

## 호르몬 添加가 돼지 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 미치는 影響

權建五 · 鄭英彩 · 金昌根 · 尹鐘澤 · 崔善昊 · 柳範龍

中央大學校 畜産學科

### Effect of Hormones on Pig Oocytes Maturation and Fertilization In Vitro

Kwon, G.O., Y.C. Chung, C.K. Kim, J.T. Yoon, S.H. Choi, B.Y. Ryu

Depart. of Anim. Sci., Chung-Ang University

#### SUMMARY

This experiment was carried out to investigate *in vitro* maturation rate of pig follicular oocytes cultured from 30 to 48hr in TCM 199 supplemented with gonadotropins(FSH, LH) and estradiol-17 $\beta$  and *in vitro* fertilization with ejaculated sperm preincubated in BO medium containing 2mM caffeine and development of IVF oocytes.

The results obtained in this experiments were as follows :

1. In addition of hormones, *in vitro* maturation rate of follicular oocyte increased gradually from 36hr and 74.47% at 48hr in addition of hormones, but there was no differences among *in vitro* maturation rates after 36hr of culture.
2. Penetration rate of pig oocytes matured in FSH · LH · E<sub>2</sub> and FSH · E<sub>2</sub> was 71.8%, 71.0% and significantly increased by the addition of hormones.
3. Percentage of developed oocytes was 44.4% for oocytes matured in FSH + LH + E<sub>2</sub> - added medium and 48.7% for oocytes matured in FSH · E<sub>2</sub> - added medium, respectively.
4. Two to 16 cells stage embryos were obtained only when pig oocytes matured *in vitro* in hormones-added medium and 72hr after IVF.
5. From present results, it is concluded that gonadotropins and estradiol17 $\beta$  can enhance *in vitro* fertilization and subsequent development as well as *in vitro* maturation pig follicular oocytes.

#### I. 緒 論

家畜의 能力改良은 人工授精을 이용한 種牡畜을 중심으로 수행되어 왔으나 최근에는 受精卵 移植 技術의 實用化로 우수한 雌畜의 能力을 함께 이용한 改良方法에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다.

受精卵移植 技術은 물론이고 體外受精技術 발달을 위해서는 무엇보다도 經濟的이며 安定的으로 多量의 卵子를 供給할 수 있어야 하는데, 屠畜場에서 屠殺되는 개체의 卵巢에서 採取된 卵胞卵은 體外受精과 受精卵의 微細造作 및 發生工學的 尖端技術을 개발하기 위한 매

우 良好한 實驗材料가 될 뿐만 아니라 卵子의 成熟과 排卵 및 受精등의 生理學的 機作을 研究하는데 매우 有用한 材料로 이용이 가능하다.

Pincus와 Enzman(1935)이 처음으로 토끼 卵胞卵의 體外成熟을 報告한 후 돼지(Edwards, 1965)를 포함하여 많은 哺乳動物들의 體外成熟과 體外受精에 관한 研究가 행하여지고 있으나 아직까지도 哺乳動物 卵胞卵의 體外成熟이나 體外受精 技術개발은 아직 만족할 만한 成績을 얻지 못하고 있어서 이를 개선하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있다.

McGaughey(1977), Richter와 McGaughey(19

79)는 培養液중에서 estradiol-17 $\beta$ 가 體外成熟率을 有意的으로 減少시킨다고 하였으나 Răcowsky와 McGaughey (1982)는 體外培養할 때 BSA나 serum이 존재하는 경우는 estradiol이 卵子成熟 開始에 有意的인 影響을 미치지 않는다고 보고하였으나 metaphase I 이후의 成熟率은 steroid를 첨가하는 方法에 따라 차이가 있다고 하였다.

Meinecke와 Meinecke Tillmanne (1979)은 돼지 卵胞卵은 PMSG가 첨가된 培養液에서만 卵丘細胞가 膨化되고 Minato와 Toyoda (1982)는 m KRB에서 1% FCS와 性腺刺戟호르몬 10 IU를 첨가하면 卵丘細胞가 膨化되고 體外成熟率이 높아진다고 하였으나, Yoshida 등 (1989)도 性腺刺戟호르몬과 estradiol-17 $\beta$ 가 첨가된 培養液에서는 體外成熟率이 증가되며 卵丘細胞의 膨化도 PMSG 첨가시 매우 높게 나타났다고 보고하였다.

