

한국야생유래 행동이상 Mouse에 있어서 체외수정에 의한 번식장애 개선과 정자의 동결보존

남윤이 · 김상근* · 김명수 · 이철호 · 최양규 · 현병화
생명공학연구소

Improvement of Reproductive Disturbances by *In Vitro* Fertilization and Spermatozoa Cryopreservation in a Mouse Strain Showing Behavior Abnormality Derived from Korean Wild Mouse (*Mus musculus molossinus*)

Nam, Y. Y., S. K. Kim*, M. S. Kim, C. H. Lee, Y. K. Choi and B. H. Hyun
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

ABSTRACT

The present study was performed to improve the reproductive disturbance as well as the elimination of microbiological contamination for animals bred under conventional conditions followed by *in vitro* fertilization and embryo transfer techniques including embryo and sperm freezing, using a mouse strain(*M. m. molossinus-tt@Kist*) showing the abnormal behavior disorder derived from Korean wild mice(*Mus musculus molossinus*). Moreover, hematological and serum biochemical analyses were also carried out to obtain the basic data of this mouse strain.

The results are summarized as follows:

1. In comparison with hematological data, the numbers of RBC and platelet of this mouse strain were appeared as the higher value those that of the same aged inbred strains such as BALB /c, DBA /2, C57BL /6 and C3H /Hen. However, no differences were found in values of WBC, Hb and Ht. Moreover, total cholesterol of this strain showed a low value but triglyceride, total protein and albumin values were similar as in inbred strains.
2. The average numbers of superovulated oocytes treated with 2.5 /2.5 IU and 5.0 /5.0 IU of PMSG /hCG were 11.6 and 12.7, respectively. The fertilization rates of 2.5 /2.5 IU PMSG /hCG treatment(87.9%) was higher than 5.0 /5.0 IU treatment(52.0%) ($p < 0.05$) and the developmental rate of 2 cell stage embryos were also appeared as higher value 99.0% and 90.6%, respectively.
3. The rates of *in vitro* fertilization treated with frozen sperm(24.8%) was significantly lower than of that fresh sperm(87.9%), ($p < 0.05$).
4. The five, six and ten heads of offspring were obtained from frozen-thawed 2 cell embryos by *in vitro* fertilized, 2 cell embryos from *in vitro* fertilized by frozen-thawed spermatozoa and 2

* 충남대학교 수의과대학(Coll. of Vet. Med., Chungnam National University)

cell embryos by *in vitro* fertilization, respectively. These offspring developed the expected disease about 2 weeks after birth, which was confirmed that the disease character of this mutant mouse strain was reliably reproduced.

5. MHV(Mouse hepatitis virus) and *Staphylococcus aureus* were successfully eliminated from conventional animals by *in vitro* fertilization-embryo transfer and the use of SPF recipient animals.

(Key words : Wild mice, IVF, Embryo transfer, Sperm freezing, Microbiological monitoring)

I. 서 론

최근 조사된 자료에 의하면 마우스(3,290여계통), 랫드(750여계통), 토끼(70여계통), 개(15계통), 영장류(36계통) 등 22종류의 동물 중에서 7,000여 계통 이상의 실험동물들이 보고되어 있다(Altman과 Katz, 1979). 이중 마우스(*Mus musculus*)는 분포지역이 넓고, 아종의 분화도 다양하며(Marshall과 Sage, 1981), 특정지역에서 질병의 모델동물로 활용될 가능성이 높다(Altman과 Katz, 1979). 또한 다양한 유전적 변이를 가지고 있어서 생명과학분야에 널리 사용될 수 있어 야생동물자원에 대한 가치는 대단히 높다고 할 수 있다(Festing, 1993).

마우스 정자의 동결법(Tada 등, 1990; Takeshima 등, 1991; Nakagata와 Takeshima, 1992; Nakagata 등, 1995)은 질환모델동물과 같이 각종 병인에 의해 수컷이 번식장애했을 경우나 야생마우스 유래의 동물과 같이 계획적인 수정란의 채취가 어려울 경우에 수정란 동결법보다 오히려 유용하게 사용될 수 있다(Nakagata, 1995; Nakagata 등, 1997). 번식장애동물에 있어서 인공적으로 체외 수정된 수정란을 대리모(recipient)에 이식하여 계대유지하는 기법은 동물의 절멸을 방지할 수 있는 유용한 수단이 되었다(Yokoyama 등, 1995). 이러한 대리모를 이용하는 수정란이식기법은 계대유지뿐만 아니라 MHV(mouse hepatitis virus)등과 같은 병원균에 감염된 동물의 수정란일지라도 무병동물(SPF동물)을 대리모로 사용하여 수정란을 이식할 경우 성공적으로 병원균이 제거될 수 있음이 보고되었다(Okamoto 등, 1990; Rouleau 등, 1993; Suzuki 등, 1996).

