

## 牛 卵胞卵의 體外受精과 發育

金正翊

江原大學校 畜產大學

### *In Vitro* Fertilization and Development of Bovine Oocytes

C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangweon National University

#### SUMMARY

Successful techniques of *in vitro* fertilization (IVF) are valuable for studying the process of fertilization and for developing economical procedures for gene and nuclear transfer in farm animals. To date, bovine IVF system has been developed with oocytes *in vivo* or *in vitro*, but the resulting zygotes exhibit limited embryonic development after *in vitro* culture. Even though *in vitro* matured oocytes achieved high fertilization and cleavage rates, these embryos appear extremely low rate of pregnancies when transferred to synchronized recipients.

Development of early bovine embryos *in vitro* is generally arrested at the 8- to 16-cell stage. However, recent use of somatic cells such as trophoblastic vesicle, granulosa and oviduct epithelial cell for co-culture with early bovine embryos has proven effective for development of embryos, matured and fertilized *in vitro*, past the *in vitro* cell blocks.

These facts clearly indicate the value of the co-culture system in promoting development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* to morula or blastocyst stage *in vitro*. In addition, co-culture system may become a tool for evaluation of viability of ova that have been manipulated by procedures such as splitting, microinjection and nuclear transfer.

#### I. 緒 言

體外受精術은 初期發生의 經時的 觀察과 수정을 지배하는 要因分析의 手段이 될 뿐 아니라, 發生工學分野의 연구에 기본재료가 되는 初期胚의 준비와 受精卵 移植 등에 활용이 기대되는 기본기술이다.

畜牛를 포함한 大家畜의 경우는 실험동물중에 비하여 受精의 成立條件을 검토하는데 필요한 成熟排卵 卵子的 준비가 어려운 문제점 때문에 체외수정에 대한 연구가 지연되어 왔으나, 近年에 성숙배란 난

자의 代用으로 屠畜場에서 손쉽게 입수되는 卵胞卵의 體外培養에 대한 연구(Edwards, 1965; Sato 등, 1977; Fukui 와 Sakuma, 1980; Süss 등, 1980)을 시작으로 體外受精(for review: 入谷明·金正翊; Leibfried - Rutledge 등, 1989)과 受精初期胚의 co-culture system (for review: Rexroad, 1989) 등이 개발되면서 이 분야의 연구가 급진전하게 되었다.

本稿에서는 소를 중심으로 卵胞卵의 體外成熟과 受精 및 發育에 대한 最近의 研究現況을 소개하고 문제점을 검토하고자 한다.

## II. 소의 體外受精과 初期胚의 發育

### 1. 卵胞卵의 體外成熟과 受精

體內에서 일어나는 受精過程을 體外에서 再現시키는 體外수정의 기술과정은 成熟排卵 卵子和 受精能獲得 精子的 준비로 大別되며, 소의 경우 성숙배란 난자의代用으로 體外성숙 난포난이 이용된다.

牛 卵胞卵의 體外성숙과 수정에 관한 최근의 연구현황을 표 1 과 2 에 요약하였다. 도살 직후의 난소에서 회수한 卵核胞期의 난포난은 TALP(Ball 등, 1983 ; Lutterbach 등, 1987), Ham's F 10(Xu 등, 1986), TCM 199(Sirard 등, 1988 ; Critser 등, 1986) 등의 배양액에 10~20%의 牛胎兒血清(FCS)을 단독첨가하거나 hormone (GTH, Estradiol - 17  $\beta$ ) 또는 granulosa cell 을 병용 첨가하면 배양액의 단독조건에 비하여 난포난의 성숙(M - II)과 수정율의 성적이 일반적으로 향상되며, 난포난의 體外성

