

생쥐卵자의 透明帶에 대한 抗體의 生産과 이 抗體가 受精에 미치는 影響

徐光永 · 李承培* · 崔京鎬 · 金昌圭 · 鄭吉生 · 金鐘培

建國大學校 畜産大學

Studies on the Production of Antibody to Mouse Zona Pellucida and Its Effect on the Fertilization of Mouse Eggs

Seo, K.Y., S.B. Lee*, K.H. Choi, C.K. Kim, K.S. Chung and J.B. Kim

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

This experiment was carried out as a basic study to understand the role of mouse zona pellucida in early fertilization process, and to investigate the effect of anti-mouse zona pellucida antibody on the fertilization of mouse eggs *in vivo* and *in vitro*.

Antiserum to mouse zona pellucida was produced in Japanese Giant rabbit by repeated immunization of solubilized mouse zonae. The existence of mouse zona-specific antibodies was confirmed by zona precipitation reaction, indirect immunofluorescence and indirect ELISA.

The results obtained were summarized as follows :

1. Dense precipitation layers were formed on the mouse zona surface following incubation of intact mouse eggs in medium containing rabbit anti-mouse zonae serum. The zonae with precipitation layers strongly resisted the action of proteolytic enzyme such as 0.1% pronase, while the zonae of control serum-treated eggs dissolved within 5 to 7 min following 0.1% pronase treatment.
2. Mouse eggs incubated with zona-specific antiserum and followed by subsequent incubation with goat anti-rabbit IgG-FITC conjugate showed strong to moderate fluorescent light on the zona surface at an antiserum dilution of up to 1 : 1,000 in medium while the zonae of control serum-treated eggs didn't show fluorescence at all at a serum dilution of more than 1 : 10 in medium.
3. The titer of antiserum to zona was determined by indirect ELISA using polystyrene microplate coated with solubilized zonae. The O.D. value at an antiserum dilution of 1 : 12,800 was still distinguished significantly from that at the same dilution of control serum.
4. Rabbit anti-mouse zonae serum completely or considerably inhibited *in vitro* fertilization of mouse eggs at an antiserum concentration of 0.3~10% in medium, whereas control serum did not inhibit that of mouse eggs at the same serum concentration at all.
5. Rabbit anti-mouse zonae serum and IgG fraction of antiserum to zona prepared by Protein A-Affinity Chromatography completely or considerably inhibited *in vivo* fertilization of mouse

*尙志大學校 農科大學(College of Agriculture, Sang Ji University)

when passively immunized. At single dose of either 3ml of antiserum or 3mg of IgG fraction of antiserum blocked *in vivo* fertilization of all mice. However, neither control serum nor IgG fraction of control serum affected *in vivo* fertilization at all.

I. 結 論

大部分의 哺乳動物의 卵子는 透明帶로 둘러싸여 있으며 受精初期 段階에서 精子는 먼저 이 透明帶에 結合한 다음 스스로의 蛋白分解酵素로서 透明帶를 通過하여 卵자의 原形質膜과 融合하게 된다. (Austin & Braden, 1956; Srivastava, et al., 1965). 受精後 透明帶는 受精卵의 發達에 適切한 環境을 提供하고 卵管에서의 受精卵 移動에 寄與하는 것으로 推測되고 있다 (Mintz, 1962; Modlinski, 1970).

一部 哺乳動物에 있어서 透明帶는 소위 透明帶反應의 機轉에 의해 多精子侵入을 防止하는 重要한 機能을 담당하는데 (Barros & Yanagimachi, 1971, 1972), 이는 受精後 透明帶의 蛋白分解酵素에 대한 抵抗性이 增加하기 때문인 것으로 알려져 있다. 그러나 例外的으로 家兔의 卵子는 受精後 透明帶의 蛋白分解酵素에 대한 抵抗性이 增加하기는 하지만 相當期間동안 精子의 侵入을 받을 수 있다고 報告된 바 있다 (Overstreet & Bedford, 1974).

한편, 생쥐, 햄스터, 흰쥐 등과 같은 일부 齧齒類에서의 透明帶膜과 精子의 結合은 種特異性이 있는 것으로 알려져 왔는데, 즉 이들 卵子의 透明帶에 種特異的인 精子受容體가 存在하여 受精初期段階에서 精子는 먼저 이 受容體와 結合한 후, 透明帶를 通過한다는 報告가 近來에 擡頭되기 시작하였다 (Schmell & Gulyas, 1980). 以後 透明帶의 構造 및 機能糾明을 위하여 免疫生化學的인 側面에서 多角的인 研究가 活潑히 進行되기 시작했으며, 最近 들어 抗透明帶抗體가 透明帶 表面에 存在하는 精子受容體를 비롯한 透明帶抗原과 免疫學的反應을 하여 透明帶의 構造의 性質을 變化시킴으로써, 受精을 顯著히 抑制하였다는 報告가 잇달아 發表되었다 (Tsunoda & Sugie, 1977; Aitken & Richardson, 1981; Aitken et al., 1981).

現在까지의 研究에 의하면 생쥐의 透明帶는 全體 卵蛋白質의 17%에 해당하는 4.8 μ g의 蛋白質을 含有하고 있으며, 電氣泳動法에 의한 分析結果, 分子量이 各 200,000, 120,000 및 83,000인 3種類의 糖蛋白質

로서 이들은 各各 ZP₁, ZP₂, ZP₃로 命名되었으며 種特異的인 精子受容體는 ZP₃에 存在한다고 알려져 있다 (Bleil & Wassarman, 1980a, 1980b, 1980c; Florman & Wassarman, 1985; Dean et al., 1986).

