

수정란이식의 일반지식(I)

편집기획실

상업적인 수정란이식은 미국에서 1975년경을 경계로 하여 유럽에서 수입한 고가의 리무진시멘탈종 등의 소를 대상으로 외과적인 채란이식법을 이용하여 실시되었고 그후 비수술적 채란이식법이 확립됨에 따라 쪼소를 중심으로 실시하게 되었다.

1. 過排卵處理

A. 과배란처리의 기전

과배란처리의 기전을 이해하기 위해서는 자연발정시의 발정로부터 배란까지의 과정을 이해할 필요가 있다.

발정을 되풀이하고 있는 소는 발정후 약 16일에서 19일후부터 발정호르몬이 감소하기 시작하여 뇌하수체로부터 분비되는 FSH에 의해 난포의 급속한 성숙이 시작된다. 난포의 발육이 방아쇠작용이 되어 뇌하수체로부터 inhibin이 대량 방출되어 뇌하수체로부터의 FSH방출을 억제하기 시작한다. 이 inhibin의 방출에 의해 이때까지 FSH의 작용으로 발육하기 시작한 많은 난포는 통상 1개를 제외하고 배란에 이를 때까지 성숙되지 않은채 소멸되어버린다(卵胞閉鎖). 그후 황체호르몬의 감소에 따라 성숙한 1~2개의 난포(정확히 말하여 난자)가 배란을 하게 되는 것이다.

한편 돼지 등에서는 1개의 난포당 inhibin의 분비량이 적기 때문에 완전히 FSH의 분비를 억제시키는 양이 분비되는 동안 12개의 난포가 배

란되기 직전에 이를때까지 발육되어버린다. 그럼으로써 돼지는 產子가 많은 것이지만 어떤 의미에서는 과배란처리는 돼지에서 일어나는 배란상태를 인공적으로 소에서 일으키게 하는 과정이라고 말할 수가 있다.

즉, 실제의 과배란처리에서는 발정후 9~10일에서부터 과량의 FSH를 투여하기 시작해서 그후 황체를 되행시켜 난포의 성숙을 촉진시키기 위해 prostaglandin F_{2α}를 투여한다. FSH투여에 의한 난포의 급속한 성장은 대량의 inhibin을 분비하지만 FSH를 계속 투여하고 있기 때문에 FSH의 작용은 억제됨이 없이 많은 난포가 발육을 계속하여 드드어 PG의 작용과 맞물려 많은 양의 난포가 배란된다.

이처럼 과잉배란처리는 자연발정을 인위적으로 우회(circumvent)시켜서 성립되는 과정이라고 할 수 있겠다.

B. 실제의 過排卵處理

FSH의 투여량 및 투여방법은 품종과 소의 크기 그리고 기술자의 선택에 따라 달라질 수 있다. 또 prostaglandin F_{2α}의 투여는 FSH투여 개시후 3일째에 실시하지만 때로는 12시간을 빨리 투여하거나 늦게 투여하는 등 투여시기를 조절하면서 총량 30~35mg를 투여한다.

FSH대신에 PMSG를 투여하는 경우도 있지만 이 호르몬은 서서히 작용하기 때문에 1회의 투여로 충분하기는 하지만 많은 실험결과를 본다면 FSH를 투여하는 편이 채란성적면에서 약간

더 좋은 결과를 얻는다고 할 수 있다. 또 배란에 관하여는 여러가지 일들이 해명되어 있지 않아 앞으로의 연구에 기대가 크다.

2. Donor

일반적으로 donor授精의 원칙으로는 발정을 확인한 12시간후에 1회, 24시간후에 2회째의 인공수정을 실시한다. 인공수정을 2회 실시하는 이유로는 과배란처리한 소에서 최초난포의 배란이 자연발정보다 일찍 일어나기 시작하며 최후의 난포의 배란은 반대로 자연발정의 배란보다 늦게 일어나기 때문이라고 하고 있다.

donor의 발정이 분명하지 않은 경우가 약 10% 있다고 해도 정상난율은 수%라고 말하고 있다.

