

(證例報告)

호랑이 난자의 체외성숙

이효상 · 윤희준 · 이영호 · 민원기 · 김태순¹ · 최종욱¹ · 윤병철¹ · 김재익¹ · 공일근[†]
순천대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

In Vitro Maturation of Tiger Oocytes: A Case Report

H. S. Lee, X. J. Yin, Y. H. Lee, W. K. Min, T. S. Kim¹, J. W. Choi¹, B. C. Yoon¹, J. I. Kim¹ and I. K. Kong[†]

Department of Animal Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences,
Suncheon National University

SUMMARY

The purpose of this study was to determine the possibility of *in vitro* maturation of tiger oocytes. Immature oocytes were recovered from a pair of ovaries. A total of 78 oocytes was collected, of which forty three were classified as good oocytes with compact cumulus cells and uniform cytoplasm. Forty three COCs were *in vitro* matured at 39°C, 5% CO₂ in air atmosphere for 48 h in a IVM medium (TCM-199 supplement with 10% FBS, 0.6 mM cysteine, 0.2 mM pyruvic acid and 10 IU/mL HMG). Experiment I: the morphologic evaluation was conducted by measuring the diameter of oocytes with or without ZP, the thickness of ZP and the diameter of cytoplasm by microeyepiece at the same magnification (×100). Experiment II: the evaluation of meiotic development was conducted of the nuclear development stage of tiger oocytes.

The results were summarized as follows:

1. The diameter of tiger oocytes ($176.5 \pm 6.1 \mu\text{m}$) with ZP was significantly ($p < 0.05$) bigger than that of bovine oocytes ($150.7 \pm 4.9 \mu\text{m}$). The ZP thickness of tiger oocytes ($20.4 \pm 2.9 \mu\text{m}$) was significantly ($p < 0.05$) bigger than that of bovine oocytes ($12.0 \pm 2.6 \mu\text{m}$; $p < 0.05$). However, there was no significant difference in the diameter of cytoplasm (without ZP) between tiger ($122.1 \pm 9.7 \mu\text{m}$) and bovine oocytes ($118.7 \pm 7.5 \mu\text{m}$).
2. The rates of meiotic development of tiger oocytes were achieved GV (12.5 %) and MII (50.0%), respectively.

These results indicated that tiger oocytes could be developed to MII in *in vitro* culture system.

(Key words : tiger, oocyte, *in vitro* maturation, oocyte morphology)

서 론

현재 조사된 세계의 포유류는 약 4,000여 종이며 그 중 멸종위기에 처한 종이 약 200여 종에 이른다. 야생동물, 특히 포유류는 지구상에 사는 인간에 있

어서 대단히 중요하다. 현재 국내에도 환경부지정 멸종위기야생포유류 (자연환경보전법 제2조 제6호)가 10종이 있으며, 보호야생포유동물 (자연환경보전법 제2조 제7호) 7종에 이른다. 특히 늑대, 여우, 호랑이, 표범 등 한국에서 서식한 고양이과와

¹ 광주광역시 우치공원관리사무소 우치동물원

[†] Correspondence : E-mail : ikong@suncheon.ac.kr

개과의 맹수류의 대부분은 일제시대 때 값비싼 가죽과 뼈를 얻기 위해 남획된 결과 그 수가 격감하였으며, 남한 내에 현재 존재가 확인되지 않거나 조사 중이다. 호랑이 미성숙난자의 체외배양에 관한 보고는 극히 드물며, Johnston 등(1991)은 호랑이 미성숙난자를 채취하여 36.2%의 핵 성숙율을 확인하였으며, Gjorret 등(2002)은 호르몬 처리하여 채취한 난자 35개중 8개를 체외성숙 배양하여 12.5%의 성숙난자를 얻었다. 고양이 생식세포 연구에서 Gomez 등(2003)은 고양이 미성숙 난포란을 체외성숙, 수정 및 배양하여 산자를 생산하였고, Shin 등(2002)은 세계 최초의 복제고양이 생산에 성공하면서, 멸종위기에 처한 고양이과 동물 연구에 돌파구가 마련되었다 할 수 있다.

따라서, 본 사례보고는 한국에 서식하는 고양이과 멸종위기 동물인 호랑이 난자의 체외성숙 가능성을 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 호랑이 난소 및 난자의 회수

난소는 광주 우치동물원에서 사육중인 2년생 Bengal Tiger(Fig. 2, a)의 것으로, 사후 약 1.5시간된 호랑이 1마리에서 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 38°C의 생리식염수가 들어있는 보온병에 넣어 2시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 난소를 면도날로 세절하여 난자를 회수하였다.