McGaughey와 Polge (1971)는 小卵胞卵을 體外培養한 결과 體外成熟에서 보다 體外成熟에 도달하는 시간이 길어진다고 보고하였으며 Sato 등 (1977)은 30시간 體外培養하였을 때 75%가 1978년도에는 培養後 39시간에 75%가 metaphase II에 도달한다고 보고하였다. Motlik 등 (1984)은 卵胞卵의 體外成熟이 卵胞의 크기에 따라 다르며 下등 (1989)은 體外培養 時間에 따라 外成熟率이 增加한다고 하였고, 金 등 (1989)은 大卵胞에서 採取한 卵胞卵이 體外成熟率이 빠르다고 보고하였다.

돼지 卵胞卵의 體外受精 能力에 관하여는 Motlik과 Fulka (1974)가 처음으로 體外培養한 卵胞卵을 암돼지 體內에 移植하여 自然交配 후 受精이 되었다고 보고된 이래 Iritani 등 (1978)이 암돼지의 摘出 生殖導管 내에서 前培養한 體內 受精能獲得 精子를 이용하여 成功하였으며, 精巢上體尾部 精子가 體外受精率에 높다고 하였다. Nagai 등 (1983)도 雌性生殖導管을 이용하여 精巢上體 精子와 射出精子를 前培養하여 體外受精의 成功을 報告하였다.

Pavlok (1981)는 射出精子를 高濃度로 前培養하여 zona free 돼지 卵子에서 精子 侵入를 報告하였고, Nagai 등 (1984)도 精巢上體 精子를 前培養할 때 精子濃도에 따라서 精子 侵入率에 差異가 있으며 永井 (1985)도 精巢上體 精子를 高濃度에서 前培養할 때 精子 侵入率은 높아진다고 보고하였다.

豊田 (1985)은 體內 및 體外成熟卵자의 受精率에 있

어서 體內成熟卵자가 높았고 前核形成도 빠르며 精子 侵入率도 높다고 하였으며 兵野와 豊田 (1986)은 射出精子를 高濃度에서 前培養할 때 侵入率에 높으며, 體內成熟卵자는 2-8細胞期로 發達하였다고 報告하였다. Yoshida (1987)는 體內成熟卵자를 體外受精하여 수정란을 얻었으며 多精子 侵入는 種牡豚에 따라 差異가 있다고 하였으며, Nagai 등 (1988)은 凍結 融解 精巢上體 精子로 體外受精하여 좋은 成績을 報告하였다.

Cheng 등 (1986)은 前培養한 射出精子와 體內成熟卵자와의 體外受精에서 受精卵을 얻어 이를 移植하여 19마리의 産子를 最初로 얻었으며 Mattioli 등 (1989)은 體外成熟 卵胞卵을 射出精子로 體外受精하여 2-4細胞期 卵자를 8頭에 移植하여 1頭에서 9마리의 體外受精産子를 얻는데 成功하였다.

그러나 아직까지도 돼지 卵胞卵의 體外成熟이나 體外受精에 관한 연구결과가 만족할 수준에 이르지 못하고 있으며 특히 돼지의 卵胞卵을 體外受精시켜 産子를 얻은 것은 Mattioli 등 (1989)뿐으로서 돼지 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 관하여 앞으로 더 많은 연구가 요구되며 해결해야 할 問題點도 많이 남아 있다.

따라서 본 實驗은 未成熟 돼지 卵胞卵을 利用하여 性腺刺戟호르몬 및 estradiol-17 $\beta$ 가 卵胞卵의 體外成熟, 體外受精 및 胎發生에 미치는 影響을 究明하기 위하여 實施하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試精液 및 卵巢

供試精液은 忠清南道 唐津에 소재하고 있는 唐津 養豚協會 種豚場에서 사육되고 있는 Hampshire, Yorkshire, Duroc, Chestwhite, Landrace 등의 種牡豚으로부터 水壓法으로 濃厚精液만을 分離 採取하여 供試하였다. 供試卵巢는 畜協中央會 가락동 屠畜場에서 屠殺된 生殖器에 異常이 없고, 黃體나 白體가 형성되지 않은 돼지의 卵巢를 採取하여 供試하였다.

