyst로의 發達率은 75%로서 서로 相異한 結果들이 보고되었다. 또한 分割球의 移植後 體內發達도 Kim 等 (1986)은 53%

의 새끼生産率을, Tsunoda 와 McLaren (1983)은 12%의 産仔率을 보고함으로써 相異한 차이를 보였다.

따라서 本 研究는 實驗動物인 생쥐에 대해 過排卵처리, 受精卵의 回收 및 兩分, 分割球의 培養 및 移植 등을 실시하여 過排卵後의 反應, 受精卵의 細胞期에 따른 兩分성적, 分割球의 體外發達 및 移植後 受胎率, 産仔率 등을 조사하여 장차 多胎性家畜에 응용할 수 있는 기초자료를 얻고자 실시되었다.

## 材料 및 方法

### 供試動物

實驗動物은 供卵생쥐로서 5~10주령의 들쥐색 CBA 系統과 黑色인 C57BL 系統을 利用하였고, 受卵생쥐로서 12~15주령의 albino BALB/C 系統을 利用하였다. 供試動物은 每日 明 14時間, 暗 10時間의 光線調節下에서 사료 및 음수를 自由 섭취케하여 사육하였다.

### 過排卵 誘起 및 發情同期化

過排卵은 Figure 1에서와 같이 供卵생쥐의 發情週期의 단계에 관계없이 午後 6時에 PMSG (Folligon, Intervet, Holland) 5 IU를 腹腔內 1回注射하고 48時間後에 同一한 方法으로 hCG (Chorulon, Intervet, Holland) 5 IU를 1回注射하여 過排卵을 誘起하였다. hCG注射後 바로 1:1로 同一系統의 雄性 생쥐와 合榿 시켰으며 翌日 아침 10時에 膣檢 檢査로서 교미여부를 확인하여 膣檢이 확인된 개체만을 採卵용으로 供試하였으며 膣檢 확인 당일을 교미 0日로 설정하였다.

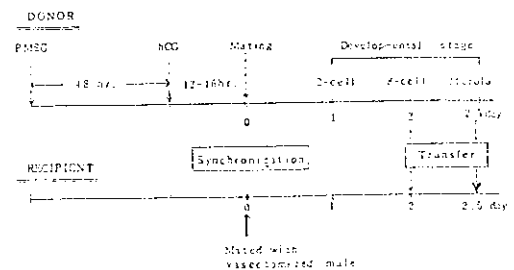


Fig. 1. Experimental procedure of superovulation, synchronization and transfer of intact embryos.

Intact embryo의 移植은 Figure 1에서와 같이

精管을 절제한 雄性생쥐와 受卵母로 利用할 雌性 생쥐를 1:5의 비율로 合畝後 翌日 아침 供卵생쥐의 膣腔 확인과 同一한 時間에 膣腔이 확인된 個體를 intact embryo의 移植을 위한 受卵생쥐로 利用하였다.

培養한 demi-embryo는 Figure 2에서와 같이 供卵생쥐의 교미 1日 아침에 膣腔을 확인하여 供卵생쥐와 1日의 時差가 나도록한 受卵생쥐에 移植하였다.

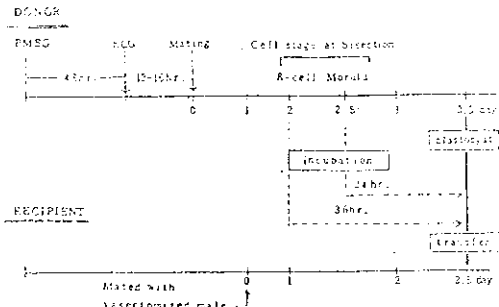


Fig. 2. Experimental procedure of synchronization and transfer of demi-embryos

受精卵의 回收, 處理 및 移植

培養液: 受精卵의 回收과 兩分 및 分割球의 培養에는 Brinster (1971)의 方法에 따라 제조한 BMOC-3 培養液을 使用하였으며 그 化學的 組成은 Table 1과 같다. 培養液의 pH는 7.1~7.4 이고 사용직전 0.2 $\mu$ m의 millipore filter (Gelman Sciences Inc., U. S. A.)를 使用하여 濾過除菌하였으며 使用 1時間前 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 습도포화 상태인 배양기內에 정치하여 CO<sub>2</sub> 平衡을 시켰다.

Table 1. Chemical composition of BMOC-3 medium

Component	Concentration
	g / l
NaCl	5.546
KCl	0.356
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.162
CaCl <sub>2</sub>	0.189
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.294
NaHCO <sub>3</sub>	2.106
Glucose	1.000
Na-lactate	2.253
Na-pyruvate	0.056
BSA	5.000

受精卵의 回收: hCG注射後 各 발달단계 즉 2細胞期 (36~42 時間), 4細胞期 (48~54 時間), 8細胞期 (62~66 時間), 桑實胚期 (72~78 時間)에 생

쥐를 屠殺하여 外科的으로 子宮과 卵管을 摘出後 50배의 實체현미경 (Olympus optical Co, Japan) 아래에서 前述한 培養液으로 灌流하였다. 이때 멸균된 30G 注射針을 附着한 1ml의 注射器를 利用하여 0.2~0.3ml의 培養液을 卵管采에서 子宮으로 灌流시켜 受精卵을 回收하였다. 回收된 受精卵은 80배의 實체현미경 아래에서 正常的인 發達 여부를 확인하였으며 本 實驗에는 形態的으로 正常發達한 8細胞期 및 桑實胚期의 受精卵을 供試하였다.

