

젖소의 신성수정란과 동결수정란의 비외과적 이식에 관하여

김일화·손동수·이광원·장인호*

국립종축원

경북대학교 수의과대학*

(1991. 10. 8 접수)

Nonsurgical transfer of fresh and frozen embryos of dairy cattle

Ill-hwa Kim, Dong-soo Son, Kwang-won Lee, In-ho Chang*

National Animal Breeding Institute

*College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University**

(Received Oct 8, 1991)

Abstract : Sixty Four fresh and 142 frozen embryos of dairy cattle were transferred to synchronized dairy, beef or Korean Native Cattle nonsurgically at National Animal Breeding Institute from 1985 to 1990.

The results obtained were as follows ;

1. The pregnancy rate of fresh embryos(39.1%) was higher than that of frozen embryos(32.4%) and average pregnancy rate was 34.5%.

2. The pregnancy rate of grade 1 embryos was higher than that of grade 2 embryos for both fresh(41.3% vs 33.3%) and frozen embryos(35.4% vs 25.6%).

3. The pregnancy rate according to development stage of fresh embryos was increased with maturity as 29.2%, 33.3%, 50.0% and 54.5% for morula, early blastocyst, blastocyst and expanded blastocyst, respectively. For frozen embryos, the pregnancy rate of blastocyst(44.4%) was higher than those of morula(31.3%) and early blastocyst(28.0%).

4. The pregnancy rate according to recipient-donor synchrony for fresh embryos was higher when the recipients exhibited estrus 1 day earlier than the donors(43.8%) than when the recipients exhibited estrus 1 day later than the donors(38.1%) or when the recipients and donors exhibited estrus at the same time(37.0%). For frozen embryos, the pregnancy rate was decreased when the recipients and donors exhibited estrus at the same time(37.9%), when the recipients exhibited estrus 1 day later than the donors(32.0%) and when the recipients exhibited estrus 1 day earlier than the donors(23.5%), in sequence.

5. The pregnancy rate of heifers was higher than that of cows for both fresh(50.5% vs 37.9%) and frozen embryos(39.7% vs 25.7%).

6. The pregnancy rate according to recipient breed for fresh embryos was higher in dairy cattle(42.1%) and beef cattle(40.%) than in Korean Native Cattle(33.3%). For frozen embryos, the pregnancy rate was decreased beef cattle(39.1%), dairy cattle(30.3%) and Korean Native Cattle(14.3%), in sequence.

7. The pregnancy rate according to equilibrium steps of glycerol and freezing rate was higher when

transferred after 3-steps equilibrium and freezing by the rate of 0.3°C/min from -6°C to -35°C and 0.1°C/min to -38°C(39.4%) than when transferred after 6-steps equilibrium and freezing by the rate of 0.5°C/min from -6°C to -30°C(30.3%).

Key words : fresh embryos, frozen embryos, nonsurgical transfer, pregnancy rate.

서 론

소의 수정란이식에 있어서 일반적으로 자궁경관을 경유한 비외과적 이식이 결부 혹은 정중선 절개후의 외과적 이식보다 수태율은 낮으나 이식시간의 단축, 이식비용의 절감 등의 장점때문에 수정란의 비외과적 이식이 증가되고 있다.¹⁻³ Christie⁴와 Newcomb과 Rowson⁵은 비외과적 이식의 수태율이 외과적 이식에 비하여 낮은 원인에 대하여 이식시 단단한 비외과 주입기에 의한 자궁내막의 손상, 경관점액 및 조직 찌꺼기의 자궁내 오염과 수정란을 자궁각 선단부에 주입하지 못하는 것이 수태율 저하에 영향을 준다고 하였다.

신선수정란은 공란우로부터 채란된 뒤 수 시간 이내에 이식되었을 때 수태율이 높은 장점은 있으나 적절한 두수의 수란우 준비와 수정란의 보존에 제약을 받는 단점이 있다. 그러나 동결수정란은 신선수정란에 비해 수태율은 낮으나 장기간 보존, 수란우의 발정동기화 시기선택, 국제간의 이동 등의 장점때문에 수정란 이식의 실용화를 위해서는 신선수정란보다 유리하다.⁶⁻⁹

