

## 過排卵 處理된 토끼의 體內 初期胚 發生에 관한 研究

조헌조 · 이흥준 · 심금섭\*

상주산업대학

### Development of Early Embryos in *In Vivo* Superovulated Rabbits

H. J. Cho, H. J. Lee and K. S. Shim\*

Sang Ju Polytechnic University

#### SUMMARY

This experiment was carried out to investigate the development of early rabbit embryos *in vivo*. Twenty-six New Zealand White does were superovulated by treatment with PMSG(Intervet Co; I. M, single injection, 150. U. /rabbit) followed 3 day later by simultaneous I,V injection of 100 I.U HCG (Intervet Co,)and natural service with fertile male. All of does was killed at the specific times (24, 27, 30, 36, 42, 50 and 93 h post-hCG) to find out the early embryonic development *in vivo* respectively. Embryos at the specified stages of development were obtained at the following times after injection of hCG: one-cell at 24 h, two-cell at 24~27h, four-cell at 27~36 h, morulae at 50 h and early blastocyst at 93 h and expanded or hatching blastocyst at 144 h. Number of embryos recovered per rabbit superovulated was 26.1 and average of recovery rate was 83.7%. The results suggest that superovulation was efficient for the increase of embryo number in rabbits, and as shown in results, asynchronous cleavage was prevalent among the recovered embryos.

**Key words:** *in vivo*, development, rabbit

#### 緒 論

Gregroy(1930)는 토끼에 있어 交配 후 날짜 경과에 따른 受精卵의 胚發生 經路를 調査하였으며, Alliston 등 (1973)은 受精卵의 직경이 發達 程度에 따른 初期胚의 胚發達에 관한 研究보고하였다. 또한 Daniel (1964)은 受精卵의 細胞數의 變化를 중심으로 한 研究를, Lawitts 등(1991) 및 Morgan 등 (1977)은 수정란의 發達 段階에 따른 蛋白質含量의 變化에 대한 研究를 하였다. Takeda 등(1977)은 PGF<sub>2</sub>α를 이용한 卵管運動性 增進에 따른 토끼

受精卵의 移動性에 관한 研究를 하였으며, Adams (1980)는 排卵 후 時間經過에 따로 胚發生 및 運送 등에 관한 研究를 한 바 있다.

한편, 최근 들어 實驗動物인 Mouse(Sato 등, 1993; Taniguchi 등, 1992), 가축(Wall 등, 1992), 및 Rabbit(Adenot 등, 1992; Correia 등, 1993)를 대상으로 核置換 및 遺傳子操作技術 (genemicro-injection; Embryo secting) 등의 生命工學의 研究(Fischer 등, 1988)들이 활발히 進行되고 있으며, 이런 고도의 尖端 技術들을 이용해 우수 家畜 生産의 目標을 달성키 위해서는 안정적인 受精卵의 供給과 研究에 사용되는 受精卵의 體內胚發生 段階

\* :연암축산원에전문대학 축산과(Dept. of Animal Science, Yonam Junior College of Livestock & Horticulture)

의 정립이 무엇보다 중요하다.

따라서 본 實驗은 일시에 많은 수의 受精卵을 얻기 위해 토끼에 過排卵 처리를 실시하고, 토끼에 있어 hCG 처리 시간 경과에 따른 初期胚의 정확한 胚發生 정도를 규명하여, 初期胚의 體外 培養의 조건 등을 확립하기 위한 基礎 資料를 제공키 위해 실시하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 供試兔

연암 축산원에 전문대학 실습 농장에서 사육된 體重 3.3~3.8kg의 성빈코 26두를 본 실험에 사용하여 으며, 品種은 new Zealand White였으며, 위임신 방지를 위해 최소 16일 이상 個體 飼育을 실시하였고, 其他 事項은 實習 農場의 관행에 준하여 飼育하였다.