透明帶 除去 및 decompaction: 受精卵 回收後의 本 實驗의 全過程은 Figure 3과 같으며 回收後 供試된 受精卵은 0.5% protease (papaya, Sigma, U. S. A.)를 함유한 培養液에 3~6分間 노출시킨 상태로 80배의 實체현미경 아래서 계속적으로 관찰하면서 透明帶가 軟化되었을때 protease가 함유되지 않은 新鮮한 培養液으로 옮겨 3~4回 반복 세척하였다. 이때 투명대가 완전히 除去

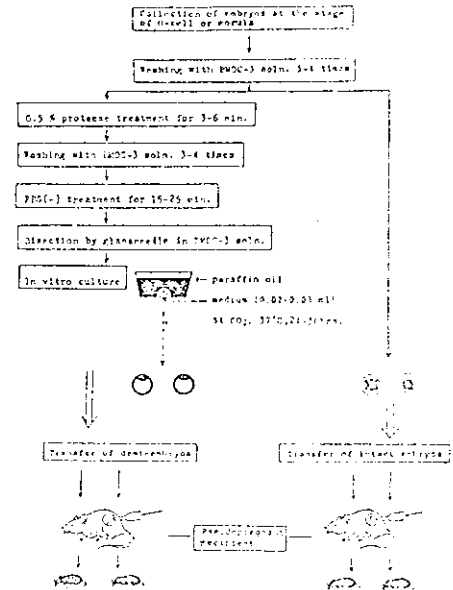


Fig. 3. Procedure of treatments and transfer of embryos

되지 않은 것은 割球에 대한 酵素의 직접적인 영향으로 인한 損傷을 피하기 위함이었으며 완전히 제거되지 않은 투명대는 3~4回的 반복세척중

pipetting 조작을 약간 강하게 함으로써 物理的으로 除去하였다. 透明帶를 除去한 桑實胚期 受精卵은 약 15~25 分間  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ 이 함유되지 않은 PBS (phosphate buffered saline) 용액에 정치하여 decompaction을 유도하였다.

受精卵의 兩分: Decompaction된 桑實胚期受精卵 및 透明帶가 除去된 8細胞期 受精卵은 新鮮한 培養液으로 옮긴후 80배의 稀釋率 아래에서 直徑 10 $\mu$ m 이하의 미세유리봉으로 受精卵의 頂部를 따라 위에서 아래로 눌러 兩分하였으며 以上の 모든 조작은 30°C 정도의 培養室內에서 실시하였다.

分割球의 培養: 兩分된 分割球은 35mm petridish (Costar cat No. 3035. U. S. A.)에 前述한 培養液의 小滴을 만들고 paraffin oil (Sigma, U. S. A.)을 피복하여 培養前 1~2時間 미리  $CO_2$  평형을 시켜놓은 培養液 小滴 內에 넣고 37°C, 5%  $CO_2$ , 습도포화상태의 培養器內에서 24~36時間 培養하였다.

移植: Intact embryo 와 培養된 demi-embryo 는 各各 Figure 1과 Figure 2에서의 方法으로 준비된 受卵생쥐에 移植하였다. 移植은 受卵생쥐에 sodium pentobarbital (Somnopenyl, Pitman-Moore Inc, U. S. A.)을 腹腔內투여, 마취시킨후 背側 正中線을 切開한 다음 卵巢, 卵管 및 子宮을 노출시키고 멸균된 26 $^{1/2}$  G 注射針을 利用하여 子宮角 先端에 小孔을 만들었으며 이 小孔에 micropipette을 삽입하여 Hogan 等 (1986)의 方法에 따라 소량의 培養液과 함께 培養된 分割球 또는 受精卵을 移植하였다.

## 結果 및 考察

### 受精卵의 回收

供卵생쥐에 各各 5 IU의 PMSG 및 hCG로 過排卵처리後 卵子를 回收한 結果는 Table 2와 같다.

hCG 注射後 36~42 時間, 48~54時間, 62~66 時 및 72~78 時間에 回收한 총 卵子數 및 平均 回收卵子數는 各各 337個와 18.9個, 366個와 16.6個, 479個와 15.5個 및 769個와 17.5個로서 hCG 注射後 36~42 時間에 回收時 平均 18.9 個로 가장 많은 卵子가 回收되었고, hCG 주사後 시간이 경과함에 따라 回收되는 卵子의 數가 약간 감소하는 경향을 나타내었으며 전체적으로 首當平均 17.0個의 卵子가 回收되었다.

時間別 胚 發達은 hCG 注射後 36~42 時間에는 2細胞期, 48~54 時間에는 4細胞期, 62~66時間에는 8細胞期, 72~78時間에는 桑實胚期の 受精卵이 가장 많이 回收되었다.

Spindle 과 Goldstein (1975)은 各各 5IU의 PMSG 와 hCG로 성숙한 ICR系統의 암생쥐에 過排卵 처리를 한 결과 29.8 個의 卵子가 回收되었다고 보고 하였는데 이는 本 研究에서 17.0個의 卵子를 回收한 結果보다 우수한 성적이었다. Gates (1971)는 過排卵 처리後 4주령의 미성숙 암생쥐에서 28.7 個, BALB/C 系統의 생쥐에서 89.5個의 卵子數를 보고 하였으며 Fowler 와 Edwards (1957) 및 Biggers 等 (1971)은 20~30個, Allen 과 McLaren (1971)은 미성숙생쥐에서 21.5 個, 성숙생쥐에서 23.8個의 卵子를 回收하였다고 보고하여 本 研究의 結果보다 우수하였으나 Jeon 과 Ishijima (1978)는 17.9個를 보고하여 本 研究의 17.0個와 유사한 성적이었으며, Oh 等 (1983)은 ICR 系統의 생쥐에 過排卵後 13.7個를 回收하여 本 研究의 17.0個보다 低조한 성적이었다.