Whittingham 등¹⁰이 처음으로 마우스 수정란의 동결보존에 성공하여 1세포기에서부터 배반포기까지의 수정란은 동결에 생존할 수 있음을 보고하였으며 뒤이어 1973년 Wilmut과 Rowson¹¹은 비슷한 동결방법을 이용하여 동결수정란 이식에 의한 첫번째의 송아지를 생산하였다. 그 이후로 동결수정란의 수태율 향상을 위해서 수장란의 동결 및 융해시 손상을 줄이기 위한 많은 연구가 진행되었으며¹²⁻¹⁸ 근래에는 신선수정란에 비하여 약 10%정도 낮은 수준이다.^{7,19}

수정란의 수태에 영향을 미치는 요인에는 수정란의 발육단계,^{20,21} 수정란의 질(quality)^{22,23}, 수란우와 공란우의 발정동기화 정도^{24,25}, 수란우의 산차^{26,27}, 수란우의 발정동기화(자연발정 혹은 인위적유기)^{21,28}, 수정란의 이식부위^{5,26}, 수정란의 이식절제 등^{28,29}의 많은 요인이 관계된다. 그리고 수정란의 동결 및 융해후 생존에 영향을 미치는 요인은 동해방지제의 종류^{15,30}, 액체질소 침지전 최종 동결온도^{31,32}, 수정란의 동결속도 등^{15,33,34}이 관계된다.

우리나라에서 소의 수정란이식은 1980년초에 시작되어^{35,36} 아직까지도 비외과적 이식에 의한 신선 혹은 동결수정란의 수태율이 낮을뿐 아니라 많은 두수를 이식하여 수태에 영향을 주는 요인에 대한 보고는 드문 실정이다.

본 연구는 젖소 공란우에 신선자극호르몬(FSH 40mg)의 투여로 과배란을 유기하여 회수한 젖소의 수정란을 신선수정란 상태로 이식 또는 수정란을 동결보존시킨후 융해하여 수란우에 이식하였거나, 외국으로부터 도입된 동결수정란을 융해하여 비외과적으로 이식하여 얻은 수태성적을 분석하여 수태에 영향을 주는 요인을 파악함으로써 우리나라의 젖소 수정란이식의 실용화에 도움을 주는 기초자료를 얻는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

수정란

1) **신선수정란** : 신선수정란의 회수를 위하여 1989년 1월부터 1990년 12월까지 충남 천안군 소재 국립종축원에서 사육중인 홀스타인 공란우 22두에 FSH-P(Burns-Biotech Laboratories, USA) 40mg을 5일동안 12시간 간격으로 감량분할 주사(6mg~6mg, 5mg~5mg, 4mg~4mg, 3mg~3mg, 2mg~2mg)와 주사 4일째 PGF₂α(Lutalyse, Upjohn, USA) 45mg의 주사로 과배란을 유기하였으며 발정발현후 12시간 간격으로 3회 인공수정하여 7~8일째에 2% fetal calf serum(FCS)을 첨가한 채란액 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Gibco Laboratories, USA)을 이용하여 자궁경관을 경유한 비외과적 방법³⁷으로 수정란을 회수하였다. 회수된 182개의 수정란에서 이식가능한 수정란이 150개였으며 그중 64개를 본 연구의 신선수정란으로 공시하였다.

2) **동결수정란** : 동결수정란의 준비를 위하여 신선수정란으로 공시된 수정란외의 이식가능한 수정란 33개를 선정하여 수정란 동결기(CG-5,000, Cryogenetic technology Inc, USA)를 사용하여 동결하였다. 동결전 수정란은 20% FCS를 함유한 D-PBS 보존배지에서 2시간 이내 배양후 동결시 수정란의 동해방지를 위하여 보존배지에 동해방지제인 글리세롤을 0.4, 0.8, 1.4M을 가한 동결배지에서 각 단계별로 10분간씩 평형(3단계평형)을 시킨 후 실온에서 -6°C까지는 1°C/분 속도로 냉각, -6°C에서 식빙후 10분간 정체하였다가 -35°C까지는 0.3°C/분, -38°C까지는 0.1°C/분의 속도로 동결후 액체질소에 침지하였다. 또한 1986년~1990년 미국 CryovaTach International Inc로부터 109개의 동결수정란이 도입되어 국립종축원에서 생산된 동결수정란 33개를 포함하여 총 142개의 동결수정란이 본 연구에 공시되었다. 도입된 수정란의 동결법은 글리세롤을 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.