숙에 차이가 인정되지 않은 경우에도 體外수정(Ball 등, 1983 ; Critser 등, 1986)과 體外발육(Critser 등, 1986)의 성적이 현저하게 향상된다. 한편, TCM 199 또는 Ham's F 10의 기본배양액에 發情牛의 血清(Estrous Cow Serum ; ECS)을 단독 첨가한 경우에도 난포난의 體外성숙과 수정율이 향상되었다(Sanbuissho 와 Threlfall, 1989). 이상의 결과는 난포난의 體外배양과 수반되어 일어나는 수정능력의 획득에 外因性的 hormone(FSH, LH, Estradiol - 17  $\beta$ ) 또는 發情牛의 血清(ECS) 등의 첨가가 효과적인 것으로 추측되며, 이와 같은 사실은 성주기에 따라 난관분비액의 성분이 크게 변화하는 사실(Sutton 등, 1984)과도 일치된다.

표 2에 제시된 바와 같이 牛 精자의 受精能獲得條件에는 TALP 또는 BO(Brackett 와 Oliphant, 1975) medium에 heparin (Parrish 등, 1986)을 단독첨가하거나 Caffeine(Niwa 와 Ohgada, 1988) 또

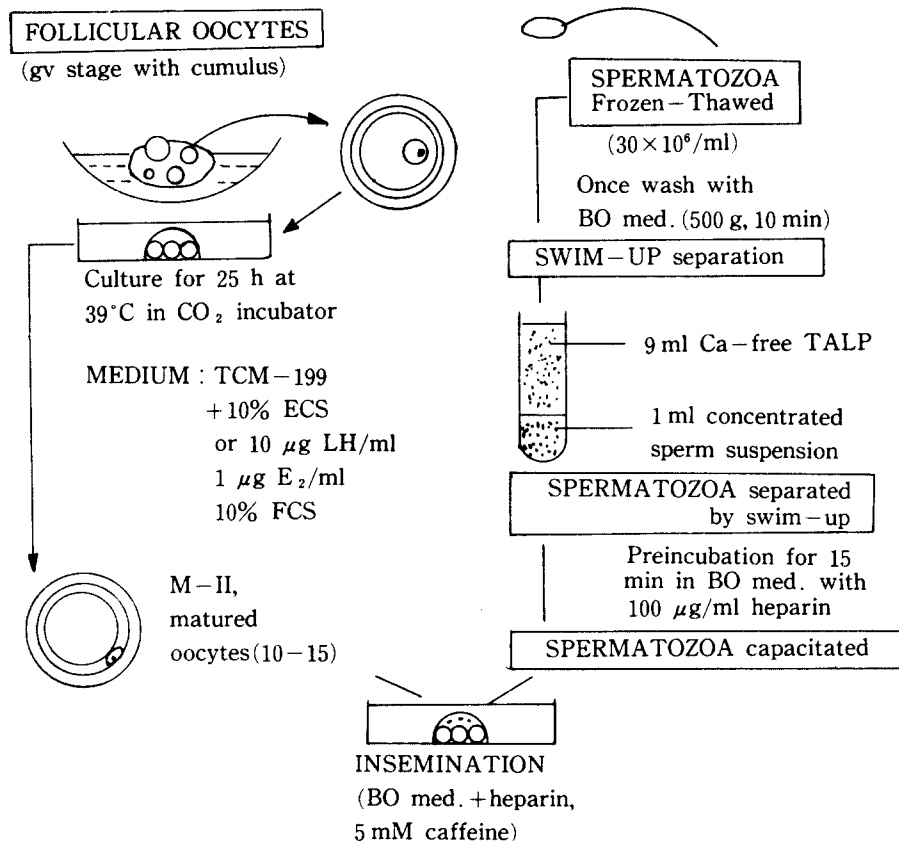


Fig. 1 Experimental procedures for bovine IVF (Kim et al, 1989 ; & Iritani et al, 1988)

