

돼지 체외성숙 난포란의 Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)에 의한 후기배로의 발달에 관한 연구

조성근 · 조황윤 · 박미령 · 이정규 · 김진회[†]

경상대학교 응용생명과학부

Production of Embryos by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) with *In Vitro* Matured Porcine Oocytes

Cho, S. K., H. Y. Cho, M. R. Park, J. G. Lee and J. H. Kim[†]

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the development of porcine follicular oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Cumulus-oocyte-complexes (COCs) were collected by aspiration from follicles of 2~7 mm in diameter from a local slaughterhouse. Oocytes were matured *in vitro* for 40~44 h, and spermatozoa were prepared by swim-up in the presence or absence of 5 mM dithiothreitol (DTT) and then M II stages of the oocyte were either centrifuged or not centrifuged for the following injection of ooplasm. Injected oocytes were cultured in NCSU 23 medium for 6 to 8 days. The results obtained were as follows:

1. The rates of cleavage and development rates into blastocyst by ICSI were not significantly different between the with (53.0% and 19.7%) or without (48.3% and 23.8%) centrifugation, respectively ($P < 0.05$).
2. The cleavage and developmental rates to blastocyst after ICSI with or without 5 mM DTT treated-sperm were not significantly different (60.4% vs 16.4% and 48.5% vs 22.2%), respectively ($P < 0.05$).
3. The cleavage and the developmental rates to blastocyst were not significantly different between the zygotes obtained by IVF (51.8% vs. 22.4%) and ICSI (51.4% vs. 21.6%) ($P < 0.05$).
4. The number of blastomere in blastocyst stages after IVF or ICSI was not significantly different (46.7 ± 2.9 and 41.9 ± 4.6).

(Key words : Centrifugation, DTT, IVF, ICSI, Porcine)

본 연구는 1999~2000년도 (주)조아제약의 기술개발사업연구비에 의하여 연구되었음.

[†] Corresponding author : Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Republic of Korea

E-mail : jinhoi@nongae.gsnu.ac.kr

I. 서 론

가축을 포함한 여러 동물에 있어서 세포질내 정자주입법(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 의한 산자 생산을 위한 연구가 rabbit(Hosoi 등, 1988), murine(Kimura와 Yanagimachi, 1995; Perry 등, 1999), ovine(Catt 등, 1996), equine(Grondahl 등, 1997), bovine(Hamano 등, 1999) 및 monkey(Chan 등, 2000) 등에서 활발하게 진행되어 왔으며, 최근에 돼지에서 체내성숙 난자를 이용하여 세포질내 정자주입법에 의한 최초의 산자 생산을 보고하였다(Martin, 2000).

그러나, 난포란을 이용한 세포질내 정자주입법에 있어서 나타나는 문제점 중 하나는 유제류에 있어서 사용된 체외성숙 난포란은 난구세포 제거 후에도 세포질내에 존재하는 지방과립층이 두터워 정자의 주입 여부를 정확히 확인하기가 어렵다는 점이다. 따라서 이를 해결하기 위하여 난포란을 원심분리시키는 방법이 몇몇 가축에서 보고되었다(Wall 등, 1985; Nagashima 등, 1994; Tatham 등, 1995, 1996; Kim 등, 1998; Rho 등, 1998). 이러한 원심분리는 체외성숙후 난구세포가 제거된 난포란을 원심분리시키면 ICSI에 있어서의 편리를 도모할 수 있을 뿐만 아니라 주입된 정자의 관찰을 용이하게 하여 정확성을 높일 수 있고, 주입시 사용하는 배양액의 난포란내 진입을 최소화 할 수 있을 뿐만 아니라, 후기배로의 발달율에 있어서도 유해한 효과를 나타내지 않는다고 보고하였다(Kim 등, 1998; Rho 등, 1998; Martin, 2000).

