

젖소 동결수정란의 비외과적 이식에 있어서 수정란의 상태 및 이식조건이 수태율에 미치는 영향

이은송 · 조충호 · 황우석
서울대학교 수의과대학
(1989. 4. 29 접수)

Effects of stage and quality of embryo, synchrony between donor and recipient and difficulty of transfer on pregnancy rate following non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos

Eun-song Lee, Choong-ho Jo, Woo-suk Hwang
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Apr 29, 1989)

Abstract: This study was performed to investigate the effects of stage and quality of embryo, synchrony between donor and recipient and difficulty of transfer on pregnancy rate following non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos.

The results were as follows;

1. The overall pregnancy rate of this experiment was 63.4% and that of heifers(73.1%) was higher than that of cows(46.7%).
2. The pregnancy rates of recipients transferred with morulae, early blastocysts and blastocysts were 50.0%, 64.7% and 71.4%, respectively.
3. The pregnancy rate of recipients transferred with good embryos(67.9%) was higher than that of recipients transferred with fair embryos(53.8%).
4. The pregnancy rates of embryos transferred to left and right uterine horn were 63.2% and 63.6%, respectively.
5. The pregnancy rate of recipients in estrous synchrony 0(76.2%) was higher than those of recipients in synchrony -1(55.6%) and +1(44.4%).
6. The pregnancy rate of recipients transferred with 2 embryos(71.4%) was higher than that of recipients transferred with 1 embryo(61.8%).
7. The pregnancy rate of embryos transferred to uterine tip (72.0%) was higher than that of embryos transferred to uterine base(50.0%).
8. Ease of transfer was ranked to a scale of one to three on the basis of increasing difficulty. Transfers ranked as ease score 1 accounted for 77.8% of pregnancies and had higher pregnancy rate than ease score 2(66.7%) or 3(45.5%).
9. The pregnancy rate of recipients with excellent corpus luteum(CL) (70.0%) was higher than those of recipients with good CL(61.1%) or fair CL(61.5%).

In reviewing above results, it was considered that the factors such as embryo stage, embryo quality, estrous synchrony, corpus luteum quality, transfer site within uterus, recipient's parity

and ease score affected the pregnancy rate after non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos.

Key words: embryo transfer, frozen embryo, cattle, pregnancy rate, recipient.

서 론

소의 수정란이식은 1951년 Willett et al¹에 의해 처음으로 산자생산에 성공한 이후 많은 발전을 거듭하여 현재에 이르고 있으며, 최근 10여년간 수정란이식기술의 향상으로 축산 생산성 향상에 있어 중요한 분야로 부각되고 있다. 특히 수정란의 비외과적 채란,^{2,3} 비외과적 이식방법⁴과 액체질소를 이용한 수정란의 동결보존⁵⁻⁷이 성공적으로 이루어짐에 따라 수정란이식의 실용화가 가속화되고 있으며, 이 분야에 대한 연구도 실험적 또는 산업적 수준에서 활발히 진행되고 있다.

1973년 Wilmut과 Rowson⁸에 의해 동결란의 이식에 의한 송아지가 처음 태어난 이래, 동결란을 이용한 수정란이식에 있어서 이식후의 수태율에 영향을 미치는 요인을 연구하여 수태율을 향상시키기 위한 노력이 세계 각국에서 진행되어 왔으며⁸⁻¹¹ 국내에서도 이에 관한 연구가 수행되었다.¹²⁻¹⁵

Schneider et al¹⁶은 동결수정란이식후의 전체적인 수태율을 68%로 보고 하였으나, Wright¹⁷와 오등¹³은 각각 33.3%와 45.0%의 수태율을 보고하였다.

Lindner와 Wright Jr,¹⁸ Pettit Jr¹⁹ 그리고 Humblot et al²⁰은 수정란의 발육단계가 이식후의 수태율에 큰 영향을 미치지 않는다고 보고하였으나, Wright,^{3,17} Hasler et al,¹¹ 김등¹² 그리고 황과 조¹⁵는 배반포가 상실배기의 수정란보다 높은 수태율을 보였다고 보고하였고, Schneider¹⁶는 초기 상실배일때 가장 낮은 수태율을, Shea²¹는 탈출배반포(hatched blastocyst)일때 가장 높은 수태율을 나타냈다고 보고하였다.

Voss et al²²은 수정란의 질(quality)이 좋은 경우 수태율이 증가하는 경향이 있으나 유의적인 차이는 없다고 하였고, Niemann et al²³은 수정란의 질이 excellent, good 그리고 poor인 경우의 수태율을 각각 56.4%, 33.3%, 45.0%로 보고하였으나, Leibo,^{24,25} Humblot et al²⁰, Lindner와 Wright Jr,¹⁸ Renard et al²⁶ 그리고 Baker et al²⁷은 수정란의 질이 excellent나 good 일때가 poor 일때보다 수태율이 유의성있게 높았다고 보고하였다.

Sreenan과 Beehan,²⁸ Newcomb과 Rowson,²⁹ 그리고 Trounson et al⁶은 공란우와 수란우의 발정일차가 0일(같은 날에 발정이 온 경우) 일때 수태율이 가장 높았다고 보고하였고, 오등,¹³ Lindner와 Wright Jr¹⁸는

공란우가 수란우보다 발정이 빨리 왔을 경우 수태율이 높았다고 보고하였으나, Wright,³ Hasler et al¹¹ 그리고 Sreenan과 Diskin³⁰은 수란우가 공란우보다 발정이 빨리 왔을 경우 높은 수태율을 나타냈다고 보고하였다.

이식시의 난이도와 수정란의 자궁내 이식위치도 수태율에 영향을 미치는 중요한 요인으로 보고되었다. Curtis et al³¹과 Wright³는 이식의 난이도가 수태율에 큰 영향을 미치지 않는다고 보고하였으나, Godkin et al³² 및 Coleman et al³³은 이식의 난이도에 따른 수태율에 유의적인 차이가 있다고 보고하였다. Christie et al³⁴ 및 노등¹⁴은 수정란을 자궁자 선단에 이식시 높은 수태율을 보였다고 보고하였고, Sreenan과 Diskin³⁰은 이식부위에 따른 수태율에는 큰 차이가 없다고 보고하였다.