Table 1. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes

Follicular size(mm)	Type of medium	Culture period(h)	% of oocytes at M-II	% of oocytes fertilized	% of mor./blastocyst	References
1~6	Ham's F 10, 20%FCS + hormone <sup>1)</sup>	24 "	49 79			Xu et al, 1986
1~5	TALP, 10% FCS + FSH (0.5 IU/ml)	24-48 "	75 70	38 50		Ball et al, 1983
2~5	TALP + Granulosa	24 "	73 81	35 44		Lutterbach et al, 1987
1~5	TCM 199, 10% FCS + hormone <sup>2)</sup>	24 "	84 99	70 73		Sirard et al, 1988
1~5	TCM 199, 10% FCS, hormone <sup>3)</sup> + Granulosa	24 "	73 70	75 87	- 36	Critser et al, 1986
3~8	Ham's F 10, 10%CS <sup>4)</sup>	26-28		13		Sanbuissho & Threlfall, 1989
	" 10%CS <sup>5)</sup>	"		18		
	" 10%ECS <sup>6)</sup>	"		34		

Hormone : 1) 2IU hCG and 1 µg estradiolbenzoate/ml

2) 0.5 µg FSH, 5 µg LH and 1 µg estradiol 17 β/ml

3) 10 µg FSH & LH and 1 µg estradiol-17 β/ml

Serum : 4) Cow serum collected from a cow at ovulation

5) Cow serum collected from a cow at 24 h after ovulation

6) Estrous cow serum collected from a cow at the time of standing estrus

Table 2. *In vitro* fertilization of bovine oocytes using frozen/thawed spermatozoa

Media used for sperm preincubation	No. of oocytes examined	No(%) of oocytes fertilized	References
TALP-hepes	101	22(22)	Parrish et al, 1986
+10 µg/ml Heparin	97	69(71)	
+Heparin, S-USS	103	80(79)	
BO medium	30	7(23)	Niwa et al, 1988
+10 µg/ml Heparin	455	160(35)	Niwa & Ohgada, 1988
+Heparin, 5 mM caffeine	423	288(68)	
BO medium, 10 mM caffeine	92	49(53)	Aoyagi et al, 1988
+0.1 µM I.A	78	68(89)	

BO : Brackett and Oliphant (1975) medium, I.A : Ionophore A 23187

S-USS : Swim-up sperm separation

는 Ca<sup>2+</sup> ionophore (Aoyagi 등, 1988)을 병용 첨가한 배양액의 조건에서 정자를 전처리하거나, 생존정자를 분리(Swim-up Separation)후에 위의 조건에서 전배양(Parrish 등, 1986)하면 난포내 정자의 침입율이 향상되어 haparin은 牛 精자의 수정능획득에 관여하는 중요한 요인(effective agent)이며, 정자의 전배양시(15분)에 첨가량은 5~10 µg/ml 이 효과적임이 확인되었다(Parrish 등, 1988).

이밖에도 소의 체외수정을 지배하는 요인 중에는 정액을 제공하는 숫가축에 個體差가 존재하며

(Niwa 등, 1988), 앞으로 種牡畜選擇에 活用方案의 검토가 요망된다.

## 2. 受精初期胚의 體外發育

체내 또는 체외수정란은 체외배양시에 발육이 지연되거나 일정시기에 발육이 지연되는 "in vitro cell block"현상이 나타나고, 그 발현시기는 동물종에 따라 다르다(표 3). 뿐만 아니라, in vitro cell block을 극복한 소수의 수정란은 체내에서 정상발육된 난자에 비하여 세포수가 현저하게 감소하고

(Kane, 1987), 同種 또는 異種의 난관내로 初期胚를 이식하면 회복된다(Boland, 1984; Eyestone 등, 1985).

소에서 "in vitro cell block"을 극복하는 수단으로 수정초기배를 trophoblastic vesicle(TV: Camous 등, 1984), granulosa cell(Critser 등, 1986) 및 난관상피세포(BOEC: Eyestone 등, 1987; Ellington 등, 1989; Kim 등, 1989) 등의

Somatic cells 과 공동배양(co-culture)한 연구보고를 표 4에 제시하였다.

