

韓牛에 있어서 多排卵의 反復處理 및 凍結受精卵 移植에 관한 研究

梁甫錫 · 吳成宗 · 柳承煥 · 金熙錫 · 鄭然厚* · 李根常

畜産試驗場 *高嶺地試驗場

Studies on Repeated Superovulation and Frozen-Thawed Embryo Transfer in Korean Native Cattle

B. S. Yang, S. J. Oh, S. H. Yoo, H. S. Kim, Y. H. Chung* and K. S. Lee

Livestock Experiment Station, R.D.A., Suwon

Summary

These studies were conducted to investigate the effect of repeated superovulation on embryo production, the effect of the frozen-thawed embryos transferred on the developmental stage and grade, and donor-recipient synchrony on pregnancy rate in Korean native cattle.

The results obtained in these studies were as follows:

1. Repeated superovulations in Korean Native Cattle were not affected on the number of corpus luteum (CL), embryos recovered and embryos cleaved (range: 4.8 ± 4.21 to 9.5 ± 6.50 , 1.8 ± 2.53 to 8.2 ± 8.04 and 1.6 ± 2.32 to 4.0 ± 4.59 , respectively).
2. Blastocyst embryos (38.5%) showed higher pregnancy rate than morula (31.6%).
3. The pregnancy rates of cattle transferred with good and fair embryos were 33.3% and 40.4%, respectively.
4. The pregnancy rate when the donors exhibited estrus 12 hours earlier than the recipients (62.5%) was higher than when the donors and recipients exhibited estrus at the same time (33.3%) or when the donors exhibited estrus 12 hours later than the recipients (20.0%).

緒 論

最近 20여년간 受精卵 移植 技術이 發達함에 따라 여러 畜産 先進國에서는 專門의인 受精卵 移植 會社들이 設立되었으며 受精卵 移植 技術을 産業的으로 擴大시켜 家畜 改良과 優秀한 仔畜의 生産에 이바지하기 위해서는 受精卵을 凍結保存하여 恒時 移植할 수 있는 凍結受精卵 製造 및 移植 技術의 必要性이 要求되고 있다.

Whittingham 等 (1972)에 의하여 mouse 受精卵의 凍結保存이 最初로 成功한 이래 Wilmut와 Rowson(1973)에 의하여 소에서도 凍結受精卵에 의하여 송아지가 生産되었다. 소에서 受精卵 移植 成功率을 左右하는 要因으로는 移植 受精卵의 發育段階

(Shea, 1981; Wright, 1981, 1985; Pettit, 1985)와 質(Leibo, 1984; Nieman 等, 1985; Wright, 1985) 그리고 供卵牛와 受卵牛의 發情同期化(Newcomb와 Rowson, 1975; Sreenan 等, 1975) 등이 있다. 그 밖에도 受精卵 移植時 使用된 培養液의 種類, 移植 部位, 受卵牛의 營養狀態 및 移植時 子宮의 感染等도 受精卵 移植 後 成功率을 左右한다.

한편 國內에서는 石 等(1983)이 美國에서 凍結受精卵을 導入하여 移植한 結果 15.8%의 受胎率을 報告하였으며 梁 等 (1986)도 美國에서 導入하여 移植한 結果 45.0%의 受胎率을 報告하였다. 그러나 國內 研究陣들의 自體技術로 受精卵을 凍結 및 移植한 研究報告는 全無한 實情이다.

따라서 本 研究는 供卵牛로 韓牛를 多排卵 反復

*Alpine Experiment Station, Daegwallyoung

處理하여 受精卵을 採卵 凍結 및 保存하였다가 受卵牛에 移植時 受精卵의 生存性에 影響을 미치는 要因中 移植 受精卵의 發育段階 및 質 그리고 供卵牛와 受卵牛의 發情 同期化 程度가 受精卵 移植後 受胎率에 미치는 影響을 調査하기 위하여 實施하였다.

材料 및 方法

本研究은 1986年 1월부터 1988年 6월까지 畜産試驗場에서 飼育하고 있는 韓牛 供卵牛 11頭와 畜産試驗場, 高嶺地試驗場 및 인근 大規模 牧場에서 飼育하고 있는 韓牛 32頭를 受卵牛로 供試하여 實施하였다.