### 2. 過排卵 處理

個體別 입식 날짜를 확인 후 個體당 150I.U.의 PMSG(Intervet 社)를 筋肉注射한 다음, 72시간 경과후 100 I.U.의 hCG(Intervet 社)를 靜脈注射하여, 過排卵을 有機하였다.

### 3. 生殖器官 發達 事項 調査

hCG처리 시간에 따라 24, 27, 30, 42, 50 및 93 시간에 각기 5ml 공기를 靜脈에 注射하여 토끼를 도축한 다음 欄巢, 卵管 및 子宮이 연결된 상태로 生殖器官을 적출하여 卵巢의 무게 測定 및 排卵點 調査와 더불어 卵管 및 子宮 發達 狀態를 調査하였다.

### 4. 受精卵의 回收

hCG처리 시간별로 Chang 등(1949)의 방법에 따라 上向式 卵管 灌流法으로 37°C, 5ml의 PBS를 사용하여 卵管 및 子宮內 受精卵을 回收한 다음 Streomicroscope(Olympus × 30~×100)하에서 受精卵의 細胞分裂 狀態를 調査하였고, 일부 受精卵은 orcein staining과 rapid staining(Byun 등, 1991)을 통해 정확한 受精卵의 細胞發達 狀態를 糾明하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 過排卵 處理된 토끼의 hCG 處理 시간 경과에 따른 生殖器官의 發達

hCG 處理 시간에 따른 토끼의 生殖器官의 發達 狀態는 Table 1에 나타난 바와 같다.

Table 1에 나타난 바와 같이 hCG 處理 시간 경과에 따라 卵巢의 무게는 증가하였으나, 卵管 및 子宮의 길이는 큰 차이가 나타나지 않았으며, 左右側의 難關 및 子宮의 길이에 있어 다소 차이가 나타났다.

특히 hCG 處理 시간 경과에 따른 卵巢의 무게가 增大되는 것은 시간 경과에 따라 卵巢의 黃體의 發達이 이루어지는 것과 밀접한 연관성을 맺고 있으며, Tsursumi 등 (1980)과 Setty 등 (1987)도 비슷한 研究 보고를 하였다.

### 2. hCG 처리 시간별 受精卵의 回收成績

hCG처리에 따라 外科의 方法으로 回收된 受精卵과 回收成績은 Table 2에 나타난 바와 같다.

過排卵 處理에 따라 회수된 受精卵은 平均 26.1개였으며, 平均 回收率은 83.7%로 나타났다. Shim 등 (1984)은 hCG 處理 후 24, 48, 및 72시간에 外科의 方法으로 受精卵을 回收하여 개체당 平均 23.2개의

Table 1. Changes of reproductive tracts in terms of Post hCG in the superovulated rabbits

Post hCG (h)	Ave. ovarian weight(g)		Length of oviduct(cm)		Lengths of uterus(cm)	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right
24	0.34	0.38	12.50	11.20	13.80	14.00
27	0.40	0.50	11.00	13.00	14.00	13.50
30	0.65	0.60	14.20	15.40	14.20	13.00
42	0.65	0.55	13.50	11.80	12.80	11.10
50	0.75	0.80	13.40	13.40	14.00	14.20

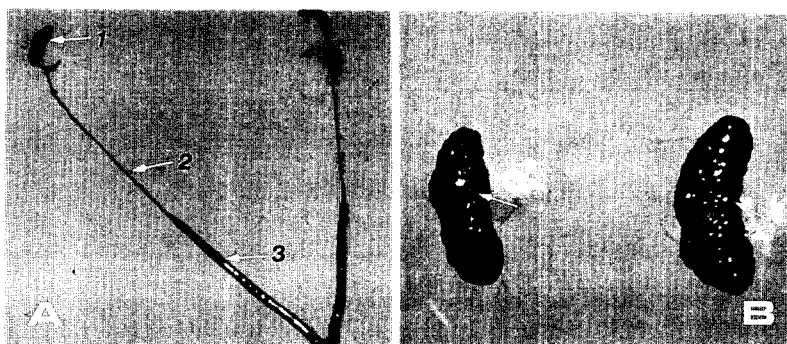


Fig. 1. Appearances of reproductive tracts at 40 hr Post hCG (A : 1, ovary : 2, oviduct : 3 uterus) and ovaries at 35 hr Post hCG (B : arrows mean ovulation point).