표 4에 나타난 바와 같이 체내 또는 체외수정된 1~8 세포기의 牛 受精卵은 Somatic cells 과 공동배양하면 8-16 세포기를 통과, 후기상실배와 배반포기로 발육율이 현저하게 향상되고 細胞數(cell numbers/embryo)도 증가된다(Ellington 등, 1989; Eyestone 과 First, 1989).

Table 3. Stages of the *in vitro* blocks to embryo development in farm animals

Species	Stage of block	Methods for overcoming blocks	References
Rabbit	Morula	Amino acids in medium (+ vitamins for blastocyst expansion), oviduct epithelial cell	Kane, 1987 Carney & Foote, 1988
Sheep	8-to 16-cell	Modify culture medium (SOF), Co-culture with trophoblastic vesicle, or with oviduct cell	Tervit & Rowson, 1974 Heyman et al, 1987 Gandolfi & Moor, 1987
Pig	4 cell	Delete pyruvate, Endometrial cells, or ovarian fibroblasts	Davis et al, 1978 Allen & Wright, 1984 "
Cattle	8-to 16-cell	Continued in table 4	

Table 4. Effect of co-culture on the development *in vitro* of early bovine embryos

Initial cell stage	Culture system		No embryos	% > 16 cells	Mean cell /embryo	References
	Medium	Cells				
1-8 <sup>1)</sup>	Medium B 2, FCS	-	106	18	Camous et al, 1984	
	"	TV	190	46		
1 <sup>2)</sup>	TCM 199, FCS hormone*	-	44	0	Critser et al, 1986	
	"	Granulosa	22	36		
5-8 <sup>2)</sup>	Ham's F 10, FCS	-	27	0	Eyestone et al, 1987	
	"	BOEC	82	46		
1-2 <sup>2)</sup>	TCM 199, FCS	-	122	0.8	Kim et al, 1989	
	CZB	BOEC	138	28		
1-2 <sup>1)</sup>	CZB	-	13	85	Ellington et al, 1989	
	"	BOEC	40	93		
1-8 <sup>1)</sup>	TCM 199, FCS	-	37	3	Eyestone & First, 1989	
	"	BOEC	35	43		

1) *In vitro* maturation and fertilization,

2) *In vitro* maturation and fertilization

\*Hormone: 10 µg FSH & LH/ml, and 1 µg estradiol-17 β/ml

CZB: Chatot, Ziomek and Bavister medium, BOEC: bovine epithelial cell

TV: trophoblastic vesicle

이상의 결과로 보아 卵管上皮細胞 등의 Somatic cell에서 수정란의 발육촉진인자(embryotropic factors)가 생산·분비되는 것으로 추측되며 (Bavister, 1988), 난관은 수정의 장소를 제공할 뿐만 아니라 대부분의 동물종에서 수정후 8-16 세포기내의 수정란은 난관에 머문 후 자궁으로 이동되는 사실과도 일치된다.

### III. 結 言

牛卵胞卵의 體外成熟과 受精率은 배양액에 성선자극 hormone(GTH)과 granulosa cell 및 發情牛의 혈청을 첨가하면 향상됨이 확인되었다. 事實, 난포난은 GTH가 첨가되지 않은 배양액내에서도 M-II기로 成熟되나 雄性前核의 형상이 이르고, LH-Surge를 받은 후 6시간 이상 경과한 난포난은 정상으로 회복되는 점으로 보아 卵胞內 成熟分裂을 抑制하는 機構는 GTH에 의하여 해제되는 것이 확실하다(豊田, 1984). 卵胞卵의 성숙과 유지에 필요한 Estradiol-17 $\beta$ 를 생산 분비하는 卵胞內 Somatic cell(Kruip와 Dieleman, 1985)과 발정기의 GTH와 代謝物(metabolic substances)이 함유된 혈청(Sanbuissho와 Threlfall, 1989)의 첨가는 난포난의 성숙 및 發育能의 개선과 유지를 돕는 것으로 추측된다.