그 외에도 산차,^{3,13} 황체의 위치,^{35,36} 황체의 등급,^{11,20} 이식수정란의 수^{10,12} 등에 대한 연구도 진행되어 왔다.

이상에서 살펴본 바와 같이 수정란이식시 수태율에 영향을 미치는 것으로 보고된 요인은 매우 많으나, 연구자들에 따라 상이한 결과가 보고되었고 국내에서의 만족할 만한 연구결과도 부족한 실정이다. 따라서, 저자는 국내의 사양조건에서 사육되고 있는 Holstein 젖소에 동결수정란을 이식할 경우 수태율에 영향을 미칠 것이라고 사료되는 몇가지 요인을 조사, 검토하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물: 공란우: 공란우는 日本 北海道の 十勝育 成牧場에서 사육되고 있는 경산우와 미경산우를 이용하였다.

수란우: 수란우는 京畿道 일원의 목장에서 사육중인 Holstein종 젖소 59두로서 생후 18개월(체중 380kg) 이상 되고 정상 발정주기를 보이며 임상적 소견과 임상병리학적 검사에 의하여 건강하다고 인정되는 미경산우 29두와, 분만 후 60일 이상 경과하고 이식전까지 3회 이상의 정상발정주기를 보인 경산우 30두를 발정 동기화 시킨 후 생식기 및 발정황체가 이식에 적합하다고 인정되는 41두(경산우 15두, 미경산우 26두)를 선발하여 발정 7일 전후에 동결수정란을 이식하였다(Table 1).

발정동기화: 수란우는 발정주기에 관계없이 25mg의 prostaglandin F₂ α(Lutalyse*, Upjohn Co., USA;

Table 1. Classification of recipients

Recipient	No. of recipients synchronized	No. of recipients transferred
Cow	29	15
Heifer	30	26
Total	59	41

이하 PGF₂ α를 11일 간격으로 2회 근육 주사하여 발정동기화를 유도하였으며, PGF₂ α 처치 후 1일 3회, 1회 30분 이상 관찰하여 standing estrus를 보이는 개체를 발정우로 규정하였다.

수정란의 동결 및 용해: 동결수정란은 日本 北海道 지방의 十勝育成牧場에서 채란, 동결된 것을 사용하였으며, 용해전까지 소형 액체질소탱크내에 보존된 상태로 목장까지 운반하였다.

수정란의 동결: 동결보존액은 50% semi-fetal calf serum(이하 SFCS)이 포함된 Dulbecco's phosphate-buffered saline(이하 PBS)에 glycerol을 1.4M되게 첨가한 액을 사용하였으며, 이 동결보존액에 직접 수정란을 넣어 10분간 평형시킨 후 0.25ml 인공수정용 straw에 수정란을 흡입하여 끝을 straw powder로 봉하였다.

동결은 컴퓨터 동결기(Hoxan PSP, Japan)를 이용하여 실시하였으며, 동결개시 온도를 20°C로, -7°C

까지는 1°C/min의 속도로 하강시키고, -7°C에서 10분간 식빙(植氷: seeding)시킨 후 -30°C까지는 0.3°C/min의 속도로 하강시켰으며, -30°C에서 10분간 정지시켰다가 수정란이 포함된 straw를 꺼내어 직접 액체질소에 넣어 동결보존하였다(Fig 1).

동결수정란의 용해: 동결수정란의 용해는 37°C의 온수에 수정란이 포함된 동결 straw를 넣고 30초간 진탕시키는 급속용해법을 응용하였다.

용해 후 straw의 끝을 절단, 수정란을 1.4M glycerol이 함유된 50% SFCS+PBS액 0.5ml에 옮긴 후 30% SFCS+PBS액을 0.1ml 첨가하여 5분간 정지시키고, 이어 동일한 액을 0.2ml 첨가 후 5분, 0.2ml 첨가 후 10분, 0.5ml 첨가 후 5분, 1.5ml 첨가 후 5분, 2.5ml 첨

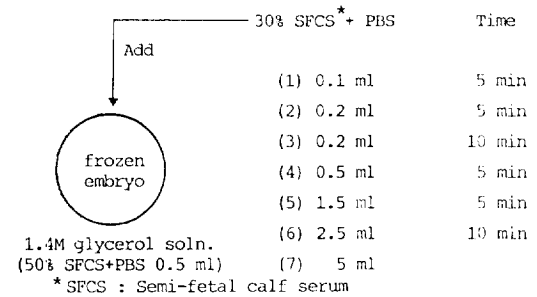
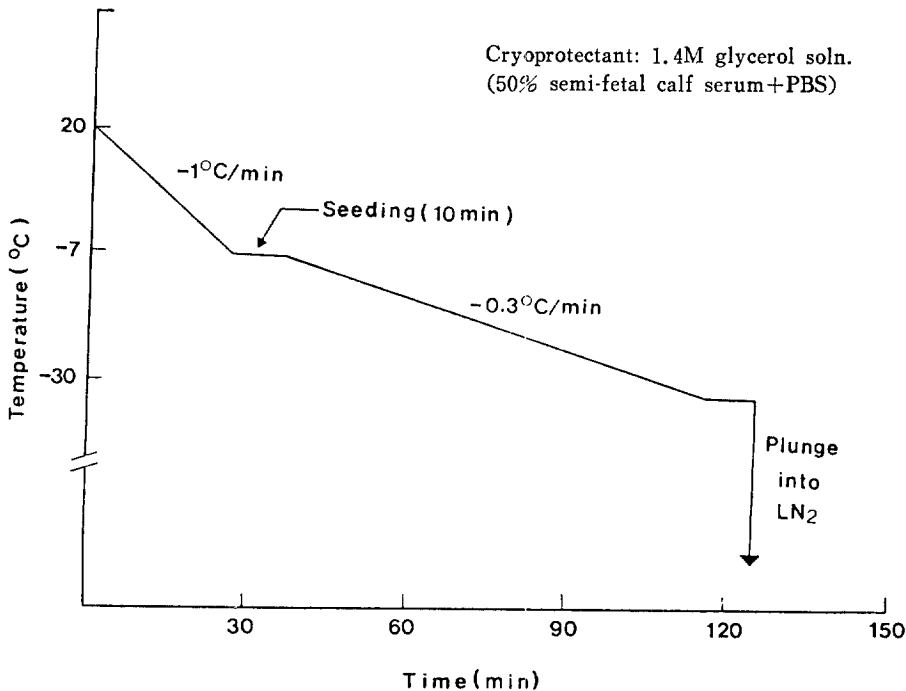


Fig 2. Removal of cryoprotectant.



