

돼지 受精卵移植의 現況과 問題點

朴 昌 植

忠南大學校 農科大學 畜産學科

Advances and Problems of Embryo Transfer in Swine

C. S. Park

Department of Animal Science, College of Agriculture, Chungnam National University

Summary

Remarkable progress has recently been made in embryo transfer technology, resulting in the birth of IVF and nuclear transfer offsprings in swine.

However, further progress of the technology to (1) make a safe, effective and economic estrual-cycle synchronization compound, (2) regulate each step of sperm capacitation (3) induce monospermic fertilization, (4) in vitro grow and mature oocytes, (5) fertilize the oocytes efficiently, (6) culture the oocytes to the blastocyst stage in defined media, (7) produce multiply copies of embryos with superior genetic merit, (8) pre-select the sex of these superior offsprings, and (9) preserve embryos by freezing and storage in liquid nitrogen is required before this promising technology is applied routinely to swine for practical use.

緒 論

受精卵移植은 in vivo나 in vitro에서 胚兒의 發達과 生存이나 妊娠維持에 미치는 要因들을 究明하는 價値 있는 實驗道具일 뿐만 아니라 疾病의 調節 및 遺傳의 改良에 크게 寄與할 수 있다는 事實에서 重要한 課題가 되고 있다.

돼지의 受精卵移植은 Kvansnikii(1951)에 의해 最初로 成功하였으며, 오늘날 대부분의 實驗室에서 많이 使用되고 있는 受精卵의 回收과 移植方法이 1960年代 Hancock와 Hovell(1962), Dziuk等(1964), 그리고 Vincent 等(1964)에 의해 開發된 이래 主要 實驗室內에서의 研究에 限定되어 왔다.

最近 in vivo에서 成熟된 卵子를 體外 受精시켜 正常仔豚을 生産한 結果가 Cheng(1985), Yoshida (1987, 1989), Nagai 等(1988)에 의해서, in vitro에서 成熟시킨 卵胞卵을 體外受精시켜 正常仔豚을 生産한 結果가 Mattioli 等(1989)에 의해서, 核移植受精卵의 移植後 1頭의 仔豚을 生産한 結果가 Prather 等 (1989)에 의해서 報告되므로써 돼지 受精卵移植技術의 實用化 可能性을 나타내었다.

受精卵移植技術을 實用化하기 위해서는 體外受精技

術의 開發이 무엇보다도 重要하기 때문에 여기에서는 지금까지 進行되어 온 體內受精에 의한 受精卵移植의 研究結果를 잠깐 살펴보고 體外受精의 研究結果를 中心으로 受精卵移植의 現況과 問題點을 살펴보고자 한다.

1. 發情同期화와 過排卵誘起

受精卵移植의 成功에 영향을 주는 要因들중의 하나가 供卵豚과 受卵豚 사이의 發情同期화로써, 受卵豚과 供卵豚의 發情週期の 段階가 1日以上 差異가 있을 경우 妊娠率과 胎兒生存率이 減少된다는 것은 이미 잘 알려진 事實이다. 現在 돼지의 發情同期화를 위해서 가장 많이 使用하는 것은 經口投與 progesterin인 Allyl trenbolone 혹은 Altrenogest (REGU-MATE, Roussel Ltd)이다. Table 1을 살펴보면 Altrenogest 處理가 끝난 後 6日內에 80%, 8日內에 98% 정도 發情을 나타내었다. 15mg/日 處理區에서는 處理後 5日에, 20mg/日 處理區에서는 處理後 6日에 最大의 發情反應을 나타내었다 (Webel, 1978). 以上の 結果는 Redmer 等(1979), Pursel 等 (1981), 그리고 Son(1988)의 報告와 비슷한 傾向을 보였다.

Table 1. Oestrus synchronization in gilts

		Altrenogest treatment for 18 days	
		15	20
		(mg / day)	(mg / day)
Number treated		144	84
Number showing oestrus after treatment		141	83
Day of onset of oestrus after treatment	4	8.5	-
(% of animals)	5	58.9	25.3
	6	27.0	53.0
	7	5.7	16.9
	8	-	4.8
Average number of corpora lutea / animal		15.5	15.6
% eggs fertilized		89.8	92.3

(Webel, 1978)

供卵豚의 過排卵은 一般의으로 生殖腺 刺戟호르몬의 投與에 의해서 이루어질 수 있다. Hunter(1964)는 成熟한 未經産豚에서 發情週期 15~16일에 1000~1500 IU PMSG를 投與하므로써 20~30個의 排卵된 卵자를 얻을 수 있다고 報告하였다. 600 IU PMSG 와 200 IU HCG를 混合해서 한번 投與해도 위와 같은 結果를 얻을 수 있다. Polge 等(1968)은 發情同期化 處理後에 生殖腺刺戟호르몬을 投與 할 수 있다고 하였으며, PMSG 處理後 3.5~4일에 正常의인 發情이 나타나며 PMSG 處理後 72時間에 500 IU HCG를 投與하면 排卵時間의 同期化를 할 수 있다고 하였다. Pursel(1983)은 排卵時間 調節을 위해 다음과 같은 方法을 使用했다. 未經産豚 1頭當 1.8kg 飼料에 15mg의 Altrenogest를 混合하여 5~9日間(發情週期 10~16日 사이에서 給與始作) 經口投與하고, Altrenogest 마지막 給與後 24時間 지나서 400 IU PMSG와 200 IU HCG를 投與하고 PMSG-HCG 投與後 78時間 지나서 500 IU HCG를 投與하여 42~44時間 後에 平均 25(14~48)個의 排卵된 卵자를 回收하였다고 報告하였다. Yoshida(1987, 1989)는 供卵豚의 過排卵을 誘起시키기 위해서 發情週期 16일에 1000~1500 IU PMSG를 投與하고 72時間後에 500 IU HCG를 投與하였는 바, HCG 投與後 39~40時間에 屠殺하여 卵巢를 剔出하고 卵胞(直徑 7~12mm)로 부터 卵母細胞를 回收하였고, 40~42時間에 排卵된 卵자를 卵管으로 부터 回收하였다고 報告하였다. 受卵豚은 發情週期 16일에 1000 IU PMSG를 投與하고, 84時間後에 500 IU HCG를 投與하였으며,

HCG를 投與後 54~72時間에 受精豚의 卵管에 受卵卵을 移植하였다고 報告하였다.