### 2. 卵胞卵의 體外成熟

#### 1) 卵胞卵의 採取

屠殺 直後 正常生殖器를 가진 未經産豚으로부터 兩側 卵巢를 摘出した 후 抗生劑 (penicillin G 0.006g/100 ml, streptomycin 0.005g/100ml)가 첨가된 0.9% 滅菌 生理食鹽水로 2~3회 洗滌後 生理食鹽水가 담긴

保溫瓶(33~35°C)에 남아 3시간 이내에 39°C 恒溫實驗室內로 運搬하여, 37°C의 生理食鹽水로 供與된 卵巢를 2회 洗滌하였다. 未成熟卵胞卵의 採取는 Ball 등(1982)의 方法에 따라 39°C 恒溫室에서 卵胞 直徑 5mm 이하의 正常卵胞로 부터 10ml 注射器와 20 gauge 注射針을 사용하여 卵巢 實質을 찌른 후 연속적으로 卵胞液을 吸入 採取하였다.

採取된 卵胞液은 10ml 試驗管에 담아 10분간 定置한 다음 下端液을 spoid로 吸入하여 少量의 培養液이 들어있는 petri dish (Falcon Plastic, 300I)에 담아 實體顯微鏡하에서 卵丘細胞層과 卵子的 細胞質이 充實한 卵胞卵만을 選別하여 供試하였다.

## 2) 培養液의 製造

### (1) 卵胞卵의 體外成熟 培養液

본 實驗에 사용된 卵胞卵의 體外成熟 培養液은 TCM 199(Earle's Salt, Gibco, USA)에 50 $\mu$ g/ml gentamycin(국제약품공업주식회사)을 첨가한 것을 基本 培養液으로 하여 FSH(5 $\mu$ g/ml), LH(10 $\mu$ g/ml), estradiol-17 $\beta$ (1 $\mu$ g/ml)등의 添加 有無에 따라 4가지 배양액을 plastic petri dish(300I, Falcon Plastic, USA)에 2ml씩 넣은 후 滅菌 파라핀 오일로 皮覆하고 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 39°C CO<sub>2</sub>배양기에서 12시간 동안 前培養을 實施하여 平衡시켰다.

Fetal bovine serum(FBS: 240-1555, GIBCO, USA)은 56°C에서 30분간 非同化시킨 후 0.2 $\mu$ m mellpore filter로 濾過한 후 사용시까지 -20°C에서 冷凍 保存하였으며, 각 培養液에 10%가 되도록 첨가하였다.

### (2) Hormone stock solution 製造

LH와 FSH(덴카製藥株式會社, 日本)는 適定 稀釋倍率에 되게 基本倍地로 稀釋하였으며, estradiol-17 $\beta$ (No. E-8875, Sigma, USA)는 먼저 0.01g을 1ml의 ethanol에 溶解시킨 후 培養液 9ml를 첨가하여 總 10ml가 되게 하였고, 培養液 중 ethanol濃度는 1%를 초과하지 않게 하였다. 각각의 hormone stock solution은 製造하여 사용할 때까지 小滴으로 分注하여 -20°C에서 冷凍 保存하였다.

### (3) 卵胞卵의 體外成熟 및 判定

未成熟 卵胞卵의 體外成熟은 12時間 平衡시킨 2ml의 培養液이 들어있는 petri dish에 10~15개의 卵胞卵을 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 39°C CO<sub>2</sub> 培養器에

서 30, 36, 42, 48時間 동안 體外成熟을 實驗하였다.

體外成熟 判定은 培養이 끝난 卵胞卵을 0.3% hyaluronidase(Sigma, USA)液에 3분간 沈漬하여 卵丘細胞를 제거하였으며, 卵丘細胞가 제거된 卵子是 slide glass에 옮겨 cover glass로 덮어 定置한 後 固定液인 aceto-ethanol solution(acetic acid 1: absolute ethanol 3)에 沈漬하여 24시간 固定하였다.

固定된 卵子是 1% aceto-orcein solution으로 染色을 實施한 後 cover glass 주위를 nail enamel로 封入하여 標本을 製作하였으며, 位相差 顯微鏡으로 核型的 狀態를 觀察하여 卵胞卵의 體外成熟 與否를 McGaughey와 Polge(1971), Sato 등(1978)의 方法으로 判定하였다.

## 3. 精子的 處理

精子的 採取는 種牡豚으로 부터 手壓法으로 주 2회 채취하였다. 채취된 精液은 즉시 液狀精液 製造用 稀釋液(Modena, SGI, USA)과 1:1로 혼합하여 18°C의 低溫 incubator에 10시간 이상 保存하였다.