이와같이 研究者에 따라 過排卵처리後 排卵 또

Table 2. Number of recovered embryos following hCG treatments in mice

Cell stage	Time of flushing after hCG inj. (hrs.)				Total
	36 - 42	48 - 54	62 - 66	72 - 78	
1-cell or degenerated	73(19.4)	53(14.5)	78(16.3)	148(19.2)	352
2-cell	304(80.6)	135(36.9)	5(1.0)	1(0.1)	445
4-cell	0	172(47.0)	60(12.5)	3(0.4)	235
8-cell	0	6(1.6)	303(63.3)	10(1.3)	319
Morula	0	0	33(6.9)	582(75.7)	615
Blastocyst	0	0	0	25(3.3)	25
Total	377(100)	366(100)	479(100)	769(100)	1991
No. of mice	20	22	31	44	117
Embryos / head	18.9	16.6	15.5	17.5	17.0

는回收되는 卵子數의 차이가 생기는것은 정상 발정주기의 體內변화와 外部호르몬(exogenous GTH)의 투여시기를 일치시키지 못하거나(McLaren 과 Michie, 1959) 미성숙 또는 성숙생쥐의 성숙정도의 차이에서 오는 호르몬에 반응할 수 있는 large follicle 數의 차이(Jones 과 Krohn, 1961) 또는 embryonic loss의 측면에서 볼 수 있는데 過排卵처리後의 embryonic loss의 원인은 여러 환경요인 즉 embryo 間의 경쟁(Edwards 와 Gates, 1959; McLaren 과 Michie, 1959; Allen 과 McLaren, 1971), 영양에 기인한 스트레스 또는 progesterone 부족과 같은 모체에 의한 요인(McLaren 과 Michie, 1959)등으로 볼 수 있으며 Beaumont 와 Smith(1975)는 착상前 卵자의 loss를 수정의 실패, 이상수정, 卵母細胞의 유전적 결함 및 부적합한 환경 등으로 보았다. 그러나, Neal과 Baker(1973)는 過排卵 처리後 排卵되는 數는 供試생쥐의 연령, 系統 및 호르몬의 용량 등에 영향을 받으며 발정주기의 단계는 호르몬에 대한 반응에 영향을 미치지 않는다고 하였다.

生體內에서의 胚의 發達에 대해 Edwards 와 Gates(1959)는 hCG 注射後 12±3時間에 排卵이 이루어진다고 추정하였으며 Biggers 등(1971)은 0~29時間에 1細胞期, 23~52時間에 2細胞期, 42~59 時間에 3~4細胞期, 49~60時間에 5~8細胞期 및 68~77時間에 桑實胚期로 發達한다고 하였으며 수정이 되어 최초의 卵割이 일어난 後에는 모든 胚들이 均一하게 分割하지는 않는다고 보고하였다. McLaren(1982)은 排卵後 21~25時間에 2細胞期, 38~50時間에 4細胞期, 60~70時間에 16細胞期 이상으로 發達한다고 하였는데 排卵時間을 Edwards 와 Gates(1959)의 기준에 의해 hCG 注射後 12±3時間이라고 산정할때 이러한 결과들은 本 研究에서의 hCG 注射後 36~42時間에 2細胞期, 48~54時間에 4細胞期, 62~66時間에 8細胞期 및 72~78時間에 桑實胚期로 발달한 受精卵이 回收된 結果와 유사한 발달 경향을 보이며 細胞期에 따라 時間的 범위가 넓은것은 Biggers 등(1971)의 보고와 일치하는 경향이다. 또한 Spindle 과 Goldstein(1975)은 교미일을 1일로 산정하여 2일에 2細胞期를, Rho와 Chung(1983)은 2일에 2細胞期, 3일에 4細胞期 및 3 1/2에 8細胞期를,

Lee와 Chung(1984)은 1 1/2일에 2細胞期, 2일에 4細胞期, 2 1/2일에 8細胞期를 回收하였으며 Baik 등(1986)은 3일에 桑實胚를 回收하였고 Oh 등(1983)은 hCG 注射後 24, 48, 72時間에 各各1細胞期, 2細胞期 및 8細胞期の 受精卵을 回收하였으며 Kim 등(1986)은 hCG 주사후 75~80 時間에 桑實胚를, Shin과 Kim(1986)은 66時間에, Ogawa 등(1983)은 74~78 時間에 各各 桑實胚를 回收하였다고 보고하여 本 研究에서의 유사한 경향을 보였다.

#### 受精卵의 兩分

透明帶를 除去後 미세유리봉에 의해 8細胞期 및 桑實胚期 受精卵을 兩分한 結果는 Figure 4와 Table 3에 나타난바 와 같다.

Table 3. Percentage of embryos bisected according to cell stages

Cell stage	No. of embryos manipulated	No. of embryos bisected	Percentage of embryos bisected
8-cell	274	229	83.6 <sup>a</sup>
Morula	339	222	65.5 <sup>b</sup>

a, b Significantly different (P<.05)

8細胞期の 受精卵 274個와 桑實胚期 受精卵 339個를 미세유리봉으로 兩分한 結果 各各 229個 및 222個가 外傷없이 兩分되었으며 兩分率은 各各 83.6% 및 65.5%로 8細胞期 受精卵의 兩分率이 桑實胚期 受精卵의 兩分率보다 유의적으로 높았다. (P<.05)

Oh 등(1983)은 생쥐의 8細胞期 受精卵을, Kim 등(1986)은 桑實胚期の 受精卵을 透明帶를 除去後 미세봉으로 兩分한 結果 各各 82% 및 63.2%가 兩分되었다고 보고하였는데 이는 本 研究에서의 兩分率인 各各 83.6% 및 65.5%와 비슷한 성적이었다.