그러나 國內에서는 이 分野에 관한 研究가 아직 報告된 바 없는 실정이며 이에 본 研究에서는 생쥐 卵子 透明帶의 生理學的인 機能糾明을 위한 基礎研究로서 생쥐의 透明帶를 免疫原으로 하여 토끼에서 生産한 抗體가 생쥐 卵子의 體外受精에 미치는 影響과, 또 이 抗體를 생쥐에 受動免疫하였을 때 受精에 미치는 影響에 관한 基礎調査를 實施하여 약간의 成績을 거두었으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 供試動物

抗透明帶血清을 生産하기 위하여 4個月齡의 Japanese Giant 種의 雄性 토끼를, 卵子 回收用으로 ICR 系의 4~5 週齡의 雌性 생쥐를 供試하였다.

2) 培養液

未受精卵의 回收, 培養 및 體外受精에는 Hoppe & Pitts의 培養液을 使用하였다 (Hoppe & Pitts, 1973). 이때 培養液의 pH는 7.2~7.4로, 滲透壓은 270~275mOsm로 調整하였으며, 使用直前に 0.2 μ m millipore filter (German Science, Inc. U.S.A.)로 濾過시킨 후 使用하였다.

2. 方 法

1) 未受精卵의 回收 및 透明帶分離

ICR 系 雌性 생쥐에게 各各 8IU의 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin; Folligon, Intervet, Holland)를 腹腔注射하고, 45~48時間後에 同一한 方法으로 8IU의 HCG (human chorionic gonadotropin; Chorulon, Intervet, Holland)를 注

射하여 多排卵을 誘起한 後, 翌日 實體顯微鏡 (Kyowa Optical Co., Japan) 下에서 卵管膨大部로부터 卵丘細胞群에 둘러싸인 卵子를 回收하였으며, 0.1% ovine testicular hyaluronidase (Sigma, Type V, U.S.A.)를 使用하여 卵丘細胞群을 分散시켰다. 이어 直徑이 약 50 μ m인 micropipette으로 吸引, 排出을 反復하여 透明帶를 分離, 回收한 다음 0.85% NaCl 溶液으로 5回 洗滌하고, 0.05M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)로 65°C, 90分間 處理함으로써 透明帶를 溶液化(solubilization)하였다 (Dunbar et al., 1980).

2) 抗透明帶 抗體生産

Primary injection을 위한 免疫原으로 900個의 透明帶가 含有된 carbonate-bicarbonate buffer와 Freund's complete adjuvant (Sigma, U.S.A.)를, booster injection으로서는 Freund's incomplete adjuvant를 各各 1:1(v/v)로 混合하여 1週 1回씩 7回에 걸쳐 토끼에 皮內注射한 후, test bleeding을 實施하여 透明帶 沈澱反應 및 間接免疫螢光分析法로 抗透明帶抗體의 存在를 確認하였으며, 最終 booster 注射 後 5日째에 採血하여 4°C에서 2時間 定置시킨 후 2,500rpm에서 30分간 遠心分離하여 抗血清을 分離하였다. 이어 56°C에서 30分間 不活性處理하고, 0.2 μ m millipore filter로 濾過한 다음 使用直前까지 -20°C에서 保管하였다. 對照血清으로서는 抗體生産을 實施하기 以前의 同一한 토끼에서 採取한 血清을 同一한 方法으로 處理하여 分離하였다.

3) 透明帶 沈澱反應 및 蛋白分解酵素에 대한 抵抗性 調査

多排卵誘起에 의하여 採取한 생쥐의 未受精卵을 抗血清과 對照血清이 0.3~10%까지 各各 含有되어 있는 培養液에서 37°C, 5% CO₂ 및 95% 空氣條件을 갖춘 CO₂ 培養器에서 2時間동안 培養한 後, 新鮮한 培養液으로 5回 洗滌한 다음 位相差顯微鏡 (Leitz, West Germany) 下에서 이 卵子들의 透明帶를 觀察하였다. 이어 이들 卵子를 0.1% pronase (*Streptomyces griseus*, Sigma, U.S.A.)가 含有되어 있는 培養液 小滴으로 옮긴 후 透明帶의 溶解度를 調査하였다.

4) 間接免疫螢光分析法

생쥐의 未受精卵을 抗血清과 對照血清이 各기 다른 濃度로 含有되어 있는 培養液 小滴에서 45分間 培養한 후, 新鮮한 培養液으로 6回 洗滌하고 goat anti

-rabbit IgG-FITC (Bio-yeda, Israel)가 1:200으로 稀釋된 培養液 小滴으로 옮기고 20分間 室溫에서 追加로 培養하였다. 이어 6回 洗滌한 다음 이들 卵子를 slide glass 中央으로 옮긴 다음 coverslip으로 덮고 螢光顯微鏡 (Leitz, West Germany) 下에서 觀察하였다.

5) 間接酵素免疫分析法

透明帶를 0.05M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)에 3pieces/ml의 濃度로 하여 polystyrene microtiter plate (Nunc, Denmark)의 各 well에 150 μ l씩 分注하여 4°C에서 18時間동안 coating을 實施한 後, 0.05% Tween 20-PBS로 5回 洗滌한 다음 3% BSA-PBS를 各 well에 150 μ l씩 分注하고 35°C에서 1時間동안 blocking 하였다. 이어 5回 洗滌한 다음 抗血清과 對照血清을 PBS에 1:100부터 1:12,800까지 double dilution하여 各 well에 150 μ l씩 分注하고 35°C에서 2時間동안 反應시킨 후 5回 洗滌하였다.