Cryoprotectant: 1.4M glycerol soln. (50% semi-fetal calf serum+PBS)

Fig 1. Freezing curve.

가 후 10분간 정치시킨 다음, 마지막으로 5ml를 첨가하여 동결보호제를 단계적으로 제거하였다¹⁵(Fig 2). 동결보호제의 제거는 37°C로 조정된 전자활력검사판(FHK, Japan) 위에서 실시하였다.

수정란의 검사: 동결보호제를 제거한 후 각 수정란을 실험현미경(Olympus Optical Co., Japan)하에서 60배로 관찰하여, Wright³의 방법에 준하여 발육단계 및 질(quality)을 분류하였다.

수정란의 발육단계(embryo stage): 각 수정란을 Table 2와 같이 세 단계로 분류하였다. 즉, 16세포 이상을 함유하고 각 핵의 구분이 명확하거나 또는 더욱 진행되어 compaction이 이루어져 있으나 포배강(blastocoele)은 형성되지 않은 상태를 상실배(morula)로, 포배강이 형성되어 있고 signet ring형태를 나타내는 것을 초기배반포(early blastocyst)로, 초기배반포보다 더욱 확장된 포배강을 가지고 있으나 완전히 확장되지 않은 것을 배반포(blastocyst)로 분류하였다.

수정란의 질(embryo quality): 각각의 발육단계가 정상이며 변성된 세포를 거의 함유하지 않는 것을 good으로, 변성된 세포를 함유하거나 형태의 이상이 존재하는 난으로서 그 정도가 미약하고, 동시에 채워진 다른 난보다 발육이 지체되어 있는 것을 fair로 분류 하

Table 2. Classification of embryo stage

Stage	Characteristics
Morula	Contains more than 16 cells that are distinct individuals or compacted mass
Early blastocyst	Blastocoele just starting to appear
Blastocyst	Large blastocoele and trophoblast

Table 3. Classification of embryo quality

Quality	Characteristics
Good	No major morphological defects
Fair	Extraneous degenerate cells or abnormal shape

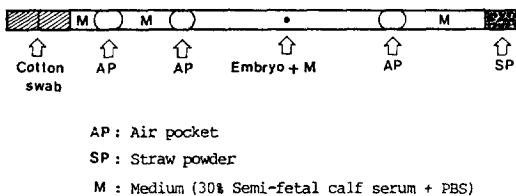


Fig 3. Diagram of straw loaded with one embryo.

였다(Table 3).

이어 1개 또는 2개의 수정란을 0.25ml 인공수정용 straw에 흡입한 후 straw 끝을 straw powder로 봉하여 이식할때까지 실온에서 보존하였다(Fig 3).

수란우의 검사: 체온 측정: 수정란을 이식하기 전에 수란우의 체온(rectal temperature)을 측정하여 정상범위(37.5~39.5°C)를 벗어나는 소는 이식에서 제외하였다.

황체의 위치 및 등급: 직장검사를 실시하여 황체의 위치(좌측 또는 우측)를 확인하고, Coleman et al³⁰의 분류기준에 준하여 황체의 크기가 정상(15~25mm)이고 좋은 형태의 crown을 지닌 것을 excellent로, 크기가 정상이하(<15mm)이나 crown을 지닌 것을 good으로, 정상의 크기이나 crown이 없는 것을 fair로, 그리고 정상이하의 크기이며 crown이 없는 것을 poor로 하여 황체의 등급을 분류하였으며(Table 4), poor 등급의 황체를 지닌 수란우는 이식에서 제외하였다.

수정란의 이식: 수란우와 공란우의 발정일차: 수란우가 공란우보다 1일 먼저 발정이 온 것을 -1로, 같은 날에 온 것을 0으로, 그리고 공란우가 수란우보다 1일 먼저 발정이 온 것을 +1로 분류하였으며(Table 5), 수정란의 발육단계를 비교하여 이식할 수란우를 결정하였다.

이식: 수란우는 이식직전 2% lidocaine액 5ml로 경막의 마취를 실시하였다. 주사 후 꼬리를 묶어 앞으로 고정시키고 비눗물과 소독액으로 외음부 및 외음부 주위를 세척한 후 멸균 생리식염수로 다시 한번 세정하

Table 4. Classification of corpus luteum(CL) quality

CL quality	Palpation remarks
Excellent	Normal size(15 to 25mm) with good crown
Good	Small size(<15mm) with palpable crown
Fair	Normal size without crown
Poor*	Small size without crown

* Recipients with poor grade CL were not transferred.

Table 5. Classification of estrous synchrony

Estrous synchrony	Recipient in estrus
-1	One day before donor
0	On the same day with donor
+1	One day after donor

Table 6. Classification of ease score

Ease score	Time required for transfer(min)
1	<6
2	6~10
3	>10

고 멸균된 tissue paper로 물기를 제거하였다.

Rowe et al⁴의 방법에 준하여 straw가 장착된 수정란이식기를 이용, 비외과적 자궁경관 경유법에 의해서 황체가 존재하는 자궁각에 수정란을 이식하였다. 사용된 수정란 이식기는 질내세균의 자궁내 감염을 막기 위해 특별히 고안된 plastic cap을 Cassou gun에 장착한 것으로, 수정란이식기가 자궁경에 도달한 다음 자궁경을 통과하기 직전에 이 plastic cap을 제거하여 이식기만을 자궁내로 삽입하였다.

이식의 난이도: 이식시 경관을 통과하는 데 소요된 시간이 5분 이하인 경우를 난이도 1로, 6~10분인 경우를 2로, 11분 이상인 경우를 3으로 분류하였으며 (Table 6), 이식 후 이식기의 끝을 관찰하여 출혈유무를 확인하였다.

수란우는 이식 전 12시간 절식시켰으며 이식과정에 사용된 모든 기구는 ethylene oxide로 멸균하였다.