최근, 생명공학연구소에서는 유지중인 한국산 야생마우스(*M. m. molossinus*, Kojuri, Korea)로부터 좌

우 또는 뒤로 쓰러지는 행동을 나타내는 자연발증 행동이상마우스(*M. m. molossinus-tt@Kist*)를 발견하여 유전학적, 조직학적 및 임상학적인 연구결과, 이 동물은 하나의 열성유전자(*tt* gene; tottery and tippy)에 의해 지배되는 유전성 행동이상동물로서, 기존의 유전성 행동이상모델동물(*rl, pcd, wv, sg* mouse)과는 상이한 동물인 것으로 밝혀져 국내 최초의 새로운 신경질환모델동물로서의 이용 가능성이 보고되었다(현 등, 1997). 그러나, 이 마우스는 대부분의 행동이상모델동물과 같이 homozygous(이하 homo로 표기) 상태에서는 번식장애가 동반되어, homo 암컷과 phenotype이 정상인 수컷을 교배하여 새끼를 얻어야 한다. 이때 한배의 새끼들 중 homo, hetero, normal의 동물이 섞여있어 증상이 겉으로 발현되기 전까지는 homo의 구분이 어렵고, 후대검정을 통해서만 유지번식이 가능하므로 인력, 사육공간, 경비 등의 부담이 따르게 된다. 이러한 경우 homo 배우자(gametes)를 체외수정하여 수정란을 얻고 대리모를 사용하여 새끼를 얻을 수 있다면 질병개시 이전이나 태아상태에서도 실험이 가능할 것이다.

이에 본 연구는 한국산 야생마우스 유래 유전성 행동이상동물의 혈액학적 및 혈액생화학치와, 난자와 동결정자를 이용한 체외수정란의 이식에 의한 산자생산, 정자동결법 및 수정란 이식기법에 의한 병원성 미생물이 제거된 무병마우스를 획득하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 경기도 광주군 고주리에서 포획후 현재 생명공학연구소에서 유지중인 한국산 야생 유래의 유전성 행동이상 증상을 보이는 마우스로서(Fig. 1), 암컷은 4~7주령, 수컷은 8~15주령의 동물을 공시하여



Fig. 1. Photographed by Sony digital camera of behavior abnormality on *M. m. molossinus-tt* @ Kist mouse.

온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 조명 12L 12D의 SPF (Specific Pathogen Free) 환경조건하에서 멸균된 음수와 “마우스 및 랫드용” 펠릿사료(제일제당주식회사)를 방사선 멸균 처리후 자유 급식하였다.

2. 과배란 유기

체외수정을 위한 난자를 채취하기 위하여 암컷 마우스(4~7주령)에 19:00~20:00사이 PMSG (PREGNECOL, Australia) 2.5 IU 또는 5 IU를 복강주사하고, 48시간 후에 hCG(Sigma, USA) 2.5 IU, 5 IU를 복강 주사하여 과배란을 유기하였다.

3. 배양액

체외수정은 HCO₃-HTF용액을 기본배양액으로, 난자회수와 세척은 Hepses-HTF용액을 사용하였는데, 전부실험전날 0.4 ml의 drop위에 mineral oil(Sigma, USA)을 도포하여 37°C, 5% CO₂ incubator (SANYO, Japan)에 넣어 전 배양하였다. 동결보존액은 10% FBS(GIBCOBRL, USA)가 첨가된 PBI 용액(NaCl 136.87 mM, KCl 2.68 mM, CaCl₂ · 2H₂O 0.90 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, MgCl₂ · 6H₂O 0.49 mM, Na₂HPO₄ · 12H₂O 8.09 mM, Na pyruvate 0.33 mM, Glucose 0.56 mM, BSA 3 mg/ml)을 기본용액으로 사용하였다.