또한 ICSI를 하기 전에 사용할 정자를 5 mM DTT에 처리하여 첨체반응을 유기한 다음 세포질내에 주입을 하면 응성전핵형성율이 높아진다고 보고하였다(Perreault 등, 1988; Rho 등, 1998). 또한 포유동물의 정자에 DTT를 처리하였을 때 정자의 첨체와 중편부 그리고 머리부분에서의 형태학적 변화를 나타낸다고 하였다(Calvin 등, 1971; Olson 등, 1976; 1997; Rho 등, 1998). 이러한 DTT처리 후 일련의 정자변화는 응성전핵의 형성과 함께 수정율과 후기배로의 발달율에도 영향을 미친다고

하였다(Martin, 2000).

따라서 본 연구에서는 ICSI에 의한 돼지 체외수정란의 생산효율을 높이고자, ICSI에 사용되는 돼지 체외성숙 난포란의 원심분리에 의한 효과, 세포질내에 주입하는 정자의 DTT 전처리 효과, 체외성숙 난포란의 체외수정시 주로 사용되는 IVF방법과 ICSI방법 사용에 따른 수정율과 후기배로의 발달율을 조사 그리고 IVF방법과 ICSI방법에 의해 발달한 배반포기배의 할구수를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 배양액

난포란의 체외성숙에 사용한 배양액은 NCSU 23을 기본배양액으로 하여 Baxter(Baxter Healthcare Co., U.S.A.)의 물 1로 제조하여 0.2 μm filter (Gelman Sci., U.S.A.)로 여과한 후 pH 7.2~7.3으로 조정하여 50 ml tissue culture flask (Falcon, U.S.A.)에 45 ml씩 분주하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 약 2주간 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 NCSU 23 배양액에 10% 난포액, 0.1 mg/ml cysteine, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ EGF, 10 IU/ml eCG 그리고 10 IU/ml hCG를 첨가하여 제조하였다. 체외배양액은 NCSU 23 배양액에 0.4% BSA를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 2~7 mm 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 1,900 \times g로 3회 원심분리하고, 최종 0.2 μm 필터로 거른 후 -20°C 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2. 난포란의 채란

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살직후 난소를 적출하여 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$)이 함유된 생리식염수(30~35°C)가 들어있는 보온병에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하였고, 미성숙 난포란을 채란하기 전 난소 주위의 지방과 결합조직을 제거하고, 생리식염수로 3~4회 세척한 후, 18-G needle이 부착된 20 ml 주사기를 이용하여 2~7 mm의 가시난포를 흡입하여 난포란을 채란하였다. 난포란의 채취시 사용된 배양액은 0.1 mg/ml PVA가 첨가된 TALP

-HEPES (Prather 등, 1995)를 사용하였다. 흡입된 난포액은 5~10 분간 정치시킨 후 침전된 하부액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 직경 60 mm 배양접시에 옮겨 40X 배율의 도립현미경(Olympus Co., Japan)에서 난포란을 수집한 후 체외성숙용 기본 배양액 NCSU 23으로 4~5회 세척하면서 선발하였다. 난포란의 선발은 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 실시하였으며, 최소한 2층 이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것을 선발하여 실험에 공시하였다.

3. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 체외성숙용 배양액을 35 mm dish (Nunc, Denmark)에 100 μ l씩 drop 분주하여 18 시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 다음, 체외성숙용 배양액에 난구세포가 2층 이상이고 세포질이 충실한 15~20개의 난포란을 넣고 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator에서 20~22시간 동안 호르몬이 첨가된 체외성숙용 배양액에서 배양하고, 다음 20~22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서 배양하여 총 40~14시간 동안 배양하였다.