수태율 판정: 수정란 이식 후 90일에 직장점사를 실시하여 태막 및 태아촉진법으로 수태여부를 판정하였다.

결 과

젖소 동결수정란의 비외과적 이식시 수태율에 영향을 미치는 요인을 조사한 결과는 다음과 같다.

본 실험에 있어서 동결수정란이식 후의 전체적인 수태율은 41두를 이식, 26두가 수태되어 63.4%를 나타냈다.

수란우의 산차에 따른 수태율은 Table 7과 같다. 즉 경산우에서는 15두를 이식해서 7두가 수태되어 46.7%의 수태율을 보였고 미경산우는 26두중 19두가 수태되어 73.1%의 수태율을 보여, 경산우에서보다 미경산우에서 수태율이 높았다.

수정란 발육단계의 수태율에 대한 영향은 Table 8과 같다. 상신패, 초기배반포 그리고 배반포군의 수태율은 각각 50.0%(5/10), 64.7%(11/17) 그리고 71.4%(5/7)로서 발육단계가 진행될수록 증가하였다.

이식한 수정란의 질에 따른 수태율은 Table 9와 같다. Good 등급의 수정란 이식군에서는 28두중 19두가 수태되어 67.9%의 수태율을, fair 등급의 수정란 이식군에서는 13두중 7두가 수태되어 53.8%의 수태율을

Table 7. Effect of recipient's parity on pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos

Recipient	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D 90(%)
Multiparous cow	15	7(46.7)
Primiparous heifer	26	19(73.1)

Table 8. Effect of embryo stage on pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos

Stage of embryo	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D 90(%)
Morula	10	5(50.0)
Early blastocyst	17	11(64.7)
Blastocyst	7	5(71.4)

Table 9. Effect of embryo quality on pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos

Embryo quality	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D 90(%)
Good	28	19(67.9)
Fair	13	7(53.8)

Table 10. Effect of side of transfer on pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos

Side of transfer	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D 90(%)
Left horn	19	12(63.2)
Right horn	22	14(63.6)

보였다. 두 군에서의 수태율은 good 등급의 수정란 이식군이 fair 등급의 수정란 이식군에 비해 높게 나타났다.

이식위치에 따른 수태율은 Table 10과 같다. 좌측 자궁각에 수정란을 이식한 군에서는 63.2%(12/19)의 수태율을 보였고 우측 자궁각에 수정란을 이식한 군에서는 63.6%(14/22)의 수태율을 보였다.

수란우와 공란우의 발정일차에 따른 수태율은 발정일차가 -1인 군이 55.6%(5/9), 0인 군이 76.2%(16/21), 그리고 +1인 군이 44.4%(4/9)로서 발정일차가 0일때 가장 높은 수태율을 보였다(Table 11).

이식한 수정란의 수에 따른 수태율은 Table 12와 같다. 1개의 수정란을 이식한 군에서는 61.8%(21/34)의 수태율을 보였고 2개를 이식한 군에서는 71.4%(5/7)의 수태율을 보여, 1개 이식군에 비해 2개의 수정란을

Table 11. Effect of donor-recipient synchrony on pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos

Estrous synchrony	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D 90(%)
-1*	9	5(55.6)
0**	21	16(76.2)
+1***	9	4(44.4)

* Recipient in estrus 1 day before donor.
 ** Recipient in estrus on the same day with donor.
 *** Recipient in estrus 1 day after donor.

Table 12. Effect of number of embryos transferred on pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos

No. of embryos transferred	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D 90(%)
1	34	21(61.8)
2	7	5(71.4)

Table 13. Effect of transfer site on pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos

Transfer site	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D 90(%)
Uterine tip*	25	18(72.0)
Uterine Base**	16	8(50.0)

* 2~5cm from utero-tubal junction.
 ** Mid to base of uterine horn.

Table 14. Effect of ease of transfer on pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos

Ease score*	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D 90(%)
1	9	7(77.8)
2	21	14(66.7)
3	11	5(45.5)

* Ease score 1 required less than 6 minutes for transfer.
 Ease score 2 required 6 to 10 minutes for transfer.
 Ease score 3 required over 10 minutes for transfer.

이식한 군에서 높은 수태율을 보였다.

수정란의 자궁내 이식위치에 따른 수태율은 Table 13과 같다. 자궁각선단에 수정란을 이식한 군에서는 25두중 18두가 수태되었고(72.0%), 자궁각 지지부에 이식한 군에서는 16두중 8두가 수태되어(50.0%) 자궁

Table 15. Effect of corpus luteum quality on pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos

CL quality	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D 90(%)
Excellent*	10	7(70.0)
Good**	18	11(61.1)
Fair***	13	8(61.5)

* Normal size(15 to 25mm) with good crown.
 ** Small size(<15mm) with palpable crown.
 *** Normal size without crown.

각 선단부에 수정란을 이식한 군에서 수태율이 높았다. 이식의 난이도에 따른 수태율은 Table 14와 같다. 이식의 난이도가 1, 2, 3인 경우의 수태율은 각각 77.8% (7/9), 66.7%(14/21), 그리고 45.5%(5/11)로서 이식의 난이도가 증가할수록 수태율은 감소하였다.

이식시 직장점사로 축진한 황체의 등급에 따른 수태율은 Table 15와 같다. 황체의 등급이 excellent, good 그리고 fair인 군의 수태율은 각각 70.0%(7/10), 61.1%(11/18), 61.5%(8/13)로서 황체의 등급이 excellent 인 군이 good이나 fair 군에서보다 높은 수태율을 보였다.

고 찰

수정란이식에 의한 수태율은 다양한 연구를 통하여 향상되어 왔고, 특히 소의 동결수정란 이식시 수태율을 향상시키기 위한 노력으로서 공란우, 수정란, 그리고 수란우의 상호작용과 이식조건의 측면에서 많은 연구가 진행되어 왔다.

Schneider et al¹⁶은 동결수정란이식후의 수태율을 68%로 보고하였고, Wright¹⁷와 오등¹³은 각각 33.3%와 45.0%의 수태율을 보고하였다. 본 실험에서 동결수정란이식후의 전체적인 수태율은 63.4%로서 Schneider et al¹⁶의 68%보다는 낮았으나 Wright¹⁷와 오등¹³의 결과보다는 높게 나타났다.