2. 호랑이 난자의 체외성숙

체외성숙배양액으로 TCM-199(Sigma, M-7528)에 10% FBS(Gibco, 26140-079), 0.6 mM cysteine (C-2529, Sigma), 0.2 mM pyruvic acid(P-4562, Sigma), 10 IU/mL human menopausal gonadotropin(HMG)(Teikokuzoki, Tokyo, Japan)를 첨가하였다. 배양액은 4-well dish(Nunc, Denmark)에 600 µL씩 분주한 후 43개의 난자를 주입하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양 후 난자의 핵성숙을 확인하였다.

3. 소 난자의 체외성숙

호랑이 난자와 비교를 위해 본 연구에서는 일상적으로 수행되고 있는 소 난자를 이용하였다. 소 미성숙난자의 체외성숙배양액은 TCM-199 (Sigma, M-7528) 배양액에 100 µg/mL streptomycin, 100 units/mL penicillin G, 1 µg/mL estradiol-17β (Sigma, E-2758), 10 µg/mL FSH (Sigma, F-2293), 0.6 mM cystein (Sigma, C-8152), 0.2 mM Na- pyruvate (Sigma, P-5280) 및 10% FBS (Gibco, 26140-079)를 첨가하여 사용하였다. 체외성숙배양에는 4-well dish를 사용하여 각 well 당 600 µL의 체외성숙배양액을 넣어 배양하였다. 회수된 미성숙난자는 체외성숙배양액으로 3회 세정 후 well 당 50개의 난자를 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator에서 20시간 배양하면서 체외성숙을 유도하였다.

4. 호랑이 및 소 체외성숙난자의 형태학적 평가
체외성숙 48시간 후 100배 (Olympus IX70, Japan) 도립현미경 하에서 난구세포가 제거된 호랑이와 소 난자의 직경 및 투명대의 두께를 측정하였으며 (Fig. 1, B), 난구세포를 제거한 후 난자의 세포질이 위축되거나 lysis 된 난자 (Fig. 2, d)를 제외한 나머지 난자만을 공시하여 제 1극체 출현 여부를 조사하였다.

5. 호랑이난자의 핵 분열상 평가

핵상 평가를 위하여 난자를 10 µg/mL Hoechst 33342 염색액이 첨가된 2.5% paraformaldehyde에 15분간 고정한 후 slide에 정착시켜 형광현미경 하에

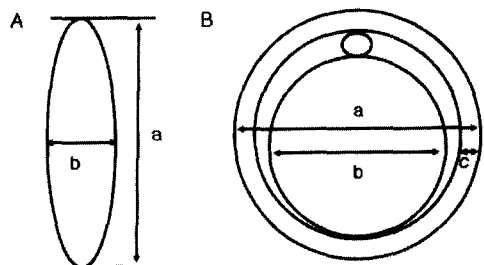


Fig. 1. Diagram for evaluation of the morphology of tiger ovary (A; a: length; b: width) and oocytes (B; a: with ZP, b: without ZP, c: thickness of ZP).