1. 供卵牛의 多排卵 反復處理

供卵牛의 多排卵 誘起를 위하여 發情週期 9~13 日 사이에 PMSG (Folligon, Intervet, Holland) 2500~3000IU를 注射하거나 FSH (Amour Pharmaceutical Co., Kanakee, U. S. A) 28 또는 35mg을 4~5 日間 處理를 하고 PGF_{2α} 類似體인 Proslavin (Intervet, Holland) 2 ml를 注射하여 多排卵을 誘起하였다. 또한 多排卵의 反復處理는 90~120 日 間隔으로 實施하였으며 만약 正常 發情週期가 2回 反復되지 않는 경우에는 反復處理 間隔을 넓게 하였다. 受精卵의 回收時 使用한 採卵液은 D-PBS (Gibco, USA)에 1%의 FCS (Gibco, USA)를 첨가한 것으로 發情後 7 日째에 非外科적으로 受精卵을 採卵하였다.

2. 受精卵의 凍結

回收된 受精卵은 實體顯微鏡下에서 觀察하여 透明帶가 充實하고 割球의 狀態가 좋은 受精卵만을 凍結에 供試하였다. 供試된 受精卵은 凍結培養液 (Embryo Transfer freezing medium, Gibco, USA)에 20%의 FCS이 첨가된 培養液으로 受精卵을 數回 洗滌한 後 0.35M, 0.7M 및 1.4M의 glycerol이 첨가된 凍結培養液에서 各 段階別 5~10 分間 平衡한 後 細胞凍結器 (Cell freezer, Planer R204, U. K)를 使用하여 室溫에서 -7℃까지는 分當 1℃씩, -7℃에서 -35℃까지는 分當 0.3℃씩 溫度를 내렸으며 植氷 (Seeding)은 -7℃에서 實施 凍結하여 液體室素에 保存하였다.

3. 受卵牛의 發情同期化

受卵牛는 供卵牛와 自然發情 同期化된 個體 또는 11日 間隔으로 Cloprostenol (Estrumate®, ICI) 500 μg을 投與하여 發情이 同期化된 個體中 發情 同期化 程度가 ±1日 以內에 있는 受卵牛만을 移植에 供用하였다.

4. 凍結受精卵의 融解 및 移植

凍結受精卵의 融解는 20℃의 恒溫水槽에서 實施하였으며 融解後 受精卵의 脫 glycerol은 sucrose가 첨가된 融解液에서 20%의 FCS가 첨가된 D-PBS液에서 最終 洗滌後 受精卵의 狀態가 良好한 것 만을 移植에 供用하였다. 供試된 受精卵의 發育段階는 桑實期가 胚盤胞期胚였으며 質은 優良 (good)의 경우는 透明帶와 割球들의 모양이 전체적으로 正常인 것이며 良好 (fair)인 경우는 割球들이 약간 損傷되었으나 移植可能한 狀態인 것으로 區分하였다. 受精卵 移植後 妊娠은 90 日째에 直腸檢査에 의하여 確認하였다.

結果 및 考察

1. 多排卵의 反復處理

多排卵의 反復處理가 黃體數 및 採卵數에 미치는 影響은 Table 1에 나타내었다.

Table 1에서 보는바와 같이 多排卵 反復處理에 따른 黃體數는 2次處理가 9.5±6.50個로서 가장 많았으며 4次處理가 4.8±4.21個로서 가장 적었으나 反復處理에 따라 一定한 傾向은 보이지 않았다. 또

Table 1. Effect of Repeated Superovulation on Embryo Production

No. of collections	No. of heads	No. of CL	Embryos	
			Total	Cleaved
1	11	6.2±5.91	3.9±5.36	1.8±2.23
2	11	9.5±6.50	6.5±6.47	3.6±5.48
3	11	5.5±5.84	4.3±5.12	2.9±3.48
4	10	4.8±4.21	1.8±2.53	1.6±2.32
5	9	8.7±3.50	5.2±3.31	2.2±2.91
6	6	8.0±3.58	4.7±3.27	2.2±2.40
7	5	9.4±9.02	8.2±8.04	4.0±4.59

한 採卵數와 採卵된 卵子中 卵分割된 受精卵은 7次處理가 各各 8.2±8.04個 및 4.0±4.59個로서 가장 많았으며 4次處理가 各各 1.8±2.53個 및 1.6±2.32個로서 가장 적었으나 黃體數에서 나타난 結果와 마찬가지로 一定한 傾向은 보이지 않았다.