4. 정자의 준비

정자의 준비는 신선정자를 이용하여 Swim-up방법으로 2.5 mM caffeine과 0.4% bovine serum albumin (BSA)이 첨가된 modified Tris-buffered medium으로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator에서 실시하였다. Swim-up의 유도는 15 ml conical plastic tube에 농후정자와 체외수정용 배양액이 층을 이루도록 하기 위해서 tube의 아래층에 정자를 넣고 그 위의 층에 modified Tris-buffered medium을 섞이지 않도록 조심스럽게 분주한 후 45°의 각도로 눕혀서 1시간 동안 활력 정자의 부유를 유도하였다. Swim-up을 유도하여 부유된 상층액의 정자를 채취한 후 500×g에서 2회 5 분간 원심분리하여 정자를 세척하였다.

ICSI에 이용할 일부 정자는 Rho 등(1998)의 방법에 따라 5 mM dithiothreitol (DTT)에서 1시간 동안

안 첨체반응을 유도하였다.

5. 난포란의 체외수정

체외수정은 체외성숙된 난포란을 2.5 mM caffeine과 0.4% BSA가 첨가된 수정용 modified Tris-buffered medium으로 3~4회 세척한 후 수정용 medium에 50 μ l drop당 30~40개의 난자를 옮긴 다음 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종 농도가 0.5×10^6 sperms/ml이 되도록 조절하여 매정한 후, 6시간 동안 39°C, 5% CO₂ incubator에서 수정을 유도하였다. 최종 정자의 농도는 hemocytometer 또는 Makler Counting Chamber로 정자의 수를 계산하였다.

6. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)용 난자의 준비

40~44시간 체외성숙된 난자는 난구세포를 제거하기 위하여 0.1% hyaluronidase가 첨가된 D-PBS 배양액으로 vortexing 및 repipetting한 후, 제 1극체가 선명하게 나타나고 세포질이 균질한 난자를 선별하여 사용하였다. 선별된 난포란의 일부는 0.1 mg/ml PVA가 첨가된 TALP-HEPES를 사용하여 12,000×g에서 7분간 원심분리를 실시해 세포질의 지방과립을 한쪽으로 치우치게 한 다음 ICSI에 이용하였다.

7. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

외경 1 mm capillary tube (Narishige Co., Japan)를 이용하여 정자주입용 pipette은 내경 6~7 μ m, 외경 8~9 μ m로 제작하여 사용하였으며, 난자 고정용 pipette은 외경이 100~120 μ m로 조절하였고 내경은 10~15 μ m로 제작하여 사용하였다.

세포질내 정자의 주입은 micromanipulator (Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 200배 도립현미경(Nikon Co., Japan)을 이용하여 Kim 등(1998)의 방법을 약간 수정하여 이용하였다.

한마리의 정자를 주입용 pipette에 흡인·장착하기 위해서는 정자의 운동성을 저하시키기 위하여 10% polyvinylpyrrolidone (PVP)이 첨가된 10 μ l 정자용 D-PBS drop에서 정자의 꼬리를 먼저 주입용

pipette으로 흡인하여 0.4% BSA가 첨가된 20 μ l 난자용 D-PBS drop으로 이동하였다.

체외성숙된 난자의 난구세포를 제거하여 도립 현미경의 stage 위에 준비된 0.4% BSA가 첨가된 ICSI용 D-PBS drop으로 옮겨 제 1극체가 6시 또는 12시 방향으로 향하게 하여 고정용 pipette으로 난자를 고정시킨 후, 정자가 들어있는 주입용 pipette을 고정된 난자의 적도부근(3시 방향) 약간 아래에서 난자의 세포질 속으로 진입시킨 다음 세포질의 내용물을 약간 흡인하여 정자용 pipette의 진입 여부를 확인한 후 흡인된 세포질의 내용물과 함께 정자를 세포질 속으로 진입시켰다. 이때 정자를 진입시킴과 동시에 10% polyvinylpyrrolidone (PVP)이 첨가된 정자용 D-PBS 배양액의 최소량을 함께 주입한 후 주입용 pipette을 빨리 후퇴시켰다. 난자의 세포질내 정자의 주입은 난자가 도립현미경 stage의 ICSI용 drop에서 노출되는 시간을 최소화하기 위해 10개의 난자를 이용하여 20분 이내에 작업을 완료하였다.