Wright³와 Godkin et al³²은 산차에 따른 수태율에서 미경산우와 경산우의 수태율을 각각 58%, 59% 그리고 35%, 33%로 큰 차이가 없다고 보고하였고, De los Santos-Valadez et al³⁷과 오등¹³은 미경산우가 경산우에서보다 높은 수태율을 나타내는 경향이 있다고 보고하였다. 본 실험에서 미경산우와 경산우의 수태율은 각각 73.1%와 46.7%로서, 이 결과는 De los Santos-Valadez et al³⁷과 오등¹³의 결과와 일치하는 경향이 있었으나 Wright³와 Godkin et al³²의 결과와는

일치하지 않았으며, 인공수정 후의 초기태아사율이 4~5산의 경산우보다 미경산우에서 높다는 Erb와 Holtz³⁸의 보고와도 일치하지 않았다. Del Campo et al³⁹은 교배적기에 도달되지 않은 미경산우는 성숙한 미경산우와 경산우에서보다 발정주기가 짧은 경향이 있으며, 수태가 성립되려면 수정란에 의한 더 큰 황체 형성자극을 필요로 한다고 보고하였고, Newcomb et al⁴⁰은 경산우는 미경산우보다 이식시의 경관통과가 용이하기 때문에 경산우에서 높은 수태율을 얻을 수 있다고 보고하였으나, Wright³는 미경산우가 18개월 이상 되어 교배적기일 때는 경관통과가 큰 문제가 되지 않는다고 보고하였다. 본 실험에 사용된 미경산우는 18개월 이상 되어 교배적기에 도달된 개체로서 Del Campo et al³⁹과 Newcomb et al⁴⁰이 보고한 문제점은 없었던 것으로 생각된다. 이상의 결과에서 볼때 미경산우를 수란우로 사용하면 경산우에서보다 더 높은 수태율을 기대할 수 있으며, 미경산우를 사용시 18개월 이상의 성숙한 개체를 사용해야 될 것으로 사료된다.

본 실험에서 상실배, 초기배반포, 배반포 수정란을 이식한 후의 수태율은 각각 50.0%, 64.7% 그리고 71.4%로서 수정란의 발육단계가 진행될수록 수태율이 증가하는 경향이 있었다. 이 결과는 황과 조¹⁵의 상실배 33.3%, 초기배반포 47.1%, 배반포 53.8%, Donaldson⁴¹의 상실배보다는 초기배반포와 중기배반포에서 수태율이 높았다는 보고와 일치하는 경향을 보였으나, Remsen et al⁴²의 상실배와 배반포의 수태율이 각각 75.0%, 37.5%로서 상실배가 배반포보다 수태율이 높았다는 보고와 Pettit Jr,¹⁹ Lindner와 Wright Jr¹⁸의 수정란의 발육단계에 따른 수태율에는 큰 차이가 없다고 한 보고와는 일치하지 않았다. 이와 같이 보고자에 따라 다양한 결과가 나타나는 것은 이식시의 조건, 수란우와 공란우의 발정일차 등, 수정란 발육단계 이외의 다른 조건이 수태율에 영향을 미치기 때문인 것으로 생각된다. Lindner와 Wright Jr,¹⁸ Donaldson⁴¹은 채란일에 따라 수정란발육단계의 빈도를 분류했는데 발정 후 7일에 채란한 경우 초기배반포와 배반포가 가장 많이 나타났다고 보고하였으며, Lindner와 Wright Jr¹⁸는 수란우의 발정일차와 수정란의 발육단계와의 일치가 중요한 요인이라고 보고하였다. 또한 Hasler et al¹¹은 상실배의 수정란은 다른 발육단계의 난보다 형태학적으로 평가하는 것이 어렵다고 보고하였다. 따라서 7일째에 채란된 상실배 수정란은 과배란처치를 받은 공란우의 부적당한 자궁환경에 의해 정상적인 초기배반포나 배반포보다 발육이 지체된 것으로 생각할 수 있다. 이식 후 상실배가 초기배반포나 배반포보다 낮

은 수태율을 보인 원인이 상실배 수정란 자체의 결합 때문인지 아니면 단지 발육이 지체된 이유때문인지는 확실하지 않으나 이러한 요인들이 복합적으로 작용하여 영향을 주는 것으로 생각된다.

Niemann et al⁴³은 수정란의 질이 excellent, good, poor일때의 수태율을 각각 56.4%, 33.3%, 그리고 45.0%로 poor급의 수정란을 이식한 군에서도 높은 수태율을 보였다고 보고하였고, Lindner와 Wright Jr¹⁸은 excellent와 good이 fair나 poor급의 수정란에 비해 유의성있게 높은 수태율을 나타냈다고 보고하였으며, Baker et al²⁷은 A와 B급 수정란이식군간에는 수태율에 유의차가 없으나 C급의 수정란을 이식했을 경우 낮은 수태율을 보였다고 보고하였다. 본 실험에 있어서 good과 fair급의 수정란을 이식한 후의 수태율은 각각 67.9%와 53.8%로서 Niemann et al⁴³의 보고와는 일치하지 않았으나 Lindner와 Wright Jr¹⁸의 보고와, 수정란의 질이 증가시 수태율도 증가했다는 Voss et al²¹의 보고와는 일치하는 경향이 있었다. 따라서, 동결수정란을 이식시 수정란의 질이 좋을수록 높은 수태율을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

Reece와 Turner,⁴⁴ Hasler et al⁴⁵은 소에 있어서 좌측난소보다는 우측난소에서 배란율이 높으며 기능적으로도 우측난소가 활성이 강하다고 보고하였다. 본 실험에 있어서 수정란을 좌측 자궁각과 우측 자궁각에 이식한 후의 수태율은 각각 63.2%와 63.6%로서 이 결과는 좌측과 우측에 따른 수태율간에는 유의적 차이가 없다고 한 Wright³, Remsen et al⁴²과 Weaver et al³⁶의 보고와 일치하는 경향이 있었다. 또한 본 실험에 사용된 수란우에 있어서 황체의 53.7%가 우측에 존재했는데 이것은 Hasler et al⁴⁵과 Reece와 Turner⁴⁴의 보고와 일치하였으나, 동결란이식 후의 수태율은 좌우측에 따른 난소의 활성차이에 의해 영향을 받지 않는 것으로 사료된다.

