

經營合理化를 위한

乳牛의 繁殖生理와 그 活用(IV)

목 차

- 8. 수정란 이식
 - 가. 기본개념
 - 나. 역사와 현황
 - 다. 이론과 기술적인 측면
 - 1) 공란우와 과배란 유기
 - 2) 공란우와 수란우의 발정동기화
 - 3) 수정과 난분할
 - 4) 수정란의 회수 및 검사
 - 5) 수정란의 보존 및 이식

農學博士 任京淳

(서울大 農科大學 教授)

8. 수정란 이식(受精卵 移殖)

최근 신문과 방송을 통하여 「시험관 아기의 탄생」, 딸과 아들의 인위적 조절 가능, 「슈퍼마우스, 산양-면양, 황소-토마토와 같은 새로운 동식물의 창조」 등 불과 몇년전에는 상상조차 할 수 없었던 사실들이 보도되고 있다.

이러한 새로운 사실들은 많은 호기심을 불러일으키지만 한편으로는 생명의 존엄성을 유린할 뿐아니라 무서운 생명체의 창조를 우려하는 불안을 낳게 한다. 소위 「생명과학」, 「유전자공학」, 「번식공학」이라는 학문의 결실에 따른 반응이라고 볼 수 있다. 이러한 학문은 현재 발전의 초기 단계에 있으며 앞으로 급속히 연구발전되어 인간의 질병과 동식물의 개량 및 증식에 막대한 공헌을 할 것으로 본다.

수정란 이식이란 이러한 학문의 한 분야로서 속칭 「시험관 아기」, 「시험관 동물」을 만들어 내는 일련의 과정을 함축적으로 표현한 용어이다.

가. 기본 개념

생식세포는 여성(雌性)이 보유한 정자와 자성(雌性)이 보유한 난자(卵子)가 있다. 생식생리 연구자들은 급세기 중반기에 이미 정자에 대한 광범위한 지식을 축적했으며 정자(精子)를 동결하여 산업적으로 이용하게 되었다. 즉 인공수정이라는 이름으로 전 세계적으로 활용되어 가축의 개량과 증식에 막대한 공헌을 해오고 있다. 정자에 대한 연구와 병행하여 난자의 연구도 빠른 속도로 진행되어 70년대에 들어와서는 수정란이식(E. T=Embryo Transfer)이라는 이름으로 산업화가 진행되고 있다. 인공수정은 여성(雌性)의 생식세포인 정자만을 활용한 것이지만 수정란이식은 여성(雌性)과 자성(雌性)의 생식세포인 정자와 난자가 결합된 수정란을 이용한 것이므로 가축의 증식과 개량 및 이용도는 인공수정보다도 그 활용도가 더 크다고 볼 수 있다.

수정란 이식은 「한 개체(供卵畜)의 자궁이나 난관(卵管)에서 회수한 수정된 난자를 공란축과

같은 시기에 발정(또는 배란)한 다른 개체(受卵畜)의 자궁이나 난관에 이식하여 생명체를 잉태시키는 과정과 기술이다.

수정란이식의 과정은 인공수정의 과정과 비슷한 일면이 있지만 다소 복잡하다. 인공수정의 과정은 정액 채취-검사-회색-동결-융해-주입이지만 수정란이식의 과정은 ① 공란축(供卵畜)과 수란축(受卵畜)의 선정, ② 공란축의 과배란(過排卵) 유기, ③ 공란축과 수란축의 발정 동기화(同期化), ④ 공란축의 수정(授精), ⑤ 공란축으로부터 수정란의 회수, ⑥ 수정란의 검사-(동결-융해), ⑦ 수란축에 수정란의 이식, ⑧ 임신진단 및 자축(子畜)의 확인으로 나누어진다.

나. 역사와 현황

수정란이식은 최초로 토끼의 수정란을 이식하여(Heape · 1890) 성공한데서 시작되었으며 쥐에서(Nicholas · 1933), 양과 산양에서(Warick 와 Berry · 1949), 돼지에서(Kvansnickii · 1951), 소에서(Willett 등 · 1951), 사람에서(Steptoe와 Edwards · 1978) 각각 최초로 수정란이식을 성공하였다. 또한 수정란을 동결하여 오랫동안 보존한 후 융해(融解)하여 이식한 결과 생명체가 태어난 것은 흰쥐에서와(Whittingham 등 · 1972) 소에서(Willmut와 Rowson · 1973) 각각 최초로 성공하였다.