이어 PBS에 1:1,000으로 稀釋된 goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (Bio-yeda, Israel)를 各 well에 150 μ l씩 分注하고 35°C에서 2時間동안 反應을 시킨 後 5回 洗滌하였다. 이어 0.05% H₂O₂ (v/v)와 0.04% O-phenylene diamine (w/v)을 含有한 0.15M citrate phosphate buffer를 各 well에 分注하여 30分간 反應시킨 後 2.5M H₂SO₄를 各 well에 50 μ l씩 分注하여 酵素-基質反應을 停止시킨 다음 492nm에서 ELISA reader (Dynatech, U.S.A.)로 O.D.價를 測定하였다.

6) 생쥐卵자의 體外受精

抗血清과 對照血清이 0.3~10%까지 各各 含有되어 있는 450 μ l의 培養液 小滴을 組織培養用 petri dish 底面에 附着시킨 後 paraffin oil로 덮고 5% CO₂, 95% air, 37°C 條件의 CO₂ 培養器內에서 6時間 以上 平衡을 實施하였다. 이어 多排卵誘起에 의하여 回收한 생쥐의 未受精卵을 上記 培養液으로 옮겨 1時間동안 培養하였다.

한편, 透明帶가 除去된 未受精卵에 대한 抗體의 影響을 調査하기 위하여 未受精卵을 0.1 hyaluronidase로 處理하여 卵丘細胞群을 除去한 後 0.5% pronase에 3~5分間 露出시켜 透明帶를 除去한 未受精卵을 抗血清과 對照血清이 各各 2.5%, 5% 및 10%가 含有된 培養液 小滴으로 옮겨 同一條件下에서 培養하였다.

體外受精을 위한 精子는 成熟한 ICR 雄性 생쥐의 精巢上體 尾部로부터 採取하여 培養液에서 90分間 培養함으로써 受精能獲得(capacitation)을 誘起하였다. 이어 精子를 抗血清과 對照血清이 卵子培養液과 同一한 濃度로 含有된 培養液에서 20分間 豫備培養한 後 最終濃도가 $1\sim 1.5\times 10^6/ml$ 이 되도록 調整하여 授精(insemination)을 實施한 다음 5時間동안 追加 培養하였다. 이어 卵子를 新鮮한 培養液으로 5回 洗滌한 다음 slide glass 中央으로 옮기고 coverslip으로 덮은 後 位相差顯微鏡(Leitz, West Germany)下에서 受精與否를 調査하였다.

受精의 判斷基準으로서 極體 또는 前核이 2개이거나 卵子細胞質內에 精子의 切片이 確認된 卵子들은 受精卵으로 看做하였다. (Blandau, 1980).

7) 抗透明帶抗體의 受動免疫

雌性 생쥐에 8IU의 PMSG를 腹腔注射하고 18時間 後에 處理群으로서 抗血清과 抗血清으로부터 protein A-affinity chromatography (Pharmacia, Sweden)로 分離한 Immune IgG를, 對照區로서는 對照血清과 對照血清으로부터 同一한 方法으로 分離한 control IgG 및 0.85% NaCl을 腹腔注射한 다음 28~29時間 後에 8IU의 HCG를 注射하였다. 이어 12~14時間 後에 雄性 생쥐와 1:1의 比率로 ผสม시키고 翌日 아침에 腹腔이 確認된 個體의 卵管膨大部로부터 卵子를 回收하였다.

回收된 卵子의 受精判別은 體外受精에서와 同一한 基準으로 實施하였다. 한편, 抗透明帶抗體의 受動免疫에 의한 透明帶의 形態學的, 生化學的인 變化를 調査하기 위하여 處理區와 對照區의 卵子들에 對해 透明帶沈澱反應, 間接免疫螢光分析 및 蛋白分解酵素에 對한 抵抗性 등을 各各 前과 同一한 方法으로 實施하였다.

III. 結果 및 考察

1. 透明帶 沈澱反應 및 蛋白分解酵素에 對한 抵抗性 調査

抗血清이 各各 0.3~10%까지 含有된 培養液에서 培養한 卵子들의 透明帶들은 (Fig. 1), 對照區 卵子들의 透明帶와는 달리 (Fig. 2) 모두 透明帶 周邊에서 뚜렷한 沈澱現狀을 나타냈으며, 다시 이 卵子들을 0.1% pronase가 含有된 培養液에서 培養하였을 때 透明帶

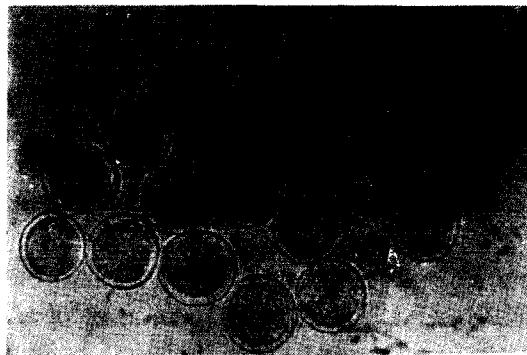


Fig. 1. Unfertilized mouse eggs exposed to antiserum at a dilution of 1:500 in medium.

