韓國臨床獸醫學會誌 第1卷 第1號
J. Korean Soc. Vet. Clin. Med.
Vol. 1, No. 1, December, 1984.

1976年까지의 소 授精卵移植의 基礎的動向

鄭 昌 國

서울大學校 獸醫科大學

궁극적으로는 ovarian follicular oocystes를 試驗管內(*in vitro*)에서 授精시킬 수 있게 되겠지만 現在로서는 過排卵과 인공수정은 授精卵을 공급할 수 있는 唯一한 방법이다. 사실상 이 방법은 장차 어느 時期가 올 때까지는 事實로 남아있을 것이다. PMSG는 過排卵의 유발을 위해 가장 널리 사용되고 있으며 가장 신빙성 있는 약품이라 할 수 있다. 이에 추가하여 $PGF_{2\alpha}$는 superovulated donor에 發情을 유기시키는 신빙성있는 약품이다. donor로부터 授精卵을 發見하는 일은 生殖管內에 존재하는 卵의 位置에 달려있고 卵들을 발견하기 위한 방법인 surgical 및 non-surgical 方法은 共히 卵을 液體內에 浮游케 함으로써 glass cup에 수집하여 차후 현미경으로 檢査하여 正常卵을 선별하는데 있다.

in vivo 및 *in vitro*의 환경조건의 多樣性은 授精卵移植의 成功 여부에 영향을 미친다. 이들 條件이란 ① 發見된 ovum의 健康狀態, ② 保存液 또는 保存培地(storage medium)의 상태, ③ 卵保存의 期間과 方法, ④ ovum의 年齡 및 ⑤ donor와 recipient의 發情同期化 등을 말한다.

授精卵의 供給

實驗動物들에서는 排卵된 卵을 試驗管 內(*in vitro*)에서 授精시키는 방법은 오래 前부터 可能했다. 1959年 Chang,[19] 1962年 Bedford 및 Chang[9]은 토끼에서, 1968年 Whittinghan[70]은 mouse에서, 그러나 소의 follicular oocytes를 *in vitro*에서 수정시키는 일은 현재(1976年)까지는 성취되지 못하였다. 물론 장차는 *in vitro*에서 fertilised ova를 求得할 수 있게 되겠지만 現在로서는 소에 過排卵을 통해서만 授精卵을 얻을 수 있다.

PMSG는 소에서 superovulation을 유발시키는 藥劑로서 가장 널리 사용해 왔지만, 몇種의 다른 동물에서 생산되는 pituitary 製劑도 또한 사용되어 왔다.

가장 일반적으로 사용된 過排卵 유기방법은 PMSG를 前發情日후 16日 또는 17日째에 皮下 또는 筋肉注射하는 方法이다.[27] 어떤 硏究에 의하면 PMSG 注射후 來到하는 發情 제1日 또는 發情豫期日에 pituitary HCG를 靜脈內注射하는 방법도[15,32,56] 이용했다.

그러나 LH源으로서 작용하는 gonadotrophin 제재를 PMSG 주사로 induction한 卵胞로부터 排卵을 유발시키기 위해 사용할 必要는 없다.[22,30,40]

소의 性周期中 16日 또는 17日째에 PMSG를 投與해야 하는 日字上의 制限은 移植計劃을 수립하는데 있어서 생기는 어려움이 있고 또한 이 方法에 의하면 donor의 發情發起時間에 상당한 差異가 생기는 점 등의 실제적 이유들 때문에 商業的 授精卵移植事業에 制限을 받게 된다. 그러나 黃體의 存在는 內因性 LH의 放出과 排卵을 制限할 것이고[48] luteal phase에 PMSG로 處理(투여)하면 cystic follicles의 發生을 유도하게 된다.[30] 發情周期中 PMSG의 투여시기에 융통성을 얻고 또한 過排卵動物에 있어서 發情同期化의 目的을 달성하기 위해서 黃體를 摘出하는 방법을 사용했다.[7,31] 1965年 Hafeg 및 기타[30]는 發情周期의 16日째보다 앞서 處理하던가 또는

黃體를 加壓摘出하는 일은 별다른 利益이 없다는 사실을 발견했다.

黃體摘出은 때로는 심한 出血을 일으키는 한편 ovaro-bursal 癒着을 일으킬수 있다는 不利點이 있음을 알았다.[21]

특히 摘出된 黃體가 bursal cavity 內에 들어박힐 때는 ovaro-bural 癒着은 더 잘 일어난다.[47]

發情同期化藥品 특히 $PGF_{2\alpha}$ 및 그 類似體의 출현은 商業的 移植計劃에 便利할 수 있도록 過排卵의 유발방법을 크게 改善시켜 놓았다. 發情同期化 製劑의 사용은 發情周期中의 follicular phase에 PMSG를 單獨注射하는 것보다 作用이 크고 더 한층 일괄성있는 過排卵을 일으키게 하였다.[8,25,39]

prostaglandin은 PMSG로 一定期間 자극을 준 후 發情을 同期化하기 위해 注射한다.[66] 그런데 PMSG를 發情期間의 제 4 日부터 제 8 日 사이에 주사하였을 때는 排卵數는 일반적으로 少數에 그치지만 한편, 제 8 日과 9日 사이에 주사하면 排卵數가 有意하게 증가한다는 報告가 있고 또 한편으로는 PMSG를 發情후 제9,10 또는 11日째에 주사하면 最大의 效果를 얻을 수 있다고 한다.[44]