한편 Oh 등(1983)은 透明帶除去後 미세유리봉에 의해 생쥐의 2細胞期, 4細胞期の 受精卵을 兩分時 그 兩分率은 各各 95% 및 96% 였고 8細胞期 受精卵의 兩分率은 82%로서 受精卵의 分化가 진행될수록 割球의 分리가 어렵다고 보고하였으며 Yang 등(1985)은 2細胞期와 4細胞期 受精卵을 미세유리봉으로 兩分時 各各 97.6% 및 96.0%가 兩分 되었다고 보고하였는데 이는 本 研究에서 8細胞期 受精卵에 대한 83.6%의 兩分率과 비

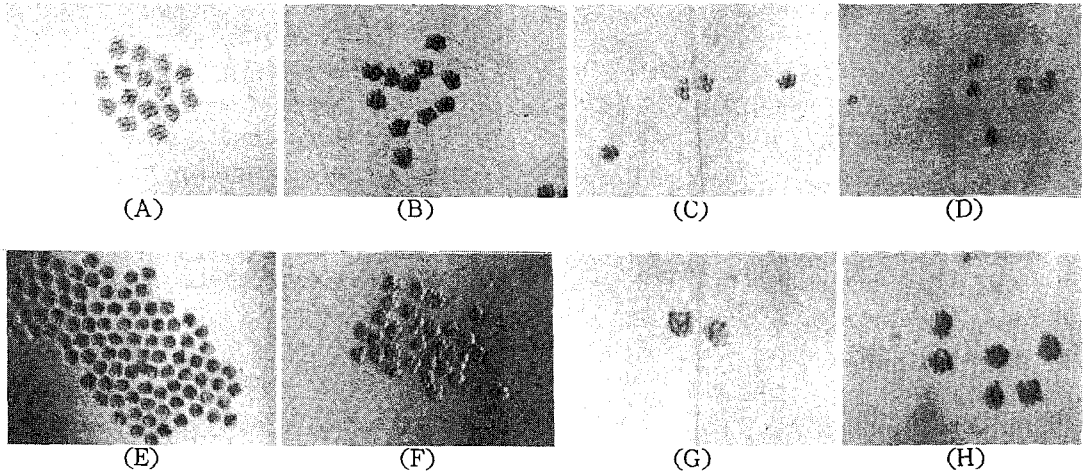


Fig. 4. Bisection of embryos at the stage of 8-cell and morula by micro-glassneedle.

A : Eight-cell embryos.

B : Zona-freed 8-cell embryos.

C : Bisection of 8-cell embryos.

D : Demi-8 cells immediately after bisection.

E : Morula.

F : Zona-freed morula.

G : Bisection of morula.

H : Demi-morula immediately after bisection.

교時 受精卵의 分化가 진행될수록 割球 분리가 어렵다고한 Oh 等 (1983)의 보고와 일치하는 경향이다.

또한 8細胞期와 비교해서 桑實胚期 受精卵을 兩分했을때 그 兩分성적이 저조한것은 Rho와 Chung (1983), Baik 等 (1986)이 보고한 바와같이 受精卵의 分割이 진행될수록 割球의 수는 많아지나 크기는 작아져 兩分時 割球에 많은 상해를 주게되거나 또는 割球數가 많음으로 인해 decompaction이 제대로 일어나지 않아 兩分과정에서 미세유리봉에 의한 割球의 損傷이 많이 일어났기 때문이라 생각된다. 한편 Kim 等 (1986)과 Nagashima 等 (1984)은 생쥐의 桑實胚期 受精卵을 micromanipulator에 의해 兩分한 結果 各各 39.2% 및 80.4%가 外傷없이 兩分되었다고 보고하였는데 이와같이 研究者의 技術적차이에 의해서도 受精卵의 兩分성적에는 차이가 많이 난다고 생각되며 本 研究에서 나타난 바와같이 미세유리봉에 의해 受精卵을 兩分할 때에는 受精卵의 分化가 덜 進行된 단계에서 兩分을 하는것이 兩分率이 더 높아진다고 思料된다.

#### 分割球의 培養

8細胞期 및 桑實胚期 受精卵을 兩分後 얻어진 分割球의 體外培養後 發達은 Figure 5와 Table 4에서 나타난 바와 같다.

Table 4. In-vitro development of blastomeres separated from 8-cell and morula stage in mice

Embryo to be separated	No. of blastomeres cultured	No. of blastomeres developed to		No. of blastomeres degenerated
		Morula	Blastocyst*	
8-cell	258(100)	23(8.9)	157(60.9 <sup>a</sup> )	78(30.2)
Morula	340(100)	6(1.7)	260(76.5 <sup>b</sup> )	74(21.8)

\*Eu-blastocyst and pseudoblastocyst

<sup>a, b</sup> Significantly different(P<.05)

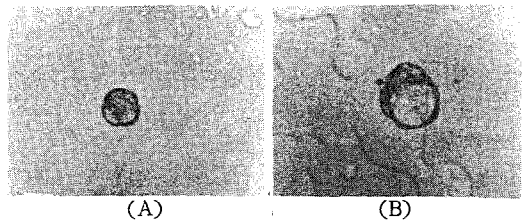


Fig. 5. In vitro development of demi-embryos obtained from 8-cell embryos.

A : Demi-morula developed from bisected 8-cell embryos which were cultured 24hrs.

B : Blastocyst developed from bisected 8-cell embryos which were cultured 36hrs.

8細胞期 受精卵에서 얻어진 分割球 258個 및 桑實胚期 受精卵에서 얻어진 分割球 340個를 培養한 結果 8細胞期에서 얻어진 分割球은 157個, 桑實胚에서 얻어진 分割球은 260個가 blastocyst로 發達하였으며 그 發達率은 各各 60.9% 및

76.5%로서 桑實胚期에서 얻어진 分割球의 blastocyst로의 發達率이 유의적으로 높았다( $P < .05$ ).

Kim 등 (1986)은 생쥐의 桑實胚期 受精卵을 미세유리봉에 의해 兩分後 33~36時間 體外培養한 結果 75%가 blastocyst로 발달하였다고 보고하였는데 이는 本 研究의 結果인 76.5%와 유사한 성적이었으며 또한 Kim 등 (1986)은 micromanipulator에 의해 兩分된 分割球를 透明帶가 없는 상태로 培養한 結果 64.9%가 blastocyst로 발달했다고 보고하였다.

Baik 등 (1986)은 미세유리봉에 의해, Nagashima 등 (1984)은 micromanipulator에 의해 생쥐의 桑實胚를 兩分후 그 分割球를 培養한 結果 各 各 67.2% 및 79.5%가 blastocyst로 발달했다고 보고 하였다.