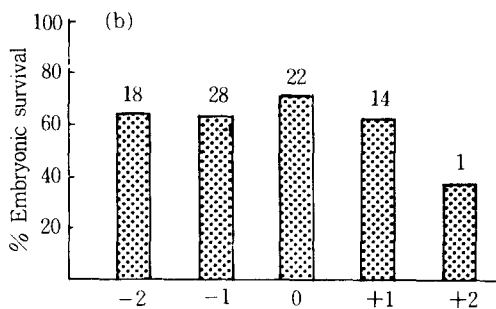
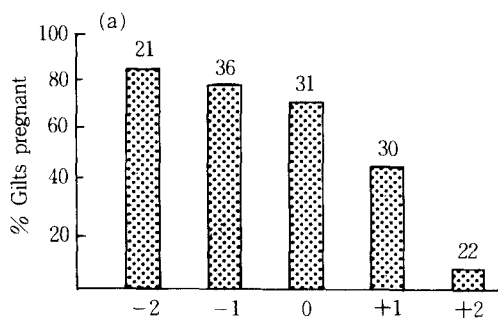
以上の 方法들이 發情同期화와 過排卵 處理를 위해서 利用되고 있으나 좀 더 經濟的이고 廣範圍하게 利用되어 질 수 있는 安全하고 效果的인 發情同期化 物質의 開發이 要求되고 있다.

2. 體內에서 受精된 受精卵의 移植結果

Figure 1(a)를 살펴보면 妊娠率은 受卵豚의 發情開始가 供卵豚과 同期化되거나 1日 혹은 2日 늦을 때 70% 以上 이었고, 가장 높은 妊娠率(86%)은 受卵豚의 發情이 供卵豚 보다 2日 늦게 왔을 때 이루어졌다. 한편, 受卵豚의 發情이 供卵豚보다 2日 먼저 왔을 때 22頭의 未經産豚中 1頭만이 妊娠되는 아주 저조한 妊娠率을 나타내었다. 發情開始後 3~9일에 供卵豚으로 부터 回收된 受精卵의 移植後 妊娠率은 비슷한 結果를 나타내었다. Figure 1(b)를 살펴보면 妊娠豚에서의 平均胎兒生存率은 65%였으며 供卵豚보다 2日 먼저 發情을 나타낸 1頭의 受卵豚에서 제일 낮았다.

Figure 2를 살펴보면 發情開始後 8~9일에 供卵豚으로 부터 回收된 受精卵을 받은 受卵豚에서 妊娠率이나 胎兒生存率이 약간 낮았으나 극적으로 낮은 結果는 나타나지 않았다.

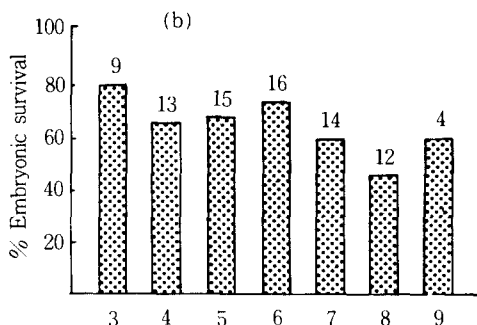
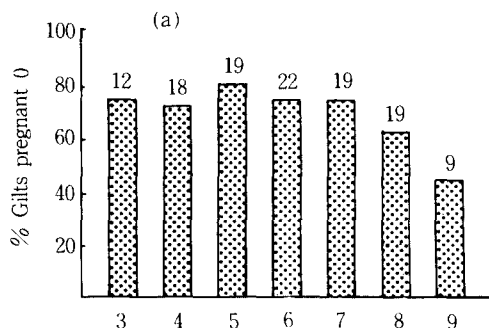
以上の 結果는 다른 家畜에서 나타난것 처럼 돼지에서 發情同期化를 벗어난 時期에 移植하는 경우 胎兒生存率은 供卵豚보다 受卵豚의 發情이 늦게 와서, 受卵豚의 子宮이 더 젊을 때 좋았음을 나타내었



Oestrus in recipients occurred days after (-) or before (+) donors

Oestrus in recipients occurred days after (-) or before (+) donors

Fig. 1. Embryo transplantation in gilts: differences in synchrony between recipients and donors. (a) Pregnancy rate following transfer of embryos collected from donors 3~9 days after the onset of oestrus. (b) Embryonic survival rate in pregnant gilts on the 30th day of pregnancy. Numbers above columns refer to the numbers of recipients in (a) and the numbers of pregnant animals in (b). (Polge, 1982)



Days after onset of oestrus of collection of embryos from donors

Days after onset of oestrus of collection of embryos from donors

Fig. 2. Embryo transplantation in gilts: transfer of embryos collected from donors 3~9 days after the onset of oestrus. (a) Pregnancy rate in recipients in which onset of oestrus varied from one day before to two days after that of donors. (b) Embryonic survival in pregnant gilts on the 30th day of pregnancy. Numbers above columns refer to the numbers of recipients in (a) and the numbers of pregnant animals in (b). (Polge, 1982)

다. 그러나 受卵豚의 發情이 供卵豚보다 2日以上 더 늦게 왔을 경우도 胎兒生存率에 害가 없느냐 하는 것은 좀더 研究할 問題이다. 한편, 受卵豚의 發情이 供卵豚의 發情보다 2日 먼저 왔을 때 受精卵을 移植할 경우 子宮內에서 生存하지 못하였다.