수정란이식이 산업적으로 실용화하게 된 것은 1971년도 부터 시작되었지만 본격적으로는 70년대 후반부터 미국, 캐나다, 오스트레일리아, 뉴질랜드 및 서구 유럽에서 활발하게 진행되고 있다. 이들 수정란이식 회사는 유전적으로 우수한 젖소(305일 보정유량; 약 11,000kg)의 수정란을 채란하여 낙농가에 보급하거나 쌍태임신(雙胎 妊娠) 또는 불임우를 활용하는 일을 하고 있다.

우리나라에서는 충남대 田暢淇(1971), 축산시험장 金重柱 등(1971)이 토끼에서, 徐國聖 등(1975)이 乳山羊과 在來山羊에서, 두산목장 崔炳完과 건국대 鄭吉生 등(1982), 성진목장과 수의사 具

滋弘 등(1983), 국립종축장 石瑚蜂, 서울대 任京淳, 美國 홀스타인 협회 말피 엘스덴 등(1983), 축산시험장 김희석 등(1983)이 소에서 각각 수정란이식을 실시하여 자축을 얻는데 성공 하였다. 이와같이 우리나라에서 수정란이식이 실시된 것은 불과 10년전이며 대가축에서는 80년경에 비로소 시작되어 현재 실험 단계에 있다고 볼 수 있다.

다. 이론과 기술적인 측면

수정란이식은 사람을 비롯하여 중소가축 및 대가축에서 이론적인 측면은 거의 유사하지만 기술적인 측면은 동물의 크기와 자궁의 구조의 차이에 따라서 그 방법을 달리할 수 있다. 본고에서는 소의 수정란이식에 관하여 기술코져 한다.

자연조건 하에서 암소는 한 발정기에 보통 한 개의 난자를 배란하여 한마리의 자축을 생산한다. 경제수명 10년동안 번식능력이 우수한 암소라도 10두의 송아지 밖에는 생산할 수 없다. 그런데 암소의 난소에는 난자가 될 수 있는 원시란포(原始卵胞)라는 것이 무려 50,000~75,000 개가 존재하므로 성선자극(性腺刺戟) 호르몬을 주사하여 다수의 원시난포를 발육, 배란, 수정시켜 그 수정란을 채란한 후 여러 마리의 다른 암소의 자궁에 이식하게 되면 한 마리의 암소가 경제수명 10년동안 다른 암소의 자궁을 빌려서 수십에서 수백두의 자축을 생산할 수 있다. 그렇다면 과연 어떻게 한번에 많은 수정란을 얻을 수 있으며 그것을 이용할 수 있는가에 대하여 알아보자.

1) 공란우(供卵牛)의 과배란(過排卵) 유기

종축장이나 개인목장에서 우유생산량이 아주 우수한 암소가 있다면 우리는 그 암소의 자축을 보다 많이 번식시켜 전체적으로 우유 생산량을 높이고 싶은 욕망을 가지게 된다. 이런 경우에 수정란이식을 이용하지 않고서는 자연조건하에서 일년에 한마리의 어미가축이 한마리의 새끼

밖에는 생산할 수 없다. 그러나 수정란 이식을 이용한다면 문제는 달라진다. 그 우수한 암소를 공란우(난자를 공급하는 암소)로 선정하여 생식기 질병 여부를 조사한 후 건강하다고 판정되면 발정주기를 2회 정도 관찰한다. 발정주기가 20~22일로 규칙적으로 진행된다면 2회의 발정이 있은후 9~14일 사이에 성선자극(性腺刺戟) 호르몬인 PMSG 또는 FSH를 그림 1 혹은 그림 2의 방법으로 근육주사 한다. PMSG의 경우는 두당 2,000~3,000IU를 투여한다. FSH는 1일 오전 오후로 나누어 (PMSG는 한번에) 5일간 표 1과 같이 근육주사 해준다. 그러면 이 호르몬의 작용에 의해 난소에는 다수의 원시 난포가 발육하여 그라아프 난포(성숙된 난자를 가지고 있는 난포)로 성숙하기 시작한다. 이때 즉 성선자극 호르몬 주사후 40~48시간째 (FSH는 48~72시간째)에 PGF_{2α} 25~30mg을 근육주사 해주면 기존하던 난소의 황체(黃體)가 퇴행(退行)되면서 다수의 난포가 완전히 성숙하여 배란하게 된다. 이와같이 성선자극호르몬을 주사하여 한번에 5~30개의 난자를 배란시키는 처리를 과배란(過排卵) 유기라 한다. 과잉배란법에 따른 난소반응은 표 2와 같이 처리에 따라 많은 차이가 있다.