한편 Rho와 Chung (1983)은 8細胞期 受精卵에서 얻어진 分割球를 培養한 結果 65.8%가 桑實胚期 이상으로 發達하였다고 보고하여 本 研究의 8細胞期에서 얻어진 分割球의 發達率과 유사한 성적 이었으나 Tarkowski와 Wroblewska (1967)는 이보다 저조한 15%의 發達率을 보고하였다.

Rho와 Chung (1983) 및 Yang 등 (1985)은 생쥐의 4細胞期 受精卵에서 얻어진 分割球를 체외 배양한 結果 各 各 73.2% 및 0%가 桑實胚期 이상으로, Fiser와 Macpherson (1975)은 2細胞期 및 4細胞期에서 얻어진 分割球의 各 各 44.6% 및 34.9%가 培養時 blastocyst로 發達하였다고 보고하여 研究者에 따라 다소 상이한 結果를 나타내는데 이와같이 研究者에 따라 차이가 나는 것은 發達한 分割球의 分類基準, 培養方法 및 兩分기술의 숙련정도의 차이 등에 기인하는 것으로 思料된다.

한편 Fiser와 Macpherson(1975), Rho와 Chung (1983) 및 Yang 등 (1985)은 細胞期가 진행될수록 分離 割球의 발생 가능성과 blastocyst까지 발생하는 비율이 떨어지며 이는 分割이 진행될수록 割球의 크기가 작아져 兩分時 分割球에 많은 상해를 加하기 때문에 그 발달 비율이 저조하다고 보고하였으나 本 研究에서는 8細胞期에서 얻어진 分割球의 발달율은 60.9%, 桑實胚期에서 얻어진 分割球의 發達率은 76.5%로서 오히려 桑實胚期에서 얻어진 分割球의 發達率이 더 높아 이들의 보고와 일치하지 않는 결과였다.

이러한 結果는 8細胞期 受精卵은 그 割球가 크기때문에 미세유리봉에 의해 兩分中 미세유리봉과 접촉하는 면적이 넓어 兩分後 그 손상에 의해 發達이 저조해진 것으로 생각되며 桑實胚期の 受精卵은 割球의 크기가 작고 그 數가 많아 미세유리봉에 의해 兩分時 미세유리봉에 접촉되어 손상되는 割球가 있다 할지라도 그 전체적인 생존 割球의 數가 많으므로 兩分後 그 發達이 정상적으로 진행되어 오히려 8細胞期에서 얻어진 分割球보다 배반포기로의 發達率이 더 높은것으로 思料된다. 本 研究에서도 Nagashima 등 (1984)의 보고와 같이 decompaction 유도後 兩分된 桑實胚의 分割球도 recompaction이 유기된 後에는 순조롭게 blastocyst로 發達하였다.

#### 受精卵 및 培養된 分割球의 移植

受胎率: 8細胞期와 桑實胚期에서 兩分後 培養한 分割球 및 回收後 바로 移植한 受精卵의 移植數에 따른 受胎率은 Table 5와 같다.

Table 5. Pregnancy rates of mice received demi- and intact embryos

Status of embryos	No. of embryos transferred/ recipient	No. of recipient	No. of recipient pregnant (%)	
Demi-embryos cultured from	8-cell	2	11	3(27.3)
		10	9	5(55.6)
		15	9	6(66.7)
	Sub total(247)*		29	14(48.3)
	Morula	2	18	4(22.2)
Intact embryo		10	9	5(55.6)
		15	9	6(66.7)
	Sub total(261)		36	15(41.7)
	Morula	2	15	4(26.7)
	8-cell	10	8	3(37.5)
	15	9	5(55.6)	
Sub total(245)		32	12(37.5)	
	Morula	2	12	5(41.7)
		10	9	5(55.6)
		15	9	7(77.8)
Sub total(249)		30	17(56.7)	

(\*) : Total number of embryos transferred to total recipients

8細胞期에서 兩分後 培養된 分割球를 2個, 10個, 15個씩 各 各 11首, 9首 및 9首의 受卵생쥐에 移植했을때 各 各 3首, 5首, 6首가 受胎되었으며 受胎率은 各 各 27.3%, 55.6%, 66.7%로서 총 247個의 分割球를 29首에 移植한 結果 14首가 受胎되어 受胎率은 48.3%였다.

桑實胚期에서 兩分後 培養된 分割球를 2個,

10個, 15個씩 各各 18首, 9首, 9首의 受卵생쥐에 移植한 結果 各各 4首, 5首, 6首가 受胎되었으며 受胎率은 各各 22.2%, 55.6% 및 66.7%로서 總 261個의 分割球를 36首에 移植한 結果 15首가 受胎되어 受胎率은 41.7%였다. 또한 8細胞期의 受精卵을 2個, 10個, 15個씩 各各 15首, 8首, 9首의 受卵생쥐에 移植한 結果 各各 4首, 3首, 5首가 受胎되었으며 受胎率은 各各 26.7%, 37.5% 및 55.6%로서 總 245個의 受精卵을 32首에 移植한 結果 12首가 受胎되어 受胎率은 37.5%였다.

한편 兩分하지 않은 그대로의 桑實胚期 受精卵을 2個, 10個, 15個씩 各各 12首, 9首, 9首의 受卵생쥐에 移植한 結果 各各 5首, 5首, 7首가 受胎되었으며 受胎率은 各各 41.7%, 55.6% 및 77.8%로서 總 249個의 受精卵을 30首에 移植한 結果 17首가 受胎되어 受胎率은 56.7%였다.

8細胞期와 桑實胚에서 兩分後 培養된 分割球의 移植에 있어서 各各 受卵생쥐當 15個씩을 移植하였을때 受胎率은 受卵생쥐當 各各 2個, 10個를 移植한 경우보다 높았으며 8細胞期 및 桑實胚期 受精卵의 移植에서도 受卵생쥐當 各各 15個씩 移植하였을때 各各 2個, 10個를 移植하였을때 보다 受胎率은 높았으나 移植數에 따른 受卵생쥐의 受胎率間에 유의적인 차이는 없었다. 또한 demi-embryo와 intact embryo 內에서의 細胞期에 따른 受胎率에도 유의적인 차이는 없었다.