Webel 等(1970)은 發情開始後 7~8日에 供卵豚에서 採卵하여 受卵豚에 移植한 受精卵은 子宮內에서 生存할 수 없다고 하였다. 이 結果는 지금까지 살펴본 Polge (1982)의 報告와 다른 結果를 나타내고

있는 바, 이와같은 差異는 受精卵採卵時 使用되는 培地の 種類와 關係가 있는 것으로 思料되며, 受精卵採卵時 使用되는 培地는 初期受精卵을 더 培養시키기 위해서 使用되는 培地로써 適合하지 않을 지도 모른다고 Robl과 Davis(1981)는 報告하였다.

受精卵移植은 子宮內에 存在하는 受精卵의 數를 正常以上으로 增加시켜, 子宮의 크기가 胎兒生存率과 產仔數에 影響을 주는 重要한 要因인가를 알아보기 위해서도 使用해 왔다(Pope 等, 1972; Bazer 等,

Table 2. Embryonic survival in recipient gilts to which 12 or 24 embryos were transplanted (synchronous transfer on day 5)

Number of embryos / recipient	Number of recipients	Number pregnant on day 30	%	Embryo survival			
				Total transferred	Total live embryos on day 30	% survived	% survived in pregnant gilts
12	21	15	71.4	244	102	41.8	58.6
24	20	18	90.0	408	247	60.5	61.9
Total	41	33	80.5	652	349	53.5	60.9

(Polge, 1982)

1969; Dziuk, 1968). 子宮 내에서 受精卵의 密集이 妊娠 25~30日 동안에 돼지의 産仔數를 制限하는 主要要因이 아니라는 것이 밝혀졌다. Pope 等 (1972)은 12個와 24個의 受精卵를 各各 移植했을 때 妊娠 25日齡에서 비슷한 胚兒生存率을 나타내었다고 報告하였다. Table 2의 結果도(Polge, 1982) 上記의 結果와 비슷하였다. 한편, 子宮의 크기가 妊娠後期에는 胚兒生存率에 重要な 要因이지만 過排卵이나 正常보다 더 많은 受精卵를 移植하므로써 分娩時 産仔數를 正常以上으로 增加시키지는 못한다고(Fenton 等, 1970; Longenecker와 Day, 1968) 報告하였다. 子宮 내에서 受精卵의 數를 受精卵移植에 의해서 減少시켰을 때 未經産豚에서 4個以上の 受精卵이 存在하여야 妊娠初期에 黃體機能이 維持된다고(Polge 等, 1966) 報告하였다.

3. 精子的 體外受精能獲得

射出된 精자의 體外受精能獲得을 위해서 現在 많이 使用되고 있는 方法은 Table 3에 나타난 바와 같다. Pavlok(1981), Cheng(1985) 그리고 Yoshida(1987) 等에 의해서 開發된 Modified M199 精子前處理培地를 使用할 경우 精子濃度는 2×10^8 / ml, 培養時間은 4~5 h, 培養溫度는 37°C, 그리고 pH는 7.8이

適合한 것으로 나타났다.

Hamano와 Toyoda(1986)는 40×10^8 / ml의 高濃度 精자를 TYH(modified krebs-Ringer bicarbonate solution) 精子前處理培地에서 4時間 培養했을 때 2.5×10^8 / ml의 低濃度 精子보다 더 높은 受精能力을 얻었다고 報告하였다. 그러나 最近 Hamano 等(1989)은 20×10^8 / ml 혹은 40×10^8 / ml의 精자를 TYH 培地에서 4時間동안 培養한 後, 1000g에서 20分間 遠心分離하여 上澄液을 Conditioned Media로 使用할 경우 2.5×10^8 / ml 低濃度 精子로 前處理培養해도 優秀한 受精率을 얻었다고 Figure 3과 같이 報告하였다.

上記 方法들 以外에 Mattioli 等(1988, 1989)에 의해서 開發된 商業用 Modena 稀釋液(Semen Italy, Modena)을 利用한 精자의 體外受精能獲得方法이 있다.

4. 體內成熟卵자의 體外受精과 培養

體內成熟卵자의 體外受精은 Oil 밑에 있는 0.2~2 ml의 受精培地에 15~20個의 卵자를 옮긴후 精子最終濃도가 1×10^5 , 1×10^6 혹은 2×10^6 / ml 되도록 精자를 添加하여, 5% CO₂, 95% 空氣 및 溫度가 飽和인 CO₂ incubator에서 實施하였으며, 이 때에 體外受精時

Table 3. Capacitation of ejaculated spermatozoa for IVF in swine

Medium	Sperm concentration at preincubation per ml	Time of sperm preincubation hour	References
Modified M199	2×10^8	4-5	Pavlok (1981), Cheng (1985)
Modified KRB (TYH)	2.5×10^8 or 40×10^8	4	Hamano & Toyoda (1986), Hamano et al. (1989)