표 1. FSH와 PGF_{2α} 투여에 의한 다배란 유기

처리일	1	2	3	4	5
시간					
오 전	5	5	5	4 + 30*	2
오 후	5	5	5	2 + 15*	

단위 : mg, 수치 : FSH, (Baken 1983)

* : PGF_{2α}

표 2. 3가지 다른 과배란 처리에 따른 난소반응

	처 리 내 용		
	PMSG 2000IU	PMEG 2000IU	FSH/LH 30/6mg
미경산우의 수	20	15	15
평균 배란수	17±3	17±2	14±2
범 위	0.53	6.27	1.25
배 란 율	분 포 (%)		
0 - 4			
5 - 20	30%	66%	73%
21	40%	33%	13%

(Sreenan, 1983)

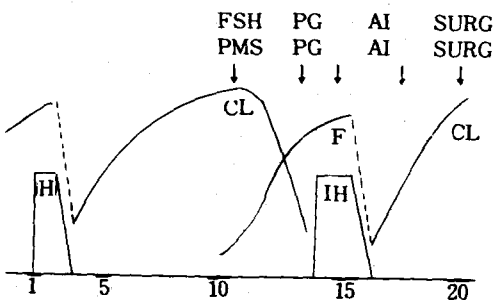
2) 공란우와 수란우(受卵牛)의 발정동기화

공란우와 수란우가 발정이 동시에 오도록 하는 것은 수정란이 생존할 수 있는 자궁의 환경 조건을 일치시키는 것을 의미한다. 이 처리는 수정란이식의 성공율에 직접적인 영향을 미치는 중요한 부분이다. 가장 이상적인 발정 동기화는 자연적으로 공란우와 수란우가 같은 날에 발정이 일어나는 것이지만 이렇게 되기 위해서는 대규모의 축군을 사육하며 번식에 공용하지 않아야 하므로 엄청난 경제적 손실을 초래한다. 따라서 인위적인 방법에 의해서 발정을 동기화(同期化)시켜야 한다.

즉 수란우에게 공란우보다 16시간 앞서 25mg의 PGF_{2α}를 근육주사하여야 한다. 이와같은 처리에 의하여 공란우와 같은 날이나 또는 하루 전 후에 발정이 일어난 암소를 수란우로 선택한다. 발정이 이틀이상 차이가 나면 수정란을 이식해도 성공율이 매우 낮다. (표 3)

3) 수정(授精)과 난분할(卵分割)

PGF_{2α} 주사후 보통 48±12시간에 공란우는



F : 난포발육
CL : 황체형성
H : 처리전 발정
O : 배란
IH : 유기한 발정
: 다배란

그림 1. PMSG와 PGF_{2α} 투여에 의한 다배란법

표 3. 공란우와 수란우의 발정동기화가 이식란의 수태율에 미치는 영향

	이식란의 수태율		
	발정동기화의 정도		
	0 일	± 1 일	± 2 일
수란우의 수 (No.)	200	191	26
임신우의 수 (No.)	157	103	10
수 태 율 (%)	79%	54%	38%

(Sreenan 1983. 세계축산학회 보고서)

발정을 개시한다. 수정은 발정 개시후 12시간 간격으로 3회 실시한다. 과배란시 수정을 3회 실시하는 것은 다수의 난자가 배란하는 시간이 각각 다르기 때문이다. 수정된 난자는 분할(分割)하면서 발육하게 된다. 난자는 발정후 3~4일까지는 난관을 하강하면서 8세포 까지 발육하며 발정후 4~5일이 되면 난자는 자궁에 도달하여 16세포(4~5일)-상실배(桑實胚: 5~7일)-배반포(胚盤胞: 7~8일)로 발육하여 10일경이 되면 투명대를 깨고 나오기 시작한다. 12일경에는 완전히 투명대를 벗어나며 14일경에는 길쭉하게 되어 18일경에는 약 20cm 정도로 발육한다. 18일 이후에야 비로소 자궁과 접촉하게 되어 착상이 이루어 진다. (본향에서 그림부분을 삭제하였습니다. 집필선생님의 해량 있으시기 바랍니다)