4. 혈액화 및 혈액생화학적 검사

혈액학적 검사는 마우스의 안와정맥으로부터 heparinized capillary tube(Fisher Scientific, USA)로 채혈한 후 30분 이내에 자동혈구분석기(CELLTAC, Japan)로, 혈액생화학적 검사는 non-heparinized capillary tube(Fisher Scientific, USA)로 채혈 후 4°C 냉장실에 1시간 동안 방치후 원심분리(3,000 rpm, 10 분간)하여 혈청을 Chemistry analyzer(CIBA CORNING, USA)로 분석하였다.

5. 정자의 동결과 융해

수컷 마우스(8주령이상)의 정소상체 미부를 분리하여 여과지위에 놓고 실체현미경하에서 지방과 혈액을 제거한 후, R18S3용액이 담긴 dish내에서 미세가위로 6조각으로 세절하고, 1분간 고르게 분산시킨 뒤 straw(0.25 ml, I.M.V., France)내에 정자현탁액을 10 μl씩 각각 분주하여 electric sealer(Hwanjoo Co., Korea)로 밀봉한 뒤, LN2 표면위에 15 초간 정치후 곧바로 침지하여 LN2 container내에 보관하였다. 정자의 융해는 LN2 container로부터 straw를 꺼내어 37°C water bath에서 15분간 융해시킨 후 체외수정용 HCO₃-HTF용액에 정자현탁액을 1~2 μl정도 넣고 1.5시간동안 incubator에서 배양하여 체외수정에 이용하였다.

6. 체외수정과 수정란 회수

체외수정을 위한 난자의 준비는 hCG주사후 13~15 시간째에 난관을 잘라내어 Hepses-HTF 용액에 넣어 26FG 주사침으로 난관팽대부를 찢어 HCO₃-HTF 용액의 drop내에 난구괴를 방출시켜 준비한 난자와, 동결정액을 37°C water bath에서 15분간 융해시킨 후 1.5~2시간 배양으로 수정능획득을 유기한 정자현탁액(동결융해 정자는 2000~4000/μl로 신선정자는 100~300/μl의 농도로 조정)을 체외수정용 용액 drop내에 넣어 4~6시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 매정시킨 후, 배양을 통해 제 2 극체의 자동 전핵이 관찰되고 형태가 정상적인 것만을 수정란으로 판정하여(Fig. 2) 수정란이식과 동결에 이용하였다.

7. 수정란의 동결 및 융해

2세포기 체외수정란을 0.5M DMSO(Dimethylsul-

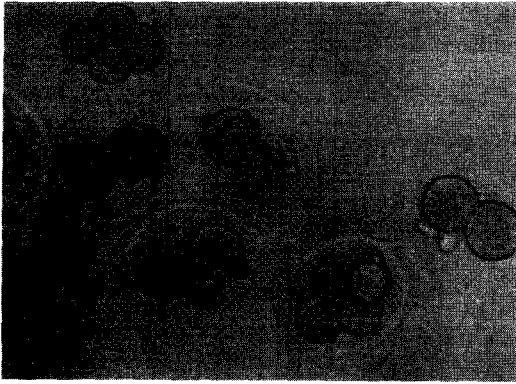


Fig. 2. 2~4 cell embryos after in vitro fertilization of *M. m. molossinus-tt* @ Kist mouse ($\times 400$).

foxide, Sigma, D2650, USA) + 10% FBS + PBI용액용액에서 2분간, 1M DMSO용액에서 10분간 평형시킨 후, 0.25 ml의 straw에 8~15개씩 주입하여 programmable freezer(CryoLogic, Australia)로, 실온에서 -7°C 까지는 $-0.2^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ 로 -7°C 에서 -50°C 까지는 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, -50°C 에서 -70°C 까지는 $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ 으로 동결후(Taya 등, 1994) LN2 container에 침지하여 보관하였다. 용해는 동결의 역순으로 Hepes-HTF용액의 micro-drop내에 옮겨 37°C incubator에서 30분간 정치 용해한 후 수정란이식에 이용하였다.

8. 수정란 이식 및 산자획득

성주기 검사를 통해 발정기의 암컷마우스를 골라 15:00-18:00시에 정관절제 수술한 Kist:ICR 수컷마우스의 케이지에 넣어 동숙시키고 익일 아침 질전검사를 통해 질전이 확인된 개체를 대리모로 선정하여 2.5% avertin(Aldrich, USA)을 체중 1 g당 0.02 ml를 복강주사하여 마취시킨 후 실체현미경하에서 이식용 수정란을 PBI용액으로 3회 세척하여 이식용 pipette에 8~15개씩 주입하여 한쪽 난관에만 이식할 경우 8~14개, 양쪽 난관에 이식할 경우 각 난관에 8~12개씩을 이식하였다. 이식 후 새끼로 출산된 것만을 생존한 것으로 판정하였다.

