

돼지 체외성숙 난자의 세포질내 정자주입에 의한 수정에 관한 연구

김상근 · 김민수 · 남윤이*

충남대학교 수의과대학

Studies on the Fertilization Rates using Intracytoplasmic Sperm Injection with *In Vitro* Matured Porcine Oocytes

Kim, S. K., M. S. Kim and Y. Y. Nam*

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate on the improvement of fertilizing ability of *in vitro* matured oocytes from sperm density and motility by intracytoplasmic sperm injection(ICSI) into the porcine oocytes.

1. The *in vitro* fertilization and cleavage rates of oocytes from 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 ($\times 10^6$ /ml) sperm concentration by IVF and ICSI of porcine oocytes were 46.7%~75.0%, 60.0%~85.7% and 10.6%~25.0%, 20.0%~64.3%, respectively.
2. The *in vitro* fertilization and cleavage rates of oocytes from 20, 40, 60, 80% of sperm motility by IVF and ICSI of porcine oocytes were 46.4%~71.4%, 67.9%~85.7% and 7.1%~21.4%, 28.6%~60.7%, respectively.
3. The *in vitro* fertilization and developmental rates of oocytes by IVF and ICSI methods were 55.6%~60.0%, 77.8%~80.0% and 17.8%~24.0%, 42.2%~56.0%, respectively. This ICSI method was improved high fertilization rates of porcine oocytes.

(Key words : Porcine oocytes, IVF, ICSI, Fertilization, Cleavage rates)

I. 서 론

난자의 세포질내 단일정자 주입(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 관한 연구는 인간을 대상으로 불임증 해결을 위한 치료법 개발목적으로 주로 연구되어 왔다(Trounson 등, 1994; Catt와 Rhodes, 1995; Palemo 등, 1995, 1996; Ahmadi 등, 1996; Motoishi 등, 1996; Bar Hava 등, 1997; Barros 등, 1997; Hoover 등, 1997; Novero 등, 1997; Polcz 등, 1997).

돼지의 체외수정과 체외발생에 관한 연구는 근래에 와서는 활발한 연구가 이루어지고는 있지만 현재까지도 체외수정율과 체외발생율이 낮아 이의 개선이 절실히 요청되고 있는 실정이다(Nagashima 등, 1989; McGaughey와 Polge, 1971; Sato 등, 1978). Lacham Kaplan과 Trounson(1995)은 mouse난자의 수정시 ICSI전에 정자를 Ca-inophore로 침체반응을 유지한 intact oocytes의 전핵형성율은 59~62%였으며, 전핵형성 난자는 수정후 배반포까지 발생되었다고 보고하였으며, Motoishi 등(1996)은 난자의 ICSI시 micropipette내 정자의 흡입시 배양액에 PVP

* 한국과학기술원 생명공학연구소(Korea Research Institute of Biosci. and Biotech., KIST)

(polyvinylpyrrolidone)를 첨가하여 주입했을 때 난자에 주입시 정상수정, 발생 및 세포수에 있어서 해를 주지 않았으며, 또한 난자의 ICSI는 동물이나 사람에 있어서 배 발생이나 배 세포질에 있어서 나쁜 영향을 주지 않았다고 보고하였다. 한편, Catt와 Rhodes (1995)는 주요 가축의 체외성숙 난자에 대해 정자주입을 시험하고 이것을 사람의 것과 비교하였는데 양, 소 돼지 난자에 정자 주입전, 후에 외인적으로 활성화시키지 않은채 수정과 발생 여부를 시험하였을 때 돼지는 배 발생 및 수정시에 온도에 민감하고, 양은 정자 존재여부에 관계없이 주입후 활성화되는 경향이 있다고 보고하였다. 또한, Ahmadi 등(1996)은 햄스타 난자를 이용하여 사람의 정자를 ICSI법에 의해 수정시키는 방법으로 수정능력을 검정할 수 있다고 보고하였다. 그러나 가축난자의 세포질내 단일정자의 주입에 의한 수정에 관한 연구와, 난자의 세포질에 정자주입시 정자수, 활력 및 PVP 농도 등이 수정율에 미치는 영향에 관한 보고는 접할 수 없었다. 특히, 소형 개나 고양이 등 고가의 애완동물은 고단백사료로 사육하면서도 운동량이 극히 적어 수태가 잘 안되는 불임증에 가까운 개체가 많아 이의 해결이 절실히 요청되고 있다.