실제의 수정을 동결정액의 가격에 따라 다음과 같이 실시하고 있다.

1) 정액의 가격이 그다지 비싸지 않은 경우 발정후 3회 수정을(발정확인후 0, 12시간, 24시간) 하든가 발정후 12시간에 1개 24시간후에 2개를 수정한다.

2) 정액의 가격이 고가일경우 donor의 발정개시후 15~18시간째에 스트로에 든 정액을 반반씩 양측 자궁각에 투여한다. donor의 발정을 2~3시간마다 관찰하고 있을 경우에는 발정개시후 24시간째에 수정한다.

어느 경우에서나 자궁과 경관을 손상시켜 내막염을 일으키지 않도록 정확하고 부드럽게 수정조작을 행하여야할 필요가 있다.

특히 최초의 수정에서는 많은 난포가 미배란 상태에 있고 또 배란후의 출혈도 일반적인 상태보다 양이 많기 때문에 난소의 축진은 난포의 파열과 난소의 유착을 야기시킬 위험성이 있기 때문에 행하지 않는 것이 좋다. 또 수정후에 G_nRH 를 투여하더라도 체란수의 증가를 볼 수 없었다는 보고가 있으므로 G_nRH 는 투여하지 않는 것이 좋다.

또 적절한 시기에 수정을 하였는데도 미수정난만이 회수될때는 스트로 내에 들어있는 정자를 37°C 정도의 생리식염수로 세척해서 현미경검사로 정자의 활력을 검진할 필요가 있다.

3. 관류액과 이식액

일반적으로 관류액으로서 가장 널리 사용되고 있는 관류액의 Dulbecco씨의 인산완충액(Dulbecco's PBS, 이하 PBS)이다.

표 1. Dulbecco씨의 PBS 성분

성분	주된 역할
水分	溶媒
Na	浸透壓調整
鹽化物	中和機能
磷酸鹽	pH 調整
K	細胞膜機能維持
Ca	酵素機能
Mg	酵素機能
黃酸鹽	단백成分
牛血清 Albumin	受精卵이 스트로 등에 附着하는 것을 防止함
Glucose	Energy源
Bilirubic acid	Energy源
抗生物質	細菌增殖防止

수정관은 적어도 24시간은 관류액 내에서 생존이 가능하다.

PBS의 조성성분은 표 1과 같으며 그 조성의 대부분(99%)은 증류, 탈 ion한 순수한 물이다.

일상 우리가 사용하고 있는 수도물중에는 수정관에 대해 매우 유해한 물질인 납, 카드뮴, 아연 등의 중금속이 함유되어 있으므로 수도물을 증류시킨 뒤에 탈 ion처리를 한 純水를 사용할 필요가 있다. 물 이외의 성분에서는 수정관이 생존하기 위해서 부가결한 관류액중의 삼투압을 조정하는 염화나트륨이라든가 관류액을 중성으로 유지시키기 위한 pH조절을 하는 인(P) (산성비에서 상정되는 것처럼 물은 산성으로 기울기 쉽다), 세포막의 전위를 조정하는 칼리(K), 수정관의 영양으로서 필요한 bilirubin산, glucose, 수정관이 샬레, 스트로 등에 부착되는 것을 방지하는 albumin 등이 함유되어 있다.

또 수정관이식의 경우에는 실험실내에서 무균적으로 조작하는 경우와 달리 완전한 멸균조작이 불가능하기 때문에 penicillin, SM 등의 항생물질을 첨가할 필요가 있다.

4. 採 卵

비수술적 채란방법은 약 40여년만에 개발된 방법이지만 시초에는 회수율이 낮았으므로 주로 수술적 채란방법이 선택되었다.

그러나 수술적 채란방법에서는 자궁을 손상시키기 때문에 때로는 번식장애의 원인이 되는 많은 문제가 있었다.

그러나 1970년대 중반무렵부터 여러가지가 개선되어 오늘날에는 비수술적 채란방법이 주류를 이루고 있다.