8. IVF와 ICSI 후 체외수정란의 체외배양

IVF와 ICSI 후 0.4% BSA가 첨가된 체외배양액 NCSU 23에 3~4회 세척한 후 20~30개의 수정란을 50 μ l drop에 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 수정 후 48시간에 수정율을 조사하였으며, 144~192시간까지 배반포기 상태의 수정란을 조사하였다.

9. 체외수정란의 할구수 조사

체외수정란의 할구수를 조사하기 위하여 수정 후 8일까지 배양한 배반포기배를 Hoechst 33342 (Sigma, U.S.A.)를 이용하여 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 핵염색을 실시하여 형광현미경 200~400 배의 배율하에서 핵의 수를 조사하였다.

10. 실험설계

본 연구는 4가지의 실험으로 설계하였다. 실험 1에서는 ICSI에 사용되는 돼지 난포란의 원심분리에 의한 효과, 실험 2에서는 세포질내에 주입하는 정자의 DTT 전처리 효과, 실험 3에서는 체외성숙

난포란의 체외수정시 IVF방법과 ICSI방법 사용에 따른 수정율과 후기배로의 발달달을 조사 그리고 실험 4에서는 IVF방법과 ICSI방법에 의해 발달한 배반포기배의 할구수 조사로 수행하였다.

11. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM (General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square mean을 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)에 사용되는 돼지 난포란의 원심분리에 의한 효과

ICSI에 사용된 유체류의 체외성숙 난포란은 난구세포 제거후 세포질내에 존재하는 지방과립층이 두터워 정자의 주입 여부를 정확히 확인하기에는 어려움이 따른다. 따라서 Table 1에서는 ICSI하기 전에 체외성숙된 난포란을 각각 원심분리를 실시한 군과 원심분리를 실시하지 않은 군으로 나누어 각 군에 있어서의 수정율과 후기배로의 발달율을 각각 비교·조사하였다. 수정율에 있어서 원심분리를 실시하지 않은 군과 실시한 군에서 각각 48.3%와 53.0%로 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 후기배로의 발달율에 있어서도 각각 23.8%와 19.7%로 나타나 두 처리군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

체외성숙된 난포란을 이용하여 여러 가지의 실험을 수행하는데 있어서 난포란을 원심분리시키는 방법이 몇몇 가축에서 보고되었다(Wall 등, 1985; Nagashima 등, 1994; Tatham 등 1995, 1996; Kim 등, 1998; Rho 등, 1998). 또한 체외성숙후 난구세포가 제거된 난포란을 원심분리시키면 ICSI에 있어서의 편리를 도모할 수 있을 뿐만 아니라 주입된 정자의 관찰을 용이하게 하여 정확성을 높일 수 있고, 주입시 사용하는 배양액의 난포란내 진입을 최소화 할 수 있을 뿐만 아니라, 후기배로의 발달율에 있어서도 유해한 효과를 나타내지 않는다고 보고하였다(Kim 등, 1998; Rho 등, 1998; Mar-

Table 1. Effect of centrifugation on development *in vitro* of pig zygotes following intracytoplasmic sperm injection

Oocyte treatments	Replicates	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocysts	
				At day 6	At day 8
Control (noncentrifugation)	10	296	143 (48.3) ^a	8 (5.6) ^b	34 (23.8) ^c
Centrifugation*	10	268	142 (53.0) ^a	10 (7.0) ^b	28 (19.7) ^c

† Values with same superscripts in the column were not significantly different (P<0.05).

* At 12,000 × g for 7 min.

tin, 2000).

따라서 위의 보고서에서 자세한 결과가 언급되지 않았지만, 본 실험에서는 원심분리를 실시한 군과 실시하지 않은 군을 비교하여 수정율과 후기배로의 발달율을 조사해 본 결과, 수정율과 발달율에 있어서도 두 군간의 차이가 나타나지 않았을 뿐만 아니라, ICSI를 수행하는데 있어서도 정자의 주입여부를 정확히 관찰할 수 있어 ICSI의 효율성과 정확성을 높이는 데 유효한 방법이라고 사료된다.