Note the zona precipitation layers (X 150)

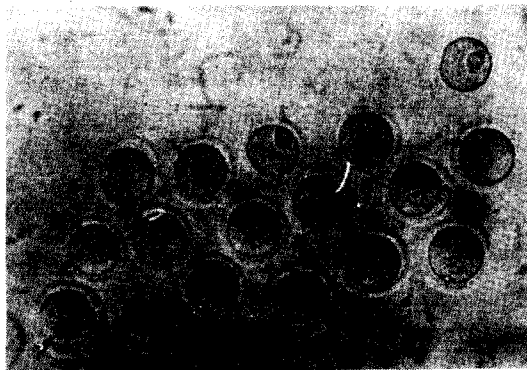


Fig. 2. Unfertilized mouse eggs exposed to control serum at a dilution of 1:10 in medium.

No precipitation layers are visible. (X 150)

는 對照區에서 5~7分 사이에 完全히 融解되었으나, 處理區에서는 2~3時間까지 殘存하였다. 이러한 結果는 햄스터 卵子의 透明帶에 抗原性이 存在한다고 報告된 以來 (Ownby & Shivers, 1972), 생쥐를 비롯한 다른 哺乳動物 卵子의 透明帶에도 抗原性을 갖는 物質이 存在한다는 報告를 確認하는 것으로서, 이 透明帶抗原에 特異的인 抗體가 結合하여 透明帶의 生化學的 性質의 變化시킴으로써 蛋白分解酵素에 對한 透明帶의 抵抗性이 增加하였다는 報告와 一致하는 것이다 (Garavagno et al., 1974; Dunbar & Shivers, 1976;

Tsunoda et al., 1979). 이러한 透明帶沈澱反應은 最近까지 各種 哺乳動物의 透明帶抗原에 대하여 生産된 抗體確認의 한 方法으로 利用되고 있다.

2. 間接免疫螢光分析法에 의한 透明帶抗體의 確認

處理區 및 對照區 卵자를 FITC-goat anti-rabbit IgG 를 含有한 培養液에서 培養한 後 螢光顯微鏡下에서 觀察하였을 때 對照區에서는 10%의 對照血清이 含有된 培養液에서 培養된 一部 卵자의 透明帶에서 약간의 螢光이 觀察되었으나 10%미만의 血清濃度에서 培養된 卵자의 透明帶에서는 螢光이 전혀 觀察되지 않았던 反面에, 處理區의 卵자들은 모두 강한 螢光을 나타내었으며 (Fig. 3) 本 研究에서는 抗血清이 1:1,000으로 稀釋된 培養液에서 培養된 卵자의 透明帶에서도 밝은 螢光을 觀察할 수 있었으며 이 結果 역시 既存의 報告와 一致하는 것이다 (Jilek & Pavlok, 1975; Oikawa & Yanagimachi, 1975; Sacco, 1978; Ahuja &

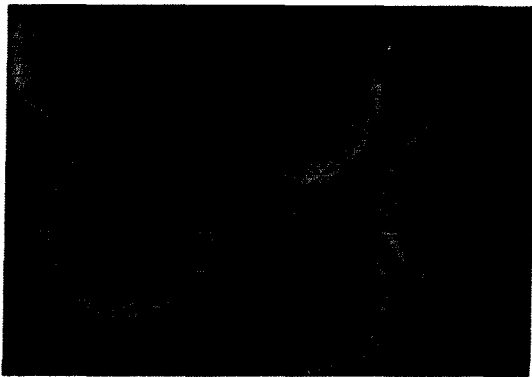


Fig. 3. Mouse eggs treated with FITC-Goat anti-Rabbit IgG following incubation in medium containing 0.3% antiserum in medium. ($\times 250$)

Tzartos, 1981; Aitken et al., 1981).

3. 間接酵素免疫分析法에 의한 透明帶抗體의 確認

抗原인 透明帶溶液을 coating 한 後 抗血清과 對照血清을 各 well에 分注하여 反應시킨 다음 ELISA reader로 492nm에서 O.D.價를 測定한 結果는 Table 1에서 보는 바와 같았다.

Table 1에서 보는 바와 같이 對照區인 E-F에서 O.D.價는 0.23~0.36의 範圍에 지나지 않았는데 이는 抗血清 또는 對照血清에 의한 反應過程이 省略되었기 때문에 coating 된 透明帶抗原에 대한 第2次 抗體의 直接的인 反應에 의한 結果로 判斷되며 本 試驗에 있어서의 background에 該當되는 O.D.價로 思料된다.

C-D는 對照血清을 PBS로 1:100으로 稀釋한 後 double dilution하여 透明帶抗原과 反應시킨 結果로서 1:200까지의 稀釋濃度에서의 O.D.價는 處理區인 A-B에서의 O.D.價와 별로 差異를 나타내지 않았으나 稀釋度가 增加할수록 處理區의 O.D.價보다 有意하게 낮아져 1:3,200의 濃度에서 E-F의 O.D.價와 비슷한 水準으로 낮아진 反面에, 處理區의 경우 1:12,800의 稀釋濃度에서도 各各 1.06, 1.14의 높은 水準의 O.D.價를 나타냄으로써 抗透明帶 抗體의 存在를 確認할 수 있었으며 또, 本 試驗에서 生産된 抗體의 titer가 相當히 높은 水準임을 알 수 있었다. 그리고 對照血清의 경우 1:200까지의 稀釋濃度에서 比較的 높은 水準의 O.D.價가 나타난 것은 透明帶抗原 및 第2次 抗體에 대한 血清成分中の 未知의 因子에 의한 非特異的인 反應結果로 思料된다. 그러나 血清稀釋度가 增加함에 따라 이러한 非特異的인 反應現象이 除去됨에 따라 本 試驗에서 試圖된 indirect ELISA는 抗透明帶 抗體確認의 主要 手段으로 利用되어온 既存의 透明帶沈澱反應