Hafez 및 기타[30]는 PMSG 注射日과 受情日 사이를 最少限 3日 간격을 두는 것이 動物이 정상적인 發情症狀을 나타내고 또한 만족스러운 排卵反應을 나타내는데 바람직하다고 하였다. 대부분의 硏究者들은 PMSG 注射日과 發情日의 간격을 4~5日로 잡는 것을 가장 적절한 것으로 생각하고 있다.[15,30,56]

Cambridge의 연구 team은 PMSG 注射와 發情日의 간격을 4日로 잡는 것이 3日 또는 5日 간격을 잡는 것보다 월등히 좋은 反應을 보였다고 한다.[44] PMSG 注射日과 發情日間의 4日 간격은 PMSG를 注射한 후 2日째에 $PGF_{2\alpha}$를 투여함으로써 이루어질 수 있다. 이런 식으로 發情期의 9日째 또는 그 이후에 PMSG를 주사하고, PMSG 주사후 2日째에 $PGF_{2\alpha}$를 주사하며, 2日후 發情이 왔을 때 人工수정 함으로써 合理的이고 一貫性있는 過排卵을 얻을 수 있다.

授精卵의 回收

授精卵은 過排卵 처리후 人工수정한후 도살한 donor에서 발견할 수 있거나 또는 生 donor를 開腹手術하거나 또는 非手術的方法을 사용해서 발견할 수 있다.

donor를 도산한 후 排授卵을 발견하는데 소요되는 時間이 짧으면(時間간격이) recipient에 移植한 卵의 受胎率은 높다.[65] 그러나 어떤 硏究者는 이런 狀態下에서의 卵은 生育力(viability)이 저하된다고 한다.[55]

도살한 donor의 生殖器를 無菌的으로 제거해서 生理的食鹽水로 flushing하여 卵들이 發見된다. 이런 方法은 장차 大規模的으로 授精卵을 생산할 단계에서 사용될 것이다. 그러나 個體의 遺傳質(genetic material)을 最大限으로 이용되어야 할 곳에서는 反復採卵이 가능한 surgical 또는 non-surgical 卵採取 방법이 이용되는 것이 바람직하다.

全身麻醉나 局所麻醉下에서 開腹術을 실시하여 採卵하는 方法은, 過排卵 수정卵을 효과적으로 採卵하는데 상당한 操心이 따라야 하며 手術후에 있을수 있는 內臟의 癒着을 最少限으로 방지해야 할 手術上의 技術이 필요하기 때문에 매우 成功的인 方法은 아니었다고 할 수 있다.

牛에서는 發情後 4日까지는 卵은 子宮內로 移行하지 않는다.[33] 따라서, 發情後 4日까지는 子宮角의 先端에서 生理的食鹽水를 輸卵管內로 注入함으로써 採卵容器內에 회수할 수 있다. 그러나 그 이후의 stage에 있어서는 子宮을 flush하여 세척液을 輸卵管을 통하거나 子宮 cannula를 거쳐 수집해야 한다.[36,55] 또 子宮과 卵管에 각각 cannula를 삽입한 후 교대로 採卵하거나 兩者 擇一할 수 있다.[45] 授精卵이 아직도 輸卵管內에 존재하는 동안 flush하면 卵의 회수율은 有意性있게 높아진다.[44] 子宮에서의 卵回收率이 수란관에서보다 낮은 이유는 子宮腔은 그 부피가 크기 때문에 回收效果가 적고 또한 卵이 子宮으로부터 구축(expel)되는 경향이 있는 듯 하다. 卵의 상실은 개략적으로 말해서 過排卵 donor에 있어서의 非正常的 호르몬 환경에 기인한다고도 할 수 있는데 發情後 6日째에 있는 過排卵 donor의 末稍血漿中의 estrogen 濃度는 發情期에 있는 正常牛의 estrogen 농도의 10倍나 더 많은 量이라고 한다.[14]

卵의 發見은 還流液을 특수 硝子製 수집 cup

에 충분히 還流시키는데 달려있다고 할수 있다. 특수 유리 cup의 底面은 圓形이고, 卵들의 比重은 높으므로 卵들은 底面이 圓形인 유리 cup 바닥에 자리잡게 되어서 檢定하는데 도움될 수 있다.

卵回收장치를 non-surgical 方法으로 子宮頸管을 통해 子宮內에 삽입하였을 때는 끈적이는 頸管粘液과 子宮內膜을 손상시키므로 脫落되는 內膜組織片들은 catheter의 內腔을 폐쇄시켜 還流液의 流出을 방해할 수도 있으며, non-surgical 方法으로 子宮을 flush할때 脫落된 多量의 組織片들은 卵檢出을 힘들게 만들며 때로는 組織片에 달라붙은 卵은 分離하기 어렵다.