한편 rat에 있어서 Seong 과 Yun(1987)은 受卵母當 桑實胚와 blastocyst를 9~12個 移植했을 때 3~8個 移植한 경우보다 受胎率이 유의적으로 높았다고 보고하였으나 本 研究에서는 受精卵의 移植數에 따른 受卵생쥐의 受胎率에 있어서 유의적인 차이가 나타나지 않았는데 Seong 과 Yun(1987)의 보고를 볼때 생쥐 또는 rat와 같은 多胎動物에 있어서는 원래의 자연배란 數의 범위 內에서는 子宮內에 존재하는 受精卵의 數가 많을 수록 착상 또는 受胎가 더 잘 되리라고 생각되나 이에 관해서는 더 많은 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

産仔率: embryo의 상태에 따른 생쥐 8細胞期 受精卵 및 桑實胚의 移植後 전체적인 새끼 生産率과 태어난 새끼는 Table 6 및 Figure 6과 같다.

Table 6에 나타난바와 같이 8細胞期에서 兩分

Table 6. Production of offspring following transfer of 8-cell and morula embryos

Stage of embryo	Status of embryo	No. of embryos transferred	No. of recipient	No. of offspring
8-cell	Demi-embryo*	247	29	57(23.1 <sup>a</sup> )
	Intact embryo	245	32	92(37.6 <sup>b</sup> )
	Total	492	61	149(30.3)
Morula	Demi-embryo**	261	36	64(24.5 <sup>a</sup> )
	Intact embryo	249	30	108(43.4 <sup>b</sup> )
	Total	510	66	172(33.7)

a, b : Different superscript within stage of embryos show significant difference ( $P < .05$ )

\* : Demi-embryos obtained from 8-cell and cultured to blastocyst

\*\* : Demi-embryos obtained from morula and cultured to blastocyst

( ) : Percentage of No. of offspring/No. of embryos transferred

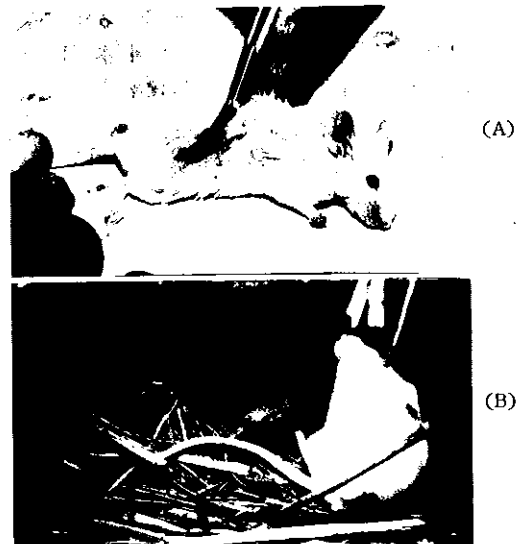


Fig. 6. Transfer of mouse embryos and the young mice obtained following transfer.

A : Transfer of embryos into the uterus of recipient

B : The young mice obtained, with different coat color from recipient.

後 培養된 demi-embryo 247個와 8細胞期의 intact embryo 245個를 各各 29首 및 32首의 受卵생쥐에 移植한 結果 57首 및 92首의 새끼가 生産되어 새끼 生産率은 各各 23.1% 및 37.6% 였으며 8細胞期에서의 전체적인 새끼 生産率은 30.3%로서 8細胞期에서 바로 移植한 intact embryo의 새끼



生産率이 培養後 移植한 demi-embryo에 비해 유의적으로 높았다( $P < .05$ ).

桑實胚에서 兩分後 培養한 demi-embryo 261個와 intact embryo 249個를 各各 36首 및 30首의 受卵생쥐에 移植한 結果 64首 및 108首의 새끼가 生産되어 새끼 生産率은 各各 24.5% 및 43.4%였으며 桑實胚에서의 전체적인 새끼 生産率은 33.7%로서 桑實胚를 兩分하지않고 바로 移植한 受精卵의 새끼 生産率이 培養後 移植한 demi-embryo에 비해 유의적으로 높았다( $P < .05$ ).

Kim 等 (1986)은 미세유리봉에 의해 桑實胚期에서 兩分된 分割球를 培養後 移植하여 53%의 새끼 生産率을 얻었으며, Nagashima 等 (1984)은 micromanipulator에 의해 桑實胚期 受精卵을 兩分後 培養하여 移植한 結果 54.2%의 새끼 生産率을 얻어 本 研究의 結果인 24.5%보다 우수한 성적이었다. 한편 Kim 等 (1986)은 micromanipulator로 桑實胚期 受精卵을 兩分한後 그 分割球를 培養하여 透明帶가 없이 移植한 結果 9.0%의 새끼 生存率을, Baik 等 (1986)은 分割球를 移植하여 11.1%의 産仔率을 얻었다고 보고하였는데 이는 本 研究에서 미세유리봉으로 桑實胚期 受精卵을 兩分하여 얻어진 分割球를 培養, 移植한 結果인 24.5%보다 저조한 성적이었다.

Tsunoda 와 McLaren (1983)은 桑實胚期の 受精卵에서 얻어진 分割球를 卵管에 移植한 結果 受胎率과 産仔率은 各各 67% 및 27%였으며 子宮에 移植한 結果 各各 45% 및 12%, 그리고 8細胞期 胚를 兩分하여 얻어진 分割球를 培養後 子宮에 移植하여 各各 67% 및 9%의 성적을 보고하였다.

생쥐의 桑實胚期 受精卵의 移植에 있어 Ahn 等 (1986)은 桑實胚를 위임신 3日째의 受卵생쥐에 移植하여 各各 87.5%와 61.9%의 受胎率과 새끼 生産率을 보고하였는데 이는 本 研究에서 桑實胚期 受精卵을 위임신 2.5일째의 受卵생쥐에 移植한 後의 結果인 43.4%의 새끼 生産率보다 우수한 성적이었다.

