

## 牛 受精卵의 凍結保存에 관한 研究

### I. 性腺刺戟ホルモン과 PGF<sub>2α</sub>의 투여에 따른 卵巢反應

南相憲 · 梁富根 · 成洪龍\* · 高光斗 · 金正翊

江原大學校 農科大學

## Study on the Freezing of Bovine Embryos

### I. Ovarian response to the administration of gonadotrophins

Nam, S. H, B. K. Yang, H. R. Seong\*, K. D. Goh, and C. I. Kim

College of Agriculture, Kangweon National University

#### Summary

This study was carried out with 46 cows to investigate the ovarian response to the administration of PMSG, PGF<sub>2α</sub> and hCG, and the developmental stage of embryos recovered. Superovulation was induced by the injection of 2,000IU to 3,000IU PMSG on the days of 7-13 of the estrus cycle followed 48 hours later by the injection of 22.5mg PGF<sub>2α</sub>. Of 29 cows treated with 3,000IU PMSG and 22.5mg PGF<sub>2α</sub> 18 cows were given 2,000IU hCG at the onset and 7 after artificial insemination.

The results obtained were summarized as follows;

1. The number of developed follicles per cow after an injection of 2,000, 2,500, 3,000IU of PMSG and 3,000 PMSG-2,000IU hCG in combination with 22.5mg PGF<sub>2α</sub> were 12.6, 19.6, 21.5 and 29.3, respectively. This result indicates that the no. of developed follicles per cow was increased according to the increase of PMSG dosage and the combination with hCG injection.
2. The highest number of ovulation was 17.1 in cows treated with PMSG-hCG and the number of matured corpus luteum was increased as the dosage of PMSG was higher.
3. Ovulation rate from cows treated with 2,500IU PMSG was 71.0% and this result was higher than the average of ovulation rate (59.3%).
4. Average recovery rate was 36.8% (232/631), and the number of ova per cow was 5.0.
5. Of 232 recovered embryos, the number of morulae and blastocysts were 76 (32.8%) and 83 (35.8%), respectively.
6. 28.4% of total recovered embryos was abnormal morphologically.

#### I. 緒 論

암가축의 卵巢內에는 수 많은 原始卵胞(primary follicle)가 있으나 生涯를 통하여 생산되는 仔牛의 數는 10頭内外로서, 평균 4~5頭에 머문다(Hafez, 1961). 이와같은 암가축의 潛在的 繁殖能力을 産業的으로 이용하려는 受精卵의 移植術이 Heape(1890)에 의하여 家兎에서 최초로 成功된 이래, 가축을 대

상으로한 연구가 시작되어 緬羊(Warwick et al, 1934), 山羊(Warwick & Berry, 1949), 돼지(Kvansn-snikill, 1951)와 소(Willet et al, 1951)등에서 受精卵移植法에 의하여 仔畜을 생산하게 되었다.

受精卵의 移植術은 실시과정에서 移植卵子의 受胎를 成立시키기 위하여 受精卵를 제공하는 供卵畜과 받아서 기르는 受卵畜간에 發情期를 同期化시키는 기술과정을 거치게 되며, 性週期의 同時性은 —

\*三養畜産開發(株)

致할수록 受胎率이 향상된다. Sreenan(1983) 그러나 受精卵을 凍結하여 採取한 狀態로 長期間 保存하게 되면 供卵畜과 受卵畜간에 發情期の 同期化 過程을 생략하고 受卵畜의 發情期에 맞추어 受精卵을 移植하면 受胎가 成立하게 되므로 受精卵의 移植術은 훨씬 간편하게 되어 實用化를 앞당기게 된다.

本 實驗은 牛 受精卵의 凍結保存에 관한 기초자료를 얻기 위하여 卵巢에 대한 性腺刺戟호르몬(gc-nadotrophin; PMSG와 hCG)과 prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α)의 反應과 受精卵의 回收成績을 조사하기 위하여 실시하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 試驗期間 및 供試動物

本 實驗은 한국과학재단의 연구비를 수혜받아 1982年 11월부터 1984年 10月 사이에 江原大學校 畜産學科 가축번식학 실험실과 三養畜産 대관령목장에

서 實施되었다.

供試牛로는 1~5畜의 經産牛 46頭였으며, 品種別로는 Holstein 43頭와 Simmental 3頭가 사용되었다.