4) 수정란의 회수 및 검사

수정란(受精卵)의 회수는 공란우가 발정후 7~8일째, 난분할(卵分割) 상태가 상실배(桑實胚) 말기 또는 배반포(胚盤胞)에 도달했을때 실시한다. 왜냐하면 이 시기의 수정란을 이식할 경우 다른 시기의 수정란보다 수태율이 높고 외부적인 충격에 안전하기 때문이다.

수정란의 회수는 수술에 의한 외과적인 방법과 자궁세척에 의한 비외과적인 방법이 있다. 1970년 이전까지는 외과적 방법에 의하여 수정란을 회수하였으나 그 이후에는 시술방법이 간단하고 경제적이며 수술로 인한 부작용을 방지할 수 있는 비외과적방법(자궁경관 경유 자궁세

척법)이 개발되어 최근에는 이 방법을 거의 이용하고 있다. 이 방법은 다음과 같다.

가) 기구 및 재료: 채란시 필요한 기구로는 자궁경관 확장봉, 채란기, 철침등 채란기(採卵器)를 이용하여 수정란을 채란하며 이때 사용되는 자궁세척액은 PBS 또는 TCM199라는 배양액이다.

회수된 세척액 속의 수정란을 찾을때에 사용되는 기구로는 난자검사용 접시, 난자조작용 유리관, 세척액회수용기 등의 기구와 실체현미경을 사용한다.

나) 채란 과정: 동물을 안정시키고 고통을 줄이기 위해서 시술전에 후구마취(제 1, 2尾椎 사이에 2% lidocaine을 5~8ml 주사)시킨다. 그 다음 자궁경관 확장봉으로 자궁경관을 확장하고 채란기를 질-자궁경관-자궁체-자궁각으로 삽입한다. 이때 반대편 손을 직장에 넣어 채란기의 삽입이 용이하도록 생식기를 조절하여야 한다. 채란기의 앞부분이 자궁각 중상단부에 도달하면 보조원은 채란기의 공기 주입부로 18~20cc의 공기 또는 배양액을 주입한다. 채란기 앞부분에 장치된 풍선이 팽창하면 채란기는 그림 2와 같이 자궁각에 고정된다.

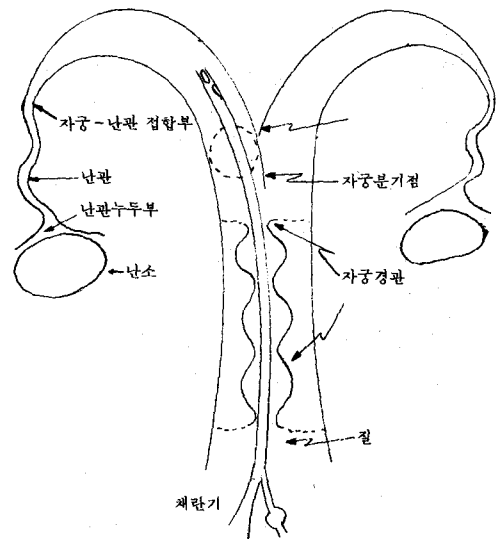


그림 2. 자궁내에서 채란기의 위치

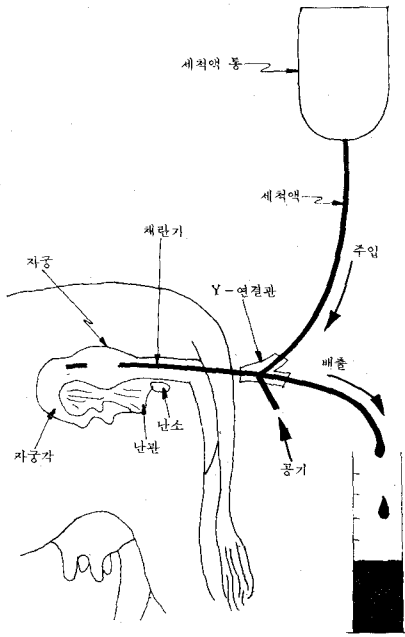


그림 3. 비외과적으로 수정란을 채란하는 모식도

그 다음 채란기 뒷부분에 Y관을 연결하여 그림 3과 같이 호스를 통하여 세척액을 주입하고 회수할 수 있도록 한다.

