

수정란의 위생적인 처리법

김 일 화

농촌진흥청 축산기술연구소

1. 서 론

수정란이식 기술의 적용은 가축의 능력개량, 유전자원의 지역간 또는 국제간 이동에 효과적으로 이용되고 있으며, 근자에는 멸종위기 또는 희귀 동물의 증식과 보존 수단으로서의 이용을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Solti 등, 2000). 수정란의 형태로서 유전자원의 이동이 생축이나 정액을 이용한 방법에 비해 질병 전파의 위험성이 낮으나, 적절하게 위생 처리되지 않을 경우 가축뿐만 아니라 사람의 위생에도 심각한 결과를 초래할 수 있다(Stringfellow and Givens, 2000).

체내생산 수정란의 경우에는 투명대에 의한 보호, 채란액에 의한 희석, 세척과정, 항균제 및 효소처리를 통하여 병원체 전파의 통제가 다소 용이하나, 체외수정란의 경우에는 도축장으로부터 수집되는 세포, 조직과 동물 유래의 혈청, 호르몬, 효소 등의 사용에 의해 병원체의 전파 가능성이 증가된다(Stringfellow and Wrathall, 1995; Guerin et al., 1997).

1998년의 국내 수정란이식 조사 자료에 의하면(김과 손, 1999), 수정란이식우 4,161두 중 3,179두(76.4%)에 체외수정란이 이식되어 수정란의 위생관리에 대한 관심이 더욱 요구된다. 또한 수정란 생산과정중 위생처리에 대한 적절한 기준이 설정되지 않은 상황이므로 이에 대한 보완이 요구된다.

수정란의 위생적인 취급을 위해서 국제수역사무국(OIE)과 국제수정란이식학회(IETS)가 서로 협력하여 수정란의 이동에 따른 질병전파 위험성의 평가 및 위험성 감소를 위한 실제적인 방법을 제시하였으며 또한 관련 정보를 제공해 오고 있다.

본고에서는 IETS에 의해 국제적으로 권장되고 있는 내용을 위주로 수정란의 위생처리에 관한 내용을 소개하고자 한다.

2. 체내 · 외 수정란과 관련된 병원체의 전파

체내에서 생산된 수정란은 투명대에 의한 1차 방어벽의 역할로 많은 병원체에 대해 감염의 가능성이 낮으며, 어떤 병원체들은 수정란 보존배지에서 잘 생존하지 못하는 것으로 알려져 있다.

체내수정란과는 달리 체외수정란은 투명대의 특성차이와 다양한 세포, 조직 및 생물학적 제재의 사용으로 전파의 위험성이 더욱 커진다(Guerin et al., 1997).

난자, 공배양세포, 배지

배란전 난자는 난소의 세포 및 난포액에 존재하는 감염원의 접촉에 의해 전파될 수 있으며, 체외배양체계에서는 수정란의 발육에 양호한 환경을 조성하기 위해 공급되는 혈청이나 공배양세포를 포함하는 복합배지에서 병원체의 도입 가능성이 높아진다. Bielanski 등(1993)은 캐나다의 5개 체외수정 실험실에서 난자, 수정란, 난포액, 난관세포 등의 85개 시료를 검사한 결과 난관세포에서 BHV-1, BVDV가 각각 6.2%, 1.2% 감염되었다고 보고하였으며, Avery 등(1993)은 덴마크에서 비슷한 조사를 한 결과 1,163두의 난포액과 배양액에서 BVDV가 검출되었다. 또한 도축장에서 수집한 난소 및 난관세포를 이용한 체외수정체계에서 *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* 및 *Yeast*가 오염되었으며, 이것이 배양배지의 오염을 일으켜 수정란의 발육이 저하되었다(Bielanski and Stewart, 1996).

정액

체외수정을 위해 높은 운동성을 가진 정자를 준비하는데 원심분리, swim up, Percoll gradients, albumin gradients, glass-wool filtration과 같은 여러 가지 방법이 이용된다. Bolton 등(1986)은 60% Percoll gradients를 이용하여 정자의 세균수가 감소된 것을 확인하였다. 그러나 Bielanski 등(1992)은 위에서 언급한 여러 가지 정자 처리법에 의해서도 소의 정액에서 BVD virus를 제거하는데 실패하였다고 보고하여 체외수정을 위해 정자를 준비할 때 이용되는 단순한 물리적 방법에 의해 이 바이러스가 완전히 제거되지 않음을 보여주었다. 체외수정중 정액에 오염된 세균, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* 및 *Pantoea*에 의해 체외수정 배지 및 배양 배지가 오염되어 혼탁하게 변화되었으며 또한 수정율의 감소 및 수정란

의 변성, 사멸을 초래하였다(Stringfellow et al., 1997; Kim et al., 1998).