25, 1.4M가한 동결배지에서 각 단계별로 10분간씩 평형(6단계 평형)을 시킨후 실온에서 -6°C 까지는 $2^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 속도로 냉각, -6°C 에서 식빙후 10분간 정체하였다가 -30°C 까지 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 속도로 동결후 액체질소통에 침지하여 국내로 수송되었다. 동결수정란의 용해 및 글리세롤의 희석은 액체질소통에서 수정란을 포함하는 스트로를 꺼내어 $30\sim 32^{\circ}\text{C}$ 의 온수에서 10초간 급속용해한후 수정란을 페트리 접시($35 \times 10\text{mm}$)에 옮겨 동결시 역순으로 각 단계별로 10분간씩 평형시켜 글리세롤을 희석하였으며 최종적으로는 글리세롤이 함유되지 않은 보존배지에 옮겼다.

3) 수정란의 검경 및 평가: 수정란의 회수후 혹은 동결수정란의 용해후 14~84배율의 실체현미경하에서 수정란의 발육단계와 질을 평가하였다. 수정란의 발육단계와 질의 판정은 Linder와 Wright⁸⁾의 방법에 준하였으며 발육단계는 상실기, 초기배반포기, 배반포기, 확장배반포기로 구분하였고 각 단계의 수정란은 질에 따라 1등급, 2등급, 3등급으로 분류하였다. 형태적인 결함(morphological imperfection)이 전혀 없는 수정란과 극히 소수의 돌출된 할구의 미세한 결함을 가지는 수정란은 1등급으로, 윤곽은 뚜렷하나 소수의 돌출된 할구와 변성세포가 존재하는 심하지 않은 결함을 가지는 수정란은 2등급으로, 다수의 돌출된 할구 및 변성세포가 존재하는 심한 형태적인 결함을 가지는 생존한 것으로 보이는 수정란은 3등급으로 구분하였다. 본 연구에서는 1등급과 2등급의 수정란만 이식하였다.

수란우 및 발정동기화: 이식된 수란우는 충남 천안군 소재 국립종축원에서 사육중인 홀수타인 127두, 강원도 평창군에 소재하는 국립종축원 대관령지원에서 사육중인 육우 51두(헤어포드 15두, 앵거스 27두, 샤로레 9두)와 전북 남원군에 소재하는 국립종축원 남원지원에서 사육

중인 한우 28두로서 총 206두의 성빈우가 공시되었으며, 번식경력 및 직장검사를 통하여 생식기의 상태가 정상적인 것이 선발되었다.

공란우와 발정의 동기화를 위하여 $\text{PGF}_2\alpha$ (Lutalyse, Upjohn, USA) 30mg 혹은 $\text{PGF}_2\alpha$ 유도제인 Iuprostiol(Prosolvin, Intervet, Holland) 15mg을 1회 주사하거나 10~11일 간격으로 2회 주사하여 발정을 동기화 시켰으며 주사 다음날부터 매일 3회(6시, 12시, 18시) 발정상태를 관찰하였으며 발정이 동기화된 자연발정우도 수란우에 공하였다.

수정란의 이식 및 임신진단: 이식된 수란우에 2% lidocaine(리도카인, 제일제약, 한국)으로 경막의 마취를 하고 0.25ml 스트로(IMV, France)에 장진된 수정란을 비외과 이식기(Disposable Gun, Veterinary Concepts Inc, USA)로 황체가 확인된 쪽의 자궁각 선단부에 이식하였으며 이식 60일후에 직장검사에 의하여 임신여부를 진단하였다.

결 과

젖소의 신선수정란 64개와 동결수정란 142개를 수란우에 비외과적으로 이식한 결과 수태성적은 Table 1에서 보는 바와 같다. 신선수정란은 64개를 이식한 결과 25개가 수태되어 수태율이 39.1%였으며 동결수정란은 142개 중 46개가 수태되어 32.4%의 수태율을 보여 신선수정란

Table 1. Pregnancy rate according to fresh or frozen embryos

Embryos	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)
Fresh embryos	64	25	39.1
Frozen embryos	142	46	32.4
Total	206	71	34.5

Table 2. Effect of embryo quality on pregnancy rate

Embryo quality	Fresh embryos			Frozen embryos		
	No. of Transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)
1	46	19	41.3	99	35	35.4
2	18	6	33.3	43	11	25.6

Table 3. Effect of development stage of embryos on pregnancy rate

Development stage	Fresh embryos			Frozen embryos		
	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)
Morula	24	7	29.2	99	31	31.3
Early blastocyst	15	5	33.3	25	7	28.0
Blastocyst	14	7	50.0	18	8	44.4
Expanded blastocyst	11	6	54.5	-	-	-

Table 4. Effect of recipient-donor synchrony on pregnancy rate

Synchrony* (day)	Fresh embryos			Frozen embryos		
	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)
-1	16	7	43.8	34	8	23.5
0	27	10	37.0	58	22	37.9
+1	21	8	38.1	50	16	32.0