9. 무병동물화에 따른 미생물학적 검사

보통동물(conventional animal)과 청정대리모에 이식후 태어난 청정마우스를 대상으로 실시한 미생물학적 검사는 다음과 같이 실시하였다.

1) 혈청검사

후안와정맥총에서 채혈한 혈액을 3,000~4,000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리하고, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) plate(실험동물중앙연, 일본)에 혈청을 40배 희석한 후 $200\ \mu\text{l}$ 씩 분주하여 실온에서 1시간 배양한 후, 3회 세척하고, 2차 항체를 $200\ \mu\text{l}$ 씩 분주하여 실온에서 1시간 배양한 후 3회 세척하였다. OPD(o-Phenylenediamine-Dihydrochloride, Sigma, USA)를 $200\ \mu\text{l}$ 씩 분주하여 발색시키고 10분간 실온에서 반응시킨 후 반응정지액을 $50\ \mu\text{l}$ 씩 분주하여 반응을 정지시켰다. ELISA plate reader(Flow Lab, Lugano, Switzerland)를 이용하여 492 nm의 파장 하에서 흡광도를 측정한 후 양성대조 및 음성대조와의 흡광도를 비교하여 감염여부를 평가하였다.

IFA(indirect immunofluorescence antibody) test는 IFA 항원 slide(일본 실험동물중앙연, 일본)로 혈청을 10배 희석하여 $10\ \mu\text{l}$ 씩 분주한 후, 37°C 에서 20분간 배양하고 PBS로 3회 세정한 후, FITC conjugated anti-mouse Ig G를 $10\ \mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 37°C 에서 20 분간 배양하고 PBS로 3 회 세정한 후, 형광현미경으로 양성 및 음성대조와 비교하여 감염여부를 평가하였다.

2) 배양검사

2Diethyl ether(Junsei Chemical Co., Japan)로 마취한 후 등쪽 피모를 멸균된 핀셋으로 채취하여 Sabouraud glucose agar(Merck, Deutschland)에 접종하였다. 기관의 ventral part를 멸균한 가위 및 겹자로 천공하고 멸균한 면봉으로 기관을 도말한 후 PPLO agar(Difco, USA), Blood agar(Becton-Dickinson, USA), Vogel-Johnson agar(Merck)에 도말 접종하였다. 복강을 개봉하여 맹장 내용물을 노출시키고 내용물을 smear한 후, NAC agar(Eiken, Japan), DHL agar(Merck), Vogel-Johnson agar(Merck)에 도말 접종하였다. Blood, Vog-

el-Johnson, NAC, DHL agar는 37℃ incubator에서 24~48시간, Sabouraud glucose agar는 22℃ incubator에서 5~20일간, PPLO agar는 37℃ CO₂ incubator에서 7일간 배양 후 colony의 성상을 관찰하고 의심이 되는 colony를 선택하여 동일 배지에 도말하여 생화학적 성상검사를 실시하였다.

10. 기생충 검사

십이지장 및 맹장 내용물을 각각 slide glass에 도말한 후, 생리식염수를 적하하고 cover glass를 덮은 후 실체현미경으로 검사하여 기생충의 충란, 충체, 원충 등의 유무를 검사하였다.

11. 통계학적 분석

실험결과에 관한 통계처리는 Microsoft Window Excel Version 7.0을 사용하여 Student's t-test를 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 혈액학적 및 혈액생화학적

한국야생 유래의 행동이상 마우스를 대상으로 하여, 5주령 암수 마우스의 혈액학적치를 검사한 결과, WBC, RBC, Hb, Ht 치에서는 암컷이 수컷보다 높게 나타났으며, 혈소판치는 수컷이 암컷에 비하여 높았다(Table 1). 혈액생화학적 검사 결과, creatinine, total cholesterol, total protein 수준은 암수간에 차이가 거의 없었으며, triglyceride, albumin, glucose에서는 암컷이 수컷에 비해 훨씬 높은 수치를 나타내었다(Table 2).