소의 黃體期間(leuteal phase)中 큰 cannula를 頸管을 거쳐 子宮內에 삽입하는 能力은 교묘한 기술성에 달려있다. 물론 이런 문제들은 기본적으로 技術的인 것이고 앞으로 non-surgical 方法으로 卵을 효율적으로 발견할 수 있는 적절한 器材가 實際化되어야 할 것이다. non-surgical 方法에 관한 硏究의 결과로 1949年에는 二種의 장치를 고안해 내었다.

Dracy 및 Peterson[23]은 나긋나긋한(flexible) cannula에 통과시켜서 子宮角의 선단까지 도입시킬 수 있게 고안한 金屬 cannula를 소개했다. 이 장치는 子宮洗滌液을 flexible cannula를 통해 子宮角의 선단까지 注入하고 세척液과 浮游된 卵은 金屬 cannula를 통해 排出시키는 장치이다. 이 장치의 원리는 현재 市販되고 있는 sugie apparatus[63]와 동일하다.

1949年에 만들어진 Ruwson-Dowling 장치는 붉은 色 3-way 고무 catheter의 內腔에 金屬 stillette를 삽입시켜 頸管을 통과한 다음에는 金屬棒을 빼내고 cuff(고무풍선)에 空氣를 주입 팽창시켜 子宮內腔을 밀폐시킨다. 세척液은 catheter 선단에 뚤린 孔을 통해 배출시킨다.

授精卵의 移植

Stereo dissecting microscope 下에서 glass collecting cup 內의 卵을 檢出하여 신선한 medium으로 卵을 옮긴다. 卵을 1ml 注射器에 연결된 Pasteur pipett에 少量의 medium과 함께 吸引하여 外科的으로 移植한다. Pasteur pipette를 Recipient의 子宮壁에 직접 刺通시키거나 또는 先端이 鈍한 注射針으로 子宮壁을 통과하여 內腔에 이르게한 다음 注射針을 빼내고 注射針의 貫通路를 따라 Pasteur pipette를 子宮內腔까지 통과시킨 다음 少量의 液에 浮游해 있는 卵을 注入한다. 移植部位는 子宮角의 上 1/3部位로 한다. 卵은 子宮角 先端 또는 頸管을 向해서 注入한다.[55,59]

非外科移植은 子宮頸通過(transcervical)로 실시하는데 AI pipette[42,50] 또는 Cassou insemination straw[44,57]를 사용한다.

Sugie[62]에 의하면 膣의 先端을 刺通시키고 子宮을 carbon dioxide로 팽창시킨 다음 non-sugical 法으로 卵을 이식하여 좋은 성공율을 거두었다고 한다.

授精卵의 surgical transfer는 성과가 좋아 91%의 姙娠[55,58]을 보고하였는데 最近까지[42,57] non-surgical 移植法은 姙娠率이 낮은 것으로 보고되고 있다.[43,54,62]

授精卵移植에 영향을 미치는 要因들

만족할만한 姙娠率을 얻기 위해서는 donor와 recipient 사이에 發情同期化의 정도가 매우 接近된 상태에 있어야 한다.[53,58] Rowson 및 기타[53]는 donor와 recipient 사이의 정확한 發情同期에 의해 91%의 姙娠率을 기록하였다. 그러나 recipient의 發情日이 donor의 發情日보다 +1日이 빠르거나 −1日 늦었을 때는 姙娠率은 각각 56%와 52%로 下落한다. 正確한 發情同期化와 非同期化 사이의 임신율에는 有意性있는 差가 생긴다.[46] 發情同期化의 差가 생긴 recipient의 子宮內에서 신속히 變化하는 要因들이 무엇인지는 명백하지 않으나 姙娠率이 낮아지는 요인들은 아마도 黃體에서 分泌되는 progesterone 濃度와 관련이 있는듯 하다.

Tronson 및 Moore[68]에 의하면 實驗的으로 處理한 羊에서 卵巢靜脈의 progesterone level이 정확한 학도內로 下落할 때에 한해서만 암羊의 ova는 生存하여 正常發達을 할 수 있다는 것이다.

肉用種 heifers를 underfeeding하면 黃體重量이 減少하고, 5日以內에 progesterone의 血漿濃度가 減少하며, 正常授精卵을 가지는 比率이 감소한다.[35]

이렇게 progesterone과 連關된 子宮變化狀은

卵移植에 있어 發情同期化를 요구하는 이유를 충분히 이해할 수 있으며 또한 營養不良이 姙娠率을 감소시키는 이유도 알 수 있다.[38] 따라서 recipient의 적절한 영양상태는 매우 중요시된다.

成牛의 授精은 年齡의 進行에 따라 감소된다.[16] 따라서 Recipient는 젊은 소를 사용하는 것이 바람직하다. Adams[1]는 토끼에서 年齡進行이 embryo 生存에 미치는 有害作用에 관한 연구에서 만일 老齡 토끼의 卵을 젊은 recipient의 子宮에 이식하였을 때는 그 生存率은 젊은 donor로부터 卵을 이식받은 control과 거의 동일하다고 한다.