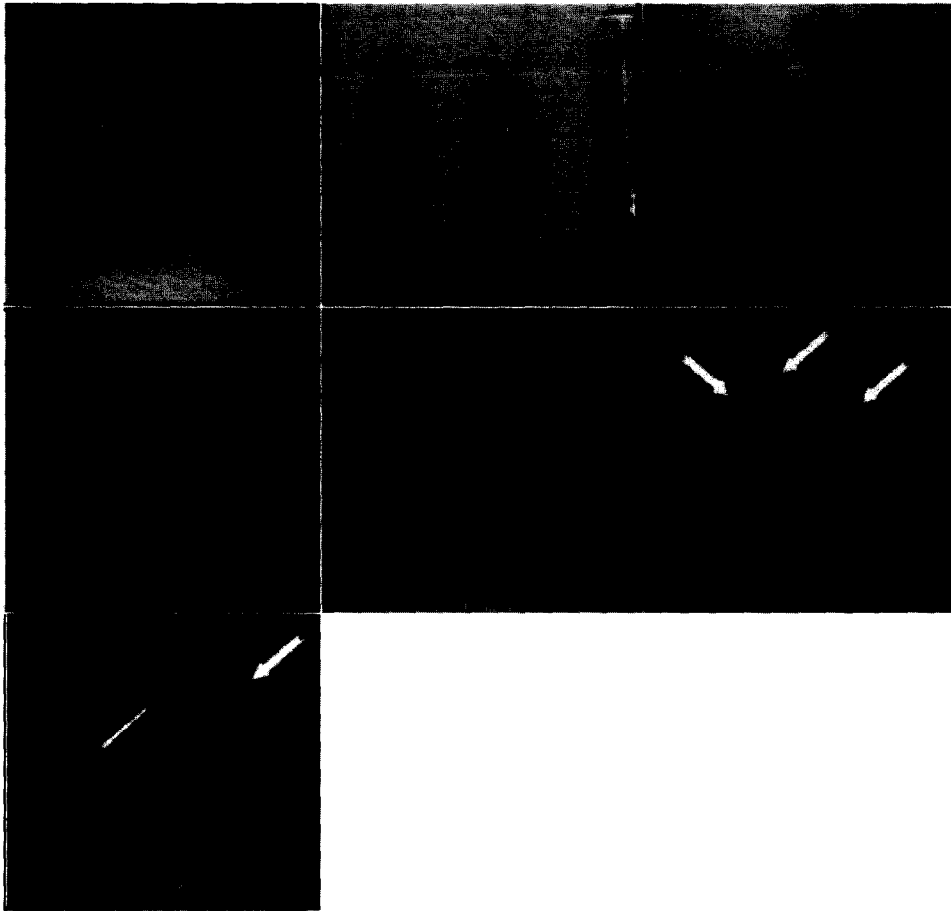


Fig. 2. Morphology of tiger's sample, a) Oocyte-donor tiger, b) Tiger ovary, c) Tiger oocytes, d) Lysis oocytes, e) 1st polar body (arrow), f) abnormal polar bodies (white arrows), g) ZP of tiger oocyte (white arrow: ZP; black arrow; microvillus), h) ZP of bovine oocyte (arrow).

서 핵상을 관찰하였다. 핵의 형태에 따라 핵막이 뚜렷이 존재하는 것을 GV로 판단하였으며, chromosome이 적도판에 배열하거나 동시에 극체가 확인된 난자를 각각 MI 및 MII로 판단하였다.

6. 통계학적 분석

본 연구의 실험결과와 통계학적 분석은 SAS 8.0 package(1999)를 이용하였으며, GLM(Generalized Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square means를 구하여 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 호랑이 난자의 형태학적 특성

난소 (Fig. 2, b)는 세로 (a)×가로 (b) (Fig. 1, A)를 측정하였다. 크기는 약 2.2×1.1 cm와 2.3×1 cm였으며 가시난포는 보이지 않았다. 2개의 난소에서 총 76개의 난자를 회수하여 난구세포가 3층 이상이고 세포질이 균일한 난자 43개를 체외성숙 및 배양에 공시하였다 (Fig. 2, c). 체외성숙 48시간 후 난자의 형태학적 분석은 Table 1과 같다. 난구세포를 제외한 난자의 평균 직경은 $176.5 \pm 6.1 \mu\text{m}$ 로 소 난자의 직경($150.7 \pm 4.9 \mu\text{m}$)보다 유의적으로 컸으며, 세포질의 직경은 호랑이 난자 ($122.1 \pm 9.7 \mu\text{m}$)와 소 난자($118.7 \pm 7.5 \mu\text{m}$)를 비교하였을 때 유의

적 차이는 없었다. 그리고, 투명대의 두께는 평균 $20.4 \pm 2.9 \mu\text{m}$ 로 소 난자 ($12 \pm 2.6 \mu\text{m}$)에 비해 유의적으로 두꺼웠으며, 투명대가 성숙된 소 난자의 투명대와 같이(Fig. 2, h) 매끄럽지 못하고 미세한 점모상 돌기형태의 구조물이 관찰되었다(Fig. 2, g). 이러한 결과는 Gomez 등(2003)이 호랑이 난자를 24시간 체외성숙시켜 투명대의 상태를 조사한 결과와 유사하였다. Karja 등(2002)이 비 발정기의 고양이 난소에서 채취한 난자를 24시간 체외배양 후 lysis 되는 난자가 17.5% 였다고 보고하였으나, 본 연구에서 호랑이난자의 체외성숙배양 시 세포질의 lysis율이 81.3%(35/43)를 보였다. 앞으로, 호랑이 난자의 체외성숙조건외의 추후검토가 필요하다고 판단된다.

2. 호랑이 난자의 핵 분열상 평가

호랑이 난자의 핵분열상 평가는 Table 2와 같다. 8개의 난자 중, 위관강에 1개의 극체가 있는 난자는 4개 (Fig. 2, e), 여러 개의 극체모양을 가진 난자 1개 (Fig. 2, f)가 조사되었다. 염색 후 핵상을 관찰하였을 때 GV 단계의 난자는 1개가 확인되었으며,

Table 1. Comparison of tiger and bovine oocytes matured *in vitro*

Kind of species	No. of oocytes	Diameter of oocytes (Mean±S.E., μm)		Thickness of ZP (μm)
		with ZP	without ZP	
Tiger	43	176.5 ± 6.1^a	122.1 ± 9.7	20.4 ± 2.9^a
Bovine	20	150.7 ± 4.9^b	118.7 ± 7.5	12.0 ± 2.6^b

^{ab} Values with different superscripts within the same columns are different significantly ($p < 0.05$).