2. 세포질내에 주입하는 정자의 dithiothreitol (DTT) 전처리 효과

체외성숙된 난포란에 주입할 정자를 두 처리군으로 나누어 ICSI에 사용하였다. DTT를 처리하지 않은 정자와 5 mM DTT를 처리한 정자를 이용하여 각각 ICSI 후 수정율과 후기배로의 배발달율을 비교·조사하였다. Table 2에서는 DTT를 처리한 군에서 수정율이 60.4%로 DTT를 처리하지 않은 군의 48.5% 보다 높은 성적을 나타내었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 배반포기배로

의 발달율에 있어서도 DTT를 처리하지 않은 군에서 22.2%로 DTT를 처리한 군의 16.4% 보다 높은 성적을 나타내었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

ICSI에 사용할 정자를 5 mM DTT에 처리하여 침체반응을 유기한 다음 세포질내에 주입을 하면 응성전핵형성율이 높아진다고 보고하였다(Perreault 등, 1988; Rho 등, 1998). 또한 다른 연구진에서도 포유동물의 정자에 DTT를 처리하였을 때 정자의 침체와 중편부 그리고 머리부분에서의 형태학적 변화를 나타낸다고 하였다(Calvin 등, 1971; Olson 등, 1976; Sutovsky 등, 1997a, 1997b; Rho 등 1998). 또한 DTT처리 후 일련의 정자막 단백질의 변화는 응성전핵의 형성과 함께 수정율과 후기배로의 발달율에도 영향을 미친다고 하였다(Martin, 2000).

본 실험에서는 ICSI에 사용될 정자를 5 mM DTT를 이용하여 침체반응을 유기한 다음 체외성숙된 난포란의 세포질내에 주입하여 수정율과 그에 따른 후기배로의 배발달율을 향상시키려고 하

Table 2. *In vitro* developmental capacity of porcine zygotes following intracytoplasmic injection of oocytes with sperm either treated or not treated with dithiothreitol (DTT)

Sperm treatments	Replicates	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocysts
Control (no DTT)	6	167	81 (48.5) ^a	18 (22.2) ^b
DTT	4	101	61 (60.4) ^a	10 (16.4) ^b

† Values with same superscripts in the column were not significantly different (P<0.05).

였으나, 수정율에 있어서는 5 mM DTT를 처리한 군에서 높게 나타났고, 후기배로의 발달달에 있어서는 DTT를 처리하지 않는 군에서 높은 성적을 나타내었으나 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 종간에 차이가 있으나, 소의 체외성숙 난포란을 이용한 Rho 등(1998)은 수정율과 배반포기배의 발달율에 있어서 5 mM DTT를 처리한 군에서 높은 성적을 나타내었다고 보고하였는데, 이는 종간의 차이와 함께 ICSI의 기술적인 차이와 사용한 배양액의 차이에 의해 나타날 수도 있을 것으로 사료된다. 따라서 돼지의 난포란을 이용한 ICSI에 있어서는 DTT에 의한 정자의 전처리는 수정율과 발달율 향상에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

3. 체외성숙 난포란의 IVF 및 intracytoplasmic sperm injection (ICSI)에 의한 체외수정 후 수정율과 배 발달율

도축장에서 도축되는 돼지의 난소에서 채란된 난포란을 이용하여 체외성숙 후 IVF 또는 ICSI에 의한 체외수정 후 수정율과 후기배로의 발달율을 조사한 결과는 다음과 같다. Table 3에서는 IVF와 ICSI에 의한 체외수정 48시간후의 수정율은 51.8%와 51.4%로서 두 처리군간의 유의성은 나타나지 않았으며, 체외배양 8일째 배반포기배의 발달율에 있어서도 22.4%와 21.6%로 나타나 두 처리군간의 유의성은 나타나지 않았다.