* Esturs in recipients exhibited times after(+) or before(-) donor

Table 5. Effect of recipient parity on pregnancy rate

Recipient parity	Fresh embryos			Frozen embryos		
	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)
Heifer	6	3	50.0	68	27	39.7
Cow	58	22	37.9	74	19	25.7

Table 6. Pregnancy rate according to recipient breed

Recipient breed	Fresh embryos			Frozen embryos		
	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)
Dairy						
Holstein	38	16	42.1	89	27	30.3
Beef	5	2	40.0	46	18	39.1
Hereford	1	-		14	5	35.7
Angus	1	1		26	10	38.5
Charolais	3	1		6	3	50.0
KNC*	21	7	33.3	7	1	14.3

*KNC : Korean Native Cattle

Table 7. Effect of equilibrium steps of glycerol and freezing rate on pregnancy rate

Glycerol steps	Freezing rate	No. of transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)
	-6℃~-35℃ 0.3℃/min			
3 Steps	-35℃~-38℃ 0.1℃/min	33	13	39.4
6 Steps	-6℃~-30℃ 0.5℃/min	109	33	30.3

이 동결수정란에 비해 수태율이 높았으며 평균 34.5%였다.

수정란의 질에 따른 수태율은 Table 2에서 보는 바와 같다. 신선수정란은 1등급이 46개 이식중 19개가 수태되어 41.3%였으며 2등급은 18개 이식중 6개가 수태되어 33.3%의 수태율을 보여 1등급이 2등급에 비하여 수태율이 높았다. 동결수정란은 1등급 99개 이식한 결과 35개가 수태되어 35.4%였으며 2등급은 43개중 11개가 수태되어 25.6%로서 신선수정란과 마찬가지로 1등급이 2등

급에 비해 높은 수태율을 보였다.

수정란의 발육단계에 따른 수태율은 Table 3에서 보는 바와 같다. 신선수정란은 상실기가 24개 이식중 7개 수태(29.2%), 초기배반포기는 15개 이식중 5개 수태(33.3%), 배반포기는 14개 이식중 7개 수태(50.0%), 확장배반포기는 11개 이식중 6개 수태(54.5%)되어 수정란 발육이 진행될수록 높은 수태율을 보였다. 동결수정란에서는 상실기가 99개 이식중 31개 수태(31.3%), 초기배반포기는 25개 이식중 7개 수태(28.0%), 배반포기는 18개 이식중 8개가 수태(44.4%)되어 배반포기의 수태율이 가장 높았으며 초기배반포기는 상실기에 비해 다소 낮은 수태율을 보였다.

수란우와 공란우의 발정동기화 정도에 따른 수태율은 Table 4에서 보는 바와 같다. 신선수정란은 수란우의 발정발현시간이 공란우에 비하여 1일 빨랐을때가 43.8%(7/16두), 1일 늦었을때가 38.1%(8/21두), 일치되었을때가 37.0%(10/27두)의 수태율을 보여 1일 빨랐을때가 수태율이 가장 높았으며 일치되었을때와 1일 늦었을때는 비슷하였다. 동결수정란에서는 수란우의 발정발현시간이

공란우와 일치되었을때가 37.9%(22/58두), 1일 늦었을 때 32.0%(16/50두), 1일 빨랐을 때 23.5%(8/34두) 순으로 수태율이 낮아졌다.

수란우의 산차에 따른 수태율은 Table 5에서 보는 바와 같다. 신선수정란을 미경산우 6두에 이식한 결과 3두가 수태되어 수태율이 50.0%였으며 경산우 58두에 이식하여 22두가 수태되어 37.9%였다. 동결수정란은 미경산우 68두에 이식한 결과 27두가 수태되어 수태율이 39.7%였으며 경산우는 74두에 이식중 19두가 수태되어 25.7%의 수태율을 보여 미경산우가 경산우에 비해 높은 수태율을 나타내었다.

수란우의 품종에 따른 수태율은 Table 6에서 보는 바와 같다.