이에, 본 연구는 고가이면서 정자회소증 또는 불임 증세를 나타내는 소형개의 수태율의 증진과 불임해결에 적용할 목적으로, 일차적으로 난소회득이 용이한 돼지 정자의 농도별, 활력별로 체외수정과 현미조작에 의해 난자의 세포질내 단일정자의 주입에 의한 수정율과 체외발생율을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수와 배양

도살돼지의 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 난포액을 흡입하여 실험현미경(20~40×)난포란의 회수와 배양난포란의 회수와 배양하에서 난포란을 회수하여 10%(v/v)의 FCS(Sigma, USA)와 1 µg/ml의 FSH(Sigma, USA), 2 IU/ml의 HCG(Sigma, USA), 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 g/ml의

streptomycin sulfate(Sigma, USA)가 첨가된 TC-M-199(Whittaker, USA) 배양액으로 배양하였다.

2. 난자의 체외성숙과 체외수정

난포란의 체외성숙은 배양액 50 µl의 drop을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간전에 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5℃)에서 5~6시간 평형시킨 후 drop내에 5개의 난포란을 주입하여 48~50시간 성숙배양하였다.

난자의 체외수정은 성숙배양이 끝난 난포란을 45 µl의 배양액 소적에 5개씩 주입하고, 정소상체 미부정액 0.2 ml와 BO액 1 ml를 시험관내에서 혼합하여 CO₂ 배양기에서 swim-up시킨 다음, 약 0.5 ml의 상층액을 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전된 정자 pellets을 동량의 heparin용액(100 µg/ml, Sigma, USA)과 혼합하여 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유기시킨 정자부유액 2 µl(1~5×10⁶ ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 후 38℃의 CO₂배양기에서 5~7시간 동안의 매정에 의해 수정시켰다.

3. ICSI

체외성숙 난자의 세포질내 정자의 주입은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 petri dish내 PVP액(PVP 0.1 g과 3차 증류수 1 ml)을 넣어 vortex mixer로 용해시킨 후 0.2 µm filter syringe로 여과한 다음 냉장 보관하면서 사용 전날부터 preincubation한 drop중에 수정능획득 정자를 넣어 운동성을 저하시킨 정자를 micropipette에 장진시켜 보정용 pipette으로 흡인 고정 한 체외성숙난자내에 현미조작에 의해 주입하였으며 시험은 3반복으로 수행하였다.

4. 생존성 및 체외발생율의 검사

IVF 및 ICSI후 초기배를 배양액으로 3회 세척후 10% FCS + TCM-199 배양액으로 배양하면서 배의 발생상태를 관찰하거나, FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 생존성과 체외발생율을 판정하였다(Schilling 등, 1982).

III. 결과 및 고찰

1. 정자의 농도별 IVF 및 ICSI시 수정율 및 체외발생율

돼지 난자의 수정시 정자의 농도별로 IVF 및 ICSI 후 배양하였을 때 수정율 및 체외발생율은 Table 1에서 보는 바와 같이, 돼지 난자의 수정시 정자를 1.0, 2.0, 3.0, 5.0($\times 10^6$ /ml)의 농도별로 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때 IVF시에 수정율은 각각 56.7%~75.0%와 10.0%~25.0%이고 ICSI시에는 60.0%~85.7%와 20.0%~64.3%로서, 정자 농도별 수정시 IVF에 비해 ICSI법이 수정율과 체외발생율이 높게 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다.