Table 1. Hematological values of *M. m. molo-sinus-tt*@Kist mice with 5 weeks of age

Items(Unit)	Sex (Mean±SD)	
	Male	Female
WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1.80± 0.50	2.24± 0.45
RBC($\times 10^6/\mu\text{l}$)	10.44± 0.52	10.86± 0.31
Hb(g/dl)	14.74± 0.70	15.38± 0.37
Ht(%)	47.46± 2.48	50.12± 1.19
PLT($\times 10^3/\mu\text{l}$)	918.2±48.40	768.6±42.40

Table 2. Blood biochemical values of *M. m. molo-sinus-tt*@Kist mice with 5 weeks of age

Items(Unit)	Sex (Mean±SD)	
	Male	Female
Creatinine	0.26± 0.56	0.23±0.064
Total cholesterol	119.21±11.76	118.32± 8.53
Triglyceride	107.89±22.79	119.69±50.06
Total protein	5.23± 0.30	5.26± 1.03
Albumin	2.48± 0.19	2.90± 0.16
Glucose	86.56±16.24	106.68±33.80

현재 한국야생마우스의 혈액학적 성상에 대한 자료가 거의 없어 비교는 어렵지만, 본 실험결과 RBC와 WBC에서 20일 및 30일령의 BALB/c를 포함한 근교계 마우스와 비교하여 Gyllensten과 Swanbeck (1959)의 RBC치($7.27 \times 10^6/\mu\text{l}$, $8.04 \times 10^6/\mu\text{l}$)와 Penny(1967)의 WBC치($4.51 \pm 2.29 \times 10^3/\mu\text{l}$)에 비해 높은 수준이었다. RBC, 혈소판치와 total cholesterol치는 inbred strain에 비해 높게 나타났으나 triglyceride, total protein, albumin치는 유사하였다. 그러나 유용한 생물자원으로서 활용되기 위해서는 야생마우스의 혈액치의 생리현상에 대한 기초적 연구가 체계적으로 이루어져야 할 것으로 생각되었다.

2. 과배란 유기시의 배란율과 수정율

한국야생마우스 유래의 행동이상동물들 PMSG/hCG로 2.5/2.5, 5.0/5.0 IU 투여하여 과배란 처리했을 때의 평균 채란수는 각각 마리당 11.6, 12.7개로, 5.0/5.0 IU 투여군의 배란율이 약간 높았으나 통계학적 유의차는 인정되지 않았다(Table 3). 또한, 수정율은 각각 87.9%와 52.0%로서 2.5/2.5 IU 투여군의 수정율이 높았으며, 2 세포기로의 발달율도 각각 99.0%와 90.6%로서 2.5/2.5 IU 투여군의 발달율이 더 높았다($p < 0.05$, Table 4).

실험결과, 본 실험의 한국야생유래 행동이상 마우스에서는 PMSG/hCG를 5.0/5.0 IU 투여하는 것 보다 2.5/2.5 IU를 투여하는 것이 높은 수정율을 얻을 수 있을 것으로 사료되었다. 야생유래 행동이상마우스에서는 배란율이나 배란시간에 따른 체외 수정율의 차이 등과 같이 체외수정에 있어서 중요한 지표가 되

Table 3. Total numbers of superovulated oocytes in *M. m. molossinus-tt*@ Kist mice treated with various doses of PMSG and hCG

Dose PMSG /hCG (IU* /head), i.p.**	No. of animals examined	Total numbers of superovulated oocytes	
		Mean \pm S.D. (range)	
		4~7 weeks old	
2.5 /2.5	10	11.6 \pm 3.63(7~18)	
5.0 /5.0	8	12.7 \pm 3.87(10~21)	

* IU: International Unit; ** i.p.: intraperitoneal injection

Table 4. Numbers and percentages of fertilized oocytes after superovulation in *M. m. molossinus-tt*@ Kist mice 6hr and 24hr after insemination.

Dose PMSG /hCG (IU /head), i.p.	No. of examined oocytes	No. of fertilized oocytes(%)*, 1)	No. of 2 cell embryos(%) ²⁾	Degenerated embryos**
2.5 /2.5	116	102(87.9)a	101(99.0)c'	1
5.0 /5.0	117	53(52.0)b	48(90.6)d'	5

* : Oocytes show second polar body extrusion, or oocytes with male and female pronuclei

** : Unevenly cleaved and fragmented embryos

1): Percentage of examined oocytes; 2): Percentage of fertilized oocytes

a>b, p<0.05; c>d, p<0.05

는 기본적인 분야들에 대한 연구가 거의 되어있지 않은 상태이다. 그러므로 앞으로도 이에 대한 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되었다.