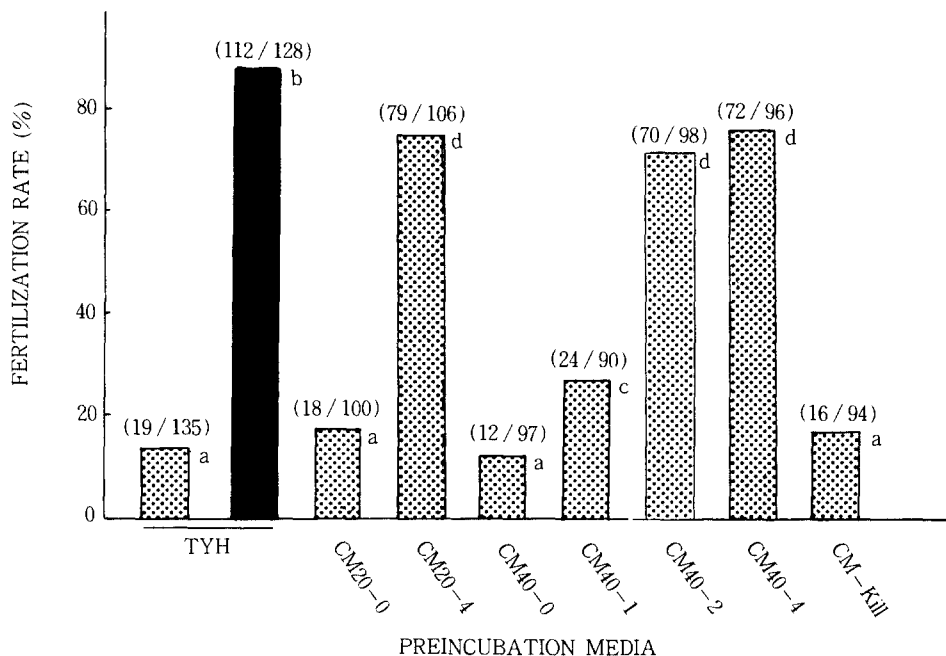


Fig. 3. Fertilizing ability of boar ejaculated spermatozoa preincubated with several conditioned media (CM: for details, see text) or modified Krebs-Ringer bicarbonate solution (TYH) at a concentration of 2.5×10^8 / ml (▨) or 40×10^8 / ml (■). Nos. in parentheses represent the no. fertilized ova per the no. matured ova. Values with different subscripts differ significantly. (Hamano et al, 1989)

間은 6~7時間, 溫度 $38.5^{\circ} \sim 39^{\circ}C$, 그리고 pH는 7.4였다. 여기에서 사용한 體外受精培地는 100mg/ml Na-pyruvate, 550 mg/l glucose, 900 mg/l Ca-lactate, 100 mg/l dibekacin sulphate, 10% FCS 그리고 2mM caffeine을 添加한 M199(Earle's salts) 이었다 (Yoshida, 1989, 1987; Cheng, 1985).

Table 4의 精子添加後 6~7時間에 나타난 體外受精의 結果는 다음과 같다 (Yoshida, 1987). 卵子의 95% (25/26)는 受精되었고 成熟된 卵胞卵子와 排卵된

卵管内 卵子사이나, 서로 다른 種牡豚 사이에 受精率에는 差異가 없었다. 多精子 侵入率은 25%에서 100%로 變異가 심하였으며 種牡豚 사이에서도 큰 差異가 認定되었다.

精子添加後 6~7時間에 精子尾部를 가진 膨大精子 頭部나 雄性前核을 觀察할 수 있으며, 雄性前核이나 雄性前核을 가진 受精卵의 比率이 排卵된 卵管의 卵子보다 成熟된 卵胞卵子에서 더 높았다.

Table 5는 앞에서 언급한 種牡豚 A를 사용한 體外

Table 4. Results of IVF at 6 to 7 hr after insemination

Boar	Source of oocytes	No. of oocytes examined	No. of oocytes		
			fertilized (%)	polyspermic (%)	with both pronuclei (%)
A	Fc ^{a)}	5	4 (80.0)	1 (25.0) ^{c)}	3 (75.0) ^{c)}
	T ^{b)}	3	3 (100)	1 (33.3)	1 (33.3)
B	Fc	9	9 (100)	9 (100)	9 (100)
	T	9	9 (100)	6 (66.7)	6 (66.7)

^{a)} Follicular.

^{b)} Tubal.

^{c)} Represented from fertilized oocytes.

(Yoshida, 1987)

Table 5. Results of in vitro development of IVF pig embryos in experiments using boar A

Source of oocytes	No. of embryos cultured	Total No. of embryos cleaved (%)	Developmental stage of embryos cultured for	
			27 ~ 28 hr	48 ~ 72 hr
			2 cell ^{c)}	2 ~ 8 cell
Fc ^{a)}	52	43 (82.9)	24	19
T ^{b)}	27	18 (66.7)	13	5

^{a)} See the foot-notes on Table 1.

(Yoshida, 1987)

^{c)} Used for ET.

Table 6. Results of in vitro development of IVF pig embryos cultured for 28 to 30 hr after insemination

Exp. No.	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved (%)	
		Total	Two-cell stage
1	50	23 (46.0)	17 (73.9) ^{a)}
2	31	20 (64.5)	16 (80.0)
3	24	15 (62.5)	13 (86.7)

^{a)} Represented from cleaved embryos.

(Yoshida, 1989)

受精卵의 體外培養 結果가 나타나있다. 受精卵의 半정도가 精子添加後 27~28時間에 2細胞期에 到達되었고, 이 受精卵들은 受精卵 移植에 使用되었다. 受精卵의 全體分割率은 精子添加後 27時間에서 72時間까지 2細胞期부터 8細胞期까지 分割된 受精卵의 數로 決定한 바, 成熟卵胞卵子가 排卵된 卵管卵子보다 더 높았다. 分割된 受精卵의 68%(13/19: 成熟卵胞卵子)와 20%(1/5: 卵管卵子)는 正常形態를 나타내었고, 2個의 受精卵(成熟卵胞卵子)은 精子添加後 72時間에 8細胞期에 到達되었다. 여기에서 使用된 受精卵培養培地는 10% FCS과 100mg/l dibekacin sulphate를 添加한 modified whitten's medium (Trounson, 1984) 이었다.