精子的 受精能獲得은 BO 培養液(Brackett와 Oliphant, 1975)에 2mM caffeine과 5mg/ml BSA를 첨가하여 保存된 液狀精液 중 精子活力 70%이상인 稀釋 精液 2ml와 同量 稀釋하여 2,500rpm에서 10분간 遠心分離하여 3회 洗滌하였으며, 2mM caffeine과 10 mg/ml BSA가 함유된 BO 培養液으로 精子濃度는 2 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml로 하여 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 39°C CO<sub>2</sub>배양기에 4시간 동안 培養하여 精子的 受精能獲得을 야기시켰다.

## 4. 體外受精 및 胚發生卵

體外受精은 42시간 體外成熟된 卵胞卵을 이용하였으며 4시간 前培養된 精子を 2 $\times$ 10<sup>7</sup>cell/ml濃度로 조정하여 200 $\mu$ l의 drop을 만든 후 滅菌 paraffin oil로 皮覆하여 각각 10~15개의 成熟 卵胞卵을 注入하여 20시간 동안 受精을 實施하였다. 受精된 卵子중 一部는 體外成熟率 判定과 같은 方法으로 染色하여 Motlik과 Fulka(1974), Iritani 등(1978)의 方法으로 體外受精率을 檢査하였으며, 體外受精은 精子的 侵入, 頭部の 膨化, 前核 形成, 多精子侵入으로 判定하였다. 一部는 胚發達을 調査하기 위하여 FCS가 10% 첨가된 TCM 199 培養液에 옮겨 52시간 동안 追加 培養한 다음 胚發生率을 實體顯微鏡下에서 檢査하였다.

## 5. 統計分析

體外成熟率의 統計分析은 Yates 補正을 하여  $\chi^2$  檢定을 하였다.

## IV. 結果 및 考察

### 1. 호르몬의 添加 및 培養時間에 따른 體外成熟率

基本培養液 TCM 199에 性腺刺戟호르몬 및 estradiol-17 $\beta$  첨가 有無와 體外 培養時間에 따른 돼지 未成熟 卵胞卵의 體外 成熟率은 Table 1과 같다.

卵胞卵의 體外成熟率은 性腺刺戟호르몬과 E<sub>2</sub>의 첨가에 관계없이 體外培養시간에 따라서 增加하였다. 性腺刺戟호르몬과 E<sub>2</sub> 添加區는 體外培養 30시간 이후에 體外成熟率이 높아져 培養時間이 經過함에 따라 有意하게 增加하였고 호르몬 無添加區에서도 體外培養 36시간 이후에 體外成熟率이 增加하여 시간이 지남에 따라 48시간 이후에 有意적으로 향상되었다.

FSH, LH 및 E<sub>2</sub>의 添加區와 FSH와 E<sub>2</sub>의 添加區

에서는 體外培養 42시간에 70% 이상의 metaphase II에 到達하였지만 體外培養 36시간 이후에는 큰 차이가 없었다. 그러나 LH와 E<sub>2</sub> 添加區에서는 體外培養 48시간에 62.5%가 metaphase에 도달하였고, LH와 E<sub>2</sub> 添加區의 體外成熟率은 다른 添加區에 比하여 다소 낮았다. 이와 같이 돼지 卵胞卵의 體外成熟率은 性腺刺戟 호르몬 및 E<sub>2</sub> 첨가에 의하여 有意하게 增加하였으며 특히 FSH 첨가가 LH 첨가보다는 體外成熟率에 有效한 作用을 하였다.

Hunter와 Polge(1966), McGaughey(1977)가 HCG 注射 후 36시간에 *in vivo*에서 metaphase II에 도달율이 最高值에 이룬다고 하여 FSH 添加區는 비슷한 성적을 보이거나 호르몬 無添加區나 FSH가 첨가되지 않은 區에서는 약 6시간의 差異를 나타내고 있다. 그러나 Meinecke와 Meinecke Tillmann(1979)은 HCG 주사 후 體內成熟에서 4~8시간의 潛伏期가 필요하다고 하여 본 성적과 매우 料似한 結果로 생각된다.

호르몬 無添加區의 36, 42시간의 體外成熟率은 FSH와 LH 및 E<sub>2</sub> 添加區에 比하여 有意적으로 낮았

Table 1. Effect of various combinations of gonadotropins and estradiol-17 $\beta$  on timing of nuclear maturation of pig oocytes.