先體反應前 정자의 受精能獲得과 수정능 획득후 정자의 선체반응에 유효인자로 알려진 Ca<sup>2+</sup> ionophores와 heparin과 같은 fusogenic agents는 성숙난자의 투명대(Bleil과 Wassarman, 1983; Florman 등, 1984)와 cumulus/oocyte complex(Parrish 등, 1988)에 존재하며, 外因性的 heparin(Parrish 등, 1988) 또는 Caffeine과 併用(Niwa와 Ohgada, 1988)한 전처리 정자의 난세포질내 침입을 증가시키는 점 등을 고려할 때 이들 물질이 전처리 과정에서 fusogenic agent의 효과를 증진시키는 것으로 추정된다(Parrish 등, 1988). 한편, 생존정자의 분리(Swim-up Separation)가 수정율을 향상시키는 사실은 精子浮遊液의 조건을 개선하는데 기인되는 것으로 생각된다.

受精初期胚의 體外培養時 發現되는 "in vitro cell block"의 現象은 同種 또는 異種의 卵管內 移植으로 극복될 수 있으나, 이식란의 회수성적이 불확실한 문제점이 있다. 난관상피세포 등의 somatic cells과

수정초기배를 공동배양하면 8-16 세포기를 통과, 배반포기로 발육되고 세포수도 현저하게 증가되나 최외 수정란의 경우 16세포기 이상 발육율은 30~40% 선에 머문다. 앞으로 somatic cell에서 생산 분비되는 것으로 추정되는 embryotropic factors의 分離·精製와 體外培養系의 改善 등에 관한 연구가 요망된다.

大家畜에서 유전적으로 동일한 複制個體(clone)를 만들거나, 2개 이상의 受精卵에서 由來하는 複合個體(chimera)의 생산이 가능하게 되면 가축의 改良增殖과 新品種의 作出이 가능하고, 性支配와 受精卵의 移植術을 導入하게 되면 유전적으로 우수한 수정란의 이용효율을 증진시킬 수 있을 것이다. 가축의 경우는 실험동물에 비하여 수정전 성숙난자와 수정후 초기배의 입수가 어려운 문제점으로 하여 이 분야의 연구가 지연되어 왔으나, 앞으로 上記의 卵胞卵의 體外成熟, 受精과 發育에 대한 기술의 개발은 家畜胚를 이용한 發生工學分野의 연구개발에 활용이 기대된다.

### IV. 引用文獻

1. Allen, R.C. and Wright, R.W.Jr. 1984. *In vitro* development of porcine embryos in culture with endometrial cell monolayers or culture supernatants. J. Anim. Sci. 59 : 1657-1661.
2. Aoyagi, Y., Fujii, K., Irsazumi, Y., Furudote, M., Fukui, Y., Ono, H. 1988. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. Theriogenology 30 : 973-985.
3. Ball, G.D., Leibfried, M.L., Lenz, R.W., Ax, R.L., Bavister, B.D., and First, N.L. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28 : 717-725.
4. Bavister, B.D. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology 29 : 143-154.
5. Brackett, B.G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12 : 260-274.
6. Camous, S., Heyman, Y., Meziou, W. and