子宮內에 移植될 수정卵의 發情후 경과된 時日間隔이 또한 임신에 중요한 영향을 미친다. 즉, 發情同期化한 子宮에 day 3 egg를 移植하였을 때는 4,5,6 또는 7日卵을 移植하였을 때보다 姙娠率은 극히 저하한다.[46] 이러한 결과는 임신은 단순히 子宮效果에만 있는 것이 아니고 age-of-egg factor도 관계된다고 할 수 있는데 이는 day 4 egg를 day 3 子宮에 移植한 것이 同時化 1日差 day 3 egg를同期化子宮에(day 3 uterus) 移植하였을 때보다 $p<0.01$ 수준에서 임신율이 높았다(47%對 11.8%). 그런데 發情후 早期에 子宮에 移植된 卵은 구축(expulsion)되는 일이 있으므로 早期卵의 임신率을 저하시키는 또 하나의 factor로 작용한다. 發情後 早期에 이식한 授精卵의 expulsion과, 黃體期에 있는 子宮의 細菌感染에 대한 감수성은, non-surgical 移植의 성공율이 낮은 이유로 설명된다.[12,34,51]

卵의 expulsion의 시범 model로서 radioactive microsphere가 사용되었는데[34,49] 子宮으로부터 microsphere의 구축(expulsion)은 빨라서 삽입후 1.5時間에 구축되었는데 이 실험은 surgical transfer 후 수정율이 낮은 것으로 알려진 時期인 day 3에서 day 3.5에 이 실험이 실시되었는데 그 結果를 보면 non-surgical transfer에서 생기는 問題 외의 관련성은 적은 것으로 나타났다.

Marper 및 기타[34]는 microspheres를 手術的으로 子宮에 移植하였을 때 4.75時間 후에는 膣內로 구출된 것을 發見하였다. 이들은 또한 發情後 9日째 되는 암소에 microsphere를 手術的으로 移植하였는데 그 결과는 發情후 早期移植한 것보다 黃體期의 peak에 있을 때 移植한 것의 구출이 時間的으로 더 서서히 일어났다고 한다.

Tervit[64]에 의하면 microsphere의 구출은 黃體期의 早期에서만 일어났고 後期에 있어서는 잘 停滯되어 있었다고 한다.

以上에서 얻은 결과는 Lowson 및 기타[42]가 행한 non-surgical transfer 실험에서도 증명되었는데, 이들은 早期移植(day 3~5)에서는 30 heifer 中 2두가 임신되었고 後期(day 6~9)에 移植한 것은 50 heifer 중 16두가 임신했다.

더우기 이 實驗에서는 모든 卵移植은 右側子宮角에 실시하였는데 Benesch 및 Wright[11]에 의하면 黃體는 그 60% 정도만이 右側卵巢에 형성된다고 하므로, 만일 黃體가 局所的 방법으로 姙娠에 영향을 미친다고 받아진다면 그들의 실험 결과는 反對로 불리하게 영향을 받았을지도 모른다. Sreenan 및 기타[59]는 黃體가 존재하는 側의 子宮角에서 姙娠率이 더 높았다고 하였는데 이들의 實驗에서는 黃體의 作用은 절대적인 것으로 증명되었다. 그 이유로는 黃體가 존재하는 側의 子宮角에 移植한 13두의 소들 중 6두가 임신되었는데 反해서 黃體가 없는 側의 子宮角에서는 13두 전부가 姙娠되지 않았다. 이러한 사실이 성립된다면(黃體가 존재하는 側의 子宮角의 임신率이 높다는) Lawson 및 기타[59]가 실시한 實驗에서 卵移植을 右側子宮角에만 국한하지 않고 黃體가 存在하는 側의 子宮角을 선택하여 실시하였다면 그 姙娠率은 더 높아졌을지도 모른다. non-surgical 移植은 發情후 早期를 피한다면 근본적으로 改善될 것이다.

Dziuk 및 기타[24]는 人工授精한 동물의 子宮內에 頸管을 거쳐 1ml의 serum을 注入하였을 때는 14두 중 2두만이 姙娠되었고(14%), 1ml serum에 1,000IU의 penicilline을 혼합하여 注入했을 때는 8두 중 5두가 임신하였다(63%). Hafez[28,29]가 행한 哺乳類 embryo의 保存培地(storage media) 內의 最高許容 抗生劑 濃度는 소에서도 적용될 수 있을 것이다. 이런 식으로 抗生劑를 注入하면 non-surgical transfer 후의 임신率을 높일 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 Sreenan[57]은 膣을 통한 卵移植術에서 卵구출과 感染은 큰 문제가 되지 않는다는 것이다. Sreenan[57]은 1두에 2個씩의 卵을 이식한 8두의 recipient에서 4두가 임신되었지만(50%) 임신한 소에서는 1個

의 卵만이 生存하였다고 한다(25%).

non-surgical transfer의 目標들 중의 하나는 commercial cattle에서 雙胎를 임신시키는데 있다. Rowson 및 기타[52], Sreenan 및 기타[59]는 手術的 方法으로 2個의 授精卵을 移植하여 高率의 雙胎妊娠率을 얻었다. 그러나 이 成績은 卵을 1個씩 各子宮角에 이식함으로써 73%의 임신율을 얻었고, 黃體가 존재하는 子宮角에 2個의 卵을 同時에 이식하였을 때는 45%의 雙胎만을 얻을 수 있었다.[52] 이러한 현상은 1個 子宮角內에서 두 胎兒 사이에 경쟁이 일어나는 것과 아마도 cotyledon의 數에 관계가 있다고 할수도 있다.[52] 고로 雙胎를 얻기 위해서는 各子宮角에 1個씩의 卵을 주입할 필요가 있을 것이고 실제적 관점에서 non-surgical 移植이 더 요구될 것이라는 뜻을 함축하고 있다.