Table 1. Detection of anti-mouse zona antibody by indirect ELISA

Sample	Serum dilution							
	$\times 100$	$\times 200$	$\times 400$	$\times 800$	$\times 1,600$	$\times 3,200$	$\times 6,400$	$\times 12,800$
A	1.35	1.34	1.37	1.35	1.33	1.36	1.20	1.06
B	1.37	1.39	1.36	1.34	1.36	1.34	1.25	1.14
C	1.31	1.23	1.00	0.65	0.40	0.32	0.31	0.29
D	1.30	1.18	0.96	0.68	0.46	0.27	0.22	0.26
E	0.36	0.33	0.30	0.30	0.28	0.28	0.26	0.25
F	0.34	0.32	0.28	0.30	0.28	0.26	0.27	0.23

A-B: antiserum, C-D: control serum, E-F: PBS

또는 間接免疫螢光分析法보다 detection sensitivity 가 월등히 높음을 나타내었다.

이러한 透明帶 抗體確認法으로서의 ELISA system 은 透明帶抗原에 대한 monoclonal antibody 의 生産을 위한 抗體檢證(screening test)방법으로 使用될 수 있을 것으로 期待되며(Isojima et al., 1983; Drell & Dunbar, 1984; Dean et al., 1986), 또한 原因不明의 일부 不妊女性에서의 透明帶에 대한 自家抗體의 存在與否에 대한 臨床診斷法으로도 活用될 수 있을 것으로 期待된다(Mori et al., 1978; Sacco, 1979; Tsunoda & Chang, 1979; Dakhno et al., 1980; Nishimoto et al., 1980; Trounson et al., 1980).

한편, 近來 들어 放射免疫分析法(radioimmunoassay)에 의한 抗透明帶 抗體 確認技法도 꾸준히 試圖되어 오고 있다(Palm et al., 1979; Gerrity et al., 1981).

4. 抗透明帶 抗體가 생쥐 卵자의 體外受精에 미치는 影響調查

抗透明帶 抗體가 생쥐 卵자의 體外受精에 미치는 影響은 Table 2에서 보는 바와 같았다.

抗血清과 對照血清이 0.3~10%까지 各各 含有된 培養液으로 體外受精을 實施하였을 때의 受精率은 對照區에서 77.7~87.7%로서 正常的인 受精率을 나타낸 反面에 處理區에서는 0~29.8%로서 특히, 抗血清의 濃도가 2.5% 以上이었을 때 體外受精이 完全히 抑制되었다. 이러한 結果는 透明帶 抗原에 대한 抗體가 體外受精을 完全히 또는 顯著히 抑制하였다는 報告를 確認하는 것으로서(Shivers et al., 1972; Jilek & Pavlok, 1975; Tsunoda & Chang, 1976a, 1976

c), 이는 抗體가 透明帶와 結合함으로써 透明帶의 構造의 性質을 變化시켜 蛋白分解酵素에 대한 抵抗性이 增加함에 따라 精子가 透明帶에 結合하여 通過하는 것을 抑制하기 때문인 것으로 思料된다.

그러나 Table 2에서 보는 바와 같이 透明帶가 除去된 卵자를 抗血清과 對照血清이 各各 10%, 5% 및 2.5%의 濃도로 含有된 培養液에서 體外受精하였을 때의 受精率은 處理區에서 93.0~98.3%, 對照區에서는 93.3~94.3%로서 抗透明帶 抗體에 의한 體外受精의 抑制現象이 전혀 나타나지 않음으로써 本 試驗에서 使用된 抗體가 透明帶에 대한 特異性을 갖고 있음을 確認할 수 있었다.

5. 抗透明帶 抗體의 受動免疫이 생쥐 卵자의 受精에 미치는 影響 調查

抗透明帶 抗體를 생쥐에 受動免疫한 후 卵자를 回收하여 受精率을 調查한 結果는 Table 3에서 보는 바와 같았다. Table 3에서 보는 바와 같이 抗血清을 0.3ml 또는 抗血清으로부터 分離한 IgG를 3mg 注射하였을 때 受精은 完全히 抑制되었으며, 受動免疫된 抗體는 體外受精에서의 마찬가지로 透明帶에 結合함으로써 透明帶 沈澱反應을 나타내었고, 또한 蛋白分解酵素에 대한 透明帶의 抵抗性을 增加시켰다. 이러한 事實은 受動免疫에 의해 投與된 抗透明帶抗體가 排卵前의 卵자의 透明帶와 結合함으로써 精子에 의한 透明帶通過를 抑制한다는 報告를 確認하는 것으로서(Oikawa & Yanagimachi, 1975; Tsunoda & Chang, 1976b, 1976d; Yanagimachi et al., 1976; Sacco, 1979), 今後 특히 精子受容體를 包含한 透明帶抗原에 대한 monoclonal antibody를 大量生産한다면 人間에 있어서의 避妊製材로 應用될 수 있다는 점에서 많은 관심을 끌고