보조 수정기술(ICSI, Zona drilling)을 이용시에는 투명대를 뚫기 때문에 난자 감염의 위험성이 더욱 커진다.

3. 수정란의 위생처리 절차

수정란의 위생처리 절차는 IETS Manual(1998) 제 3판 5장~8장 및 10장을 발췌, 요약하여 기술한다.

체내 수정란의 위생처리

배지 : 모든 배양액, 혈청, 효소 및 동해방지제는 병원체의 오염을 피하기 위하여 출처가 확실한 것을 구입하며, 특히 혈청은 팀수의사에 의해 신중히 선택함이 권장된다.

수정란의 세척절차 : 수정란의 전 표면을 검사하여 부착된 모든 점액이나 찌꺼기를 제거하며 수정란 검사시 현미경 배율은 투명대의 손상과 점착성 물질의 확인을 위해 최소 50배로 검사한다. 투명대 손상이 발견되거나 점착성 찌꺼기가 제거될 수 없으면 수정란을 폐기한다. 수정란의 적절한 세척을 위한 필수 요구조건은 표 1에 기술되어 있다.

표 1. 수정란의 적절한 세척을 위한 필수 요구조건

-
- 공란우 한 개체의 수정란만 같이 세척
 - 한 번에 10개 이하 수정란만 세척
 - 투명대 손상이 없는 수정란만 세척
 - 점착성 물질이 없는 수정란만 세척
 - 최소한 10회 세척(부드럽게 혼합하면서 세척)
 - 수정란을 다른 세척액으로 옮길 때 멸균된 새 피펫 사용
 - 각 세척시 이전의 세척액보다 최소 100배 희석이 되도록 세척액 양 조절
-

수정란의 트립신 처리 : 수정란의 트립신 처리는 투명대에 부착된 바이러스 제거 또는 불활화에 효과가 있는 것으로 보고되었다(Stringfellow 등, 1990). 트립신 처리 절차는 수정란을 광범위 항생제와 0.4% BSA가 첨가된 PBS 용액에서 5회 세척후 0.25% 멸균 트립신에서 60~90초간 2회 노출시키며 수정란을 항생제와 2% FBS 또는 0.4% BSA가 첨가된 PBS 용액에서 5회 세척한다.

체외수정란과 관련된 위생처리

난자 수집 : 체외수정란 생산을 위한 도축난소 유래 난자와 OPU 기법에 의한 채취난자가 제공될 수 있다. 표 2는 도축난소 유래 난자의 수집 및 취급 요령을 제시한다.

표 2. 도축난소 유래 난자의 수집 및 취급 요령

-
- 국가적인 동물질병 근절 프로그램에 의하여 도축되는 암소 사용 금지
 - 도축장에서는 사전·사후 검사를 포함한 공식적인 검사 프로그램 준수
 - 난소 채집 인원은 도축장내에서 위생 및 안전규칙 준수
 - 난소 및 기타조직은 위생적인 상태로 운반
 - 한 번에 채집한 난소군은 모든 공란우들이 사후 검사의 통과를 확인한 다음 실험실로 운반하며, 수집일, 도축장, 체외수정란 생산팀이 지정한 번호를 부여하고, 사후 검사 불합격 판정시 그 번호에 해당하는 조직과 난소는 폐기함
-

OPU 기법에 의한 난자의 채취시는 도축난소 유래 난자와는 다르게 공란우의 위생상태와 채취시의 위생조건에 유의해야 한다.

체외조작 과정 : 난자 또는 수정란의 체외조작 과정은 laminar-flow hood 하에서 소독된 장비와 배양액을 이용해야 하며, 난자와 수정란의 세척은 표 3에서 기술된 방법으로 한다.

표 3. 체외수정란의 생산을 위한 난자와 수정란의 세척과정

- 각 세척 단계마다 petri dish 또는 multiwell plate에서 3~4회 세척
- 각 세척시 이전의 세척액보다 적어도 100배 이상 희석 비율로 세척하며, 세척시 가볍게 저어줌
- 세척과정중 난자 또는 수정란을 다음 세척 단계로 옮길 때 멸균된 새 피펫 사용
- 동일 롯트 번호의 도축난소 유래 또는 동일 공란우 유래 OPU 난자 또는 수정란만 동시에 세척
- 체외수정란의 이식 또는 동결보존전 최소한 10회 세척

배양액 : 모든 배양액, 용액, 혈청 및 첨가제는 소독된 상태로 구입하거나 사용전 실험실에서 소독한다. 용액은 0.22 μ m 필터로 멸균한다. 혈청, 호르몬 및 다른 첨가제는 조직배양용 재제를 사용하며 특정성분은 실험실에서 배취와 롯트의 효과를 평가하고, 정례적인 분석을 통하여 체계적으로 바이러스를 검사한다. 특히 혈청을 첨가시에는 마이코플라즈마, 바이러스, 세균 및 진균의 존재 여부를 검사하고 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화하여 작은 멸균 용기에 분주하여 -70 $^{\circ}$ C 또는 그 이하 온도에서 보관한다. 혈청 첨가 대응으로 성장인자 또는 혈청 알부민으로 대체하는 것도 권장되나 단순 제한배지에서의 배양이 위생적인 측면에서 가장 이상적이다.