수정란은 보통 donor의 발정일부터 계산해서 6일부터 8일사이에 채란된다. 이 시기까지는 대부분의 수정란은 난관으로부터 채란가능한 부위인 자궁각선단부로 내려와 있다.

7일째 채란에서의 난회수율은 6일째 채란에서의 난회수율보다 약간 높다고 느낄때도 있다. 그 이유로서는 몇개의 수정란이 난관내에 남아 있을 가능성을 생각할 수 있다. 9일째 이후가 되면 수정란은 탈각하기 시작하여 거의 모든 수정란은 모두 탈각을 끝내버린다.

그러기 때문에 9일째 이후는 동결 및 분할이 곤란한 상태로 되기 때문에 보통 채란을 하지 않는다. 또한 만약 100두의 건강한 젖소의 donor로부터 채란했을 경우에는 donor의 36%로부터 0~2개, 45%로부터 3~6개, 19%로부터 11개 이상의 비율로 정상수정란이 채란된다고 보고되어 있다. 따라서 100두를 채란하더라도 전체의 약 60%로부터만이 이식가능한 수정란이 회수되지 않는다는 것을 전제로 채란을 하여야 한다.

실제로 비수술적 채란방법의 술식은 다음과 같다.

① 미추마취를 한 후 소의 꼬리를 전방으로 당겨 맞출로 묶고 외음부를 비누로 세척한 다음 다시 소독용 알콜로 외음부를 소독한다.

② 술자는 직장검사로 난소의 난포 그리고 황체의 숫자를 촉진한다.

③ balloon, catheter를 자궁경관을 통과시켜 한쪽의 자궁각 내에 삽입하고 catheter로 선단에 부착되어 있는 balloon을 팽창시킨다(공기의 총량: 16~18^{cc}정도). 이 조작으로서 관류액이 역류하는 것을 방지하며 자궁선단부에 존재하는 수

정란을 회수할 수 있다.

회수된 관류액은 필터로 여과시켜 2개의 샬레에 담는다. 수정란을 잘 회수하기 위해서는 충분한 양의 관류액을 자궁선단부에 관류시켜야 한다. 이 관류조작은 매우 힘들어서 조작의 착오가 있을 때는 수정란의 회수는 힘들어지고 때로는 자궁내막을 손상시켜 번식장애를 일으키게 하는 경우도 있다. 그 이유로서는 donor에 따라 자궁의 크기나 그 상태의 차이가 있고 세척의 난이도가 다르기 때문에 적어도 50회 내지 100회 정도의 채란경험이 필요하다.

채란에 수반되는 문제점과 그 처치를 요약하면 다음과 같다.

a) 자궁의 크기와 자궁내에서의 balloon의 팽창정도가 관류액의 회수에 큰 영향을 준다.

자궁의 크기가 작을때는 소량의 관류액으로도 수정란의 회수가 가능하지만 자궁의 크기가 크고 또한 자궁이 하수되어 있을 경우에는 일측자궁각에 필요한 관류액의 양은 1ℓ 정도가 된다. 또 balloon에 주입하는 공기의 양이 지나치게 많을 때는 자궁내벽을 손상시킬 수 있고, 반대로 공기의 양이 적었을 때에는 balloon이 자궁각내에서 빠져나오기 때문에 자궁의 크기에 따라 주입하는 공기량을 적절히 조절해야 한다.

b) 자궁경관이 좁아서 balloon, catheter의 삽입이 힘들때는 경관확장봉으로 경관을 확장시킬 필요가 있고 가느다란 catheter(16호)를 사용한다.

c) 자궁으로부터 관류액이 거의 회수되지 않을 경우에는 balloon, catheter의 선단부가 자궁내벽면의 함몰부위에 걸려 있어서 catheter를 선단쪽으로 움직여 삽입함으로써 조절할 수 있다.

d) 채란을 함에 있어서 자궁을 난폭하게 다루면 자궁내부에 출혈이 일어나 관류액이 붉게 회수되는 경우가 있다.