Table 6을 살펴보면 精子添加後 28~30時間동안 體外培養된 105個 受精卵의 分割結果가 나타나 있다 (Yoshida, 1989). 105個 受精卵中 58個(55%)가 分割되었다. 58個中 46個(79%)가 2細胞期로 均等하게 分割되었다. 여기에서 使用된 受精卵培養培地는 40mg/l Na-pyruvate, 3.7ml/l Na=lactate(60% syrup), 100mg/l dibekacin sulphate 그리고 10% FCS을 添加한 M199(Earle's salts) 이었다.

以上の 結果들을 綜合해 볼 때 體內成熟卵자의 體外受精時 多精子 受精이 問題點으로 나타났으며, 體外受精卵의 生存性에는 體外培養期間(James 等,

1983; Polge, 1982; James 等, 1980; Pope와 Day, 1977)과 培養培地의 構成成分(Davis, 1985; Davis와 Day, 1978)이 重要하다고 報告한 바, 앞으로 계속 研究하여야 할 課題이다.

5. 體外成熟卵胞卵의 體外受精과 培養

種牡豚의 卵巢에서 採取한 未成熟卵胞卵을 體外에서 成熟시켜 體外受精 및 培養한 結果는 Iritani 等(1978), Nagai 等(1984, 1990), 그리고 Naito 等(1988)에 의해서 報告되었으나 아직도 究明해야 할 많은 問題點들이 있다.

여기에서는 Yoshida 等(1990)과 Mattioli 等(1989)에 의해서 報告된 結果를 中心으로 살펴보고자 한다.

屠殺場에서 種牡豚으로 부터 採取한 卵巢들은 100 mg/l Kanamycin sulphate를 添加한 NaCl(Yoshida, 1990)이나 0.4% BSA(w/v), 0.36 mM Pyruvate, 5.5 mM glucose, 그리고 70µg/ml Kanamycin sulphate를 添加한 Dulbecco's PBS(Mattioli 等, 1989)에 保管(35~37°C) 되어 實驗室內로 運搬되어졌고, 卵母細胞는 直徑 2~6 mm 卵胞로 부터 上記 Dulbecco's PBS를 利用해서 採卵되었다.

未成熟卵胞卵의 體外成熟培地는 100 mg/l Na-pyruvate, 550 mg/l glucose, 900 mg/l Ca-lactate,

100 mg/l dibekacin sulphate, 10% FCS, 10 IU PMSG/ml, 10 IU HCG/ml, 1 μ g estradiol-17 β /ml 그리고 10%(v/v) pig follicular fluid를添加한 M199(Yoshida, 1990)이나, 10% FCS, gonadotropins (sheep luteinizing hormone NIH S₂O, 2.5 μ g/ml; pig follicle-stimulating hormone LER 441-2, 1.5 μ g/ml; pig prolactin Ler 2073, 20 μ g/ml), 그리고 1 μ g 17 β -estradiol/ml을添加한 M199(Mattioli 등, 1989)이었으며, 培養時間은 各各 36時間과 40~44時間이었다. 이 以外의 體外受精條件은 앞에서 언급한 體內成熟卵자의 體外受精條件과 비슷하였다.

Table 7을 보면 體外成熟培地에서 未成熟卵胞卵을 36時間 成熟시켜 體外受精시킨 後 18時間 培養한 結果가 나타나 있다. 未成熟卵胞卵의 成熟率과 受精率은 매우 높았으나 受精卵의 多精子受精率이 또한 매우 높았다. 한편 雌性前核은 모든 受精卵에서 나타났으나, 雄性前核은 그들중 60%(27/45)만 나타났다. 2個 혹은 그 以上の 雌性前核을 가진 受精卵의

Table 7. Results at 18 h after insemination of in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro

	No. (%) of oocytes	
Nuclear maturation	48 / 53	(90.6)
Fertilization	45 / 53	(84.9)
Normal	7 / 45*	(15.6)
Polyspermic	28 / 45*	(62.6)
Polygynic	5 / 45*	(11.1)

* Oocytes fertilized (Yoshida et al, 1990)

† Includes three polyspermic oocytes

比率은 매우 적었다. 正常受精率은 2個의 極體, 1個의 雄性前核, 그리고 1個의 雌性前核을 가진 受精卵의 數에 의해서 評價하였으나 매우 낮았다(Yoshida 등, 1990).

Table 8을 보면 2~4細胞期의 受精卵을 受卵豚에 移植한 後 4日과 7日에 回收하였을 때 結果가 나타나 있다. 回收率은 2細胞期의 受精卵이 3~4細胞期의 受精卵보다 더 높았다. 移植後 4日에 3頭의 受卵豚子宮에서 回收하였을 때 16個의 受精卵이 桑實胚段階(13桑實胚, 2胞胚, 1膨脹胞胚)까지 到達하였다. 移植後 7日에 3個의 孵化된 胞胚가 1頭의 受卵豚子宮에서 回收되었다(Yoshida 등, 1990).