3. 동결 용해 정자의 체외수정율

한국야생유래 행동이상 마우스의 동결정자를 용해하여 체외수정에 사용했을 때 체외수정율은 24.8%로 신선정자를 사용하였을 때의 87.9% 보다 낮게 나타났다(Table 5).

본 실험결과는 Nakagata와 Takeshima(1993)의 일반 근교계 마우스에서의 동결정자를 이용한 체외수정시험 결과 BALB /c 계통 47.5%, C57BL /6N 계

통 25.5%, CBA /JN 계통 76.5%, C3H /He 계통 73.3%, DBA /2N 계통 88.9%에 비해 낮은 수정율을 나타내었다. 또한 Nakagata 등(1995)은 China, Czechoslovakia, Denmark, India, Japan, Switzerland 유래 야생마우스에서의 정자동결실험에서 46~67%로 본 실험결과와 보다 약간 높은 수정율을 보고하였고, 동결용해후의 정자운동성이 낮은 계통에 대해서는 부분적인 투명대 절개법(partial dissected zona-pellucida)이 수정율을 높일 수 있다고 하였다. 위의 결과로 보아 동결정자의 용해후 생존성과 수정율은 계통에 따라 많은 영향이 있음을 알 수 있으며, 앞으로도 수정율과 생존성을 보다 높일 수 있는 동결보

Table 5. Fertility of the frozen-thawed *M. m. molossinus-tt*@ Kist mice spermatozoa assessed by *in vitro* fertilization

Sperm	No. of examined oocytes	No. of fertilized oocytes(%)*, 1)	No. of 2 cell embryos(%) ²⁾	No. of degenerated embryos**
Fresh(control)	116	102(87.9)	101(99.0)	1
Frozen-thawed	125	31(24.8)	29(93.5)	2

* : Oocytes show second polar body extrusion, or oocytes with male and female pronuclei

** : Unevenly cleaved and fragmented embryos

1): Percentage of examined oocytes; 2): Percentage of fertilized oocytes

Table 6. Pregnancy rates frozen-thawed 2-cell embryos *in vitro* fertilized in *M. m. molossinus-tt* @ Kist mice oocytes after transfer to pseudopregnant recipients

	No. of embryos transferred	No. of pregnant / No. of recipients(%)	No. of pups Total(%)	No. of pups Females	No. of pups Males
F-T embryos*	76	1 / 5(20.0)	5(6.6)	3	2
F-T-S embryos**	31	1 / 2(50.0)	6(10.0)	4	2
Control***	46	1 / 3(33.3)	10(21.7)	4	6

* Frozen-thawed 2-cell embryos;

** 2-cell embryos by *in vitro* fertilized from frozen-thawed spermatozoa

*** 2-cell embryos by *in vitro* fertilized

호제의 개발과 동결법의 개선에 관한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료되었다.

4. 동결 체외수정란의 이식후 산자율

한국야생 유래 행동이상 마우스의 체외수정란의 체내 이식후의 산자율에 있어서, 동결융해 2 세포기 체외수정란의 경우 5마리(6.6%), 동결 융해한 정자를 이용한 2 세포기 체외수정란의 경우 6마리(10.0%), 그리고 대조군인 2 세포기 체외수정란의 경우 10마리(21.7%)의 산자율을 얻었다(Table 6). 세 경우에서 얻은 21마리의 새끼는 모두 생후 약 2주령 후부터 행동이상증상이 발현되었으므로 체외수정을 통한 번식 장애개선과 수정란 및 정자의 동결보존법을 이용한 야생동물자원의 보존 가능성이 높음을 확인하였다.

Yokoyama 등(1995)은 C57BL / 6-*dy/dy* progressive muscular dystrophy model, C57BL / 6-*ob/ob* obesity model과 BALB / c-*rl/rl*, BALB / c-*shi/shi*, C57BL / 6-*mld/mld* motor ataxia model에서 71.7%~ 97.8%의 체외수정율을 얻었고 이식 수정란의 39.2~57.7%가 새끼로 복원되었다고 보고하였다. 그는 이 결과로 번식장애를 가진 질환모델 동물에서 체외수정과 수정란 이식기법을 이용하여 mutant gene에 대한 homozygous 산자(産子)생산과 질병개시전에 이들 산자들을 실험에 사용할 수 있음을 보고하였다.