관류액에 혈액이 혼입되어 붉게 변색했을 때는 샬레내에서의 검란이 힘들어지므로 샬레에 관류액을 붓기전에 필터에 신선한 관류액을 부어서 세척하면 혈액만이 씻겨져 내려가므로 검란이 용이하다.

e) balloon, catheter를 자궁내에 급속히 삽입하거나 관류액의 많은 양을 급격히 주입하면 자궁벽을 관통하거나 파열되어서 관류액과 수정란이 복강내로 유실되어버릴 우려가 있으므로 catheter삽입관 관류액의 주입은 서서히 행하여야 한다.

5. 受精卵의 품질평가와 Recipient의 同期化

채란은 보통 donor의 발정일로부터 6~8일째에 행하지만 이 시기에는 발육과정이 서로 다른 수정란이 회수된다. 발정일로부터 4일째이전 즉, 발정일로부터 3일째에는 8세포, 4일째에는 8~16세포기의 수정란이 자궁난관접합부에 존재하며 이 시기에는 수정란은 자궁에서 회수되지 않는다.

32세포기 이후에서는 수정란은 치밀화(compaction)되기 시작하여 발정일로부터 6~8일째에는 桑實胚, 胚盤胞, 擴張胚盤胞가 각각 회수된다.

donor로부터 회수된 수정란은 그 크기가 160 μm 이므로 육안으로는 볼 수 없다. 그러므로 실체현미경을 사용해야 한다.

형태학적으로는 excellent에서부터 poor에 이르기까지 품질을 판정한 후 donor와 같은 환경에 놓여 있는 recipient에 이식한다. 수정란의 품질은 수태율과 매우 깊은 상관관계에 있으며 일반적으로 품질이 양호한 수정란일수록 수태율은 높다(표 2).

그러나 나쁘다고 판단된 수정란을 이식했을 때도 정상적인 태아로 성장하는 예도 있다. 일반적으로 알려져 있는 수정란의 기준은 다음과 같다.

Excellent embryos(Quality 1)은 형태적으로 결점이 없는 수정란이며 Good embryos(Quality 2)

는 형태적으로 한곳이 돌출된 分割細胞(또는 割球)의 결점이 있는 수정란이며 Fair embryo(Quality 3)은 2개이상의 형태적 결점을 가지고 있고 발육도 2일 늦어져 있는 수정란이다.

Poor embryos(Quality 4)는 세포의 변성이 있고 발육이 2일 이상 늦어져 있는 수정란이다.

수정란을 회수한 다음에는 도립현미경으로 수정란을 관찰하고 품질의 구분 excellent에서 poor까지)을 기록한 뒤 동결시키거나 이식한다.

동결시키는 수정란은 excellent와 good으로 구분된 것만 사용하고 fair 및 poor의 품질에 속하는 수정란은 단기배양후에 정확한 등급을 매기고 신선난 상태로 이식하거나 또는 폐기하는 것을 결정한다. 채란후 단기간 내에 이식할 경우에는 인산완충액에 실온보존해도 상관없지만 2~6시간 보존할때는 15% 혈청가 Ham's F-10 배양액에 넣어서 CO_2 부란기내에 배양보존할 수 있다.

그러나 24시간 이상 배양할 때 수정란의 생존성 즉, 수태율에 나쁜 영향을 미치므로 배양은 단시간에 그치는 것이 좋다.

표 2. 受精卵의 品質과 受胎率과의 關係

品 質	受精卵數	受胎率 (%)	移植全體의 對한 比率
Poor	42	12 ^b	8
Fair	42	31 ^c	8
Good	152	58 ^d	30
Excellent	275	63 ^d	54

注) b,c,d間에서 有意差가 있다($p < 0.05$).

수정란은 0.25ml의 스트로에 집어 넣어 자궁 환경이 같은 recipient에 이식한다. 수정란은 桑實胚는 발정후 6일째에 recipient, 胚盤胞는 7일째에 recipient에 擴張胚盤胞는 8일째의 recipient에 각각 이식하는 것을 원칙으로 한다.