Table 9를 살펴보면 다음과 같다. 移植後 4日에 回收된 桑實胚와 胞胚를 더 發育시키기 위해 24時間 동안 體外에서 再培養시켰을 때 13個의 桑實胚中 11個가 胞胚나 孵化된 胞胚段階로 發育되었고, 3個의 胞胚는 膨脹 또는 孵化된 胞胚로 發育되었다. 4日에 回收하여 再培養된 胞胚當 核의 數는 22個에서 150個(平均: 56.4)의 範圍를 나타낸 바, 대부분(50%)은 30~50個의 核을, 29%는 60個 以上の 核을, 그리고 2個의 孵化된 胞胚는 150個의 核을 가졌다. 移植後 7日에 回收된 3個의 孵化된 胞胚는 200個 以上の 核을 가졌다. 그러나 胞胚形成率과 胞胚當 核의 數는 2細胞期에 移植한 것이 3~4細胞期에 移植한 것 보다 더 높았다. 全般的으로 移植後 體外에서 再培養했을 때 190個의 受精卵中 17個(9%)만이 胞胚를 形成했다(Yoshida, 1990).

Mattioli 등(1989)에 의해서 報告된 體外에서 成熟되고 受精된 卵胞卵의 發育段階를 살펴보면 Table 10과 같다.

Table 8. Results of recovery of embryos from recipient gilts

Days after transfer	No. of CL*	Stage of embryos transferred†	No. of embryos transferred	No. (%) of embryos recovered‡	Developmental stages §				
					1-cell	2-8 cell	M	BL	DG
4	19	2-cell	86	83 (79.1)	15	49	10	2	7
	12	3-4-cell	52	28 (43.8)	3	20	3	1	1
7	15	2-cell	33	14 (29.2)	0	0	0	3	11
	10	3-4-cell	19	3 (10.3)	0	0	0	0	3

* In recipients.

† At 33 h after insemination.

‡ In relation to the No. of embryos transferred and the No. of CL.

§ M = morula; BL = blastocyst; DG = degenerate.

(Yoshida, 1990)

Table 9. Summary of blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro

Days after transfer	Stage of embryos transferred	No. of embryos transferred	No. of blastocysts			Mean No. of nuclei blastocyst (range)
			Total (%)	At recovery	After re-culture*	
4	2-cell	86	10 (11.6)	2	8	65.8 (22-150)
	3-4-cell	52	4 (7.7)	1	3	31.5 (28- 50)
7	2-cell	33	3 (9.1)	3	—	> 200
	3-4-cell	19	0 (0)	0	—	—
Total	2-4-cell	190	17 (8.9)	6	11	—

* At 33 h after insemination.

(Yoshida, 1990)

* For 24 h after recovery.

Table 10. Embryonic developmental stages from pig oocytes matured and fertilized in vitro

No. of oocytes exposed to sperm	681
No. of two- to four-cell embryos after 48 h (% of oocytes exposed to sperm)	266 (39)
No. embryos recovered 4 d after transfer (% of transferred embryos)	211 (79)
No. of morulae (% of recovered embryos)	42 (20)
No. of blastocysts (% of recovered embryos)	86 (41)
No. of hatched blastocysts (% of total blastocysts)	11 (13)

(Mattioli et al, 1989)

精子添加後 48時間後에 681個의 卵子中 266個(39%)만이 正常的인 2~4細胞期에 到達되었고, 12頭의 受卵豚에 移植하였다. 移植後 4日에 子宮으로 부터 211個(79%)의 受精卵을 回收하였다. 回收된 受精卵의 41%는 胞胚期까지 到達되었고, 胞胚中 13%는 孵化된 胞胚였다. 또한, 回收된 受精卵의 20%는 桑實胚였으며, 나머지는 退化되었다.

以上の 研究結果들은 未成熟卵胞卵도 體外에서 成熟, 受精되어질 수 있고, 胞胚段階까지 發育할 수 있음을 알 수 있으나, 發育率을 增加시키고, 正常分娩까지 成就시키기 위해서는 더 많은 研究가 要求된다.

6. 體內成熟卵자의 受精卵移植結果

지금까지 體內成熟卵자의 受精卵移植에 의하여 生産한 仔豚은 Table 11에 나타난 바와 같다.

最初の 仔豚生産은 Cheng(1985)에 의해서 報告된 바, 2~4細胞期の 206個의 受精卵을 15頭의 受卵豚에

Table 11. Results of ET of IVF embryos matured in vivo

No. of recipients	No. of embryos transferred (stage)	No. of pregnant recipients	No. of piglets born	References
15	206 (2-4 cell)	6	19	Cheng (1985)
4	98 (1-2 cell)	1	4	Yoshida (1987)
3	46 (2 cell)	2	12	Yoshida (1989)
2	31 (2-4 cell)	1	7	Park & Pursel (Unpublished)

移植하여 6頭를 妊娠시켰다. 妊娠率 40%, 受卵豚에서 胎兒生存率 21.3%를 나타내면서 19頭의 仔豚을 生産하였다.

Yoshida(1987, 1989)는 처음에는 4頭의 受卵豚에 98個의 受精卵을 移植하여 1頭를 妊娠시켜 4頭의 仔豚을 生産했고, 다음에는 3頭의 受卵豚에 46個의 受精卵을 移植하여 2頭를 妊娠시켜 12頭의 仔豚을 生産했다. Park과 Pursel(Unpublished)은 2頭의 受卵豚에 31個의 受精卵을 移植하여 1頭를 妊娠시켜 7頭의 仔豚을 生産했다.

上記의 仔豚生産에서 Cheng (1985)과 Yoshida (1987, 1989)는 5% CO₂를 使用한 受精卵培養培地를

利用했으나, Park과 Pursel(Unpublished)은 5% CO₂를 使用하지 않은 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES) buffer를 利用한 受精卵培養培地를 利用했다.