卵의 保存

소의 生殖器內에서 卵을 회수(recovery)하는데 사용되는 가장 보편적 培地는 TCM-199라는 조직배양 培地이다. Rowson 및 기타[55]는 bovine serum 대신 TCM-199를 保有液으로 사용해서 91%의 임신율을 얻었다. 이러한 결과는 소 授精卵移植의 商業的 開發을 가능케 한 획기적 개발이라 하겠다.

소 血淸은 卵을 죽이는 성분(ovicidal properties)으로 알려져 왔다.[18] 그러나 1953년 Willett 및 기타[74]는 donor에서 채취한 동상성 血淸을 卵의 medium으로 사용하여 5두에 移植하였는데 3두의 송아지가 출생했다고 했다. 이 medium은 소 血液을 37°C 부란기 內에서 30~60分間 incubating한 다음 2回 遠心分離하여 얻은 血淸을 移植에 사용하기 전에 2~3日間 refrigeration하였다.

저자는 이 storage period 內에서 소위 血淸이 지니는 殺菌效果가 제거되는 것으로 믿었다.

뒤이어 TCM-199가 卵移植에 적합한 medium임을 1971-Rowson 및 기타[52] 1974-Sreenan 및 Beeham,[58] 1975-Sreenan 및 기타,[59], 1974-Betteridge 및 Mitchell[13] 등이 증명했다. 그러나 bicarbonate를 첨가한 이 medium이 공기 중에 노출되면 bicarbonate 첨가후 1.5~2時間에 pH는 6.9~7.5 사이로 變動한다.[69] day 3 egg와 day 5 egg를 bench t°에서 保存상태를 비교한 실험에서 保存 후 이들 卵을 토끼의 수란管內에 再移植하였는데 PBS 內에 保存된 day 3 및 day 5 egg의 high %가 토끼 oviduct에 再移植된 후 적절히 발육된 것을 발견하였다.[71](85 및 88%) 그렇지만 day 5 egg의 상당한 수가 TCM-199 培地內에서 정상발육을 하였고(71%), day 3 egg는 그 49%만이 정상으로 발육하였다.[69] 관례적으로 회수된 卵은 recipient에 移植할 때까지 37°C 부란기에 저장한다. mouse embryo는 體溫에서 2°C 上昇하면 卵의 발육은 中斷되거나 크게 지연된다.[10] 그리고 羊을 높은 환경온도(90°F)에 노출시키면 early pregnancy loss를 일으킨다.[4] 마찬가지로 1 cell rabbit ova를 上昇한 體溫과 同等한 溫度(40°C)에서 6時間 배양한 다음 이 卵을 移植하였을 때에는 移植後 embryo-mortality는 증가한다.[3] 그러나 培養溫度가 정상 體溫이었을 때 또는 첫 단계의 分割이 끝난 후에 培養을 시작한 것의 mortality는 증가하지 않는다. 그러므로 embryo를 incubator 內에 보존할 때는 정상 體溫 이상으로 상승하여 cow embryo가 t° stress를 받지 않도록 주의해야 한다. 또한 부란기에서 卵保存容器를 卵檢査를 위해 꺼내거나 卵을 제거한 다음 부란기 內에 다시 넣어두는 등의 조작은 embryo에 t° stress를 주게 되므로 바람직하지 않다.

cow egg를 적합한 培地에 넣어 bench temprature(18~21°C)에 놓아 두면 차후 발육이 만족하다. egg에 손상을 주는 下限溫度에 관하여는 未詳하지만 과도한 cooling은 해롭고 day 5 및 day 6 egg를 0°~7.5°C 사이에서 cooling하면 상당數의 egg는 degeneration을 일으킨다.[69] 만일 egg를 incubator 內에 保有하지 않고 bench t°에 保存함으로써 일어나는 다른 有害作用은 light에 노출되는 일이다. Daniel[20]에 의하면 rabbit egg는 可視光線에 노출됨으로써 卵細胞의 分割이 억제되었다고 한다. 특히 단시간 ultra-violet light에 조사해도 分割은 중단된다.

試驗管內 培養

소의 卵을 培養하는 데에는 몇가지 이유가 있다. *in vitro* 授精의 system은 授精 및 分割이 정상적으로 이루어졌는가를 증명하기 위한 cult-

ure system과 卵이 凍結 및 移植에 사용하리 만큼 적절한 stage로 發育했는가를 조사하기 위해서 culture한다. 사실 形態的으로 의심되는 卵들의 生育能力을 부여하기 위한 culture는 바람직하며 實驗的으로 특수한 處理가 卵에 미치는 영향을 보기 위해서도 culture가 필요하다.

소의 ova가 *in vitro*에서 分割된다고 보고한 사람은 많다.[15,32,60] 近來에 와서 羊의 수란관液에 egg를 넣고 5% CO_2 送風으로 培養하였다[64,65]고 하나 이런 system에서 배양한 卵의 授精率은 낮았다.

culture에서도 또한 egg의 日齡은 중요성을 갖는다. 營養値를 높힌 dulbecco's phosphate buffered saline 內에서 later stage(day 5+)의 卵은 blastocyst stage까지 쉽게 배양되며 이들 卵이 移植될 때는 姙娠이 된다(Trounson, unpublished).