### 2. 過排卵의 誘起

過排卵을 誘導하기 위하여 Table 1 과 같이 46頭의 供試牛에 妊馬血清性 性腺刺戟호르몬(PMSG; Serotrophin; Teikok-Zoki co, Japan)과 prostaglandin F<sub>2</sub>α (prosolvin; Intervet co, Holland)를 투여하였으며, 그중 18頭에 대해서는 胎盤性 性腺刺戟호르몬(hCG; Chorulon; Intervet co, Holland)을 투여하였다.

### 3. 人工授精

受精卵의 採取를 위하여 過排卵處理후 發情이 發現하는 시기에 제 1차 人工授精을 실시한 다음, 排卵된 卵子의 受精率을 높이기 위하여 제 1차 수정 후 12시간 간격으로 2回授精을 반복 실시하였다.

Table 1. Gonadotropic hormone and prostaglandin F<sub>2</sub> alfa treatment

Treatments	No. of animals	PMSG		PGF <sub>2</sub> α		hCG	
		Dosage (IU)	Inj. day of cycle	Dosage (mg)	Day of inj. after PMSG	Dosage (IU)	Time of injection
A	5	2,000	7-13	22.5	2	-	onset of estrus
B	12	2,500	7-13	22.5	2	-	onset of estrus
C	11	3,000	7-13	22.5	2	-	onset of estrus
D	18	3,000	7-13	22.5	2	2,000	onset of estrus

人工授精에 사용된 精液은 Canation社에서 導入된 活力이 우수(65%이상 생존)한 Holstein 種牡牛의 凍結精液을 사용하였다.

### 4. 受精卵의 回收

人工授精 후 6~7日째에 生體 또는 屠殺하여 受精卵을 採取하였다.

受精卵의 非外科的 採取를 위하여 生體를 保定하여 5~7 ml의 Lidocaine을 尾根部(1,2미추사)에 注射한 다음, 2-way式 Folly Catheter을 사용하여 phosphate buffered saline(PBS; Whittingham, 1971)에 牛胎兒血清(fetal calf serum; FCS; Flow Lab Icc, Australia)을 1%첨가한 관류액으로 3회

씩 반복세척하여 受精卵을 回收하였다.

外科的 方法에 의한 受精卵의 회수는 屠殺直後에 摘出した 生殖器를 실험실로 옮겨 生體灌流法과 동일한 방법으로 회수하였다. 黃體가 있는 3宮角에서 卵子가 回收되지 않는 경우에는 卵管内를 上向式灌流法(Chang, 1949; Hunter et al, 1955)으로 관류하여 난관내난자를 회수하였다.

回收된 灌流液은 분액여두(Separate Funnel)내에 약 30분간 定置시킨 후에 침전부분을 1회용 plastic petric dish에 취하여 실제현미경으로 卵子를 확인, 신선한 保存液(PBS+10%FCS)이 들어있는 Watching glass로 옮겨 受精卵의 發育段階와 形態의 正常性을 검사하였다.

### III. 結果 및 考察

#### 1. 性腺刺戟hormone과 PGF<sub>2α</sub>투여에 따른 卵巢反應

수준별 PMSG와 PGF<sub>2α</sub>(22.5mg)의 투여 및 hCG를 추가투여한 供試牛에서 卵胞의 發育과 排卵 및 排卵率등을 조사한 成績을 표 2에 要約하였다.

PMSG 2000IU(A區), 2500IU(B區), 3000IU(C區)에 PGF<sub>2α</sub> 225mg씩을 병용투여하거나 PMSG3000IU와 PGF<sub>2α</sub> 22.5mg에 hCG 2,000IU(D區)을 추가하여 투여한 處理別 發育卵胞數는 각각 12.6, 19.8, 21.5, 29.3개로서 PMSG투여수준의 증가와 hCG병용 투여에 따라 發育卵胞數가 증가하는 경향을 보였다. 以上の 成績은 PMSG투여량을 증가시키면 發育卵胞數가 증가한다는 Sreenan등(1975)과 高登(1981)의 成績과 一致하였다.

그러나 頭當 平均卵胞數(23.1개)는 이들의 2.9~16.3개보다 현저하게 증가하였고 鄭등(1983)의 20.7±8.6개의 성적과 대체적으로 일치한다. 이와같은 結果는 過排卵을 目的으로 사용된 hormone劑의 種類와 투여량 및 供試牛의 品種의 차이에 기인된 것으로 생각된다.

排卵成績은 PMSG의 투여량을 증가시키면 排卵數가 증가되어 卵胞의 發育成績과 대체적으로 동일

한 경향을 보였으며 hCG을 병용투여한 D區가 17.1개로서 가장 많았다. 그러나 수준별 PMSG의 단독 투여區간에는 B區가 141개로서 C區의 11.5개보다 다소 높은 경향이 있으나 평균치의 13.7개와 큰 차이는 인정되지 않았다.