Table 2. Effect of anti-mouse zonae serum on in vitro fertilization

Concentration of serum(%)	Control serum		Antiserum	
	Fertilized eggs/total eggs(%)		Fertilized eggs/total eggs(%)	
	Intact eggs	zona-free eggs	Intact eggs	zona-free eggs
10	100/114 (87.7)	33/35 (94.3)	0/107 (0)	40/43 (93.0)
5	68/81 (84.0)	57/61 (93.4)	0/73 (0)	57/58 (98.3)
2.5	73/91 (80.2)	42/45 (93.3)	0/75 (0)	45/47 (95.7)
1.3	82/98 (83.7)	—	6/83 (7.2)	—
0.6	73/94 (77.7)	—	11/61 (18.0)	—
0.3	61/74 (82.4)	—	25/84 (29.8)	—

Table 3. Effect of Rabbit anti-mouse zona pellucida serum and Immune IgG on *in vivo* fertilization of mouse

Type of Injection	Dose	No. of mouse	Eggs		Zona* precipitation layers	Resistance** of zona to 0.1% pronase
			No. examined	% fertilized		
Antiserum (ml/mouse)	0.3	6	0 (127)	0	+++	++
	0.2	5	7 (168)	4.2	++ to +++	++
	0.1	7	43 (147)	29.3	- to +	- to +
	0.05	4	63 (94)	67.0	- to +	- to +
	0.01	5	132 (168)	78.6	-	-
Control serum (ml/mouse)	0.3	4	78 (97)	80.4	-	-
	0.2	6	114 (135)	84.4	--	-
	0.1	4	83 (92)	90.2	-	--
Immune IgG (mg/mouse)	3	5	0 (113)	0	+++	++
	2	5	7 (121)	5.8	++	++
	1	6	29 (102)	28.4	- to +	- to +
	0.5	4	41 (97)	42.3	- to +	- to +
	0.1	5	85 (105)	81.0	-	-
Control IgG (mg/mouse)	3	3	78 (84)	92.9	-	-
	2	5	106 (129)	82.2	-	-
	1	4	67 (71)	94.4	-	-
Saline (ml/mouse)	0.3	3	56 (64)	87.5	-	-

*very strong, +++ ; strong, ++ ; moderate, + ; absent, -.

**treatment for 60min with 0.1% pronase.

failure to dissolve the entire zonae within 60 min, ++ ; failure to dissolve within 30min, + ; zonae completely dissolved within 10 min, -.

있다.

이밖에 同種 또는 異種의 卵子透明帶를 能動免疫하여 受精에 미치는 影響을 調査한 研究報告가 더러 있으나 (Gwatkin et al., 1977; Sacco, 1977; Gwatkin & Williams, 1978; Wood et al., 1981) 아직 報告者에 따라 能動免疫에 의한 受精抑制程度가 다소 差異點을 나타내고 있으므로 이 分野 역시 今後 더욱 폭 넓은 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

以上的 結果를 綜合하여 考察할 때 免疫生化學的인 側面에서의 透明帶에 대한 本格的인 研究는 그리 오래 되지 않았지만 精子和 卵子의 受精初期段階에서 發生學的 側面에서의 透明帶의 機能理解에는 相當한 成果를 거두고 있다. 또한 생쥐 卵子의 透明帶에서의 精子受容體의 構造糾明을 위한 實驗的인 研究가 活潑히 進行되

고 있으므로 (Greve & Wassarman, 1985; Florman & Wassarman, 1985), 가까운 將來에 생쥐를 비롯한 기타 哺乳動物 卵子의 透明帶에서 種特異的인 精子受容體의 存在 및 그 構造가 밝혀질 것으로 期待된다.

IV. 摘要

本 試驗은 受精初期段階에서의 發生學的 側面에서 생쥐 卵子 透明帶의 機能을 糾明하고 種特異的인 精子受容體의 存在 및 構造理解를 위한 基礎研究로서 ICR 생쥐의 透明帶를 免疫原으로 하여 토끼에서 抗透明帶抗體를 生産하고 免疫分析法 및 生物學的 檢査法으로 生産된

抗體가 생쥐 透明帶에 特異성이 있음을 確認한 후 이 抗體가 생쥐 未受精卵의 體外受精에 미치는 影響과 또 이 抗體를 생쥐에 受動免疫하였을 때 受精에 미치는 影響을 調査하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 處理區로서 抗血清을, 對照區로서 對照血清을 卵子 培養液에 各各 0.3~10%로 含有한 培養液에서 생쥐의 未受精卵을 2時間 培養한 後 觀察하였을 때 對照區 卵子들의 透明帶가 正常的인 形態를 나타내었던 反面에, 處理區의 卵子들은 모두 透明帶 表面에 뚜렷한 沈澱層을 나타내었다. 이어 對照區와 處理區의 卵子를 0.1% pronase가 含有된 培養液으로 옮긴 후 觀察하였을 때, 對照區 卵子들의 透明帶가 5~7분만에 完全히 融解한 反面에, 處理區에서는 2~3時間까지 殘存하였다.
2. 處理區와 對照區 卵子를 FITC-goat anti-rabbit IgG가 含有된 培養液에서 培養한 후 螢光顯微鏡下에서 觀察하였을 때 對照區에서 對照血清을 10% 含有한 培養液에서 培養한 일부 卵子들의 透明帶에서 희미한 螢光이 나타났으나 血清稀釋度가 增加함에 따라 전혀 螢光을 나타내지 않았던 反面에, 處理區에서는 抗血清이 1:1,000으로 含有된 培養液에서 培養한 卵子의 透明帶에서도 강한 螢光이 나타났다.
3. 透明帶를 抗原으로 하여 間接酵素免疫分析法을 實施하였을 때 抗血清과 對照血清이 PBS에 1:200까지 稀釋되었을 때의 O.D.價는 별다른 差異를 나타내지 않았으나 血清의 稀釋度가 增加함에 따라 O.D.價가 有意한 差異를 나타냄으로써 透明帶에 特異성을 갖는 抗體임을 確認할 수 있었다.
4. 抗血清과 對照血清이 各各 0.3~10%까지 含有된 培養液으로 생쥐의 未受精卵을 豫備培養한 다음 體外受精을 實施하였을 때의 受精率은 對照區에서 77.7~87.7%이었던 反面에, 處理區에서는 0~29.8%로서 抗透明帶抗體가 생쥐卵의 體外受精을 完全히 또는 顯著히 抑制하였다. 그러나 抗血清과 對照血清이 各各 2.5~10%까지 含有된 培養液으로 透明帶를 除去한 未受精卵의 體外受精을 하였을 때의 受精率은 處理區와 對照區에서 各各 93.0~98.3% 및 93.3~94.3%로서 受精抑制現象을 나타내지 않았다.
5. 抗血清과 正常血清, 그리고 兩 血清으로부터 protein A-affinity chromatography에 의해 分