Maturation medium <sup>a)</sup>			Culture period (hr)	No. of oocyte examined	No. of oocyte <sup>b)</sup>		Significance in % of Met II		
FSH	LH	E <sub>2</sub>			GV	Met II	P vs 30hr	P vs 48hr	P vs Contl
-	-	-	30	22	8	5(22.73)	-	<0.01	-
			36	31	17	7(22.58)	NS	<0.01	-
			42	34	6	11(32.35)	NS	<0.01	-
			48	41	13	26(63.90)	<0.01	-	-
+	-	-	30	27	2	9(33.33)	-	<0.01	NS
			36	42	9	22(52.38)	<0.05	NS	<0.01
			42	56	2	41(73.21)	<0.01	NS	<0.01
			48	47	2	35(74.47)	<0.01	-	NS
-	-	-	30	29	2	8(27.59)	-	<0.01	NS
			36	33	5	18(54.55)	<0.01	NS	<0.01
			42	55	6	39(70.91)	<0.01	NS	<0.01
			48	47	6	35(74.47)	<0.01	-	NS
-	+	+	30	24	10	4(16.67)	-	<0.01	NS
			36	34	14	11(32.35)	<0.05	<0.01	NS
			42	39	6	21(53.85)	<0.01	NS	<0.05
			48	40	6	25(62.50)	<0.01	-	NS

<sup>a)</sup>FSH : 5 $\mu$ g/ml, LH : 10 $\mu$ g/ml, Estradiol 17 $\beta$  : 1 $\mu$ g/ml

<sup>b)</sup>GV : Germinal vesicle, Met II : Metaphase II with first polar body

고, LH와 E<sub>2</sub>添加區에서는 42시간에서만 有意的 差  
 異가 있었으며 體外培養 48시간은 對照區와 차이가 없  
 었다.

이상과 같이 體外 培養時間에 따른 성적은 Minato  
 와 Toyoda(1982), 金 등(1989), 下 등(1989)의 결과  
 와는 비슷하지만, McGaughey와 Polge(1971)의 體  
 外成熟率보다는 다소 높고 metaphase II에 到達하는  
 시간도 약간 빠른 편이었다. 또한 Sato 등(1977,  
 1979)의 體外成熟率과도 비슷한 성적이었으나 meta-  
 phase II에 도달하는 시간은 약간 늦은 경향이었으며  
 Yoshida 등(1989)의 體外成熟率보다 다소 낮은 성적  
 이었고, metaphase II에 도달하는 시간도 역시 늦은  
 傾向이었다.

本實驗에서 호르몬 無添加區는 體外培養 48시간에 最  
 高 成熟率을 나타내고 호르몬 添加區는 36시간에 最  
 高 成熟率을 나타내어 性腺刺戟호르몬이 卵子的 核成熟 分  
 裂 開始에 작용하는 것 같다.

Estradiol-17β 첨가에 따른 體外 成熟率도 Mc-  
 Gaughey(1977), Richter와 McGaughey(1979),  
 Racowsky와 McGaughey(1982) 등은 돼지 卵子的 體  
 外成熟을 抑制한다고 하였으나, 本實驗에 사용된 1μg  
 /ml의 E<sub>2</sub>는 돼지 卵胞卵의 體外成熟에 영향을 미치지  
 않는 것으로 생각된다.

따라서 돼지 卵胞卵의 性腺刺戟호르몬 첨가에 따른  
 體外成熟率은 E<sub>2</sub>와 관계없이 향상시켰고 FSH와 LH  
 의 相互 共同作用은 없는 것으로 생각되며 돼지 卵胞卵  
 의 體外成熟에는 FSH가 보다 크게 작용하는 것으로  
 생각된다.

## 2. 體外成熟 卵胞卵의 體外受精率

基本 培養液 TCM 199에 性腺刺戟호르몬과 E<sub>2</sub>를 첨

가하여 42시간 體外成熟시킨 卵胞卵을 BO 培養液에  
 caffeine을 첨가하여 4시간 前培養시킨 돼지 射出精子  
 를 이용하여 受精 후 20시간에 受精率을 調査한 結果는  
 Table 2와 같다.