최근 돼지 난포란을 이용한 체외수정란의 생산은 많은 연구를 거듭하여 발전해 오고 있으며, 이에 따라 체외수정란을 이용한 산자도 생산하였다

(Mattioli 등, 1989; Yoshida 등, 1993; Abeydeera 등, 1998; Kikuchi 등, 1999; Coy 등, 1999). 그리고 최근에는 돼지에서 체내성숙 난자를 이용하여 ICSI에 의한 최초의 산자 생산을 보고하였다(Martin, 2000).

그러나 이러한 최초의 ICSI에 의한 돼지에 있어서의 산자 생산은 체내에서 성숙된 난포란을 이용하여 얻어진 결과였다. 따라서 본 연구에서는 도축되는 돼지의 난소로부터 채란된 난포란을 이용하여 체외성숙후 ICSI에 의한 방법으로 수정율과 후기배로의 발달을 조사하였다. Control로 사용된 IVF방법에 의한 수정율과 배반포기배로의 발달율에 있어서는 ICSI와 비교하여 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 ICSI에 의한 수정율과 배반포기배로의 발달율에 있어서는 Catt와 Rhodes (1995), Kim 등(1998) 그리고 Martin (2000) 등과의 결과에는 미치지 못하였다. 이는 난포란의 성숙조건과 ICSI의 기술적인 차이, 그리고 각기 사용되는 배양액의 차이 등과 같은 많은 여러 조건들에서 유래될 수 있을 것으로 사료되지만, 더 중요한 것은 이러한 차이에 대한 원인을 조사하여 규명하고 지속적인 연구가 수행되어진다면 더욱더 향상된 결과가 나타나리라 사료된다.

4. IVF방법과 ICSI방법에 의해 발달한 배반포기배의 할구수 조사

Table 4에서는 IVF와 ICSI에 의해 체외수정된 수정란에 있어서 8일째까지 발달한 배반포기배의 할구수를 조사한 결과는 다음과 같다. IVF에 의해

Table 3. *In vitro* development of porcine zygotes cultured for 8 days following IVF or intracytoplasmic sperm injection

<i>In vitro</i> production conditions*	Replicates	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocysts**
IVM-F-C	14	731	379 (51.8) ^a	85 (22.4) ^b
ICSI	14	397	204 (51.4) ^a	44 (21.6) ^b

† Values with same superscripts in the column were not significantly different ($P < 0.05$).

* Maturation medium: NCSU 23; Fertilization medium: mTBM; IVF sperm concentration: 0.5×10^6 cells/ml; Culture medium; NCSU 23

Table 4. Number of blastomere of *in vitro* developed porcine blastocyst derived from IVF or ICSI blastocysts*

In vitro production conditions	No. of blastocysts used	No. of blastomeres	
		Mean \pm S.E.	Ranges
Control (IVM-F-C)	22	46.7 \pm 2.9 ^a	22~68
ICSI	10	41.9 \pm 4.6 ^a	27~52

† Values with same superscripts in the column were not significantly different ($P < 0.05$).

* Examined at 192 h post-insemination.

발달한 배반포기배의 할구수와 ICSI에 의해 발달한 배반포기배의 할구수는 각각 46.7 ± 2.9 개와 41.9 ± 4.6 개로 나타나 두 처리군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

돼지의 체외성숙된 난포란을 이용하여 IVF방법과 ICSI 방법에 의해 생산된 배반포기배의 할구수는 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 ICSI에 의해 생산된 배반포기배의 할구수는 Kim 등(1999)의 결과에는 미치지 못하였다. 이는 사용된 정자의 상태, 즉 성숙된 정자 또는 원형정자의 차이와 난포란의 활성화에 기인될 수도 있으나, ICSI후 체외배양액에 따른 후기배로의 발달율을 향상시킬 수 있는 연구 또한 필요하다고 사료된다.