Table 2. Average number of recovered embryos and recovery rate in the superovulated rabbits

Post hCG (hr)	No. of does recovered use	Ave. No. of ovulation embryos	Ave. No. of point	Ave. recovery rate(%)
24	6	22.5	24.2	93.0
27	3	31.0	35.3	87.8
30	3	25.0	28.0	89.3
36	2	35.0	40.0	88.8
42	5	30.4	35.0	86.9
50	5	22.0	30.0	73.3
93	2	16.5	25.0	66.6

受精卵을回收하였고, Ishijima 등(1967)은 교미후 1, 2, 3일에回收한 평균 卵子數는 각각 32개, 19개, 23.5개 였다고 보고하였다.

Tsunoda 등(1983)도 過排卵 토끼에서 교미후 17~90시간에 걸쳐  $15.8 \pm 15.7$ 개의 受精卵을回收하여 本實驗의 結果와 거의 일치하였다.

한편 Hodgson 등 (1976)은 자연 排卵시, 교미후 40, 60, 66 및 72시간에 평균 7.9, 7.0, 7.4 및 11.25개의 受精卵을回收하였다고 보고하였는 바 토끼의 경우 過排卵 處理를 하게 되면 自然 排卵에 비해 약 3배 정도 더 많은 受精卵을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

本實驗에서 얻어진 回收率은 평균 83.7%로 비교적 좋은 성적을 얻었으며 hCG 處理 시간 경과에 따라 回收率이 떨어짐을 알 수 있었다.

특히 受精卵이 子宮에서 出現되는 hCG處理 후

50시간 이후부터 급격히 受精卵의 回收率이 떨어졌다.

Ishijima 등(1967, 1973)과 Tsunoda 등(1987)은 過排卵 토끼에 있어 卵管内 운동성이 매우 증진되고, 自然 排卵 토끼에 비해 약 18시간 이상 卵管 이행이 촉진되어 일부의 卵子들이 腔로 放出된다고 보고하였다.

Tsutsumi 등(1980)은 過排卵 處理 토끼에 있어 교미후 48, 60, 72 및 80시간 경과시 각각 7.4 %, 16.2%, 15.5%, 13% 및 12%의 卵子를 腔에서回收하였다고 보고하여, 위의 사실들을 뒷받침해 주고 있다.

### 3. hCG 처리 시간에 따른 受精卵의 發達 狀態

hCG 처리 시간에 따라 다양한 受精卵의 發達 狀態가 進行됨을 알 수 있었으며, 그 結果는 Table 3에

Table 3. Development of early embryos *in vivo* in terms of post-hCG in the superovulated rabbits

Post hCG (hr)	Morphology and No. of embryo collected(%)											Total No. of embryos	
	1	2	3	4	5	6	8	16	M <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	D <sup>c</sup>		
24	108 (80.0)	26 (19.3)		1 (0.7)									135
27	8 (8.6)	27 (29.0)		58 (62.4)									93
30	3 (4.0)	10 (13.3)	10 (13.3)	39 (52.0)	2 (2.7)	2 (2.7)					9 (12.0)		75
36	17 (23.9)	3 (4.3)	6 (8.5)	2 (28.2)	1 (1.3)	2 (2.8)	12 (16.9)				10 (14.1)		71
42	17 (11.2)	1 (0.65)	6 (3.9)	43 (28.3)	1 (0.65)	8 (5.3)	52 (34.2)	5 (3.3)			19 (12.5)		152
50	5 (5.0)			2 (1.2)			46 (41.9)	28 (25.5)	20 (18.2)		9 (8.2)		110
93									23 (69.7)	10 (30.3)			33