호르몬 無添加區는 43%의 精子 侵入率을 나타내고  
 FSH와 LH 및 E<sub>2</sub> 添加區에서 體外成熟된 卵胞卵은  
 71.8%, FSH와 E<sub>2</sub> 添加區는 72.0%, LH와 E<sub>2</sub> 添  
 加區는 53.6%로 호르몬 添加區에서 體外成熟된 卵胞  
 卵은 모두 50% 이상의 受精率을 나타내었고 對照區의  
 體外受精率은 LH와 E<sub>2</sub> 添加區와는 有意差가 없었으  
 나 호르몬 添加區에서 體外成熟된 卵胞卵의 體外受精率  
 보다는 有意的으로 낮았다.

性腺刺戟호르몬과 E<sub>2</sub> 첨가에 의하여 體外成熟된 卵  
 胞卵의 體外受精率이 향상되었으며 이에 따라 多精子  
 侵入率도 증가되었다. 그러나 LH와 E<sub>2</sub> 添加區에서  
 體外成熟된 卵胞卵의 受精率은 차이가 없으면서 多精子  
 侵入率은 증가하였다. 특히 FSH가 첨가된 處理區에  
 서 體外成熟된 卵胞卵은 精子頭部の 膨化나 前核形成率  
 이 無處理區에 비하여 매우 높게 나타났다.

Iritani 등(1978), Nagai 등(1984), 永井(1985)은  
 射出精子에서는 受精率을 얻지 못하고 豊田(1985)은  
 射出精子에 ionphore A23187로 前培養하고 受精培地  
 에 2mM caffeine을 첨가하여 4시간에 67%의 精子  
 侵入率을 얻어 本實驗 결과와 類似하였으나 體外成熟되  
 卵子에서는 卵內 侵入된 精子의 頭部 膨化와 前核形成  
 率이 매우 낮다고 하였다.

Cheng 등(1986)과 Yoshida 등(1987)이 射出精子  
 로 前培養하여 體內成熟 卵子和 體外受精으로 얻은 精  
 子侵入率(89%, 95%) 보다는 낮은 결과였다. 그러나  
 Mattioli(1989)은 射出精子로 78%의 侵入率과 47%

Table 2. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured in various media for 42hr

Maturation medium			No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated*				
FSH	LH	E <sub>2</sub>		Total(%)	I	II	III	Polyspermy(%)
-	-	-	25	11(44.0) <sup>a</sup>	8	0	0	3(27.3)
+	.	+	39	28(71.8) <sup>b</sup>	7	6	4	11(39.3)
+	-	+	38	27(71.0) <sup>b</sup>	11	7	0	9(33.3)
-	+	+	28	15(53.6) <sup>a</sup>	7	1	1	6(40.0)

Oocytes were examined 20hr after insemination

\* : I : unswollen sperm head, II : enlarged sperm head, III : pronuclear.

<sup>a,b</sup> : Values with different superscripts differ significantly (P<0.05)

多精子侵入를 報告하여 本 實驗成績과 비슷한 결과를 나타내었다.

FSH와 LH의 添加區에서 精子侵入率과 精子頭部의 膨化, 前核形成率이 높은 것은 Mattioli 등(1988a, b)이 卵胞卵을 conditioned medium에 co-culture 하였을 때 follicle cell이 생산하는 soluble factor가 卵胞卵의 細胞質 成熟에 영향을 미쳐 精子의 頭部 膨化와 雄性前核 形成이 良好하다고 한 結果와 類似하였다.

### 3. 體外受精 卵胞卵의 胚發生率

性腺刺戟호르몬과 E<sub>2</sub>가 첨가된 培養液으로 體外成熟된 卵胞卵을 2mM caffeine이 함유된 BO 培養液에서 20시간 受精시킨 후 FCS가 10% 함유된 TCM 199 胚發生 培養液에서 52시간 追加 培養하여 얻은 胚發生率은 Table 3과 같다.

對照區에서 體外成熟된 卵胞卵의 胚發生率은 17.6% 이었고 FSH와 LH 및 E<sub>2</sub>가 첨가된 培養液에서 體外成熟된 卵胞卵의 胚發生率은 44.4%, FSH와 E<sub>2</sub> 添加區에서 成熟된 卵胞卵의 胚發生率은 48.7%, LH와 E<sub>2</sub> 添加區에서 體外成熟된 卵胞卵의 胚發生率은 27.0%이었다.