지금까지의 이러한 결과들을 바탕으로 하여 ICSI에 의한 체외수정란의 생산을 위한 연구가 지속적으로 수행해 나가야 할 것이며, 또한 계속적인 연구로 Martin (2000)이 언급했던 ICSI를 이용하여 외부유전자의 도입에 의한 형질전환동물의 생산이 가능 할 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 요약

본 연구에서는 ICSI에 의한 돼지 체외수정란의 생산효율을 높이고자, ICSI에 사용되는 돼지 체외성숙 난포란의 원심분리에 의한 효과, 세포질내에 주입하는 정자의 DTT 전처리 효과, 체외성숙 난포란의 체외수정시 주로 사용되는 IVF방법과 ICSI방법 사용에 따른 수정율과 후기배로의 배발달을 조사 그리고 IVF방법과 ICSI방법에 의해 발달한 배반포기배의 할구수를 조사하여 다음과 같은 결과

를 얻었다.

ICSI에 사용되는 돼지 체외성숙 난포란을 이용하여 원심분리를 실시하지 않은 군과 실시한 군에 있어서 수정율과 후기배로의 발달율에 있어서는 두 처리군간에 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 또한 ICSI에 사용되는 정자를 주입전에 DTT를 처리한 군과 DTT를 처리하지 않은 군에서의 수정율과 배반포기배로의 발달율에 있어서도 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그리고 체외성숙 후 IVF 또는 ICSI에 의한 체외수정 후 수정율과 후기배로의 발달율에 있어서도 두 처리군간의 유의성은 나타나지 않았다. IVF와 ICSI에 의해 체외수정된 수정란에 있어서 8일째까지 발달한 배반포기배의 할구수를 조사한 결과 각각 46.7 ± 2.9 개와 41.9 ± 4.6 개로 나타나 두 처리군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

이상의 실험 결과들을 종합해 보면, ICSI에 의한 체외수정란의 생산은 체외성숙후 난구세포가 제거된 난포란을 원심분리시키면 ICSI에 있어서의 편리를 도모할 수 있을 뿐만 아니라 주입된 정자의 관찰을 용이하게 하여 정확성을 높일 수 있고, 주입시 사용하는 배양액의 난포란내 진입을 최소화 할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 ICSI전 정자의 침체반응 유도과 난포란의 활성화, 그리고 후기배로의 발달을 향상에 따른 할구수의 증가를 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 지금까지의 이러한 결과들을 바탕으로 하여 ICSI에 의한 체외수정란의 생산을 위한 연구가 지속적으로 수행해 나가야 할 것이며, 또한 계속적인 연구로 ICSI를 이용하여 외부유전자의 도입에 의한 형질

전환동물의 생산이 가능 할 수 있을 것으로 사료 된다.