Ma: morula Bb: blastocyst Dc: degenerated embryos

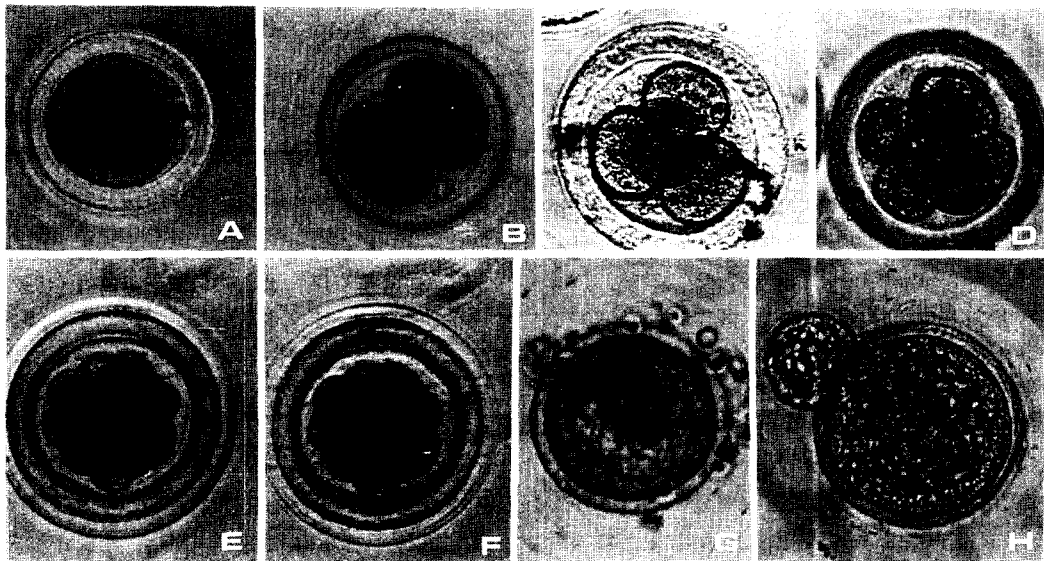


Fig. 2. Morphology of rabbit embryos collected at the various times(  $\times 100$  )

A : one-cell B : two-cell C : four-cell D : eight-cell  
 E : early morula F : late-morula G : late blastocyst  
 H : hatching blastocyst collected at 144hr Post hCG.

나타나 있다.

hCG 처리 후 시간 경과에 따른 회收到 受精卵의 發達은 24시간에는 1細胞 (80.0%)가 主從을 이루었고, 27시간에는 4細胞 (62.4%), 42시간에는 8細胞 (34.2%), 50시간 경에는 桑實胚(18.2%), 93시간에는 初期 胞胚가 나타났고, hCG 처리 후 144 시간경에는 Hatching Blastocyst가 發見되었다

Lutwak-Mann (1971)은 hCG 처리 후  $10 \pm 2$ 시간에 排卵이 일어난다고 보고하고 있어, 토끼 受精卵의 初期 胚發生은 매우 짧은 시간에 桑實胚 狀態까지 發達함을 알 수 있었다. Morgan 등 (1993)도 본 研究 結果와 거의 一致하는 보고를 하였으며, 過排卵 처리된 토끼의 수정란은 같은 시간대에 회收到 경우에도 매우 다양한 受精卵의 發達 狀態를 나타내었다.

## 摘 要

本 實驗은 hCG 처리 시간에 따라 特定 시간대 별로 토끼를 도축하여, 처리 시간에 따른 生殖器官의 發達 狀態의 調査 및 受精卵의 發達狀態를 精確하게 밝혀 내기 위해 실시하였으며, 그 結果는 아래와 같다. hCG 처리 시간 (24, 27, 30, 42 및 50시간)에 따른 卵巢의 무게 變化는 0.34~0.80 g 으로 나타났으며, 卵管 및 子宮의 길이의 變化는 각각 11.20~15.40 및 11.10~14.40 cm 였다. hCG 처리 시간 경과에 따른 平均 회收到 受精卵의 數는 26.1개였고, 平均 회收到率은 83.7%였으며, hCG 처리 시간 경과에 따라 회收到率은 떨어졌다. hCG 처리 시간에 따라 다양한 受精卵의 發達 狀態를 보여주었으며, 동일 시간대에도 受精卵이 다양한 發達 分布를 하고 있음을 알 수 있었다.