FSH와 LH 및 E<sub>2</sub> 添加區나 FSH와 E<sub>2</sub> 添加區에서 體外成熟된 卵胞卵의 胚發生率은 無添加區나 LH와 E<sub>2</sub> 添加區에서 體外成熟된 卵胞卵의 胚發生率보다는 有意的으로 높았다.

胚發生段階를 살펴보면 호르몬 添加區에서 體外成熟된 卵胞卵은 16細胞期까지 발달하였으나 無添加區는 2細胞期 밖에 進行되지 못하였으며 胚發生도 Table 3에서 보는 바와 같이 體外受精率과 같은 傾向을 나타내고 있다.

이와 같은 成績은 兵野와 豊田(1986)이 體內成熟卵子和 體外受精하여 48시간에 2-8細胞期로 발달한다고

하여 本 實驗結果와 비슷한 胚發達 速度를 나타내었고, Cheng 등(1986)도 體外受精 40시간에 86%의 2-4細胞期 胚發生率을 얻어서 胚發生率은 本 實驗 結果보다는 높았으나 胚發生速度는 비슷하였다.

Yoshida(1987)는 體外成熟 卵子를 體外受精하여 28~72시간에 2-8細胞期の 胚發生率을 報告하여 本 實驗의 結果보다는 약간 낮은 傾向이었으나, Mattioli 등(1989)은 體外受精 후 44시간에 34%가 2-4細胞期로 발달하였다고 하여 本 實驗과 매우 類似한 結果를 나타내었다.

이와 같이 性腺刺戟호르몬과 estradiol 17β가 未成熟 卵胞卵의 體外成熟을 向上시킬 뿐만 아니라 胚發達에도 영향을 미치는 것으로 思料된다.

## V. 摘要

本 實驗은 未成熟 돼지 卵胞卵을 이용하여 기본 培養液 TCM 199에 性腺刺戟호르몬(FSH, LH)과 estradiol 17β를 添加하여 시간별(30, 36, 42, 48)로 體外成熟率을 調査하였으며, 射出精子를 液狀精液으로 제조하여 BO 培養液에 2mM caffeine으로 體外受精能을 獲得시켜 體外受精率과 胚發達率을 조사한 結果는 다음과 같다.

1. 호르몬 添加에 따른 시간별 卵胞卵의 體外成熟率은 36시간에 증가하여 시간이 경과함에 따라 尙상되었으며, FSH, LH 및 estradiol-17β 添加區와 FSH 및 estradiol 17β 添加區에서 48시간에 74.47%로 最高值의 metaphase II 도달율을 나타내었으나, 體外培養 36시간 이후에는 유의적인 차이가 없었다.
2. 호르몬 添加 有無에 따라 體外成熟된 卵胞卵의 體外受精率이 차이를 나타냈으며, FSH, LH 및

Table 3. Development of pig eggs cultured for 72hr in vitro after insemination

Maturation medium			No. of eggs examined	No. of oocytes developed				
FSH	LH	E <sub>2</sub>		2 cell	4 cell	8 cell	16 cell	Total(%)
-	-	-	34	6	0	0	0	6(17.6) <sup>a</sup>
+	+	+	36	6	2	6	2	16(44.4) <sup>b</sup>
-	-	+	39	6	5	6	2	19(48.7) <sup>b</sup>
-	+	+	37	4	4	0	2	10(27.0) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Values with different superscripts differ significantly (P<0.01)

estradiol 17 $\beta$ 添加區와 FSH 및 estradiol-17 $\beta$ 添加區에서 體外成熟된 卵胞卵의 體外受精率은 71.8%, 71.0%이었다.

3. 호르몬添加에 따라서 體外成熟된 卵胞卵의 胚發生率은 FSH, SH 및 estradiol-17 $\beta$ 添加區에서 體外成熟된 卵胞卵은 44.4%, FSH 및 estradiol-17 $\beta$ 添加區에서 體外成熟된 卵胞卵은 48.7%이었다.

4. 호르몬이 첨가된 培養液에서 體外成熟된 卵胞卵은 體外受精 72시간 이후에 2-16細胞期로 발달되었다.

5. 이상과 같은 결과로 性腺刺戟호르몬과 estradiol-17 $\beta$ 가 돼지 卵胞卵의 體外成熟率 뿐만 아니라 體外受精率 및 胚發生率도 향상시킴을 알 수 있었다.