Northey et al⁴⁶은 수정란이식 당일에 채취한 혈청의 progesterone 수준이 2.00~6.00ng/ml⁶일때 높은 수태율을 얻었다고 보고하였다. 그러나 Stubbings와 Walton⁴⁷은 혈청 progesterone 수준은 이식당일에 바로 측정할 수 없기 때문에 직장점사를 통해 황체를 촉진하여 수란우를 선발해야 한다고 하였다. 본 실험에서 황체의 등급이 excellent, good, fair인 군의 수태율은 각각 70.0%, 61.1%, 61.5%로서 황체의 등급이 excellent인 군에서 가장 높게 나타났다. 이 결과에서 excellent와 good군의 수태율은 황과 조¹⁵의 59.3%, 50.0%, 25.0%, Hasler et al¹¹의 76%, 72%, 79%에서와 유사한 경향을 보였으나, 3군이 1, 2군에 비해 유

의성 있게 낮은 수태율을 보였다는 황과 조¹⁵의 보고와는 일치하지 않았다. 황체의 등급이 good인 군이 fair인 군에서와 유사한 수태율을 보인 것은 직장점사에 의한 황체의 등급이 progesterone 수준과 정확히 일치하지 않았으며 수태율과 황체의 등급과는 일관성있는 상관관계가 없다는 Ott et al⁴⁸과 Donaldson⁴⁹의 보고와 일치하는 것으로 생각된다. Hasler et al¹¹은 황체의 등급과 progesterone 수준이 일치하지 않는 것은 발정 시간을 정확히 관찰하지 못했기 때문이라고 보고하였다. 따라서 수란우를 선발하는데 있어 황체의 측정에 의한 방법보다는 발정증상과 발정이 온 시간을 정확히 관찰한 후 crown을 확인하여 수란우를 선발하는 것이 수정란이식 후의 수태율 향상에 도움이 되리라 생각된다.

Trounson et al⁶은 수란우와 공란우의 발정일차가 -1, 0일때의 수태율을 21.4%, 36.8%로 보고하였고, Newcomb과 Rowson²⁹도 발정일차가 0일 일때 가장 높은 수태율을 얻었다고 보고하였다. 또한 오동¹³과 Lindner와 Wright Jr¹⁸는 공란우가 수란우보다 발정이 빨리 왔을 경우 수태율이 높았다고 보고하였고, Wright,³ Hasler et al¹¹과 Sreenan과 Diskin⁵⁰은 수란우가 공란우보다 발정이 빨리 왔을 경우 수태율이 높게 나타났다고 보고하였다. Nelson et al⁵¹은 질이 낮은 수정란에서보다는 질이 높은 수정란을 이식시 발정일차에 의한 영향이 크다고 보고하였으며, Lindner와 Wright Jr¹⁸는 발정일차 2일까지의 차이는 수태율에 큰 영향이 없으며 발정일차보다는 수란우와 수정란의 발육단계와의 관계가 수태율에 있어 더욱 중요한 문제라고 보고하였다. 본 실험에서 발정일차가 -1, 0, +1인 경우의 수태율은 각각 55.6%, 76.2%, 44.4%로서 발정일차가 0인 군이 가장 높은 수태율을 보였다. 이 결과는 Trounson et al⁶, Newcomb과 Rowson²⁹의 결과와 일치하는 경향이 있었으나 오동¹³과 Hasler et al¹¹의 보고와는 일치하지 않았다. 이와 같이 보고자들에 따라 다양한 결과를 보인 원인은 수정란의 발육단계와 질에 따른 차이에 기인되는 것으로 생각되며 수정란의 질과 발육단계, 발정일차와의 상호작용에 대해서는 더 많은 연구가 요망된다.

본 실험에서 1개 또는 2개의 수정란을 이식한 군의 수태율은 각각 61.8%와 71.4%로, 이 결과는 이식한 수정란의 수가 증가할수록 수태율이 증가했다는 Heyman¹⁰의 보고와, 1, 2, 3개의 수정란 이식 후 87.1%의 높은 수태율을 보고한 Sreenan과 Beehan²⁸의 결과와 일치하는 경향을 보였으나, 1개 이식군보다 2개 이식군에서 수태율이 낮았다는 김동¹²의 결과와는 일치하

지 않았다. Thatcher et al,⁵² Heyman¹⁰ 그리고 Sreenan과 Diskin⁵⁰은 모축의 자궁에 태아(conceptus)가 존재시 태아와 자궁내막으로부터 단백질, steroid대사 산물 등이 생성되며, PGF₂ α의 생성을 억제하여 황체퇴행을 억제한다고 보고하였다. 위의 보고에서 볼때 이식한 수정란의 수가 증가시 수정란의 모체에 대한 신호가 강해짐으로써 수태가능성이 증가되는 것으로 생각되며 따라서 2개의 수정란을 이식하는 것은 수정란 이식후의 수태율 향상을 위한 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

수정란의 자궁내 이식위치에 대해서 노동¹⁴과 Christie et al³⁴은 수정란을 자궁각 선단에 이식시 자궁각 기저부에서보다 현저히 높은 수태율을 보였다고 보고하였고, Sreenan과 Diskin⁵⁰ 그리고 Seidel¹³은 자궁각 선단에 수정란을 이식시 수태율이 증가하는 경향이 있으나 그것은 수정란의 일령(age)과 수란우(경산우 또는 미경산우)에 따라 다를 것이라고 보고하였다. 또한 Sreenan과 Diskin⁵⁰은 수정란을 비외과적으로 자궁각 선단에 이식시 자궁에 상처를 줄 수 있으며 이로 인해 태아사멸을 증가시킨다고 하였다. 본 실험에서 자궁각 선단과 기저부에 수정란을 이식한 후의 수태율은 72.0%와 50.0%였다. 이 결과는 노동¹⁴과 Christie et al³⁴의 보고와 일치하는 경향이 있었다. Christie et al³⁴은 자궁각 선단에 수정란을 이식시 높은 수태율을 보이는 이유는 수정란의 자궁내 위치가 황체형성 자극 신호(luteotropic signals)와 황체퇴행억제 신호(anti-luteolytic signals)를 난소에 전달하는데 영향을 줄 수 있으며 자궁각 선단이 초기 발육단계의 수정란이 영양을 공급받을 수 있는 좋은 장소일 가능성이 있다고 보고하였고, Ginther⁵⁴는 아마도 난소 hormone이 counter current mechanism을 통해 자궁각 선단에 직접적으로 전달되며, 자궁각 선단에서의 높은 progesterone 수준이 자궁내막의 분비를 증가시킬지도 모른다고 하였다. 자궁각 선단에서 높은 수태율을 보인 이유가 영양적인 요소때문인지 기술적인 문제때문인지는 명확하지 않으나 수정란을 자궁각 선단에 이식시 높은 수태율을 얻을 수 있는 것으로 생각된다.