이러한 결과들로 질환모델동물, 유전자도입 동물과 같이 번식장애가 발생할 가능성이 높은 동물과 야생동물 등에서 체외수정과 수정란 이식기법, 정자의 동결법 등이 효과적으로 이용될 수 있음을 시사하였다.

5. 미생물학적 검사

실험에 사용된 보통마우스(CV마우스)를 미생물학적 검사결과 검사대상의 모든 마우스에서 MHV (Mouse hepatitis virus)가 검출되었으며, 9 마리에서는 Staphylococcus aureus도 검출되었다. 이러한 CV동물의 체외수정에 의해 얻은 수정란을 청정대리모에 이식하여 태어난 새끼를 대상으로 미생물학적 검사를 실시한 결과 CV동물에서 검출되었던 MHV와 Staphylococcus aureus가 검출되지 않은 것을 알 수 있었다(Table 7).

Carthew 등(1983)은 수정란이식기법을 이용하여 Sendai virus가 성공적으로 제거될 수 있음을 보고하였고, Okamoto 등(1990)은 이를 재확인하는 결과를 보고하였다. Suzuki 등 (1995)은 토끼에서 수정란 이식기법을 이용하여 *bordetella bronchiseptica*의 제거를 시도하였으며, Rouleau 등(1993)은 무병대리모를 사용하여 랫드에서 병원성미생물이 제거된 새로운 breeding colony의 생산을 보고하였다. 이러한 결과로 보아 마우스뿐만 아니라 다른 실험동물에서도 무병대리모를 이용한 수정란 이식기법을 적용하여 병원성 미생물을 제거할 수 있음을 알 수 있었다(Suzuki 등, 1996). 국제간의 연구가 활발해지면서 연구기관간의 동물 교류도 빈번해지고 있는 현실로 볼 때, 병원성 미생물의 오염 위험이 따르는 동물 자체의 수송보다는 동결수정란의 수송과 같은 다양한 방법이 앞으로 계속 발전되어야 할 것으로 생각된다.

Table 7. Results of microbiological monitoring with mice(CV animal) before embryo transfer and after cleansing by embryo transfer

Microbes	Strain	Microbiological monitoring																					
		CV mouse before transfer											After cleansing by embryo transfer										
		tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	tt- Kjr	
HVJ(Sendai virus)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MHV(Mouse hepatitis virus)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Ectromelia virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Tyzzer's organism	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MAV(Mouse adenovirus)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Hanta virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PVM(Pneumonia virus of mice)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Mouse encephalomyelitis virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MVM(Minute virus of mice)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Lymphocytic choriomeningitis virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>E. coli</i> O115 a, c : K (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Dermatophytes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Giardia muris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Spiromucleus muris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Syphacia</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Ectoparasites	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

IV. 요약

본 연구는 한국야생 유래 행동이상 마우스(*M. m. molossinus-tt@Kist*)의 혈액학 및 혈액생화학치와, 체외수정란과 정자동결보존법, 체외수정과 수정란 이식기법을 이용한 번식장에 개선과 병원성 미생물이 제거된 무병마우스 생산을 위하여 실시하였다.

1. 5주령의 혈액학치에서 RBC, platelet 치는 근교 계에 비해 높게 나타났다. 혈액생화학치에서는 total cholesterol치가 근교계에 비해 높게 나타났으나 triglyceride, total protein, albumin치는 유사하였다.
2. 과배란 유기시의 평균 체란 수는 PMSG/hCG

를 2.5/2.5 IU 투여군에서 11.6개, 5.0/5.0 IU 투여군에서 12.7 개로 통계학적 유의 차는 인정되지 않았다.

3. 2.5/2.5 IU 투여군과 5.0/5.0 IU 투여군의 수정율은 각각 87.9%와 52%로 2.5/2.5 IU 투여군이 유의성있게 높은 성적을 나타내었고(p<0.05), 2 세포기로의 발달율도 각각 유의성이 인정되는 99.0%와 90.6%였다 (p<0.05).
4. 동결정자를 이용한 체외수정에서의 수정율은 24.8%로 신선정자를 사용했을 때의 87.9% 보다 낮은 성적이 었다.
5. 체외 수정란의 이식후의 산자율은 동결 2세포기 체외수정란의 경우 5마리(6.6%), 동결 정자를 이용한 체외 수정란의 경우 6마리(19.4%)와 대

조군의 체외수정란의 경우 10마리(21.7%)의 새끼를 얻었다.