7. 體外成熟卵胞卵의 受精卵移植 結果

지금까지 體外成熟卵胞卵을 利用한 受精卵移植에 의하여 仔豚을 生産한 結果는 Table 12에 나타난 바와 같이 Mattioli 等(1989)에 의해서 最初로 報告되었다. 8頭의 受卵豚에 380個의 受精卵을 移植하여 4頭를 妊娠시켰고, 4頭의 妊娠豚中 1頭는 9頭의 仔豚을 生産했고, 1頭는 死産하였으며, 2頭는 아직도 妊娠

Table 12. Results of ET of IVF embryos matured in vitro

No. of recipients	No. of embryos transferred (stage)	No. of pregnant recipients*	No. of piglets born	Reference
8	380 (2-4 cell)	4	9	Mattioli et al, (1989)

*: Four out of eight recipient gilts were diagnosed pregnant 30 and 37 d after in vitro fertilization. One of these farrowed nine live piglets and one stillborn. Pregnancy was in progress in two animals.

中이라고 報告하였다.

以上과 같이 體內 및 體外成熟卵자의 體外受精後 移植하여 分娩까지 發育이 可能하다는 것이 立證되었으나, 分娩까지 發育시키는 體外受精卵의 比率을 增加시키기 위해서는 더 많은 研究가 必要하다.

8. 核移植受精卵의 移植結果

前核交換受精卵 56個를 6頭의 受卵豚에 移植한 後 仔豚을 生産한 結果가 Table 13에 나타나 있다. 6頭中 1頭는 16日에, 1頭는 50日에, 1頭는 93日에

Table 13. Establishment and maintenance of pregnancy after the transfer of pronuclear exchange embryos to recipient gilts

Number transferred	Recipient	Pregnancy result
9	25 ^a	estrus detected Day 16
8	1-4 ^a	estrus detected Day 50
4 ^b	17 ^c	estrus detected Day 93
8	32 ^a	4 pronuclear exchange pigs born 10 control pigs born
12	51 ^a	2 pronuclear exchange pigs born 7 control pigs born
15 ^b	7-7 ^a	1 pronuclear exchange pig born 8 control pigs born

^aGilt was bred to a color-marked boar.

(PRATHER et al, 1989)

^bEmbryos were retransferred to a secondary recipient after collection from a primary recipient gilt.

^cGilt received 2 mg estradiol on Days 12 and 13 to maintain pregnancy (Pope et al, 1987)

再發情이 왔고, 나머지 3頭는 32頭의 仔豚을 生産했다. 32頭의 仔豚中 7頭는 35個의 前核交換受精卵으로부터 生産된 仔豚이었다(Prather 等, 1989).

Table 14를 살펴보면 種付되지 않은 受卵豚 4頭에 42個의 核移植受精卵을 移植한 경우 1頭는 正常發情

週期를, 1頭는 28日에, 2頭는 52日 혹은 그 以後에 再發情이 나타났고, 種付된 受卵豚 5頭에 46個의 核移植受精卵을 移植했을 경우, 5頭의 受卵豚으로부터 1頭의 4細胞核 移植仔豚과 48頭의 對照區仔豚을 生産하였다.

Table 14. Pregnancy establishment and maintenance after the transfer of 2-, 4- or 8- cell nuclear transfer embryos to recipient gilts.

Number transferred	Donor cell stage	Recipient	Pregnancy result
10	2	25	extended cycle, 28 days
12	2	6809521	extended cycle, 52 days
11	2	509 ^a	13 control piglets born
7 ^b	4	55 ^a	6 control piglets born 1 nuclear transfer pig born
4	4	234 ^c	normal cycle
16	4	7352	extended cycle, 72 days
7	4	230 ^a	11 control piglets born
17	8	46 ^a	10 control piglets born
4	8	7372 ^a	8 control piglets born

^aGilt was bred to a color-marked boar.

(Prather et al, 1989)

^bEmbryos were retransferred to a secondary recipient after collection from a primary recipient gilt.

^cGilt received 2 mg estradiol on Days 12 and 13 to maintain pregnancy (Pope et al, 1987).

結 論

돼지의 受精卵 移植技術은 最近 體外受精과 核移植을 통한 仔豚을 生産하면서 눈부신 進展을 해 왔다. 그러나 이 有望한 技術이 養豚業에서 實用化되기 위해서는 (1) 安全하고, 效果的이고, 經濟的인 發情週期 同期化物質의 開發, (2) 精子受精能獲得의 效果的 調節, (3) 單精子受精의 誘導, (4) 卵母細胞의 體外成長과 成熟, (5) 卵母細胞의 効率的인 受精, (6) 精製된 培地를 利用한 卵母細胞의 胞胚期까지의 培養, (7) 優秀한 遺傳形質을 가진 受精卵의 複製增殖, (8) 優秀한 遺傳形質을 가진 受精卵의 性鑑別, 그리고 (9) 液體室素를 利用한 受精卵의 凍結 및 保存 等에 대한 技術이 더욱 더 進展되어야 할 것이다.

參 考 文 獻

Bazer, F. W., Robison, O. W., Clawson, A. J. and Ulberg,

- L. C. 1969. Uterine capacity at two stages of gestation in gilts following embryo superinduction. *J. Anim. Sci.* 29:30-34.
- Cheng, W. T. K. 1985. In vitro fertilization of farm animal oocytes. Ph. D. Thesis. Council for National Academic Awards.
- Davis, D. L. 1985. Culture and storage of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 33:115-124.
- Davis, D. L. and Day, B. N. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. *J. Anim. Sci.* 46:1043-1053.
- Dziuk, P. J. 1968. Effect of number of embryos and uterine space on embryo survival in the pig. *J. Anim. Sci.* 27:673-676.
- Dziuk, P. J., Polge, C. and Rowson, L. E. A. 1964. Intra-uterine migration and mixing of embryos in swine following egg transfer. *J. Anim. Sci.* 23:37-42.