돼지 난포란의 체외수정율과 체외발생율은 소의 그것과 비교할 때 낮게 나타났으나, ICSI법이 IVF에 비해 높게 나타났다. 이러한 결과는 사람에게 있어서 IVF술에 비해 ICSI법이 체외수정율과 분할율이 높게 나타났다고 보고한 Trounson 등(1994)의 보고와 대상은 다르지만 시험결과는 대체로 일치하였다. 한편, Kanezevich 등(1995)은 21개의 난자를 세포질내 단일정자를 주입하였을 때 수정율은 90.9%로서 체외성숙 난자의 손상율은 낮았다고 보고하였다. 또한, Lac-

ham Kaplan과 Trounson(1995)은 mouse에 있어서 ICSI전에 정자를 Ca-inophore로 처리하여 침체반응을 유기(28~58%)한 intact oocytes의 진행형성율은 60% (59~62%)였으며, 진행형성 난자는 수정후 이식하였을 때 배반포까지 발생되었다고 보고하였다.

2. 정자의 활력별 ICSI에 의한 수정 및 체외발생율

돼지 난자의 수정시 정자의 활력별로 IVF 및 ICSI 후 배양하였을 때 수정율 및 체외발생율은 Table 2와 같다.

돼지 난자의 수정시 정자를 20, 40, 60, 80%의 활력별로 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율과 체외발생율은 각각 IVF시 46.4%~71.4%와 7.1%~21.4%이고 ICSI시에는 67.9%~85.7%와 28.6%~60.7%였다. 정자의 활력별 수정시 IVF에 비해 ICSI법에서 수정율과 체외발생율이 높게 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다.

이러한 결과는 이와 유사한 보고가 없어 비교할 수는 없지만 ICSI법이 IVF에 비해 높은 수정율과 체외발생율을 나타냈다. 한편, Novero 등(1997)은 ICSI시 FSH와 정상정자, 정자농도, 활력, 형태, 수정, 분할, 임신 등과의 관계를 조사하였을 때 정자농도와 총 활력과는 역상관계, 전진활력 및 형태와는 무관하다

Table 1. Results of fertilization and cleavage rates on sperm density of IVF and ICSI of porcine oocytes

Density of sperm($\times 10^6$ /ml)	No. of oocytes examined	No. of oocytes(IVF)		No. of oocytes(ICSI)	
		Fertil.(%)	Cleaved(%)	Fertil.(%)	Cleaved(%)
1.0	30	17(56.7)	3(10.0)	18(60.0)	6(20.0)
2.0	28	18(64.3)	4(14.3)	20(71.4)	15(53.7)
3.0	30	22(73.3)	6(20.0)	24(80.0)	17(56.7)
5.0	28	21(75.0)	7(25.0)	24(85.7)	18(64.3)

Table 2. Results of fertilization and cleavage rates on sperm motility of IVF and ICSI of porcine oocytes

Motility of sperm(%)	No. of oocytes examined	No. of oocytes(IVF)		No. of oocytes(ICSI)	
		Fertil.(%)	Cleaved(%)	Fertil.(%)	Cleaved(%)
20	28	13(46.4)	2(7.1)	19(67.9)	8(28.6)
40	30	17(56.7)	4(13.3)	21(70.0)	12(40.0)
60	30	18(60.0)	5(16.7)	23(76.7)	15(50.0)
80	28	20(71.4)	6(21.4)	24(85.7)	17(60.7)

고 보고하였다. 또한, Catt와 Rhodes(1995)는 주요 가축의 체외성숙 난자에 대해 정자주입을 시험하고 사람의 그것과 비교하였는데 양, 소 돼지 난자에 정자 주입전, 후에 외인적으로 활성화시키지 않은채 수정과 발생 여부를 시험하였을 때 돼지는 배 발생 및 수정시에 온도에 민감하고, 양은 정자 존재 여부에 관계없이 주입후 활성화되는 경향이 있다고 보고하였다.

3. 체외수정 및 ICSI의 수정율 및 체외발생율

돼지 난자의 체외수정과 ICSI시의 수정율 및 체외발생율을 비교하기 위하여 정상적 whole semen을 이용하여 체외성숙 난자를 각각 IVF와 ICSI법으로 조건을 달리하여 수정시켰을 때 수정율과 체외발생율은 Table 3과 같다.