한편 發育卵胞數에 대한 배란율에서는 PMSG 2,500IU에 PGF<sub>2α</sub> 22.5mg를 투여한 B區가 71%로서 평균배란율의 59%보다 높은 성적을 보였다.

이상의 배란성적은 Sreenan등(1975)이 PMSG 1,500~2,500IU, 具와 鄭(1982), 鄭등(1983), 任등(1983)이 2,750~3,000IU의 PMSG를 투여하여 두당 평균 3.8~7.8개의 황체가 확인되었다고 보고한 성적보다는 상회하고 있으나, 2,000IU의 PMSG를 투여하여 두당 평균 17±3개 황체가 형성되었다는 Sreenan(1983)의 성적에는 미치지 못하였다.

본실험의 결과로 볼 때 소의 過排卵 誘起를 위한 性腺刺戟hormone의 투여방법과 투여량은 투여방법에 대한 두당 過排卵數와 排卵率 및 PMSG와 hCG의 구입비를 감안할 때 PMSG 2,500IU와 PGF<sub>2α</sub> 22.5mg을 병용투여하는 것이 바람직하다고 생각된다.

#### 2. 受精卵의 回收

人工授精후 6~7일째에 回收한 採卵成績은 표 3과 같다. 표 3에서 보는 바와 같이 평균 採卵率은

Table 2. Ovarian response to the hormone treatment with different dosage

Treatment	No. of animals	No. of developed follicles		No. of matured corpus luteum		Ovulation rate
		Total	No./cow	Total	No./cow	
A	5	63	12.6	29	5.8	46.0
B	12	238	19.8	169	14.1	71.0
C	11	236	21.5	126	11.5	53.4
D	18	527	29.3	307	17.1	58.3
Total	46	1,064	23.1	631	13.7	59.3

Table 3. Recovery rate of ova following GTH and PGF<sub>2α</sub> administration

Classification	Hormone treatment				Total
	A	B	C	D	
No. of cows	5	12	11	18	46
No. of ovulations	29	169	126	307	631
No. of ova recovered	20	55	50	107	232
No. of mean ova per cow	4.0	4.6	4.5	5.9	5.0
Recovery rate of ova	69.0	32.5	39.7	34.9	36.8

36.8%로서, 두당 회수난자수는 5.0개였다.

이와같은 성적은 두당 난자의 회수數가 1.7~4.6개였다는 具와 鄭(1982), 任등(1983) 및 鄭등(1983)의 성적보다는 다소 높은 경향이였으나 Danielle Manniaux등(1983)과 Hasler등(1983)의 6.0~8.9개보다는 저조하였다.

한편 동일한 방법에 의한 회수율의 성적에서는 任등(1983), 鄭등(1983)의 50.3~59.4%와 Shea등(1976) 및 Hasler등(1983)의 66~77.5%에는 미치지 못하고 있으나, 43~43.5%였다는 Testart와 Go-

dard-Siour(1975), 具와 鄭등(1982)의 성적과는 대체적으로 일치하였다.

이와같은 결과는 본실험의 供試牛의 일부가 번식기능이 불량한 도태대상우로서 卵巢 및 卵管의 기계적 장애의 요인과 採卵技術의 숙련도의 차이에 기인된 것으로 생각된다.

### 3. 受精卵의 發育段階

과배란처리와 人工授精을 실시한 후 6~7日째에 회수한 수정란의 발육단계를 표 4에 요약하였다.

Table 4. Development stages of embryos recovered 6-7 days after oestrus

Treatments	No. of animals	No. of eggs recovered	Embryo stage				
			4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst	Abnormal*
A	5	20			4	7	9+0
B	12	55	1	1	22	18	0+13
C	11	50		2	15	17	2+14
D	18	107	2	1	35	41	9+19
	46	232	3 (1.3)	4 (1.7)	76 (32.8)	83 (35.8)	66 (28.4)

\*The first figure denotes the number of eggs unfertilized and second denotes the number of eggs degenerated

회수된 총난자 232개중 상실배와 배반포기의 卵자는 76개 (32.8%)와 83개 (35.8%)로서 전체의 68.5%를 차지하였다. 이와같은 발육단계는 Betteridge(1977)가 제시한 牛受精卵의 發育分布와 비슷하나, Elsden(1982)의 발육단계보다는 다소 빠른 경향을 나타내고 있다.