신선수정란은 젖소 수란우 38두에 이식한 결과 16두가 수태되어 42.1%, 육우 5두(헤어포드 1, 앵거스 1, 샤로레 3)에 이식 2두가 수태되어 40.0%, 한우 21두 이식중 7두가 수태되어 33.3%의 수태율을 보여 젖소와 육우 수란우가 한우 수란우에 비해 수태율이 다소 높았다. 동결수정란은 육우 수란우 46두중 18두가 수태되어 39.1%, 품종별로는 샤로레 50.0%(3/6두), 앵거스 38.5%(10/26두), 헤어포드 35.7%(5/14두)였으며, 젖소는 89두중 27두가 수태되어 30.3% 그리고 한우는 7두중 1두가 수태되어 14.3%의 수태율을 보여 육우의 수태율이 가장 높았으며 한우는 다른 품종의 수란우에 비해 현저하게 낮은 수태율을 보였다.

동결수정란의 글리세롤 평형단계 및 동결속도에 따른 수태율은 Table 7에서 보는 바와 같다.

글리세롤 3단계 평형후 -6°C 에서 -35°C 까지 0.3 $^{\circ}\text{C}$ /분, -38°C 까지 0.1 $^{\circ}\text{C}$ /분 속도로 동결시킨후 이식 하였을때는 수란우 33두중 13두가 수태되어 39.4%의 수태율을 보여 글리세롤 6단계 평형후 -6°C 에서 -35°C 까지 0.5 $^{\circ}\text{C}$ /분 속도로 동결후 이식하였을때의 수란우 109두중 33두가 수태된 30.3%보다 높은 수태율을 나타내었다.

고 찰

가축의 수정란이식이 시작된 초기단계에는 수정란의 이식이 모두 외과적인 방법으로 실시되었으나 비외과적 이식법이 확립되고 수정란이식이 야외에서 이용이 늘어남에 따라 관련한 비외과적 이식의 활용이 늘어나고 있다.⁹ 소 수정란의 비외과적 이식에 대한 수태율은 Rowe 등²의 36%, Niemann 등⁴⁰의 45.1%, Takeda 등³⁴의 54% 등과 같이 여러 연구자에 의해 수태성적이 보고되었으나 외과적이식에 의한 수태율, Coleman²⁴의 74.6%, Hasler 등²⁰의 71.3%, Etherington 등⁴¹의 77.1%보다는 낮은 상태이다. 이와같이 비외과적 이식이 외과적 이식보다 수태율이 낮은 원인은 자궁내 세균감염, 독성물질의 자궁

오염, 이식자의 미숙련, 자궁내막의 손상, 자궁내 비적절한 이식부위와 관계된다.²

신선수정란과 동결수정란 206개를 수란우에 비외과적으로 이식한 결과 71두가 수태되어 43.5%의 수태율을 보였으며 그중 신선수정란은 64개중 25개가 수태되어 39.1%, 동결수정란은 142개중 46개가 수태되어 32.4%로 신선수정란의 수태율이 동결수정란에 비해 높았다. Renard 등⁷은 신선수정란 57.7%(26/45두), 동겨수정란 46.8%(30/64두)를 보고하였으며, Christie⁸는 신선수정란 66.4%(441/664두), 동결수정란 58.1%(829/1427두)의 수태율을 보고하여 본 연구의 결과에 비해 수태율은 높았으나 신선수정란과 동결수정란의 수태율의 차이는 10% 내외로 비슷한 경향이었다. 신선수정란의 수태율 39.1%는 Linder와 Wright³⁸의 39.3%와는 비슷하였으나 Looney 등²¹의 50.3%, Garcia와 Menard⁴²의 51.4%, Almeida⁴³의 52.3%, Greve⁴⁴의 56%에 비해서는 낮았다. 다른 연구자들의 보고^{21, 42-44}에 비해 낮은 수태율에 대한 정확한 원인은 알수 없으나 수정란의 채란후 이시전까지의 보존²⁶, 수란우의 선발^{24, 45, 46}, 이식기술 등^{1, 2, 26}에 기인된 것으로 생각된다. 동결수정란 이식후의 수태율 32.4%는 Wright⁴⁷의 33.0%와 Willadsen 등⁶의 30.0%와 비슷하였으나 Leibo⁴⁸의 42.4%, Chupin 등⁴⁹의 41.4%, Trounson 등⁵⁰의 40%에 비해 낮았으며 Leibo²⁵의 26.0% 보다는 높았다. 살아 있는 세포의 동결과정에서는 세포와 그 주위 배지사이에서 복잡한 열의 물리화학 과정과 수분의 이동이 일어나며 수정란은 1~2M 농도의 동해방지제의 존재하에서만 동결보존에 생존할 수 있으며 침투성 보호제의 첨가와 희석동안 삼투성 변화를 받는데 만일 첨가 혹은 특히 희석이 비적절하게 진행되면 세포의 생존성이 영향을 받게 된다.⁵¹ 또한 수정란은 동결시 동결속도에 매우 민감하여 적은 온도의 하강도 수정란의 수분 손실율에 심한 감소를 유발하므로 수정란으로부터 수분 손실율에 심한 감소를 유발하므로 수정란으로부터 수분의 제거를 위해서는 충분한 시간을 요한다.¹⁵ 따라서 동결수정란 이식후의 수태율 향상을 위해서는 수정란의 동결 및 융해시 받는 손상을 최소화시키기 위한 동해방지제의 종류와 평형단계 그리고 수정란의 동결속도에 대한 많은 연구가 필요하다.^{31, 52}