本 研究에서 나타난 이러한 結果는 Donaldson과 Perry(1983)가 報告한 多排卵 處理를 10回 反復한 경우 移植可能 受精卵數는 4.3±5.4~5.6±5.6個로서 差異가 없었다는 結果와 Hasler 等(1983)이 報告한 多排卵 處理를 10回 反復한 경우 採卵數는 7.8±7.0~12.6~12.6±10.2個로서 反復間에 어떠한 傾向도 보이지 않았다는 結果와 一致하였으나 Almeida(1987)가 報告한 多排卵 反復處理時 黃體數와 採卵數는 有意的인 아나나 多少 減少하는 傾向이었다는 結果와는 一致하지는 않는다. 이러한 報告者들간의 差異는 反復處理 間隔의 差異에서 起因되는 것으로 思料되며, 本 研究에서 反復間에 差異가 없었던 것은 90~120日 間隔으로 反復處理를 하였으며 最少한 2回의 正常 發情週期를 보인 供卵 牛단을 다음번 多排卵 處理에 供用하였기 때문에 反復處理에 따른 anti-hormone 生成에 의한 影響을 받지 않았던 것으로 思料된다.

2. 受精卵의 發育段階에 따른 受胎率

移植 受精卵의 發育段階에 따른 受胎率은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Effect of Developmental Stage of Embryos Transferred on Pregnancy Rate

Developmental stage	No. of recipients	No. of pregnant	Pregnancy rate(%)
Blastocyst	13	5	38.5
Morula	19	6	31.6
Total	32	11	34.4

Table 2에서 보는바와 같이 移植 受精卵의 發育段階에 따른 受胎率은 胚盤胞期胚가 38.5%로서 桑實胚의 31.6%보다 多少 높았으며 全體적으로 볼때 總 32頭中 11頭가 妊娠되어 34.4%의 受胎率을 보였다.

本 研究에서 나타난 胚盤胞期胚가 桑實胚보다 受胎率에 높은 結果는 Linder와 Wright(1982) 및 Pettit(1985) 등이 報告한 移植 受精卵의 發育段階

가 桑實胚 또는 胚盤胞期胚에 따라 移植後 受胎率에는 有意的인 差異가 認定되지 않았다는 結果와 一致하지는 않으나 Shea(1981)와 Wright(1981, 1985) 등이 報告한 移植 受精卵의 發育段階에 따른 受胎率은 桑實胚보다는 胚盤胞期胚가 좋았다는 結果와 一致하였다. 또한 Hasler 等(1987)이 報告한 移植 受精卵의 發育段階에 따른 受胎率은 初期 및 中期 胚盤胞期胚가 桑實胚나 擴張 胚盤胞期胚 보다 높았다는 結果와 本 研究에서 사용된 胚盤胞期胚가 初期 및 中期 胚盤胞期胚였기 때문에 一致하는 傾向이었다. 이러한 受精卵의 發育段階가 進行될 수록 移植後 受胎率에 좋은 結果는 受精卵의 發育段階가 進行될수록 受精卵의 細胞數가 增加하므로 同一한 方法에 의하여 採卵, 凍結 및 移植을 한 경우 體外操作에 의하여 같은 數의 細胞가 破壞되더라도 移植後 受胎率에 미치는 影響이 적었기 때문이라고 思料된다.

3. 移植 受精卵의 質

凍結 融解한 受精卵의 質이 移植後 受胎率에 미치는 影響은 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Effect of Grade of Embryo Transferred on Pregnancy Rate

Grade	No. of recipients	No. of pregnant	Pregnancy rate(%)
Good	27	9	33.3
Fair	5	2	40.0

Table 3에서 보는바와같이 移植 受精卵의 質이 優良(good)인 경우에는 33.3%로서 良好(fair)인 경우의 40.0%보다 受胎率에 多少 낮았다.