10% 또는 50%의 熱處理 소 胎兒血淸을 Ham's F-10 培地에 첨가한 培地에서는 8 cell stage의 卵에서부터 expanded blastocyst stage에 이르기까지 培養은 성공적으로 이루어진다.[79]

體內培養

토끼의 輸卵管 內에서 소의 卵이 계속 發育한다는 사실은 Sreenan 및 기타[60]에 의해 보고되었는데 Hafez 및 Sugie[31]는 이에 앞서 소의 embryo는 假姙娠된 토끼의 生殖器內에서는 生存할 수 없다고 보고한 바 있다. Averill 및 기타[5]가 fertilised sheep ova가 토끼 수란관 內에서 早期의 blastocyst stage에 도달할 때까지 최소한 5日間은 生存할 수 있었다고 보고한 以來 farm animal의 embryo를 계속 培養할 수 있는 토끼 수란관의 사용에 대한 관심이 높아졌다. 그 후 Hunter 및 기타[37]는 羊의 수정란을 토끼에 이식하여 장거리 航空輸送이 가능하였음을 보고하였다.

토끼의 수란관이 소의 수정卵 培養을 위해 적절한가를 Adams 및 기타[2]는 확증하였는데 이들은 토끼의 生理的 stage(卵胞期 또는 黃體期)는 별 중요성이 없고 同期化된 黃體期의 recipient 토끼를 사용한다고 해서 有益하지는 않은것 같다고 보고하였다.

토끼 수란관 內에서 培養한 수정卵은 2日~4日 사이에 8 cell에서 late morula 또는 flastocysts로 發育할 것이 기대되며 recipient heifer에 再移植할 때는 正常生育力을 가질 수 있다.[41] Tervit[64]는 일정기간 토끼 수란관에서 培養한 embryo의 임신율은 卵을 recipient heifer에 直接 移植해 준 것보다 높았다는 증거를 보였다.

實驗的 상황에서는 소의 수정卵을 토끼 수란관에 이식하는 것은 특히 卵의 生育力을 사정 평가하는데 有用하다. 그러나 egg가 수란관에 存在하는 동안 卵回收率이 매우 높게 기대되는 有益點이 있다면 商業的 이식에 있어서도 有用할 것으로 생각된다.[44]

토끼 수란관 內에서 egg를 3日에서 4日 培養하면 egg는 높은 姙娠이 기대될 수 있는 發育期에까지 도달하게 할 것이다. 過排卵된 卵들은 donor의 非正常的 환경에서부터 회수될 것이고 生育力이 없는 卵들은 토끼 수란관 내에서 分割이 안되므로 檢出 제거될 것이다.

이러한 system을 이용하면 같은 數의 새끼를 얻는데도 受卵牛에 대한 移植數가 적어지고 donor 당 姙娠數가 증가될 수 있다.

低溫保存 및 冷凍ing)

Chang[17]은 數日間 低溫에 保存한 토끼의 수정卵이 정상적으로 發育한다고 보고하였다. Averill 및 Rowson[6]은 滅菌한 羊血淸에 넣은 羊의 授精卵(4, 8 및 12 cell ova)을 5~8°C에 24時間 저장하는데 성공하였고 이들 卵을 recipient에 移植한 결과 15 ova 중 7個가 정상 embryo로 발육하였다고 한다. Sreenan 및 기타[61]는 低溫에서의 소의 授精卵 저장을 最初로 보고하였다. 이들은 소의 授精卵을 소의 卵胞液에 넣어 10°C까지 서서히(8시간) cooling시킨 후 토끼의 수란관 內에 移植하였는데 이들 卵은 모두 서서히 發育하였다고 한다. 이들은 delayed cooling 시험에 4~8 cell stage에 있는 7個의 ova만을 사용하였다.

그러나 Wilmut 및 기타[76]는 8-cell ova는 0°C에서 cooling할 때는 生存할 수 없었지만 late molura는 0°C에서 15分間 生存할 수 있었다고 한다.

Trounson 및 기타[69]는 4 day~6 day morula를

0°C, 7.5°C까지 cooling하였는데 卵들의 많은 수가 變性되었다고 한다. 이들이 이용한 가장 늦은 冷却率(cooling rate)은 Sreenan 및 기타[61]가 응용한 cooling rate보다 빨랐는데 Trounson 및 기타는 cooling rate를 더 낮게 하면 生存을 향상시키는 경향이 있음을 알았다. 현재로는 0°C까지 cooling하는데 있어서 소의 授精卵의 低抗力은 blastocyst stage에 이르기까지는 나타내지 않는다(즉 day 7t).

이로 미루어 보아 day 5 및 day 6 卵은 冷凍 및 Thawing(용해)에 의해 生存할 수 없는 이유를 알수 있다(Trounson Williadsen unpublished)

deep freege한 blastocyst를 이식하여 姙娠하였다는 첫 報告[77] 및 건강한 송아지의 첫 分娩[78]이 報告되었다.