수정란의 질이 수태율에 미치는 영향이 크다고 한 많은 보고가 있다.^{23, 53, 54} 신선수정란은 1등급이 41.3%, 2등급은 33.3%의 수태율을 보였으며 동결수정란은 1등급 35.4%, 2등급 25.6%의 수태율로서 신선수정란과 동결수정란 모두 1등급이 2등급에 비하여 수태율이 높았다. 이러한 결과는 Linder와 Wright³⁸의 1등급 44.2%, 2등급 27%였다는 보고와 Elsdon 등⁵⁵의 1등급 58~63%, 2등급 31%였다는 보고와 일치하였으며 또한 수정란의 질

의 등급이 높아짐에 따라 수태율이 낮아졌다고 한 Hasler²⁰, Schneider 등³, Wright⁴⁷, Donaldson²³, Humblot 등²², Elsdon 등⁵³의 보고와도 일치하였다.

수정란의 발육단계에 따른 수태율은 신선수정란에서는 상실기 29.2%에서 초기배반포기 33.3%, 배반포기 50.0%, 확장배반포기 54.5%로 발육이 진행될 수정란일수록 수태율이 높았는데 이러한 경향은 Looney 등²¹과 Schneider 등³의 보고와 일치하였으나 Linder와 Wright³⁸ 및 Christie⁸는 수정란의 발육단계는 수태율에 영향을 미치지 않는다고 보고한 바 있다. 수정란의 발육단계는 수정란의 동결 및 융해후 생존율에 매우 중요한 역할을 한다.⁵⁰ Richards 등¹⁸의 수정란의 동결 및 융해후 탈출배반포기까지 배양한 결과에 따르면 상실기의 수정란은 배반포기에 비하여 동결과 융해에 내성이 약하다고 하였다 (49.7% : 77%). 본 연구에서는 수정란의 동결 및 융해후 배반포기의 수태율이 44.4%로서 가장 높았으며 상실기가 31.3%로 초기배반포기의 28.0%보다 높았는데 이러한 결과는 배반포기의 수태율이 47.1%로 상실기의 41.7%보다 높았다고 보고한 Humblot 등²²의 보고와 일치하였으나 Wright⁴⁷는 배반포기 37.5%, 초기배반포기 35.0%, 상실기 28.5%의 수태율을 보고하여 배반포기의 수태율이 가장 높은점은 본 연구의 결과와 일치하였으나 초기배반포기의 수태율이 상실기보다 높은 것은 상이한 결과를 보였다. 그리고 Christie⁸는 상실기, 초기배반포기, 배반포기의 수태율이 61.6% ~ 62.4% 범위, Leibo⁴⁸는 상실기 45%, 초기배반포기 40%, 배반포기 42%의 수태율을 보고하여 본 연구와는 다른 결과를 나타내었다. 이와같이 동결수정란의 발육단계에 따른 수태율은 연구자에 따라 성격에 많은 차이가 있으므로 원인의 규명을 위해서는 수정란의 질(quality) 등 동결수정란의 이식시 수태율에 영향을 미치는 요인들을 가급적 동일하게 한 상태에서 발육단계별로 다수의 수정란을 이식해 보아야 할 것으로 생각된다.

수란우와 공란우의 발정동기화 정도에 따른 수태율은 신선수정란에서는 수란우가 공란우에 비해 1일 빨랐을때 (43.8%)가 일치되었거나(37.0%), 1일 늦었을때(38.1%)보다 높았는데 이러한 결과는 Hasler 등²⁰과 Coleman 등²⁴의 보고와 일치하였으나 Linder와 Wright³⁸는 2일내의 동기화는 수태율에 큰 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. Hasler 등²⁰은 수란우의 발정발현이 공란우보다 약간 빠를 때가 수태율이 높은 원인에 대해서 과배란 처리된 소에서 회수된 수정란은 처리하지 않은 소의 수정란에 비해 발육에 있어서 약간 진보된 상태이기 때문이라고 견해를 제시하였다. 동결수정란에서는 수란우의 발정발현시간이 공란우와 일치되었을때가 37.9%로 가장 높았으며 1일 늦었을때 32.0%, 1일 빨랐을때 23.