V. 인용문헌

1. Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Cantley, T. C., Rieke, A. and Day, B. N. 1998. Coculture with follicular piece can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: Relevance to intracellular glutathione. *Biol. Reprod.*, 58:213-218.
2. Catt, S. I., Catt, J. W., Gomez, M. C., Maxwell, W. M. C. and Evans, G. 1996. The birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilized by intra-cytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet. Rec.*, 139:494-495.
3. Calvin, H. I. and Bedford, J. M. 1971. Formation of disulfied bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. fertil. Suppl.*, 13:65-75.
4. Catt, J. W. and Rhodes, S. L. 1995. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Rephod. Fertil. Dev.*, 7:161-167.
5. Chan, A. W. S., Luetjens, C. M., Dominko, T., Ramalho-Santos, J., Simerly, C., Hewitson, L. and Schatten, G. 2000. Foreign DNA transmission by ISI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey birth. *Mol. Human Reprod.*, 6:26-33.
6. Coy, P., Ruiz, S., Romar, R., Campos, I. and Gadea, J. 1999. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriology*, 51:799-812.
7. Grondahl, G., Hansen, T. H., Hossaini, A., Heinze, I., Gve, T. and Hyttel, P. 1997. Intracytoplasmic sperm injection of *in-vitro* matured equine oocytes. *Biol. Reprod.*, 57:1495-1501.
8. Hamano, K., Li, X., Fuauchi, K., Furudata, M. and Yoshiaki, M. 1999. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically stored sperm heads. *Biol. Reprod.*, 60:1194-1197.
9. Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K. and Iritani, A. 1988. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon. *Proc. 11th Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.*, 3:331-333.
10. Kikuchi, K., Kashiwazaki, N., Noguchi, J., Shimada, A., Takahashi, R., Hirabayashi, M., Shino, M., Ueda, M. and Kaneko, H. 1999. Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and culture *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 60: 336-340.
11. Kim, N. H., Lee, J. W., Jun, S. H., Lee, H. T. and Chung, K. S. 1998. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:436-444.
12. Kim, N. H., Shin, J. S., Kim, C., Jun, S. H., Lee, H. T. and Chung, K. S. 1999. Fertilization and *in vitro* development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermatid nuclei. *Theriology*, 51:1441-1449.
13. Kimura, Y. and Yanagimachi, R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, 52:709-720.
14. Martin, M. J. 2000. Development of *in vivo* -matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Repord.*, 63:109-112.
15. Mattioli, M., Bacci, M. L., Galeati, G. and Seran, E. 1989. Development competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriology*, 31:1201-1207.

16. Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R. J., Grupen, C. G., Seamark, R. F. and Nottle, M. B. 1994. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.*, 51:618-622.
 17. Olson, G. E., Hamilton, D. W. and Fawcett, D. W. 1976. Isolation and characterization of the perforatorium of rat spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 47:293-297.
 18. Perreault, S. D., Barbee, R. R., Elstein, K. H., Zucker, R. M. and Keefer, C. L. 1988. Inter-species differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed *in vivo* by sperm microinjection and *in vitro* by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 39:157-167.
 19. Perry, A. C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y. and Yanagimachi, R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 14: 1180-1183.
 20. Prather, R. S., Boice, M. L., Gibson, J., Hofman, K. E. and Parry, T. W. 1995. *In vitro* development of embryos from sinclair miniature pigs: A preliminary report. *Theriogenology*, 43:1001-1007.
 21. Pursel, V. G., Wall, R. J., Rexroad, Jr. C. E., Hammer, R. E. and Brinster, R. L. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 24:686-691.
 22. Rho, G. J., Kawarsky, S., Johnson, W. H., Kochhar, K. and Betteridge, K. J. 1998. Sperm and oocytes treatment to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.*, 59:918-924.
 23. Sutovsky, P. and Schatten, G. 1997a. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronucleus apposition during fertilization. *Biol. Reprod.*, 56:1503-1512.
 24. Sutovsky, P., Tengowski, M. W., Navara, C. S., Zoran, S. S. and Schatten, G. 1997b. Mitochondria sheath movement and detachment in mammalian, but not nonmammalian, sperm induced by disulfide bond reduction. *Mol. Reprod. Dev.*, 47:79-86.
 25. Tatham, B. G., Dowsing, A. T. and Trounson, A. O. 1995. Enucleation by centrifugation of in-vitro matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 53:1088-1094.
 26. Tatham, B. G., Sathananthan, A. H., Dharmawardena, V., Munasinghe, D. Y., Lewis, I. and Trounson, A. O. 1996. Centrifugation of bovine oocytes for nuclear manipulation and sperm injection. *Hum. Reprod.*, 11:1499-1503.
 27. Wall, R. J., Pursel, V. G., Hammer, R. E. and Brinster, R. L. 1985. Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. *Biol. Reprod.*, 32:645-651.
 28. Yoshida, M., Mizoguchi, Y., Ishigaki, K., Kojima, T. and Nagai, T. 1993. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 39: 1303-1311.
- (접수일자: 2001. 4. 17. / 채택일자: 2001. 5. 10.)