회수된 난자중 未受精卵과 形態的으로 異常인 난자의 비율은 28.4%로서 Newcomb등(1976)의 31.3%보다는 다소 낮은 비율을 나타내고 있으며, Elsden(1978)의 16%에 비하여 현저하게 증가되었다. 한편 PMSG의 投與量간에 形態的 異常卵자의 비율은 투여수준이 증가됨에 따라 현저하게 증가하였는데, 이와같은 사실은 PMSG의 투여량이 2,600IU를 초과하면 異常卵자의 출현빈도가 증가된다는 Greve(1976, 1981)등의 보고와 일치하였다.

한편 hCG를 병용투여한 D區에서의 形態的 異常卵자의 비율이 현저하게 낮아진 것은 배란촉진제인 hCG의 투여에 따라 단시간내에 집중적으로 배란이 일어난데에 기인한 것으로 생각된다.

## IV. 摘要

牛 受精卵의 凍結保存에 관한 기초자료를 얻기 위

하여 46頭의 成牝牛를 사용하여 PMSG와 PGF<sub>2α</sub> 또는 hCG 병용투여에 따른 난소반응과 수정란의 발육단계 및 회수율을 검토한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1). 과배란처리후 발육난포수는 PMSG 2,000IU, 2,500IU, 3,000IU에 PGF<sub>2α</sub> 22.5mg을 병용투여, 또는 PMSG 3,000IU에 PGF<sub>2α</sub> 22.5mg와 hCG 2,000IU를 투여한 區에서 각각 12.6, 19.8, 21.5, 및 29.3개로서 PMSG투여수준의 증가와 hCG 병용에 따라 증가되었다.

2). 배란성적은 PMSG투여량의 증가에 따라 증가되었고 hCG를 병용투여한 區가 10.1개로 가장 많았다.

3). 발육난포수에 의한 배란율은 PMSG 2,500IU에 PGF<sub>2α</sub> 22.5mg 투여구가 71%로 평균 배란율 59.3%보다는 현저하게 증가하였다.

4). 비의과적 방법에 의한 평균회수율은 36.8%였으며 두당 회수난자수는 5.0개였다.

5). 회수된 수정란 232개중 상실배와 배반포의 난자수는 각각 76개와 83개로서 전체의 68.5%였다.

6). 회수된 수정란의 28.4%가 형태적 이상난자로 확인되었다.

## 引用文献

1. Betteridge, K. J. (1977) Techniques and results in cattle, superovulation. In: Embryo transfer in farm animals (ed. K.J. Betteridge) Canada department of a griculture Monograph,16 pp. 1-9.
2. Chang, M.C. (1949) Effect of heteroguos sera on fertilized rabbit ova. J. Gen. Physiol. 32:291-300.
3. Danielle Monniux, D. Chupin and J. Saumande (1983) Superovulatory of cattle. Theriogenology, 19:55-81.
4. Elsdén, R.P. and G.E. Seidel, Jr. (1982) Embryo transfer procedures for cattle. Colorado state Univ. Exp. Station in cooperation with Ani. Reprod. Lad. General Series 1011.
5. Elsdén, R.P., L.D. Nelson and G.E. Seidel Jr. (1978) Superovulating cows with follicles stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. Theriogenology, 9:17-26.
6. Greve, T. (1976) Egg transfer in the bovine: Effect of injecting PMSG on different days. Theriogenology, 5:15-19.
7. Greve, T. (1981) Bovine egg transplantation in denmark. Dissertation Copenhagen, pp.222.
8. Hafez, E.S.E. (1961) Procedures and problems of manipulation, selection, storage and transfer of mammalian ova. Cornell Vet., 51:299-333.
9. Hasler, J.F., A.D. McCauley, E.C. Schermerhorn and R.H. Foote (1983) Superovulatory response of Holstein cows. Theriogenology, 19:83-99.
10. Heape, W. (1980) Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine fostermother. Proc. Soc. London, 48:457-458.
11. Hunter, G.L., C.E. Adams and L.E.A. Rowson (1955) Inter-breed ovum transfer in sheep. J. Agric. Sci., (Cambridge) 46, 163 -149.
12. Kvansnickii, A.V. (1951) Inter-breed ova transplantation. Sovetsk. Zootech. 1:36.
13. Newcomb, R., L.E.A. Rowson and A.O. Trounson (1976) The entry of superovulated eggs into the uterus. In: Egg transfer in cattle (ed. L.E.A. Rowson) Commission of the European Communities, Luxembourg EUR 5491 pp. 1-15.