5% 순으로 낮아졌다. Leibo²⁵는 수란우의 발정발현시간이 공란우에 비해 12시간 빨랐을때(40%)와 일치되었을때(36%)가 24시간 빨랐을때(30%)와 12시간 늦었을때(31%)보다 높았다고 보고하여 본 연구와는 시간의 구분이 달랐으나 발정동기화 정도에 따른 수태율은 비슷한 경향을 보였으며 양 등⁵⁶은 수란우의 발정발현시간이 공란우에 비해 12시간 늦었을때(62.5%)가 일치되었을때(33.3%)와 12시간 빨랐을때(20.0%)보다 높았다고 보고하여 본 연구와는 다른 결과를 보였다.

수란우의 산차에 따른 수태율은 신선수정란을 미경산우 6두에 이식한 결과 3두가 수태되어 50.0%, 경산우 58두 이식중 22두 수태되어 37.9%를 나타내어 미경산우에 이식하였을 경우 수태율이 높았으며 동결수정란에서는 미경산우 68두중 27두가 수태되어 39.7%, 경산우 74두중 19두 수태되어 25.7%로서 신선수정란과 마찬가지로 미경산우에 이식하였을때의 수태율이 경산우에 비하여 높았다. 이와같은 성적은 오 등⁵⁷이 동결수정란 이식후 미경산우의 수태율이 46.9%로서 경산우의 42.9%보다 높았다고한 보고와 일치하였다. Broadbent 등²⁷은 미경산우가 경산우에 비해 영양적인 스트레스를 적게 받으며 또한 미경산우의 자궁이 수정란의 이식 장소로서 보다 적합하기 때문에 수란우로서 미경산우가 우선적으로 선발된다고 하였다. 한편 Kitto²⁶는 미경산우의 수태율이 경산우에 비해 높았으나 미경산우의 자궁경관의 통과가 경산우보다 훨씬 힘들었으며 10 ~ 15초 이내에 통과될 수 없으면 이식을 취소하거나 외과적으로 이식해야 된다고 하였다.

수란우의 품종에 따른 수태율은 신선수정란에서는 젖소 42.1%, 육우 40.0%, 한우 33.3%로서 젖소와 육우는 비슷하였으나 한우가 낮았는데 다른 품종의 수란우에 비해 2등급의 수정란이 많이 이식된 것이 주원인이라고 생각된다. 젖소는 체란후 3시간이내 이식되었으며 육우는 7 ~ 8시간, 한우는 12 ~ 13시간동안 수정란의 장거리 수송후 이식되었으나 수태율에는 영향을 미치지 않은 것으로 생각되는데 Kitto 등²⁶도 수정란을 체란후 6 ~ 12시간 장거리 이동후에 이식하여도 수태율에 큰 차이가 없었음을 보고하였다. 동결수정란은 육우, 젖소 및 한우 수란우에서 각각 39.1%, 30.3%, 14.3%의 수태율을 보여 육우가 가장 높았으며 한우는 다른 품종에 비해 현저하게 낮았다. 그리고 육우 수란우의 품종별 수태율은 헤어포드 35.7%, 앵거스 38.5%, 샤로레 50.0%였는데 샤로레는 이식두수가 6두뿐이었기 때문에 다른 품종과의 비교가 곤란하였다. 한우 수란우의 수태율이 현저하게 낮았던 원인은 이식두수가 7두로 타품종에 비해 적었으며 또한 수란우로 모두 경산우를 사용하였기 때문인 것으로 생각된다.