離한 immunoglobulin G를 各各 생쥐에 受動免疫하였을 때, 對照區로서 對照血清을 0.1~0.3ml 또는 control IgG를 1~3mg 投與했을 때의 各各의 受精率이 80.4~90.2%, 82.2~94.4%이었던 反面에, 處理區로서 抗血清을 0.3ml 또는 immune IgG를 3mg 投與한 생쥐에서는 完全한 受精抑制現象이 確認되었다.

V. 引用文獻

1. Ahuja, K.K. and S.J. Tzartos. 1981. Investigation of sperm receptors in the hamster zona pellucida by using univalent (Fab) antibodies to hamster ovary. *J. Reprod. Fert.*, 61: 257-264.
2. Aitken, R.J. and D.W. Richardson. 1981. Mechanism of sperm binding inhibition by anti-zona antisera. *Gamete Res.*, 4: 41-47.
3. Aitken, R.J., E.A. Rudak, D.W. Richardson, J. Dor, O. Djahanbakkch and A.A. Templeton. 1981. The influence of anti-zona and anti-sperm antibodies on sperm-egg interaction. *J. Reprod. Fert.*, 62: 597-606.
4. Austin, C.R. and A.W.H. Braden. 1956. Early reactions of the rodent egg to spermatozoa penetration. *J. Exp. Biol.*, 33: 358-365.
5. Barros, C. and R. Yanagimachi. 1971. Induction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature*, 233: 268-269.
6. Barros, C. and R. Yanagimachi. 1972. Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg. *J. Exp. Zool.*, 180: 251-266.
7. Blandau, R.J. 1980. *In vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 33: 3-11.
8. Bleil, J.D. and P.M. Wassarman. 1980a. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zona

- pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 20 : 873-882.
9. Bleil, J.D. and P.M. Wassarman. 1980b. Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 77 : 1029-1033.
 10. Bleil, J.D. and P.M. Wassarman. 1980c. Structure and function of the mouse zona pellucida : identification and characterization of the proteins of the mouse zona pellucida. *Dev. Biol.*, 76 : 185-203.
 11. Dakhno, F.V., T. Hjort and V.I. Grischenko. 1980. Evaluation of immunofluorescence on pig zona pellucida for detection of anti-zona antibodies in human sera. *J. Reprod. Immunol.*, 20 : 281-291.
 12. Dean, J., I.J. East and S. Shimizu. 1986. Biosynthesis of the mouse zona pellucida and the effect of anti-zona monoclonal antibodies on fertilization and early development *Theriogenology*, Vol. 25. No. 1 : 107-115.
 13. Drell, D.W. and B.S. Dunbar. 1984. Monoclonal antibodies to rabbit and pig zonae distinguish species-specific and shared antigenic determinants. *Biol. Reprod.*, 30 : 445-457.
 14. Dunbar, B.S. and C.A. Shivers. 1976. Immunological aspects of sperm receptors on the zona pellucida of mammalian eggs. In *Immunology of Receptors*. B. Cinader, ed. New York : Marcel Dekker, pp. 509-519.
 15. Dunbar, B.S., N.J. Wardrip and J.L. Hedrick. 1980. Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry*. 19 : 356-365.
 16. Florman, H.M. and P.M. Wassarman. 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP₃ account for its receptor activity. *Cell*, 41 : 313-324.
 17. Garavagno, A., J. Posada, C. Barros and C.A. Shivers. 1974. Some characteristics of the zona pellucida antigen in the hamster. *J. Exp. Zool.*, 189 : 37-50.
 18. Gerrity, M., E. Niu and B.S. Dunbar. 1981. A specific radioimmunoassay for evaluation of serum antibodies to zona pellucida antigens. *J. Reprod. Immunol.*, 3 : 59-70.
 19. Greve, J.M. and P.M. Wassarman. 1985. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.*, 181 : 253-264.
 20. Gwatkin, R.B.L., D.T. Williams and D. J. Carlo. 1977. Immunization of mice with heat solubilized hamster zonae : production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. *Fertil. Steril.*, 28 : 871-877.
 21. Gwatkin, R.B.L. and D.T. Williams. 1978. Immunization of female rabbits with heat solubilized bovine zonae : Production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. *Gamete Res.*, 1 : 19-26.
 22. Hoppe, P.C. and S. Pitts. 1973. Fertilization *in vitro* and development of mouse ova. *Biol. Reprod.*, 8 : 420-426.
 23. Isojima, S., K.Koyama, A.Hasegawa, Y. Tsunoda and A.Hanada. 1983. Monoclonal antibodies to porcine zona pellucida antigens and their inhibitory effects on *in vitro* fertilization of porcine, hamster and human oocytes. In *Reproductive Immunology*. S. Isojima and W.D. Billington, ed. Elsevier Science Publishers. pp.91-102.
 24. Jilek, F. and A. Pavlok. 1975. Antibodies against mouse ovaries and their effect on fertilization *in vitro* and *in vivo* in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 42 : 377-380.
 25. Mintz, B. 1962. Experimental study of the developing mammalian egg : Removal of the zona pellucida. *Science*, 138 : 594-597.