## 參考文獻

Adenot PG, Heyman Y, Chesne P, Rao VH and Renard JP. 1992. Relationship between kinetics of nuclear swelling and subsequent *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos. Therigenology 37, 185(Abstr.).  
Alliston CW and Pardee NR. 1973. Variability of

embryonic development in the rabbit at 19 to 168 hours after mating. Laboratory Anim. Sci. 23, 665-670.

Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. development of a rapid staining method for nucleus of the oocyte from domestic animals. Korean J. Anim. Sci. 33, 25-31.

Chang MC. 1949. Effects of heterogenous sera on fertilized rabbit ova. J. Gen. Physiol. 32, 291-300.

Correia CP, Collas P, Leon F and Robl JM. 1993. Chromatin and microtubule organization in the first cell cycle in rabbit parthenotes and nuclear transplant embryos. Mol. Reprod. Dev. 34, 33-42.

Daniel J, Jr C. 1964. Early growth of rabbit trophoblast. Am. Natur. 98, 85-97.

Gregory PW. 1930. The early embryology of the rabbit. Contributions to Embryology 21, 141-168.

Hodgson BJ and Pauerstein CJ. 1976. Comparison of oviductal transport of fertilized and unfertilized ova after hCG or coitus-induced ovulation in rabbits. Biol. Reprod. 14, 377-380.

Ishijima Y and Sakuma Y. 1967. Effect of the estrogen pretreatment on the induced superovulation by PMS in rabbits Jap. Anim J. Reprod. 12, 133-136.

Ishijima Y. 1973. Studies on pregnancy in rabbits after superovulation with gonadotrophins. Jap. J. Anim. Reprod 19, 43-55.

Lawitts JA, Butler JE, Kiessling AA and Biggers JD. 1991. Growth and DNA replication in rabbit blastocysts. Mol. Reprod. Dev. 30, 320-329.

Lutwak-Mann C. 1971. The rabbit blastocyst and its environment, physiological and biochemical aspects. In The Biology of the Blastocyst pp 243-260. Ed. RJ Blandau. University of Chicago Press, Chicago.

- Morgan PM and Kane MT. 1993. Protein content of rabbit embryos : one cell to peri-implantation blastocyst. *J. Reprod. Fert.* 97, 101-106.
- Sato M, Tada N, Iwase R and Amann E. 1993. Gene introduction into mouse blastocysts via "Pricking" *Mol. Reprod. Dev.* 34, 349-356.
- Setty SL and Mills TM. 1987. The effects of progesterone on follicular growth in the rabbit ovary. *Biol. Reprod.* 36, 1247-1252.
- Shim KS, Byun TH and Lee JK. 1984. Comparison of non-surgical and surgical recovery of fertilized superovulated rabbits. *Korean J. Anim. Reprod.* 8, 16-21.
- Taniguchi T, Cheong HT and Kanagawa H. 1992. Development of reconstituted mouse embryos produced from bisected and eletrocofused pronuclear-stage embryos. *Theriogenology* 37, 655-663.
- Tsunoda Y, Iritani A and Nishikawa Y. 1978. Studies on superovulation in the rabbit with special reference to repeated superovulation. *Jap. J. Zotech. Sci.* 4, 89-95.
- Tsutsumi Y, Terami Y, Takeda T, Suzuki H and Matsui S. 1980. *In vivo* egg recovery from the vagina and the pattern of egg distribution in superovulated rabbits. *Jap. J. Anim. Reprod.* 26, 6-14.
- Wall RJ and Seidel GE, Jr. 1992. Transgenic farm animal-A critical analysis. *Theriogenology* 38, 337-357.