돼지 체외성숙 난자와 수정능획득 정자를 체외수정한 IVF와 ICSI법에 의해 수정시켰을 때 각각 수정율과 체외발생율은 IVF시에 55.6%~60.0%와 17.8%~24.0%이고 ICSI시에는 77.8%~80.0%와 42.2%~56.0%로서 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율이 크게 향상되었으나, 수정후 체외발생율이 떨어지는 현상과 고가의 가자재와 숙련된 기술을 필요로 하는 단점이 있어 이의 개선에 관한 연구가 필요한 실정이다. 그러나 ICSI법은 고가이면서 저정자증 또는 불임증을 나타내는 소형 개에 있어서 수태율 증진과 불임 해결에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

이러한 결과는, 세포질내 정자 주입기술은 체외성숙 난자의 수정율은 증가시킬 수 있다고 보고한 Trounson 등(1994), ICSI전에 정자를 Ca inophore로 처리하여 침체반응을 유지(acrosome-free 정자율 28~58%)한 intact oocytes의 전핵형성율은 60%(59~62%)였으며, 전핵형성 난자는 수정후 이식하였을 때

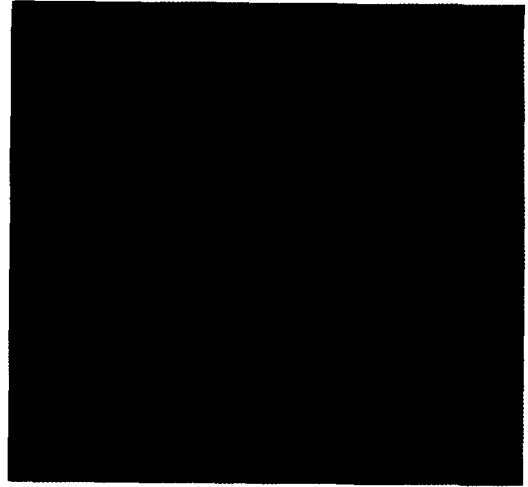


Fig. 1. Oocytes microinjected single sperm into cytoplasm.

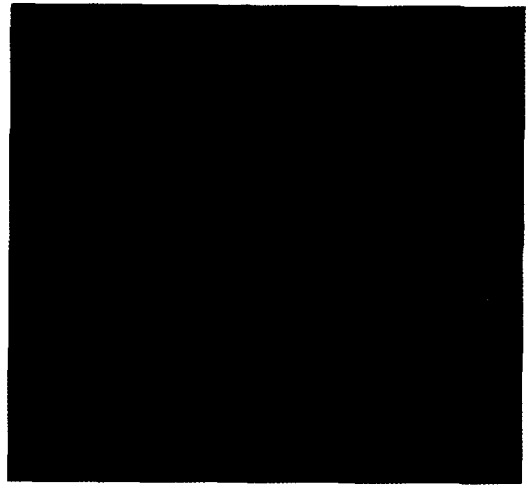


Fig. 2. Single sperm absorbed in micropipettes.

Table 3. Results of fertilization and developmental rates on whole semen of IVF and ICSI of porcine oocytes

Method of fertilization	No. of oocytes		No. of blastocyst
	Examined	Fertilized(%)	Developed(%)
IVF ^a I	45	25(55.6)	8(17.8)
	50	30(60.0)	12(24.0)
ICSI ^b I	45	35(77.8)	19(42.2)
	50	40(80.0)	28(56.0)

* Values with different superscripts within column were significantly different (P<0.05).

높은 배반포 발생율을 나타냈다는 Lacham Kaplan과 Trounson(1995)의 보고와 일치되는 경향이었다.

IV. 적 요

본 연구는 고가의 저장자중 또는 불임증을 나타내는 소형 개에 있어서 수태율 증진과 불임해결에 적용할 목적하에 일차적으로, 돼지 정자의 농도별, 활력별로 IVF 및 ICSI에 의해 수정시켰을 때 수정율과 체외발생율을 조사하였다.