수정란의 위생처리를 위한 항생제의 사용

수정란 취급과정에서 특정 전염성 병원균과 환경 오염균의 오염방지를 위해 채란 배지 또는 배양배지에 항생제를 관례적으로 사용하는데, 표준 세포 배양배지의 권장농도에 준하여 세포 배양배지 및 수정란에 대해 검사가 이루어진 고품질 항생제를 사용해야 한다. 이상적인 항생제는 독성없이 오염균을 억제하고 병원균의 확산을 방지하여 배지의 산도나 삼투압을 변화시키지 않고 배지와 혼합되어야 한다. 세균을 억제하기 위한 항생제로서 일반적으로 사용되는 것은 penicillin G(50~100IU/ml), streptomycin sulfate(50~100 μ g/ml) 및 kanamycin(100 μ g/ml)이며 그리고 진균의 오염을 통제하기 위하여 mycostatin(50IU/ml) 또는 amphotericin B(0.25 μ g/ml)가 흔히 사용된다. 항생제의 사용은 오염 세균의 발육을 억제시키는 작용을 하나 장기 배양시에는 내성 균주가 발생될 수 있다. 따라서 항생제의 사용은

별군 실험기구와 무균적인 기술의 사용의 부가적인 보호수단으로 간주되어야 한다.

동물유래 재료의 사용에 대한 품질관리

소태아혈청, 소혈청알부민, 호르몬, 효소 및 공배양 세포가 병원체의 전파에 매우 중요한 요소가 된다. 소태아혈청에서 BVD virus, BHV-1 virus, PI-3가 동정되었다(Rossi 등, 1980; Erickson 등, 1990).

공배양체계에서 흔히 난관세포와 과립막세포가 이용되는데 임상적인 전력을 모르는 동물로부터 채취되므로 Mycoplasma, Ureaplasma, BVDV, BHV-1 virus가 전파될 수 있다. 도축장으로부터 가져온 과립막, 난구 또는 난관 세포로서 난자를 공배양할 경우 바이러스의 존재여부를 조절할 수 있는 경우에만 이용한다. buffalo rat liver cells 또는 vero cells과 같은 안정된 cell line도 병원체가 없음을 검정하여야 한다.

Scrapie, bovine spongiform encephalopathy(BSE)의 전파 예방을 위하여 Scrapie와 BSE가 발생되지 않았고 고기 및 뼈와 같은 동물성 유래 단백질 사료가 급여되지 않는 지역의 어린 동물로부터 얻은 재료를 입수한다(Kimberlin, 1990).

품질관리를 위해서 비생물학적 대용품을 사용하고, 동물 유래재료의 국가를 세밀히 조사하여 구제역 및 BSE와 같은 고위험성 질병의 부재지역에서 획득하고 또한 특정 외래 병원체에 대해 적절히 검사해야 한다.

실험실 및 실험기구의 위생관리

수정란 채란후 수정란의 회수, 평가, 세척, 조작 및 동결을 위해서는 구별된 장소가 필요하며 실험실 표면의 청결과 건조상태가 유지되어야 하며 곤충, 해충은 제거되어야 한다.

실험실은 수정란 채란실 또는 OPU 난자 채취실과 창문을 통해 연결되며 바닥과 벽은 청소가 용이하며 세척제와 소독제에 저항성이 있어야 한다.

실험실 기구는 세척후 탈이온수나 증류수로 세척하며 E.O. gas 소독한 플라스틱 기구들은 공기중에서 7일간 보관후 사용하는 것이 권장된다.

배양실은 오염방지를 위해 여과된 공기의 환기, 양압 공기흐름을 이용하며 표면은 자외선 소독을 실시한다.

수정란의 위생관리를 위한 시료의 채집 및 검사

난포액, 공배양을 위한 primary cells 또는 계대 세포, 성숙 배양액, 세척한 변성 수정란 및 난자와 발육 수정란의 10회 세척중 마지막 3회의 세척액 시료의 정기적인 검사가 요구된다.