이러한 本 研究의 結果는 Leibo(1984)가 報告한 移植 受精卵의 質이 1(優秀), 2(優良) 및 3(良好)인 경우에 受胎率은 各各 37%, 35% 및 33%였으며 Nieman 等(1985)은 受精卵의 質이 1, 2 및 3에서 受胎率은 各各 56.4%, 33.3% 및 45.0%라고 報告하였으며 Wright(1985)는 受精卵의 質이 1, 2 및 3에서 受胎率은 各各 43.2%, 25.6% 및 23.4%로 報告하였으며 梁 等(1986)은 受精卵의 質이 1, 2 및 3에서 受胎率에 各各 68.9%, 35.9%, 및 40.0%로 報告하였으며 Hasler 等(1987)도 移植 受精卵의 質이 좋을수록 受胎率에 좋았다는 結果와

는一致하지 않았다. 이러한 本 研究의 結果와 다른 報告者들의 結果와의 差異는 本 研究에서 供試된 供試率의 頭數가 적었기 때문이라고 思料된다.

4. 供卵牛와 受卵牛의 發情 同期化

受精卵 移植時 供卵牛와 受卵牛의 發情 同期化 程度가 受胎率에 미치는 影響은 Table 4에 나타나 있다.

Table 4. Effect of Donor-Recipient Synchrony on Pregnancy Rate

Synchrony* (hrs)	No. of recipients	No. of pregnant	Pregnancy rate(%)
+12	8	5	62.5
0	15	5	33.3
-12	5	1	20.0
-24	4	—	—

*If the recipients were exhibited the estrus after the donors, it referred to "plus," and if before the donors, it referred to "minus."

Table 4에서 보는바와같이 受精卵 移植 受胎率은 供卵牛가 受卵牛보다 發情이 12時間 먼저 온것이 62.5%로서 供卵牛와 受卵牛가 發情이 同時에 온 경우의 33.3%와 供卵牛가 12時間 發情이 늦게 온것의 20.0%보다 높았다. 또한 供卵牛가 受卵牛보다 發情이 24時間 늦게 온것은 受胎가 되지 않았다.

本 研究에서 나타난 結果는 Wright(1981)와 Leibo(1984) 등이 報告한 受精卵 移植 受胎率은 受卵牛가 供卵牛보다 發情이 일찍 온 경우 發情이 同期化된 경우나 늦게 온 경우보다 좋았다는 結果, Srecnan等(1975)이 報告한 受胎率은 受卵牛와 供卵牛가 發情이 同期化된 경우가 가장 좋았으며 受卵牛가 供卵牛보다 發情이 일찍 온 경우가 늦게 온 경우보다 좋았다는 結果와 Newcomb(1975)가 報告한 受胎率은 受卵牛와 供卵牛가 發情이 同期化된 경우가 가장 좋았으며 受卵牛가 供卵牛보다 發情이 늦게 온 경우가 일찍 온 경우보다 結果와는 多少 一致하는 傾向은 아니나 Donaldson(1982)에 의하면 供卵牛와 受卵牛의 發情 同期化 程度는 36時間의 差異도 受精卵 移植 受胎率에는 有意的인 差異는 인정되지 않았다는 結果들을 綜合적으로 考察해 볼때 더 많은 供試頭數를 가지고 研究 檢討해 볼 必要가

있다고 思料된다.

그러나 本 研究에 供試된 頭數는 적었으나 供卵牛가 受卵牛보다 發情이 먼저 온 경우가 受胎率이 좋았던 結果로 미루어 볼 때 供卵牛에서 回收된 受精卵을 體外에서 保存溫度나 保存液等の 環境條件이 母體內的 條件에 비하여 떨어지므로 受精卵의 發育이 多少 抑制받을 수 있기때문에 供卵牛가 受卵牛보다 發情이 약간 빠른 것이 좋을 수 있다는 理論을 암시해 주는 것으로 좀더 研究해 볼 가치가 있다고 思料된다.

摘 要

本 研究는 韓牛에 있어서 供卵牛를 多排卵 反復處理하여 受精卵을 採卵, 凍結 및 移植하여 多排卵의 反復處理 効果와 受胎率에 影響을 미치는 要因中 移植 受精卵의 發育段階와 質 그리고 供卵牛와 受卵牛의 發情 同期化 程度가 受精卵 移植後 受胎率에 미치는 影響을 調査하기 위하여 實施하였다.