Gates (1956) 및 McLaren 과 Michie (1956)는 受精卵의 발달상태가 체내의 수정란의 발달상태와 生理적으로 일치하거나 또는 하루 늦었을때 移植한 受精卵의 着床率 및 새끼 生産率이 가장 좋다고 보고하였으며 Ahn 等 (1986)이 桑實胚期

受精卵의 移植適期는 위임신 2~3日이라고 보고한 結果에 비추어 볼때 本 성적이 저조한것은 供試생쥐의 系統 및 研究者의 실험조작 등의 차이에 따라 달라진 것으로 생각되며 또한 8細胞期の 受精卵을 子宮에 移植함으로 인해 受精卵의 發達 상태와 移植된 환경의 일치가 이루어지지 않아 저조한 성적을 나타내었다고 思料된다.

또한 本 研究에서 전체적으로 볼때 各 細胞期에 따라 培養後 移植한 demi-embryo에 비해 intact embryo를 바로 移植했을때 새끼 生産率이 유의적으로 높았는데 이는 體外에서 培養後 移植時 성적이 떨어지는 경향이었던 Ahn 等(1986) 및 Massip 等 (1984)의 보고와 유사한 경향이였다. 이러한 이유로는 embryo에 대한 미세조작 및 體內환경조건과 同一하지 않은 培養조건 등으로 인해 體外培養時間의 경과에 따른 embryo의 생명력 상실, 그리고 培養後 移植時 移植가능한 demi-embryo의 잘못된 분류등에 기인하였기 때문이라 思料된다.

## 摘 要

本 研究는 생쥐에 대한 過排卵反應, 回收된 受精卵의 兩分率, 兩分된 分割球의 體外培養 및 移植後 産仔로의 發達率을 조사하기 위하여 CBA 및 C57BL 系統의 供試생쥐에서 얻어진 受精卵을 0.5% protease로 투명대제거 및 미세유리봉으로 兩分하여 얻어진 分割球를 blastocyst로 培養하여 BALB/C 系統의 受卵생쥐에 移植하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

hCG 注射後 36~42時間, 48~54時間, 62~66時間, 72~78時間에 受精卵을 回收한 結果 各各 2細胞期, 4細胞期, 8細胞期 및 桑實胚期の 受精卵이 대부분 回收되었으며 首當 平均 17.0個의 卵자가 回收되었다.

回收後 兩分한 8細胞期 受精卵의 兩分率은 83.6%로서 桑實胚의 65.5%에 비해 유의적으로 높았으나 blastocyst로의 分割球의 發達率은 桑實胚에서 얻어진 分割球가 76.5%로서 8細胞期 分割球의 60.9%에 비해 유의적으로 높았다. 한편 培養된 分割球와 intact embryo에 있어서 細胞期에 따라 各各 受卵生쥐當 2個, 10個, 15個씩 移

植하였을때 共히 15個씩 移植한 경우 受胎率이 가장 높았으나 細胞期에 따른 受胎率에 있어서 유의적인 차이는 없었다.

培養된 分割球와 intact embryo의 移植후 새끼生産率에 있어서 8細胞期에서는 intact embryo

를, 桑實胚에서도 intact embryo를 移植하였을때 새끼生産率은 各各 37.6% 및 43.4%로서 各各 培養된 分割球를 移植하였을때 보다 새끼生産率이 유의적으로 높았다.

### 引用文獻

1. Ahn, C. Y., S. C. Rho, J. J. Ko, K. S. Chung and K. K. Lee : 1986, Production of chimeric mouse, Korean J. Anim. Sci., 28 : 535-541.
2. Allen, J. and A. McLaren : 1971, Cleavage rate of mouse eggs from induced and spontaneous ovulation, J. Reprod. Fert., 27 : 137-140.
3. Allen, W. R. and R. L. Pashen : 1984, Production of monozygotic(identical) horse twins by embryo micromanipulation, J. Reprod. Fert., 71 : 607-613
4. Baik, C. S., Y. M. Han, K. K. Lee, K. S. Chung, J. B. Kim and D. W. Ko : 1986, Sexing mouse demi-embryos by chromosomal analysis, Korean J. Anim. Sci., 28 : 708-713.
5. Beaumont, H. M. and A. F. Smith : 1975, Embryonic mortality during the pre-and post-implantation periods of pregnancy in mature mice after superovulation, J. Reprod. Fert., 45 : 437-448.
6. Biggers, J. D., W. K. Whitten and D. G. Whittingham : 1971, The culture of mouse embryos in vitro. In : Methods in mammalian embryology, ed. J. C. Daniel, W. H. Freeman Co., San Francisco, p. 86-116.
7. Brinster, R. L. : 1971, In : Pathway to conception Sherman, A. I. (ed.), Charles C. Thomas Publ. U. S. A. p. 245-277.
8. Edwards, R. G. and A. H. Gates : 1959, Timing of the stages of the maturation divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins, J. Endocr., 18 : 292-304.
9. Fiser, P. S. and J. W. Macpherson : 1975, Development of embryonic structures from isolated mouse blastomeres, Can. J. Anim. Sci., 56 : 33-36.
10. Fowler, R. E. and R. G. Edwards : 1957, Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins, J. Endocr., 15 : 374-384.
11. Gates, A. H. : 1956, Viability and developmental capacity of eggs from immature mice treated with gonadotrophins, Nature, 177 : 754-755.
12. Gates, A. H. : 1971, Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In : Methods in mammalian embryology, ed. J. C. Daniel, W. H. Freeman Co., San Francisco, p. 64-75.
13. Gatica, R., M. P. Boland, T. F. Crosby and I. Gordon : 1984, Micromanipulation of sheep morula to produce monozygotic twins, Theriogenol., 21 : 555-560.
14. Hogan, B., F. Costantini and E. Lacy : 1986, Manipulating the mouse embryo, CSH Lab. U. S. A. p. 89-150.
15. Jeon, C. G. and Y. Ishijima : 1978, Strains differences of ovulatory response in mice to superovulation treatment, Res. Rep. Agric. Sci. and Tech. Chungnam Natl. Univ., 5 : 77-79.
16. Jones. E. C. and P. L. Krohn : 1961, The relationship between age, number of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice, J. Endocr., 21 : 469-495.
17. Kim, N. H., K. S. Chung, H. C. Rho, U. H. Pek and K. K. Lee : 1986, Production of monozygotic twin mice by bisecting morula, Korean J. Anim. Sci., 28 : 527-534.