Table 2. Nuclear maturation stage of tiger oocytes 48 h after culture

No. of oocytes	1st polar body (%)	No. of oocytes (%)			
		GV	MII	Abnormal	No visible
8	5 (62.5)	1 (12.5)	4 (50.0)	1 (12.5)	2 (25.0)

GV: germinal vesicle, MII : metaphase II.

세포질의 핵과 극체가 보이는 MII 단계의 난자는 4개가 조사되었으며, 핵의 형태가 세포질에 흩어져 있는 비정상적인 핵상을 보인 난자도 1개가 조사되었고, 핵 상이 보이지 않은 난자도 2개가 조사되었다. Crichton 등(2003)은 호르몬을 주사한 호랑이에서 난자를 채취한 후 2시간째 난구세포가 확장된 난자의 핵 성숙율을 조사하였을 때 MI-MII 핵이 57.1%가 확인되었다. 이는 체내에서 호르몬의 영향을 충분히 받아 난자의 핵성숙이 진행된 상태라 판단되며, 본 연구에서는 난구세포가 전혀 확장되지 않은 난자를 이용하여 체외성숙을 유도하였고, 체외성숙 48시간 후 핵상 관찰을 하였을 때는 GV 단계와 MII 단계의 핵상만 관찰되었다. 또한, 고양이 생식세포 연구에서 Karja 등(2002)은 비 발정기의 고양이 난소에서 채취한 난자를 24시간 배양시켜 60.5%의 성숙난자를 얻었다는 보고와 유사하였다.

이상의 결과로 볼 때 호랑이의 투명대를 제외한 난자의 직경은 소 난자와 유사하였으며, 호랑이난자의 체외성숙 배양액 검토가 충분히 이루어 진다면 체외성숙이 가능하리라 판단된다. 그러나, 본 연구의 결과는 비 발정기의 호랑이 난소에서 채취한 난자만을 공시하였고, 단 1회의 연구결과로써 성급히 결론을 내리기에는 미흡한 점이 많으며, 추후 호랑이난자에 가장 적합한 체외성숙조건외의 검토가 요구된다고 판단된다.

적 요

본 연구는 호랑이 미성숙 난자의 체외 성숙의 가능성을 검토하였다.

1. 호랑이 난자의 직경($176.5 \pm 6.1 \mu\text{m}$)은 소 난자의 직경($150.7 \pm 4.9 \mu\text{m}$)보다 유의적으로 컸으며, 세포질 직경($122.1 \pm 9.7 \mu\text{m}$)은 소 난자의 직경($118.7 \pm 7.5 \mu\text{m}$)과 유의차가 없었다. 또한, 호랑이 난자의 투명대 두께($20.4 \pm 2.9 \mu\text{m}$)는 소 난자의 두께($12 \pm 2.6 \mu\text{m}$)보다 유의적으로 두꺼웠다($p < 0.05$).
2. 체외성숙 48시간째 제1극체의 출현율은 62.5%이며, 핵성숙은 GV 단계(12.5%)와 MII 단계(50.0%)의 핵 성숙율을 보였다.

이상의 연구결과로 보아 호랑이 난자도 체외성숙이 가능하리라 판단되며 보다 더 적합한 체외성숙조건을 검토가 요구된다.

참고문헌

- Crichton EG, Bedows E, Miller-Lindholm AK, Baldwin DM, Armstrong DL, Graham LH, Ford JJ, Gjorret JO, Hyttel P, Pope CE, Vajta G and Loskutoff NM. 2003. Efficiency of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and *in vitro* embryo production and cryopreservation in siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). Biol. Reprod., 68: 105-113.
- Gjorret JO, Crichton EG, Loskutoff NM, Armstrong DL and Hyttel P. 2002. Ultrastructure of oocyte maturation, fertilization, and early embryo development *in vitro* in the siberian tiger(*Panthera tigris altaica*). Mol. Reprod. Dev., 63: 79-88.
- Gomez MC, Pope E, Harris R, Mikota S and Dresser BL. 2003. Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. Theriogenology, 60: 239-251.
- Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ and Wildt DE. 1991. Rescue and maturation *in vitro* of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. Biol. Reprod., 45: 898-906.
- Karja NW, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M and Suzuki T. 2002. *In vitro* maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. Theriogenology, 57: 2289-2298.
- SAS. 1999. User's Guide: Statistics.SAS Institute In., Cary, NC.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L and Westhusin M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. Nature, 415: 859.

(접수일: 2004. 3. 2/ 채택일: 2004. 8. 10)