- Fenton, F. R., Bazer, F. W., Robison, O. W. and Ulberg, L. C. 1970. Effect of quantity of uterus on uterine capacity in gilts. *J. Anim. Sci.* 31:104-106.
- Hamano, S., Naito, K., Fukuda, Y. and Toyoda, Y. 1989. In vitro capacitation of boar ejaculated spermatozoa: Effect of conditioned media prepared from preincubated sperm suspension. *Gamete Res.* 24:483-489.
- Hamano, S. and Toyoda, Y. 1986. In vitro fertilization of pig eggs with ejaculated spermatozoa preincubated at high sperm concentration. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 32:177-183.
- Hancock, J. L. and Hovell, G. J. R. 1962. Egg transfer in the sow. *J. Reprod. Fert.* 4:195-201.
- Hunter, R. H. F. 1964. Superovulation and fertility in the pig. *Anim. Prod.* 6:189-194.
- Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. 1978. Sperm penetration of pig oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.* 54:379-383.
- James, J. E., James, D. M., Martin, P. A., Reed, D. E. and Davis, D. L. 1983. Embryo transfer for conserving valuable genetic material from swine herds infected with pseudorabies. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 183:525-528.
- James, J. E., Reeser, P. D., Davis, D. L., Straiton, E. C., Talbot, A. C. and Polge, C. 1980. Cultrine and long-distance shipment of swine embryos. *Theriogenology.* 14:463-469.
- Kvansnikii, A. V. 1951. Interbreed ova transplantation. *Sovetsk. Zootech.* 1:36-42.
- Longenecker, D. E. and Day, B. N. 1968. Fertility level of sows superovulated at post weaning estrus. *J. Anim. Sci.* 27:709-711.
- Mattioli, M., Bacci, M. L., Geleati, G. and Seren, E. 1989. Developmental Competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology.* 31:1201-1207.
- Mattioli, M., Galeati, G. and Seren, E. 1988. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res.* 20:177-183.
- Nagai, T., Takahashi, T., Shioya, Y. and Oguri, N. 1990. Maturation and fertilization of pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid. *Theriogenology.* 34:195-204.
- Nagai, T., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. and Hanada, A. 1988. In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 84:585-591.
- Nagai, T., Niwa, K. and Iritani, A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 70:271-275.
- Naito, K., Fukuda, Y. and Toyoda, Y. 1988. Effect of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res.* 21:289-295.
- Pavlok, A. 1981. Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated in vitro. *Int. J. Fertil.* 26:101-106.
- Polge, C. 1982. Embryo transplantation and preservation. In *Control of Pig Reproduction* (Cole, D. J. A. and Foxcroft, G. R., Eds.) London, Butterworths, pp. 277-291.
- Polge, C., Day, B. N. and Groves, T. W. 1968. Synchronization of ovulation and artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.* 83:136-142.
- Polge, C., Rowson, L. E. A. and Chang, M. C. 1966. The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. *J. Reprod. Fert.* 12:395-397.
- Pope, W. F., Lawyer, M. S. and First, N. L. 1987. The effect of exogenous estradiol on litter size in a typical swine head. *Theriogenology.* 28:9-14.
- Pope, C. E. and Day, B. N. 1977. Transfer of preimplantation pig embryos following in vitro cultrine for 24 to 48 hours. *J. Anim. Sci.* 44:1036-1040.
- Pope, C. E., Christensen, R. K., Zimmerman-pope, V. A. and Day, B. N. 1972. Effect of number of embryos on embryonic survival in recipient gilts. *J. Anim. Sci.* 35:805-808.
- Prather, R. S., Sims, M. M. and First, N. L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41:414-418.

- Pursel, V. G. 1983. Effect of processing of semen on capacitation time of fresh and frozen-thawed boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 56:1161-1166.
- Pursel, V. G., Elliott, D. O., Newman, C. W. and Staimmiller, R. B. 1981. Synchronization of estrus in gilts with allyl trenbolone: Fecundity after natural service and insemination with frozen semen. *J. Anim. Sci.* 52:130.
- Redmer, D. A., Meredith, S., Ball, G. D., Yankowsky, A. and Day, B. N. 1979. Estrus and ovulation in gilts fed a synthetic progestogen (Ru-2267). *J. Anim. Sci.* 49 (Suppl. 1):116.
- Robl, J. M. and Davis, D. L. 1981. Effects of serum on swine morulae and blastocysts in vitro. *J. Anim. Sci.* 52:1450-1456.
- Son, D. S. 1988. Studies on embryo transfer in pigs. *Korean J. Emb. Trans.* 3:6-12.
- Trounson, A. 1984. In vitro fertilization and embryo preservation. In: *In vitro fertilization and embryo transfer* (Trounson, A. and Wood, C. Eds.). New York, Churchill Livingstone Inc. pp. 111-130.
- Vincent, C. K., Robison, O. W. and Ulberg, L. C. 1964. A. Technique for reciprocal embryo transfer in swine. *J. Anim. Sci.* 23: 1084-1088.
- Webel, S. K. 1978. Ovulation control in the pig. In *Control of Ovulation* (Crighton, D. W., Haynes, N. B., Foxcroft, G. R. and Lamming, G. E., Eds.). London, Butterworths. pp. 421-434.
- Webel S. K., Peters, J. B. and Anderson, L. L. 1970. Synchronous and asynchronous transfer of embryos in the pig. *J. Anim. Sci.* 30:565-568.
- Yoshida, M., Ishizaki, Y. and Kawagishi, H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.* 88:1-8.
- Yoshida, M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vivo. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 35:35-37.
- Yoshida, M. 1987. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49:711-718.