1. 多排卵 反復處理에 따른 黃體數, 採卵된 受精卵數 및 卵分割된 受精卵數는 反復間에 一定한 傾向은 보이지 않았으며 그 範圍는 各各 4.8±4.21~9.5±6.50個, 1.8±2.53~8.2±8.04個 및 1.6 ±2.32~4.0±4.59個였다.

2. 移植 受精卵의 發育段階에 따른 受胎率은 胚盤胞期胚가 38.5%로서 桑實胚의 31.6%보다 多少 좋았다.

3. 移植 受精卵의 質에 따른 受胎率은 優良의 경우 33.3%였으며 良好의 경우는 40.0%였다.

4. 供卵牛와 受卵牛의 發情 同期化 程度에 따른 受胎率은 供卵牛가 12時間 發情이 먼저 온 경우가 62.5%로서 同期化된 경우의 33.3%와 供卵牛가 12時間 늦게 온 경우의 20.0%보다 높았다.

引 用 文 獻

1. Almeida, A.P. (1987). Superovulatory responses in dairy cows repeatedly treated with PMSG. *Theriogenology*. 27: 205.
2. Donaldson, L.E. (1982). Embryo transfer in cattle. Rio Vista International Inc. San Antonio Texas. pp. 54-65.
3. Donaldson, L.E. and Perry B. (1983). Embryo

- production by repeated superovulation of commercial donor cows. *Theriogenology*, 20: 163-168.
4. Hasler, J.F., McCauley, A.D., Schermerhorn, E.C. and Foote, R.H. (1983). Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19: 83-97.
 5. Hasler, J.F., McCauley, A.D., Lathrop, W.F. and Foote, R.H. (1987). Effect of donor-recipient interactions of pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27: 139-168.
 6. Leibo, S.P. (1984). A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21: 767-790.
 7. Linder, G.M. and Wright, R.W., Jr. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-416.
 8. Newcomb, R. and Rowson, L.E.A. (1975). Conception rate after uterine transfer of cow eggs in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 43: 539-541.
 9. Newcomb, R. (1979). Surgical and non-surgical transfer of bovine embryos. *Vet. Rec.*, 105: 432-434.
 10. Newcomb, R. (1982). Egg recovery and transfer in cattle. In *mammalian egg transfer*. Ed. C.E. Adams. pp.81-118. CRC Press.
 11. Niemann, H., Tenhumberg, H., Sacher, B. and Kruff, B. (1985). Pregnancy rates after nonsurgical transfer in cattle embryos frozen and thawed by a field method. *Anim. Breed. abstr.*, 53: 206-207.
 12. Pettit, W.H. Jr. (1985). Commercial freezing of bovine embryos in glass ampule. *Theriogenology*, 23: 13-16.
 13. Shea, B.F. (1981). Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*, 15: 31-42.
 14. Sreenan, J.M., Beehan, D. and Mulvenhill, P. (1975). Egg transfer in the cow: Factors affecting pregnancy and twinning rate following bilateral transfer. *J. Reprod. Fertil.*, 44: 77-85.
 15. Whittingham, D.G., Leibo, S.p. and Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 178: 411-414.
 16. Wilmut, I and Rowson, L.E.A. (1973) Exoeronebts on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 92: 686-690.
 17. Wright, J.M. (1981). Non-surgical embryo transfer in cattle. Embryo-recipient interaction. *Theriogenology*, 15: 43-56.
 18. Wright, J.M. (1985). Commercial freezing of bovine embryos in straw. *Theriogenology*, 23: 17-29.
 19. 石瑚峯, 李光原, 申容植, 金浩重, 趙閔衍, 池大均, 任京淳, 알피엘스덴 (1983). 소의凍結受精卵의受胎에 미치는影響. 1 그리세롤 浮遊液에 의한 六段階平衡의影響. 韓畜誌, 25: 369-374.
 20. 梁甫錫, 吳成宗, 金熙錫, 李根常, 金康植, Oury, H. M (1986). 소의凍結受精卵移植에關한研究. 2.凍結受精卵移植에있어受胎率에影響하는要因에關한研究. 農試論文集(畜産. 家衛), 28: 14-17.