#### IV. 引用文獻

1. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12, 260-274.
2. Cheng, W.T.K., Moor, R.M. and C. Polge. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology Vol. 25 No. 1(abstr.).
3. Edwards, R.G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature 208 : 349-351.
4. Hunter, R.H.F. and C. Polge. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotropin. J. Reprod. Fert. 12 : 525-531.
5. Iritani, A., K. Niwa and H. Imai. 1978. Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 54 : 379-383.
6. Mattioli, M., G. Galeati and E. Seren. 1988a. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. Gamete Res. 20 : 177-183.
7. Mattioli, M., G. Galeati, M.L. Bacci and E. Seren. 1988b. Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte. Gamete Res. 21 : 223-232.
8. Mattioli, M., M.L. Bacci, Galeati and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocyte matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology 31 : 1201-1207.
9. McGaughey, R.W. and C. Polge. 1971. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *in vitro*. J. Exp. Zool. 176 : 383-396.
10. McGaughey, R.W. 1977. The culture of pig oocytes in minimal medium and the influence of progesterone and estradiol 17 $\beta$  and meiotic maturation. Endocrinology 100 : 39-45.
11. Meineck, B. and Meinecke-Tillmann, S. 1979. Effects of gonadotropins on oocyte maturation and progesterone production by porcine ovarian follicles cultured *in vitro*. Theriogenology 11 : 351-365.
12. Minato, Y. and Y. Toyoda. 1982. Effects of homologous serum and follicular fluid on the cumulus expansion and maturation division of porcine oocyte-cumulus complexes *in vitro*. Jpn. J. Zootech. Sci. 53 : 515-520.
13. Motlik, J. and J. Fulka. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. J. Reprod. Fert. 36 : 235-237.
14. Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. J. Reprod. Fert. 72 : 323-328.
15. Nagai, T., K. Niwa, A. Iritani and W. Leidl. 1983. Improved rates for sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. Jap. J. Fert. Steril. 28 : 313-318.
16. Nagai, T., K. Niwa and A. Iritani. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertiliza-

- tion *in vitro* of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 70: 271-275.
17. Nagai, T., T. Takahashi, H. Masuda, Y. Shioya, M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki and A. Hanad. 1988. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J. Reprod. Fert. 84: 585-591.
  18. Pavlok, A. 1981. Penetration of hamster and pig zona free eggs by ejaculated spermatozoa preincubated *in vitro*. Int. J. Fertil. 26: 101-106.
  19. Pincus, G. and E.V. Enzmann. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs. J. Exp. Med. 62: 665-675.
  20. Racowsky, C. and R.W. McGaughey. 1982. In the absence of protein, estradiol suppressed meiosis of porcine oocytes *in vitro*. J. Exp. Zool. 224: 103-110.
  21. Richter, J.D. and R.W. McGaughey. 1979. Specificity of inhibition by steroids of porcine oocytes maturation *in vitro*. J. Exp. Zool. 209: 81-90.
  22. Sato, E. and T. Ishibashi. 1977. Meiotic arresting action of the substance obtained from cell surface of porcine granulosa cells. Jap. J. Zootech. Sci. 48: 22-26.
  23. Sato, E., A. Iritani and Y. Nishikawa. 1978. Rate of maturation division of pig follicular oocytes cultured *in vitro*. Jap. J. Zootech. Sci. 49: 400-405.
  24. Yoshida, M. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. Jap. J. Vet. Sci. 49: 711-718
  25. Yoshida, M., K. Bamba, and K. Yoshida. 1989. Effects of gonadotropins and estradiol- $17\beta$  on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured *in vitro*. Jap. J. Anim. Reprod. 35: 86-91.
  26. 兵野雅三, 豊田 谷. 1986. 高濃度で前培養された射出精子による豚精子の体外受精. 家畜繁殖誌 32: 177-182.
  27. 永井 卓. 1985. フォークにわけの体外受精. 家畜繁殖誌. 31: 45-51.
  28. 豊田 曲. 1985. フォークにわけの体外受精. 家畜繁殖誌. 31: 40-44.
  29. 金昌根, 鄭英採, 李明植, 尹鐘澤, 方明杰. 1989. 未經産 돼지 卵胞卵의 体外成熟 및 体外受精에 관한 研究. 中央大 遺傳工學研究論輯 2: 1.
  30. 下泰鎬, 沈金燮, 宋海範. 1989. 培養液의 種類가 돼지 卵胞卵의 体外成熟에 미치는 影響. 韓國畜産學會誌 31: 363-372.