Wilmut 및 Rowson[73]이 성공시킨 卵冷凍은 2.0M demethylsulphoxide(DMSO)를 함유하는 phosphate buffered saline을 培地로 하였고, 每分當 0.2°C의 cooling rate 및 每分當 360°C의 warming rate를 이용했다. DMSO와 sucrose의 비교 또는 DMSO와 cryo-protective agent인 polyvinyl-pyrrolidone(PVP)을 비교할 때 DMSO는 embryo 生存에 탁월한 效果를 준다는 사실을 알 수 있었다. Wilmut[75]은 PVP를 함유하는 培地에서 冷凍한 mouse embryo는 生存하지 못했다고 한다.

羊의 授精卵을 冷凍하는데 성공하였고 冷凍卵을 移植하여 仔羊이 分娩된 보고가 있다.[72,73] 소의 授精卵 冷凍은 羊의 卵冷凍과 같은 方法으로 실시하되 수정卵은 blastocyst stage의 것을 사용해서 비교적 잘 冷凍될 수 있다(Willodsen, unpublished information).

앞으로 冷凍法이 발전함에 따라 卵移植에 큰 공헌을 할 것이다. 冷凍法의 開發과 卵移植에 있어서 key가 되는 문제들의 해결은 앞으로 數年內에 이루어지면 商業的 移植事業이 이루어질 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Adams, C.E.: Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod., Trento, (1964) 2: 305.
2. Adams, C.E., Moor, R.M., & Rowson, L.E.A.: Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod., Paris (1968) 1:573.
3. Alliston, C.W., Howarth, B., & Ulberg, L.C.: J. Reprod. Fert. (1965) 9:337.
4. Alliston, C.W., & Ulberg, L.C.: J. Anim. Sci. (1981) 20:608.
5. Averill, R.L.W., Adams, C.E., & Rowson, L.E.A.: Nature, Lond. (1955) 176:167.
6. Averill, R.L.W., & Rowson, L.E.A.: J. Agric. Sci. (1959) 52:392.
7. Avery, T.L., Cole, C.L., & Graham, E.F.: J. Reprod. Fert. (1962) 3:206.
8. Avery, T.L., Fahning, M.L., & Graham, E.F.: J. Reprod. Fert. (1962) 3:212.
9. Bedford, J.M., & Chang, M.C.: Nature, Lond. (1962) 193: 898.
10. Bellve, A.R.: J. Reprod. Fert. (1972) 30. 71.
11. Benesch, F., & Wright, J.G.: Veterinary Obstetrics, Balliere Tindall, London (1951).
12. Bennett, J.P., & Rowson, L.E.A.: Proc. 4th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. The Hague. (1961) 2: 360.
13. Betteridge, K.J., & Mitchell, D.: Theriogenology (1974) 1:69.
14. Booth, W.D., Newcomb, R., Strange, H., Rowson, L.EA., & Sacher, H.B.: Vet. Rec. (1975) 97:366.
15. Brock, H., & Rowson, L.E.A.: J. Agric. Sci. Camb. (1952) 42:479.
16. Boyd, H., & Reed, C.B.: Brit. Vet. J. (1961) 117:18.
17. Chang, M.C.: Nature, Lond (1947) 159:602.
18. Chang, M.C.: J. Gen. Phys. (1949) 32:291.
19. Chang, M.C.: Nature, Lond. (1959) 184:466.
20. Daniel, J.C. Jr.: Nature, Lond. (1964) 201: 316.
21. Dawson, F.L.M.: Vet. Rec. (1961) 73:661.
22. Dowling, D.F.: J. Agric. Sci., Camb. (1949) 39: 374.
23. Dracy, A.E., & Petersen, W.E.: Proc. natn. Egg Transfer Breeding Conf., San Antonio (1949) 13.
24. Dziuk, P.J., Donker, J.D., Nichols, J.R., & Petersen, W.E.: Anim. Breed. Abstr. (1958) 27:747.
25. Elsden, R.P., Lewis, S., Cumming, I.A.,