1. 돼지 난자의 수정시 정자를 1.0, 2.0, 3.0, 5.0($\times 10^6$ /ml)의 농도별로 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율과 체외발생율은 각각 IVF시에 46.7%~75.0%와 10.6%~25.0%이고, ICSI시에는 60.0%~85.7%와 20.0%~64.3%였다.
2. 돼지 난자의 수정시 정자를 20, 40, 60, 80%의 활력별로 IVF 및 ICSI법으로 수정시켰을 때 수정율과 체외발생율은 각각 IVF시에 46.4%~71.4%와 7.1%~21.4%이고, ICSI시에는 67.9%~85.7%와 28.6%~60.7%였다.
- 3 돼지 난자의 체외수정과 체외성숙 난자에 ICSI법에 의해 수정시켰을 때 각각 수정율과 체외발생율은 IVF시에 55.6%~60.0%와 17.8%~24.0%이고, ICSI시에는 77.8%~80.0%와 42.2%~56.0%로서 ICSI법에서 수정율이 크게 향상되었다.

V. 인용문헌

1. Ahmadi, A., A. Bongso and S. C. Ng. 1996. Intracytoplasmic injection of human sperm into the hamster oocyte(hamster ICSI assay) as a test for fertilizing capacity of the male-factor sperm. *J. Assist Reprod. Genet.*, 13(8):647-651.
2. Bar Hava, I., J. Ashkenazi, M. Shelef, A. Schwartz, M. Brengauz, D. Feldberg, R. Orvieto and Z. Ben Raael. 1977. Morphology and clinical outcome of embryos after *in vitro* fertilization are superior to those after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 68(4):653-657.
3. Barros, A., M. Sousa, C. Oliveira, J. Silva, V. Almeida and J. Beires. 1997. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm recovered from the ejaculate. *Fertil. Steril.*, 67(6):1091-1094.
4. Catt, J. W. and S. L. Rhodes. 1995. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7(2):161-166.
5. Hoover, L., A. Baker, J. H. Check, D. Lurie and D. Summers. 1997. Clinical outcome of crypreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 67(4):621-624.
6. Kanezevich, K. M., J. B. Russel, J. A. Dickson, K. F. Fabian and K. J. Cunningham. 1995. High fertilization rates using intracytoplasmic sperm injection with unstimulated *in vitro* matured oocytes. A.S.R.M. Meeting(abstract).
7. Lacham Kaplan, O. and A. Trounson. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in mice : increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. *Hum. Reprod.*, 10(10):2642-2649.
8. McGaughey, R. W. and C. Polge. 1971. Cytogenic analysis of pig oocytes matured *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 176:383-396.
9. Motoishi, M., K. Koto, K. Tomita, S. Ookutsu and Y. Nakanishi. 1996. Examination of the safety of intracytoplasmic injection procedures by using bovine zygotes. *Hum. Reprod.*, 11(3):618-620.
10. Nagashima, H., Y. Kato, H. Yamakawa and S. Ogawa. 1989. Low temperature sensitivity of blastocyst and blastocyst-derived cells in pigs. *Theriogenology*, 31(3):525-530.
11. Novero, V., M. Camus, H. Tourmaye, J. Smitz, G. Verheyen, H. Joris, M.P. Derde,

- A. C. Van Steirteghem and P. Devroey. 1997. Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 12(1):59-63.
12. Palemo, G. D., J. Cohen, M. Alikami, A. Adler and Z. Rosenwaks. 1995. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection(ICSI). 1995. *Reprod. Fertil.*, 7(2):211-218.
13. Palemo, G. D., J. Cohen and Z. Rosenwaks. 1996. Intracytoplasmic sperm injection : a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil. Steril.*, 65(5):899-908.
14. Polcz, T. E., D. L. Olive and E. E. Jones. 1997. Improving the intracytoplasmic sperm injection technique by transmembrane electric potential monitoring. *Fertil. Steril.*, 68(4):735-738.
15. Sato, E., A. Iritani and Y. Nishigawa. 1978. Rate of maturation/division of pig follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 49:400-405.
16. Schilling, E., H. Niemann and D. Schmidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*. 15:245-248.
17. Trounson, A., D. Pushett, L. J. Maclellan, I. Lewis and D. K. Gardner. 1994. Current status of IVM /IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology*, 41:57-66.
- (접수일자 : 1999. 4. 14. /채택일자 : 1999. 6. 4.)