18. Lambeth, V. A., C. R. Looney S. A. Voelkel, D. A. Jackson, K. G. Hill and R. A. Godke : 1983, Microsurgery on bovine embryos at the morula stage to produce monozygotic twin calves, *Theriogenol.*, 20 : 85–95.
19. Lee, S. J. and K. S. Chung : 1984, In vitro aggregation and culture of mouse embryos, *Korean J. Anim. Reprod.*, 8 : 29–35.
20. Massip, A., P. V. D. Zwalman, F. Puissant, N. Cammus and F. Leroy : 1984, Effects of in vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the viability of mouse embryos to implant and survive, *J. Reprod. Fert.*, 71 : 199–204.
21. McEvoy, T. G. and J. M. Sreenan : 1987, The survival of bisected cattle embryos without zonae pellucidae, *Theriogenol.*, 27 : 257(Abst. r.).
22. McLaren, A. and D. Michie : 1956, Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster mothers, *J. Exp. Biol.*, 33 : 394–416.
23. McLaren, A. and D. Michie : 1959, Superpregnancy in the mouse. I. Implantation and foetal mortality after induced superovulation in females of different ages, *J. Exp. Biol.*, 36 : 281–300.
24. McLaren, A. : 1982, The embryo. In : *Embryonic and fetal development*, 2nd ed., C. R. Austin and R. V. Short (ed.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 1–25.
25. Moustafa, L. A. and J. Hahn : 1978, Experimentelle erzeugung von identischen mauszwillingen, *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 85 : 242–244.
26. Nagashima, H., K. Matsui, T. Sawasaki and Y. Kano : 1984, Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae, *J. Reprod. Fert.*, 70 : 357–362.
27. Neal, P. and T. G. Baker : 1973, Response of mouse ovaries in vivo and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin, *J. Reprod. Fert.*, 33 : 399–410.
28. 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 : 441–459.
29. Ogawa, S., K. Miyake. N. Seike and H. Kanagawa : 1983, Microsurgical technique for the bisection of early embryos in the mouse, rabbit and cow, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 29 : 198–208.
30. Oh, S. J., K. S. Im and Y. B. Lee : 1983, Studies on the microsurgical dichotomy of embryos in mouse and rat, *Korean J. Anim. Sci.*, 25 : 362–368.
31. Ozil, J. P., Y. Heyman and J. P. Renard : 1982, Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow, *Vet. Rec.*, 110 : 126–127.
32. Rho, H. C. and K. S. Chung : 1983, In vitro culture of blastomere separated from mouse embryo, *Korean J. Anim. Reprod.*, 7(1) : 24–29.
33. Seidel, F. : 1952, Die Entwicklungspotenzen einer isolierten blastomere des zweizellenstadiums im saugetiertei, *Naturwissenschaft*, 39 : 355–356.
34. Seong, H. H. and C. H. Yun : 1987, Study on the transfer of embryos in mature rats II. Pregnancy rate following surgical transfer of embryos in rats, *Korean J. Anim. Sci.*, 29 : 118–124.
35. Shin, H. D. and C. I. Kim : 1986, Study on the sexing of mouse embryos by chromosomal analysis, *Korean J. Anim. Reprod.*, 10 : 27–35.
36. Spindle, A. K. and L. S. Goldstein : 1975, Induced ovulation in mature mice and developmental capacity of the embryos in vitro, *J. Reprod. Fert.*, 44 : 113–116.
37. Tarkowski, A. K. : 1959, Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs, *Nature*, 184 : 1286–1287.
38. Tarkowski, A. K. and J. Wroblewska : 1967,

- Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4-and 8-cell stage, *J. Embryol. exp. Morph.*, 18 : 155-180.
39. Tsunoda, Y. and A. McLaren : 1983, Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres, *J. Reprod. Fert.*, 69 : 315-322.
40. Tsunoda, Y. and T. Sugie : 1984, Production of monozygous twin in mice and goats, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 30 : 18-23.
41. Tsunoda, Y., T. Tokunaga, T. Sugie and M. Katumata : 1985, Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goat, *Theriogenol.*, 24 : 337-343.
42. Tsunoda, Y., T. Yasui and T. Sugie : 1984, Production of monozygotic twins following transfer of separated half embryos in the goat, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 55 : 643-647.
43. Warfield, S. J., G. E. Seidel, Jr. and R. P. Elsdon : 1986, Transfer of bovine demi-embryos with and without zonae pellucidae, *Theriogenol.*, 25 : 212 (Abstr.).
44. Willadsen, S. M. : 1979, A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins, *Nature*, 277 : 298-300.
45. Willadsen, S. M. : 1980, The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep, *J. Reprod. Fert.*, 59 : 357-362.
46. Willadsen, S. M. : 1981, The developmental capacity of blastomeres from 4-and 8-cell sheep embryos, *J. Embryol. exp. Morph.*, 65 : 165-172.
47. Willadsen, S. M. and C. Polge : 1981, Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation, *Vet. Rec.*, 108 : 211-213.
48. Willadsen, S. M., H. Lehn-Jensen, C. B. Fehilly and R. Newcomb : 1981, The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos, *Theriogenol.*, 15 : 23-29.
49. Willadsen, S. M. and R. A. Godke : 1984, A simple procedure for the production of identical sheep twins, *Vet. Rec.*, 114 : 240-243.
50. Yang, B. S., K. S. Im and Y. B. Lee : 1985, Studies on the solubility of zona pellucida and developmental potency of isolated blastomere in mouse, *Korean J. Anim. Sci.*, 27 : 705-710.