- Menezo, Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.* 72 : 479–485.
7. Carney, E.W. and Foote, R.H. 1988. Co-culture of rabbit two-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. 11th Int. Cong. on Anim. Reprod. 4 : 468.
  8. Critser, E.S., Leibfried-Rutledge, M.L., Eyestone, W.H., Northey, D.L. and First, N.L. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 25 : 150(Abstr.)
  9. Davis, D.L., and Day, B.N. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 46 : 1043–1053.
  10. Edwards, R.P. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, Rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature (London)* 208 : 349–351.
  11. Ellington, J.E., Carney, E.W. and Foote, R.H. 1989. Comparison of media in an early bovine embryo and oviduct epithelial cell co-culture system. *Theriogenology* 31 : 189.
  12. Eyestone, W.H. and First, N.L. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 85 : 715–720.
  13. Eyestone, W.H., Northey, D.L. and Leibfried-Rutledge, M.L. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.* 32(Suppl. 1) : 100(Abstr.)
  14. Eyestone, W.H., Northey, D.L. and Leibfried-Rutledge, M.L. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.* 32(Suppl. 1) : 100(Abstr.)
  15. Eyestone, W.H., Vignieri, J. and First, N.L. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology* 27 : 228(Abstr.)
  16. Florman, H.M., Bechtol, K.B. and Wasserman, P.M. 1984. Enzymatic dissection of the mouse eggs receptor for sperm. *Dev. Biol.* 106 : 234–255.
  17. Fukui, Y. and Sakuma, Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* : Relation to ovarian activity, follicular size and the presence of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 22 : 669–672.
  18. Gandolfi, F. and Moor, R.M. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 81 : 23–28.
  19. Garnier, V. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and bovine early embryos : improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27 : 59–68.
  20. Iritani, A. and Niwa, K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.* 50 : 119–121.
  21. Iritani, A., Utsumi, K., Miyake, M., Hosoi, Y. and Saeki, K. 1988. *In vitro fertilization by a routine method and by micromanipulation*. In : *In vitro fertilization and other assisted reproduction*. Annals of the New York Academy of Sciences 541 : 583–590.
  22. Kane, M.T. 1987. *In vitro* growth of preimplantation rabbit embryos. In : Bavister, B.D. (ed). *The mammalian preimplantation embryo : Regulation of growth and differentiation in vitro*. Plenum Press, New York, pp. 193–217.
  23. Kim, C.I., Ellington, J.E. and Foote, R.H. 1989. Maturation, Fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*(Submitted).
  24. Leibfried-Rutledge, M.L., Criser, E.S., Parrish, J.J. and First, N.L. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31 : 61–74.
  25. Luttbach, A., Koll, R.A. and Brem, G. 1987. *In vitro* maturation of bovine oocytes in co-culture with granulosa cells and their sub-

- equent fertilization and development. *Zuchthys* 22 : 145-150.
26. Niwa, K. and Ohgoda, O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30 : 733-741.
  27. Niwa, K., Ohgoda, O. and Yuhara, M. 1988. Effects of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on *in-vitro* penetration of cattle oocytes. 11 th Int. Cong. on Anim. Reprod. 3 : 346.
  28. Parrish, J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rotledge, M.L., Critser, E.S., Eystone, W.H. and First, N.L. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25 : 591-600.
  29. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. and First, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Bio. Reprod.* 38 : 1171-1180.
  30. Rexroad, C.E. Jr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 31 : 105-114.
  31. Sanbuisscho and Threlfall, W.R. 1989. The effect of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology* 31 : 693-699.
  32. Sato, E., Iritani, I. and Nishi Kawa. 1977. Factors involving maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap. Ani. Reprod.* 23 : 12-18.
  33. Sirard, M.A., Parrish, J.J., Ware, C.B., Leibfried-Rutledge, M.L. and First, N.L. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39 : 546-552.
  34. Suss, U., Wuthrich, K. and Stranzinger, G. 1988. Chromosome configuration and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.* 38 : 871-880.
  35. Sutton, R., Nan Carrow, C.D., Wallace, A.L.C. and Righy. 1984. Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. *J. Reprod. Fert.* 72 : 415-422.
  36. Tervit, H.R. and Rowson, L.E.A. 1974. Birth of Lambs after culture of sheep ova *in vitro* for up to 6 days. *J. Reprod. Fert.* 38 : 177.
  37. Xu, K.P., Greve, T., Smith, S. and Hyttel, P. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocytes maturation *in vitro*. *Acta. Vet. Scand.* 27 : 505-519.
  38. 入谷 明, 金正翔. 1983. 家畜卵 体外受精. 家畜繁殖研究会報 7(1) : 1-8.
  39. 豊田裕 1984. 受精と卵子の発達. 家畜繁殖学全書(望月公子編), 朝倉書店, pp. 226-247.