자궁각내에 30~50ml의 세척액을 주입한후 직장을 통한 자궁마사지로 세척액을 체외로 회수한다. 이와같이 6~10회 정도 한쪽 자궁각을 세척한 후 새 채란기로 반대편 자궁각에 삽입하여 같은 방법으로 자궁세척을 실시한다.

다) 난자의 검출 : 양쪽 자궁각을 세척한 회수액은 그림 3의 오른쪽 우측 하단부에 있는 것과 같은 용기에 받아서 두경을 닫고 안전한 곳에서 30분 정도 靜置시킨다. 20~30분이면 난자는 용기의 바닥으로 침전된다. 그 다음 세척액 회수용기와 같은 장치로 10% 정도의 침전액만 남기고 상등액을 제거한다. 잔여 침전액을 4~5회 정도 혼든 다음 난자검사용 접시에 부어서 실험현미경하에서 난자를 찾는다. 찾은 난자는 난자조작용 유리판과 같은 피펫으로 흡입하여 난자검사용 시계접시에 옮긴후 현미경 배율 100~300배로 난자의 발육상태를 검사한다. 이때 기형란이나 퇴화된 난자는 그 생존성 여부가 불확실하므로 이식에 사용할 경우에는 배양기에서 발육시켜 재발육하는 난자만을 선택하여 이식한다. 일반적으로 이러한 난자는 이식에 이용하지 않으나 최근에는 활용하는 연구를 하고 있다.

5) 수정란의 보존 및 이식

현미경 검사 결과 정상적인 발육 과정에 있는 상실배(桑實胚) 또는 배반포단계의 수정란을 선별하여 오염되지 않은 신선한 배양액으로 옮긴다. 자궁으로 부터 수정란을 회수하는 과정에서 또는 수정란을 검사하는 과정에서 세척회수액이 이미 오염되어 있을 가능성이 있으므로 수정란을 새로운 배양액으로 옮길때는 수정란과 함께 세척회수액을 최소한 적은 양(0.2ml이하) 으로 새로운 배양액에 옮겨야 한다. 이 작업 과정에서 수정란이 손상되거나 분실되는 경우도 있으므로 매우 조심스럽게 수정란을 다루어야한다. 수정란을 이식하기 까지 2시간 이상 소요될때

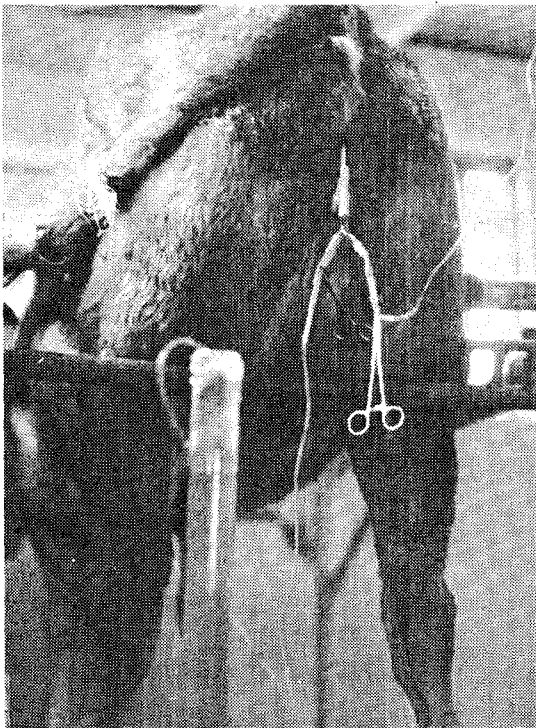


그림 3 - 2. 비외과적으로 수정란을 채란하는 사진

는 2 시간마다 수정란을 위와 같은 방법으로 신선한 배양액에 옮겨야 한다. 또한 수정란을 보관할 때는 반드시 뚜껑이 있는 용기를 이용해야 한다. 왜냐하면 배양액의 수분이 증발하여 배양액의 pH나 삼투압이 변하여 수정란의 생존에 불리한 환경조건이 될 수도 있을 뿐만 아니라 대기중의 미생물이 배양액속에 들어가 다시 오염 될 수도 있기 때문이다.