황과 조,¹⁵ Godkin et al³²은 수정란이식시의 난이도가 수태율에 유의적인 영향을 미친다고 보고하였고, Wright³는 난이도가 1, 2, 3일때의 수태율이 각각 59%, 57%, 50%로 큰 차이가 없다고 보고하였다. 본 실험에서 이식의 난이도 1, 2, 3에 따른 수태율은 각각 77.8%, 66.7%, 45.5%로서 황과 조¹⁵의 보고와 유사한 경향을 보였다. 황과 조¹⁵는 이식에 소요되는 시간이 증가시 자궁경관을 자극하여 황체퇴행을 유도함으로써

수태율이 저하 될 수 있다고 하였고, Tervit et al⁵⁵은 수정란을 자궁각 선단에 이식하기 위해 장시간이 경과 할 경우 수란우에 강한 stress를 주며 자궁내막에 손상을 줌으로써 수태율이 낮아진다고 추정하였다. 위의 보고에서 볼때 이식의 난이도는 많은 경험과 이식의 숙련도와 관련이 있으며, 이식에 소요되는 시간을 단축하고 이식기술의 숙련도를 증가시킴으로써 수태율을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

이 실험의 결과와 선인들의 연구보고에서 볼때 동결 수정란 이식시 수태율에 영향을 미치는 요인들은 매우 다양하게 나타나고 있다. 따라서 수태율에 영향을 미치는 요인들을 개선함으로써 동결수정란 이식후의 수태율을 향상시킬 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 요인들간의 복합적인 관계에 대해서는 앞으로 더욱 많은 연구가 행해져야 할 것으로 사료된다.

결 론

젖소 동결수정란을 Holstein 젖소에 비외과적으로 이식한 후, 수정란과 수란우의 상태 및 이식조건이 수태율에 미치는 영향을 조사한 결론은 다음과 같다.

1. 본 실험에서 동결수정란 이식후의 전체적인 수태율은 63.4%였으며, 경산우(46.7%)보다 미경산우(73.1%)에서 수태율이 높게 나타났다.

2. 상실배, 초기배반포, 배반포의 수태율은 각각 50.0%, 64.7%, 그리고 71.4%로서 발육단계가 진행될수록 수태율이 증가하였다.

3. Good 등급의 수정란 이식군(67.9%)이 fair 등급의 수정란 이식군(53.8%)에서보다 높은 수태율을 보였다.

4. 좌측자궁각에 수정란을 이식한 군과 우측자궁각에 수정란을 이식한 군은 각각 63.2%와 63.6%의 수태율을 보였다.

5. 발정일차가 0인 군(76.2%)이 -1, +1인 군(55.6%, 44.4%)에 비해 높은 수태율을 보였다.

6. 수정란을 2개 이식한 군(71.4%)이 수정란을 1개 이식한 군(61.8%)에서보다 높은 수태율을 나타내었다.

7. 수정란을 자궁각 선단부에 이식한 군(72.0%)이 자궁각 기저부에 이식한 군(50.0%)보다 높은 수태율을 보였다.

8. 이식의 난이도가 증가할수록 수태율이 감소하였다(1; 77.8%, 2; 66.7%, 3; 45.5%).

9. 황체의 등급이 excellent인 군(70.0%)이 good(61.1%)과 fair인 군(61.5%)에서보다 높은 수태율을 보였다.

이상의 결과를 종합하면, 수란우의 산차, 수정란의

발육단계 및 질, 공란우와 수란우의 발정일차, 자궁각 내의 이식위치, 이식의 난이도, 이식한 수정란의 수, 황체의 등급 등이 동결수정란 이식시 수태율에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Willett EL, Black WG, Casida LE, et al. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 1951;113:247.
2. Newcomb R, Christie WB, Rowson LEA. Non-surgical recovery of bovine embryos. *Vet Rec* 1978;102:414~417.
3. Wright JM. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology* 1981;15:43~56.
4. Rowe RF, Del Campo MR, Crister JK, et al. Embryo transfer in cattle. *Am J Vet Res* 1980; 41:1024~1028.
5. Wilmut I, Rowson LEA. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973;92:686-690.
6. Trounson AO, Shea BF, Ollis GW, et al. Frozen storage and transfer of bovine embryos. *J Anim Sci* 1978;47:677~681.
7. Lehn-Jensen H, Greve T. Preservation of bovine blastocysts in liquid nitrogen using two different freezing/thawing rates and DMSO/glycerol as cryoprotectants. *Theriogenology* 1980;13:100.
8. Elsdon RP, Seidel Jr GE, Takeda T, et al. Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology* 1982; 17:1~10.
9. Donaldson LE. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. *Vet Rec* 1985a;117:489 ~491.
10. Heyman Y. Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. *Theriogenology* 1985;23:63~75.
11. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, et al. Effect of doner-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 1987;27:139 ~168.
12. 김희석, 오성중, 양보석등. 소에 있어서 이식수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인에 관한 연구.