4. 결 론

1970년대 초 수정란이식의 상업화가 시작되어 수정란의 지역간의 이동 또는 국제교역이 많이 이루어졌으나, 수정란에 의한 심각한 질병의 전파가 발생되었다는 보고는 거의 없다. 즉 추가적인 연구가 요구되나 IETS가 권장하는 방법에 의해 수정란을 처리시에는 체내수정란에 의한 질병전파의 위험성이 거의 없는 것으로 여겨진다. 그러나 최근에는 체외수정란의 이식 및 이동이 증가되고 있으나 체외수정란과 관련하여 명백한 위생처리 방법이 확립되지 않아 체외수정란과 관련된 병원체의 전파에 대해서는 많은 주의를 기울여야 한다. 즉 도축장으로부터 수집되는 세포, 조직이나 혈청 등의 생물학적 제재를 사용하는 체외수정란의 생산 체계에는 병원체 전파의 위험성이 증가된다. 따라서 배양배지의 사용에서도 공배양세포를 포함한 복합배지보다는 단순 제한배지의 사용이 권장되며, 체외수정시 병원체가 오염되지 않은 정액의 사용 그리고 체내수정란에서와 같이 IETS에서 권장하는 세척 및 효소처리법을 준수하는 것이 필요할 것이다. 또한 실험실 위생관리의 준수와 수정란의 위생관리를 점검하기 위한 난포액, 공배양세포, 변성 수정란, 수정란 세척액 등의 시료의 정기적인 검사가 요구된다.

5. 참고문헌

- Avery B, Greve T, Ronsholt L and Botner A. 1993. Virus screening of a bovine in vitro embryo production system. *Vet. Rec.*, 132:660.
- Bielanski A, Dubuc C and Hare WCD. 1992. Failure to remove bovine diarrhea virus (BVDV) from bull semen by swim up and other separatory sperm techniques associated with in vitro fertilization. *Reprod. Domest. Anim.*, 27:303-306.
- Bielanski A, Lowen KS, Del Campo MR, Sirard MA and Willadsen S. 1993. Isolation of bovine herpesvirus-1(BHV-1) and bovine viral diarrhea virus(BVDV) in association with the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 40:531-538.

- Bielanski A and Stewart B. 1996. Ubiquitous microbes isolated from in vitro fertilization (IVF) system. *Theriogenology*, 45:269 abstr.
- Bolton VN, Warren RE and Braude PR. 1986. Removal of bacterial contaminants from semen for in vitro fertilization or artificial insemination by the use of buoyant centrifugation. *Fert. Steril.*, 46:1128-1131.
- Erickson GA, Bolin SR and Landgraf JG. 1990. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. Symposium on Virological Aspects of the Safety of Biological Products. *Develop. Biol. Standard.*, 75:173-175.
- Guerin B, Nibart M, Le Guinne B and Humblot P. 1997. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*, 47:33-42.
- Kim IH, Son DS, Lee HJ, Yang BC, Lee DW, Suh GH, Lee KW and Jung SC. 1998. Bacteria in semen used for IVF affect embryo viability but can be removed by stripping cumulus cells by vortexing. *Theriogenology*, 50:293-300.
- Kimberlin RH. 1990. An overview of bovine spongiform encephalopathy. Symposium on Virological Aspects of the Safety of Biological Products. *Develop. Biol. Standard.*, 75:75-82.
- Rossi CR, Bridgman CR and Kiesel GK. 1980. Viral contamination of bovine fetal serum. *Am. J. Vet. Res.*, 41:1680-1681.
- Solti L, Crichton EG, Loskutoff NM and Cseh S. 2000. Economical and ecological importance of indigenous livestock and the application of assisted reproduction to their preservation. *Theriogenology*, 53:149-162.
- Stringfellow DA, Lauerman LH, Nasti KB and Galik PK. 1990. Trypsin treatment of bovine embryos after in vitro exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpesvirus-4. *Theriogenology*, 34:427-434.
- Stringfellow DA and Wrathall AE. 1995. Epidemiological implication of the production and transfer of IVF embryos. *Theriogenology*, 43:89-96.
- Stringfellow DA and Seidel SM (eds). 1998. *Manual of the International embryo Transfer Society*, 3rd edition. Savoy, IL: IETS.
- Stringfellow DA and Givens MD. 2000. Infectious agents in bovine embryo production: Hazards and solutions. *Theriogenology*, 53:85-94.
- Stringfellow JS, Hathcock TL, Riddell KP, Stringfellow DA, Galik PK, Riddell MG and Carson RL. 1997. Introduction of *Stenotrophomonas maltophilia* through semen used for in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 47:382 abstr.
- 김일화, 손동수. 1999. 1998년 국내 소 수정란이식 현황. *한국수정란이식학회지*, 14(부록):53.