6. 이식후 출산한 산자의 미생물학적 검사에서 MHV(Mouse hepatitis virus)와 *Staphylococcus aureus* 등의 병원성 미생물이 무병대리 모를 이용한 수정란이식에 의해 제거되었음을 확인하였다.

V. 인용문헌

1. Altman, P. L. and D. D. Katz. 1979. Mouse and Rat. Federation of American Societies for Experimental Biology. Saunders, Newyork, USA pp:121.
2. Carthew, P. M. J. Wood and C. Kirby. 1983. Elimination of Sendai(parainfluenza type 1) virus infection from mice by embryo transfer. J. Reprod. Fertil. 69:253-257.
3. Festing, M. F. W. 1993. International Index of Laboratory Animals, 6th ed. British Library. Press U.K. pp, 132.
4. Gyllensten, L. and G. Swanbeck. 1959. Influence of concentrated oxygen on the circulating erythrocytes in growing mice. Acta. Path. Microbiol. Scand. 45:229-236.
5. Marshall, J. T. and R. D. Sage. 1981. Taxonomy of the house mouse. Symp. Zool. Soc. Lond. 47:15-25.
6. Nakagata, N. 1995. Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. Exp. Anim, 44:1-8.
7. Nakagata, N., M. Okamoto, O. Ueda and H. Suzuki. 1997. The positive effect of partial zona-pellucida dissection on the *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. Biol. Reprod. 57:1050-1055.
8. Nakagata, N. and T. Takeshima. 1992. High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. Theriogenology 37(6):1283-1291.
9. Nakagata, N. and T. Takeshima. 1993. Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F₁ hybrid strains. Exp. Anim. 42(3):317-320.
10. Nakagata, N., S. Ueda, K. Yamanouchi, M. Okamoto, Y. Matsuda, K. Tsuchiya, M. Nishimura, S. Oda, K. Koyasu and S. Azuma. 1995. Cryopreservation of wild mouse spermatozoa. Theriogenology 43(3):635-643.
11. Okamoto, M., S. Matsushita. and T. Matsumoto. 1990. Cleaning of Sendai virus-infected mice by embryo transfer technique. Exp. Anim. 39:601-603.
12. Penny, R. H. C. 1967. The blood and marrow picture of the laboratory mouse. Br. Vet. J. 123:227.
13. Rouleau, A. M. J., P. R. Kovacs, H. W. Kunz and D.T. Armstrong. 1993. Decontamination of rat embryos and transfer to specific-pathogen-free recipients for the production of a breeding colony. Lab. Anim. Sci. 43:611-615.
14. Suzuki, H., N. Nakagata, M. Anzai, K. Tsuchiya, M., Nakura, S. Yamaguchi and Y. Toyoda. 1996. Transport of wild mice genetic material by *in vitro* fertilization, cryopreservation, and embryo transfer. Lab. Anim. Sci. 46(6):687-688.
15. Suzuki, H., M. Togashi, E. Kumagai, M. Miwa, T. Tatsumi, N. Nakagawa, N. Tanaka and J. Adachi. 1995. An attempt at embryo transfer as a means of controlling *Bordetella bronchiseptica* infection in the rabbit. Exp. Anim. 39:397-400.
16. Tada, N., M. Sato, J. Yamamoto, J. Mizorogi, K. Kasai, and S. Ogawa. 1990. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence raffinose and glycerol. J. Reprod. Fert. 89:511-516.
17. Takeshima, T., N. Nakagata and S. Ogawa. 1991. Cryopreservation of mouse spermatozoa.

- ozoa, *Exp. Anim.* 40(4):493-497.
18. Taya, C., H. Kaneda, M. Sakaizumi, N. Miyashita, K. Moriwaki and H. Yonekawa. 1994. Preservation of wild mouse genes by embryo and gamete freezing. *Genetics in Wild Mice* 313-324.
19. Yokoyama, M., M. Katsuki and T. Nomura. 1995. The creation of mouse models for human diseases associated with reproductive disturbances by *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Exp. Anim.* 44(2):139-143.
20. 현병화, 김명수, 정영길, 이철호, 윤원기, 오양석, 서준교, 김환목, 원무호. 1997. A new mouse showing behavior abnormality and neurological disability. 대한정위기능신경외과연구회, 대구, 한국 pp:32.
(접수일자 : 1999. 8. 6. /채택일자 : 1999. 9. 19.)