가) 보존 및 이식용 배양액: 수정란을 짧은 시간동안 보존할때 수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인은 배양액의 성분, 온도, 수소이온농도(pH), 삼투압, 오염 및 독성등이다. 온도는 실온(15~25℃)이나 37℃ 어느쪽이나 수태율에는 큰 차이가 없지만 pH는 7.2~7.6, 삼투압은 270~310mOsm/kg이 되도록 조절되어야 한다. 배양액에는 여러종류의 염, 아미노산, 비타민이 함유되어 있을뿐 아니라 오염을 방지하기 위해서 1 ml당 100IU 페니실린G와 50μg 황산스트렙토마이신이 첨가되어야 한다. 또한 수정란이 용기에 부착되는 것을 방지하기 위해서 열처리된 소혈청을 10% (세척액에는 1%) 첨가해야 한다. 배양액을 제조하는 과정에서 용기 또는 대기중의 미생물이 혼합될수 있으므로 배양액은 0.45μm의 미세여과지로 여과시켜야 한다. 일반적으로 많이 이용되고 있는 배양액은 조직배양액199(TCM 199) 또는 PBS이지만 최근에는 중탄산 완충액의 이용이 늘어나고 있다.

나) 이식방법: 수정란이식은 채란의 역과정으로 수술에 의한 외과적방법과 인공수정과 유사한 비외과적방법이 있다. 외과적방법은 황체가 존재하는 난소축의 옆구리를 약 5cm정도 절개한 후 소독된 한 손을 집어 넣어 자궁각을 눈으로 관찰할 수 있는 부위까지 꺼집어낸다. 투관침으로 자궁각의 상단부에 미세한 구멍을 뚫은후 그 구멍을 통하여 소량의 배양액(0.1~0.2 ml)과 함께 수정란을 주입해 준다. 숙련된 기술자는 수술과 난자이식을 15분만에 해낼수 있다. 비외과적방법은 0.5ml스트로(인공수정용)나 0.25ml스트로(수정란 이식용)에 그림 4와 같이 배양액과 난자를 흡입한 후 그것을 인공수정용 스트로 주입기(0.5ml용)나 수정란이식기(0.25ml)에 장치하여 인공수정과 같은 요령으로 황체가 존재하는 난소가 있는 쪽의 자궁각 상단부에 소량의 배양액과 수정란을 적하시킨다. 이식기주입시 외부생식기가 오염되지 않도록 하고 자궁내막에 손상을 입히지 않도록 하여야 한다. 자궁각 상단부에 이식기 끝부분을 주입할 때 그림 5와 같이 자궁각 상단부를 들어 올리면서 이식기가 나아가는 방향으로 똑바로 펼쳐야만 자궁각 상단부 깊숙한 곳에 수정란을 적하시킬수 있다. 이 과정은 숙련된 기술자에 의하면 1분만에 완료할 수 있다. 비외과적방법의 문제점으로는 황체에 자궁경관이 닫혀 버려(특히 미경산우)

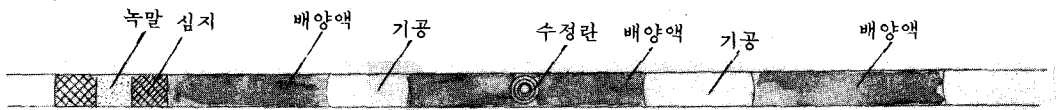


그림 4. 수정란과 배양액이 들어 있는 0.25 ml 스트로

이식을 할 수 없는 경우와 자궁각상단부 깊숙한 곳에 수정란을 적하시키기가 어렵다는 점을 지적할 수 있다.

다) 수태율에 영향을 미치는 요인: 수정란을 이식한후 수란우(受卵牛)의 자궁내에서 수정란

의 생존율(또는 수태율)에 영향을 미치는 요인은,

- ① 공란우와 수란우의 발정동기화
- ② 수정란의 발육 단계와 형태
- ③ 이식과정에서 기구의 오염과 자궁내막의 손상 여부 (다음호에)