26. Modlinski, J.A. 1970. The role of the zona pellucida in the development of mouse egg *in vivo*. J. Embryol. Exp. Morph., 23: 539-547.
27. Mori, T., T. Nishimoto, M. Kitagawa, Y. Noda, T. Nishimura and T. Oikawa. 1978. Possible presence of autoantibodies to zona pellucida in infertile women. Experientia, 34: 797-799.
28. Nishimoto, T., T. Mori, I. Yamada and T. Nishimura. 1980. Autoantibodies to zona pellucida in infertile and aged women. Fertil. Steril., 34: 552-556.
29. Oikawa, T. and R. Yanagimachi. 1975. Block of hamster fertilization by anti-ovary antibody. J. Reprod. Fert., 45: 487-494.
30. Overstreet, J.W. and J.M. Bedford. 1974. Comparison of the penetrability of the egg vestments in follicular oocytes, unfertilized and fertilized ova of the rabbit. Dev. Biol., 41: 185-192.
31. Ownby, C.L. and C.A. Shivers. 1972. Antigens of the hamster ovary and effects of anti-ovary serum on eggs. Biol. Reprod., 6: 310-318.
32. Palm, V.S., A.G. Sacco, F.N. Syner and M.G. Subramanian. 1979. Tissue specificity of porcine zona pellucida antigen(s) tested by radioimmunoassay. Biol. Reprod., 21: 709-713.
33. Sacco, A.G. and V.S. Palm. 1977. Heteroimmunization with isolated pig zona pellucida. J. Reprod. Fert., 51: 165-168.
34. Sacco, A.G. 1978. Immunological specificity of anti-zona binding to zona pellucida. J. exp. Zool., 204: 181-186.
35. Sacco, A.G. 1979. Inhibition of fertility in mice by passive immunization with antibodies to isolated zonae pellucidae. J. Reprod. Fert., 56: 533-537.
36. Sacco, A.G. and K.S. Moghissi. 1979. Anti-zona pellucida activity in human sera. Fertil. Steril., 31: 503-506.
37. Schmall, E.D. and B.J. Gulyas. 1980. Mammalian sperm-egg recognition and binding *in vitro*. Specificity of sperm interactions with live and fixed eggs in homologous and heterologous inseminations of hamster, mouse and guinea pig oocytes. Biol. Reprod., 23: 1075-1085.
38. Shivers, C.A., A.B. Dudkiewicz., L.E. Franklin and E.N. Russell. 1972. Inhibition of sperm-egg interaction by specific antibody. Science, 178: 1211-1213.
39. Srivastava, P.N., C.E. Adams and E.F. Hartree. 1965. Enzymic action of acrosomal preparations on the rabbit ovum *in vitro*. J. Reprod. Fert., 10: 61-67.
40. Trounson, A.D., C.A. Shivers, R. McMaster and A. Lopata. 1980. Inhibition of sperm binding and fertilization of human ova by antibody to porcine zona pellucida and human sera. Arch. Androl., 4: 29-36.
41. Tsunoda, Y. and M.C. Chang. 1976a. Effect of anti-rat ovary antiserum on the fertilization of the mouse and hamster eggs *in vivo* and *in vitro*. Biol. Reprod., 14: 354-361.
42. Tsunoda, Y. and M.C. Chang. 1976b. The effect of passive immunization with hetero- and isoimmune anti-ovary antiserum on the fertilization of mouse, rat and hamster eggs. Biol. Reprod., 15: 361-365.
43. Tsunoda, Y. and M.C. Chang. 1976c. *In vivo* and *in vitro* fertilization of hamster, rat and mouse eggs after treatment with anti-hamster ovary antiserum. J. exp. Zool., 195: 409-416.
44. Tsunoda, Y. and M.C. Chang. 1976d. Reproduction in rats and mice isoimmunized with homogenate of ovary or testis with epididymis or sperm suspensions. J. Reprod. Fert., 46: 379-382.

45. Tsunoda, Y. and T. Sugie. 1977. Inhibition of fertilization in mice by anti-zona pellucida antiserum. Jpn. J. Zootech. Sci., 48: 784-786.
46. Tsunoda, Y. and T. Sugie and J. Mori. 1979. Quantitative determination of titers of anti-zona antiserum. J. exp. Zool., 207: 315-320.
47. Tsunoda, Y. and M.C. Chang. 1979. The suppressive effect of sera from old female mice on *in vitro* fertilization and blastocyst development. Biol. Reprod., 20: 355-361.
48. Wood, D.M., C. Liu and B.S. Dunbar. 1981. The effect of alloimmunization and heteroimmunization with zonae pellucidae on fertility in rabbit. Biol. Reprod., 25: 439-450.
49. Yanagimachi, R., J.L. Winkelhake and G. L. Nicholson. 1976. Immunological block to mammalian fertilization: Survival and organ distribution of immunoglobulin which inhibits fertilization *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73: 2405-2408.