- 한국축산학회지 1986;28:578~583.
13. 오성중, 양보석, 김희석등. 소의 발정동기화 및 동결수정란 이식에 관한 연구. 한국축산학회지 1986; 28:468~473.
 14. 노환철, 정광업, 신규용등. 우 동결 수정란의 산업적 이용에 관한연구. 한국축산학회지 1988;30: 151~159.
 15. 황우석, 조충호. 소의 비외과적 수정란이식에 있어서 수태율에 영향을 미치는 요인. 한국임상수의 학회지 1988;5:1~7.
 16. Schneider Jr HJ, Castleberry RS, Griffin JL. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* 1980;13:73~85.
 17. Wright JM. Commercial freezing of bovine embryos in straw. *Theriogenology* 1985;23:17~ 29.
 18. Lindner GM, Wright Jr RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 1983;20:407~416.
 19. Pettit WH Jr. Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules. *Theriogenology* 1985; 23:13~16.
 20. Humblot P, Perrin J, Jeanguyot N, et al. Effects of age and quality of thawed embryos, synchroni- zation and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Therio- genology* 1987;27:240.
 21. Shea BF. Evaluating the bovine embryo. *The- riogenology* 1981;15:31~42.
 22. Voss HJ, Landmann D, Wilke G, et al. Pregnancy rate after surgical transfer of imported frozen bovine embryos. *Theriogenology* 1986;25:209.
 23. Niemann H, Tenhumberg H, Sacher B. Pregnan- cy rates after nonsurgical transfer of cattle embryos frozen and thawed by a field method. *Anim Breed Abstr* 1985;53:206~207.
 24. Leibo SP. Field trial of one-step diluted frozen- thawed bovine embryos: An update. *Theriogen- ology* 1985;23:201.
 25. Leibo SP. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1986;25:166.
 26. Renard JP, Heyman Y, Leymonie P, et al. Sucrose dilution: A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Ther- iogenology* 1983;19:145.
 27. Baker AA, Kobayashi G, Jillella D. A compar- ison of the pregnancy rate following non- surgical and surgical transfer and visual grading of bovine embryos on farm in South-Eastern Queensland. *Theriogenology* 1983;19:111.
 28. Sreenan JM, Beehan D. Egg transfer in the cow: Pregnancy rate and egg survival. *J Reprod Fert* 1974;41:497~499.
 29. Newcomb R, Rowson LEA. Conception rate after uterine transfer of cow eggs, in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *J Reprod Fert* 1975;43:539~541.
 30. Sreenan JM, Diskin MG. Early embryonic mortality in the cow: Its relationship with progesterone concentration. *Vet Rec* 1983;112: 517~521.
 31. Curtis JL, Elsdon RP, Seidel Jr GE. Non- surgical transfer of bovine embryos. *Therioge- nology* 1981;15:124.
 32. Godkin AM, Leslie KE, Wain GM, et al. Factors affecting pregnancy rate following non-surgical transfer of frozen bovine embryos. *Theriogen- ology* 1987;27:230.
 33. Coleman DA, Dailey RA, Leffel RE, et al. Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *J Dairy Sci* 1987;70:858~866.
 34. Christie WB, Newcomb R, Rowson LEA. Non- surgical transfer of bovine eggs: Investigation of some factors affecting embryo survival. *Vet Rec* 1980;106:190~193.
 35. Ghafouri MTA, Ludwick TM, Rader ER, et al. Some effects of side of pregnancy on performance in dairy cattle with implication on embryo transfer procedures. *Theriogenology* 1980;13:96.
 36. Weaver LD, Galland J, Sosnik U, et al. Factors affecting embryo transfer success in recipient heifers under field conditions. *J Dairy Sci* 1986; 69:2711~2717.
 37. De los Santos-Valadez S, Seidel Jr GE, Elsdon RP. Effect of HCG on pregnancy rates in embryo transfer recipients. *Theriogenology* 1982;17:85.
 38. Erb RE, Holtz EW. Factors associated with estimated fertilization and service efficiency of

- cows. *J Dairy Sci* 1958;41:1541~1552.
39. Del Campo MR, Rowe RF, French LR, et al. Unilateral relationship of embryos and corpus luteum in cattle. *Biol Reprod* 1977;16:580~585 (cited by Wright, 1981).
 40. Newcomb R, Rowson LEA. Investigation of physiological factors affecting non-surgical transfer. *Theriogenology* 1980;13:41-49.
 41. Donaldson LE. Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle. *Vet Rec* 1986; 118:661~663.
 42. Remsen LG, Roussel JD, Karihaloo AK. Pregnancy rates relating to plasma progesterone level in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology* 1982;18:365~372.
 43. Niemann H, Sacher B, Elsaesser F. Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1985;23:631~639.
 44. Reece RP, Turner CW. The functional activity of the right and left bovine ovary. *J Dairy Sci* 1983;21:37~39.
 45. Hasler JF, Bowen RA, Nelson LD, et al. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. *J Reprod Fert* 1980;58:71~77.
 46. Northey DL, Barnes FL, Eyestone WH, et al. Relationship of serum progesterone, luteinizing hormone and the incidences of pregnancy in bovine embryo recipients. *Theriogenology* 1985; 23:214.
 47. Stubbings RB, Walton JS. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. *Theriogenology* 1986; 26:145~155.
 48. Ott RS, Bretzlaff KN, Hixon JE. Comparison of palpable corpora lutea with serum progesterone concentrations in cows. *J Am Vet Med Ass* 1986;188:1417~1419.
 49. Donaldson LE. Recipients as a source of variation in cattle embryo transfer. *Theriogenology* 1985b;23:188.
 50. Sreenan JM, Diskin MG. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 1987;27:99~114.
 51. Nelson LD, Elsdon RP, Seidel Jr GE. Effect of synchrony between estrous cycles of donors and recipients on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 1982;17:101.
 52. Thatcher WW, Knickerbocker JJ, Bartol FF, et al. Maternal recognition of pregnancy in relation to the survival of transferred embryos: Endocrine aspects. *Theriogenology* 1985;23:129~143.
 53. Seidel GE. Critical review of embryo transfer procedures with cattle. In: Mastroianni L Jr, Biggers JD, ed. *Fertilization and Embryonic Development in vitro* Plenum Press, 1981;323~353.
 54. Ginther OJ. Internal regulation of physiological process through local venoarterial pathways: A review. *J Anim Sci* 1974;39:550~564.
 55. Tervit HR, Cooper MW, Goold PG, et al. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology* 1980;13:63~71.