& Lawson, R.A.S.: J. Reprod. Fert. (1974) 36:455.
26. Lamond, D.R.: Anim. Breed. Abstr. (1970) 38:359.
27. Gordon, I., Williams, G., & Edwards, J.: J. Agric. Sci., Camb. (1962) 59:143.
28. Hafez, E.S.E.: Fert. Steril. (1962) 13:583.
29. Hafez, E.S.E.: Am. Zool. (1962) 2:31.
30. Hafez, E.S.E., Jainudeen, M.R., & Lindsay, D.R.: Acta Endocr., Copenh. (1965) Suppl. 102.
31. Hafez, E.S.E., & Sugie, T.: J. Anim. Sci. (1963) 22:30.
32. Hafez, E.S.E., Sugie, T., & Gordon, I.: J. Reprod. Fert. (1963) 5:359.
33. Hamilton, W.S., & Laing, J.A.: J. Anat. (1946) 80:194.
34. Harper, M.J.K., Bennett, J.P., & Rowson, L.E.A.: Nature, Lond. (1961) 190:789.
35. Hill, J.R.Jr., Lamond, D.R., Henricks, D.M., Dickey, I.F., & Niswender, G.D.: Biol. Repord. (1970) 2:78.
36. Hunter, G.L., Adams, C.E., & Rowson, L.E.A.: J. Agric. Sci. (1955) 46:143.
37. Hunter, G.L., Bishop, G.P., Adams, C.E., & Rowson, L.E.: J. Reprod. Fert. (1962) 3:33.
38. Lamond, D.R.: Anim. Breed. Abstr. (1970) 38: 359.
39. Laster, D.B.: J. Reprod. Fert. (1972) 28: 285.
40. Laster, D.B.: J. Reprod. Fert. (1973) 33: 275.
41. Lawson, R.A.S., Rowson, L.E.A., & Adams, C.E.: J. Reprod. Fert. (1972) 28: 313.
42. Lawson, R.A.S., Rowson, L.E.A., Moor, R.M., & Tervit, H.R.: J. Reprod. Fert. (1975) 45:101.
43. Mutier, L.R., Graden, A.P., & Olds, D.: A.I. Digest. (1964) 12:3.
44. Newcomb, R., & Rowson, L.E.A.: Proc. of 23rd Easter School in Agric. Sci. Univ. of Nottingham (April 14-17, 1975). Eds. Swan, H.E. Broster, W.H., Butterworth (1975).
45. Newcomb, R., & Rowson, L.E.A.: Vet. Rec. (1975) 96:468.
46. Newcomb, R., & Rowson, L.E.A.: J. Reprod. Fert. (1975) 43:539.
47. Rowson, L.E.A.: Vet. Rec. (1942) 54:311.
48. Rowson, L.E.A.: J. Endocrin. (1951) 7:260.
49. Rowson, L.E.A., Bennett, J.P., & Harper, M.J.K.: Vet. Rec. (1964) 76:21.
50. Rowson, L.E.A., & Dowling, D.F.: Vet. Rec. (1949) 61:191.
51. Rowson, L.E.A., Lamming, G.E., & Fry, R.M.: Nature, Lond. (1953) 171:749.
52. Rowson, L.E.A., Lawson, R.A.S., & Moor, R.M.: J. Reprod. Fert. (1971) 25: 261.
53. Rowson, L.E.A., Lawson, R.A.S., Moor, R.M., & Baker, A.A.: J. Repord. Fert. (1972) 28:427.
54. Rowson, L.E.A., & Moor, R.M.: J. Reprod. Fert. (1966) 11:311.
55. Rowson, L.E.A., Moor, R.M., & Lawson, R.A.S.: J. Reprod. Fert. (1969) 18. 517.
56. Scanlon, P., Sreenan, J., & Gordon, I.: J. agric. Sci. (1968) 70:179.
57. Sreenan, J.M.: Vet. Rec. (1975) 96:490.
58. Sreenan, J.M., & Beehan, D.: J. Reprod. Fert. (1974) 41:497.
59. Sreenan, J.M., Beehan, D., & Mulvehill, P.: J. Reprod. Fert. (1975) 44:77.
60. Sreenan, J., Scanlon, P., & Gordon, I.: J. Agric. Sci. (1968) 70:183.
61. Sreenan, J., Scanlon, P., & Gordon, I.: J. Agric. Sci. (1970) 74:593.
62. Sugie, T.: J. Reprod. Fert. (1965) 10:197.
63. Sugie, T., Soma, T., Fukumitsu, S., Otsuki, K.: Bull. natn. Inst. Anim. Ind. CHIBA 17, (1972).
64. Tervit, H.R.: Ph.D. Thesis, Univ. of Cambridge, (1973).
65. Tervit, H.R., & Rowson, L.E.A.: VIIth Int. Congr. Anim. Repord. A.I., Munich (1972) 489.
66. Tervit, H.R., Rowson, L.E.A., & Brand, A.: J. Reprod. Fert. (1973) 34:179.
67. Tervit, H.R., Whittingham, D.G., & Rowson, L.E.A.: J. Reprod. Fert. (1972)

30:493.
68. Trounson, A.O., & Moore, N.W.: Aust. J. Biol. Sci. (1974) 27:511.
69. Trounson, A.O., Willadsen, S.M., Rowson, L.E.A., & Newcomb, R.:J. Reprod. Fert. (1976).
70. Whittingham, D.G.: Nature, Lond. (1968) 220:592.
71. Whittingham, D.G.: Nature, Lond. (1971) 233:125.
72. Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A., & Moor, R.M.: J. Cryobiology (1974) 11:560 (Abstr.).
73. Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L. E.A., & Moor, R.M.: J. Reprod. Fert. (1976).
74. Willett, E.L., Buckner, P.J., & Larson, G.L.: J. Dairy Sci. (1953) 36:520.
75. Wilmut, I.: Life Sci. (1972) 11:1071.
76. Wilmut, I., Polge, C., & Rowson, L.E.A.: J. Reprod. Fert. (1975) 45:409.
77. Wilmut, I., & Rowson, L.E.A.: J. Reprod. Fert. (1973) 33:352.
78. Wilmut, I., & Rowson, L.E.A.: Vet. Rec. (1973) 92:686.
79. Wright, R.W.Jr., Anderson, G.B., Cupps, P.J., & Drost, M.: Proc. Am. Soc. Anim. Prod. Abstr. (1975) 75.