수정란의 동결시 동해방지제로서 글리세롤이 많이 쓰여지고 있다.^{58,59} 그러나 수정란의 세포들이 동결배지의 갑작스런 삼투압의 변화에 노출되었을 때 손상이 일어나므로 이러한 이유에서 동해방지제는 많은 연구보고에서 여러단계에 걸쳐 평형이 되었다.^{6,15,50,60} Franks 등³³은 수정란의 동결속도가 수정란의 생존성에 미치는 영향을 시험하기 위하여 관례적인 동결속도(Conventional freezing rate), 즉, 20°C에서 -7°C까지 1°C/분 속도로 냉각 후 식빙을 하고 -35°C까지 0.3°C/분 -38°C까지 0.1°C/분으로 동결후 액체질소에 침지하는 동결법과 20°C에서 -7°C까지 10°C/분 속도로 냉각후 식빙을 한뒤 7분간 정체, -30°C까지 10°C/분 속도로 동결, 30분간 정체시킨 후 액체질소에 침지시킨 2단계 동결법을 비교한 결과 관례적인 동결속도가 2단계 동결법에 비해 높은 수정란의 생존율(37.2% : 16.5%)을 보고하였다. Lehn-Jensen³²도 소의 배반포기 수정란을 이용한 연구보고에서 -5°C까지 10°C/분 속도로 냉각후 식빙을 하고, -30°C까지 0.3°C/분 속도로 동결하였을때와 -25°C까지 1.0°C/분 속도로 동결후 수란우에 이식한 결과 수태율이 각각 55%와 44%를 나타내어 완만한 동결속도가 수정란의 융해후 생존에 좋은 영향을 준다고 하였다. 본 연구에서 동결수정란의 글리세롤 평형단계 및 동결속도에 따른 수태율은 글리세롤 3단계 평형후 -6°C에서 -35°C까지 0.3°C/분, -38°C까지 0.1°C/분 속도로 동결시킨 수정란의 수태율이 39.4%로 글리세롤 6단계 평형후 -6°C에서 -30°C까지 0.5°C/분의 속도로 동결시킨 수정란의 30.3%보다 높은 수태율을 보였는데 이러한 수태율의 차이는 관례적인 동결법과 유사한 완만한 동결속도가 보다 빠른 속도로 동결한 방법보다 수정란의 융해후 생존에 좋은 영향을 주었기 때문인 것으로 생각되며 몇단계의 글리세롤 평형이 수정란의 생존에 유리한지에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않았으므로 글리세롤 평형단계에 대해서는 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

국립종축원에서 1985년부터 1990년까지 젖소의 신선수정란 64개와 동결수정란 142개를 발정이 동기화된 젖소, 육우 또는 한우에 비외과적으로 이식한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 신선수정란의 수태율이 39.1%로서 동결수정란의 수태율 32.4%보다 높았으며 평균 34.5%였다.

2. 수정란의 질에 따른 수태율은 신선수정란(41.3% : 33.3%)과 동결수정란(35.4% : 25.6%) 모두 1등급이 2등급보다 높았다.

3. 수정란의 발육단계에 따른 수태율은 신선수정란에서는 상실기(29.2%)에서 초기배반포기(33.3%), 배반포

기(50.0%), 확장배반포기(54.5%)까지 발육이 진행될수록 높았으며 동결수정란은 배반포기(44.4%)가 상실기(31.3%)와 초기배반포기(28.0%)에 비해 높았다.

4. 수란우와 공란우의 발정동기화 정도에 따른 수태율은 신선수정란은 수란우가 공란우에 비해 1일 빨랐을때(43.8%)가 1일 늦었을때(38.1%)와 일치되었을 때(37.0%)보다 높았으며 동결수정란은 일치되었을 때(37.9%), 1일 늦었을 때(32.0%), 1일 빨랐을 때(23.5%) 순으로 낮아졌다.

5. 수란우의 산차에 따른 수태율은 신선수정란(50.0% : 37.9%)과 동결수정란(39.7% : 25.7) 모두 미경산우에 이식하였을 때가 경산우에 이식 하였을 때보다 높았다.

6. 수란우의 품종에 따른 수태율은 신선수정란에서는 젖소(42.1%)와 육우(40.0%)가 한우(33.3%)에 비해 높았으며 동결수정란은 육우(39.1%), 젖소(30.3%), 한우(14.3%) 순으로 낮아졌다.

7. 동결수정란의 글리세롤 평형단계 및 동결속도에 따른 수태율은 3단계 평형후 -6°C에서 -35°C까지 0.3°C/분, -38°C까지 0.1°C/분 속도로 동결후 이식했을 때(39.5%)가 6단계 평형후 -6°C에서 -30°C까지 0.5°C/분 속도로 동결후 이식시(30.3%)보다 수태율이 높았다.

참 고 문 헌

1. Sreenan JM. Embryo transfer procedure and its use as a research technique. *Vet Rec* 1983; 112 : 494~500.
2. Rowe RF, Del campo MR, Critser JK, et al. Embryo transfer in cattle : Nonsurgical transfer. *Am J Vet Res* 1980; 41 : 1024~1028.
3. Schneider HJ, Castleberry RS, Griffin JL. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* 1980; 13 : 73~85.
4. Christie WB. Non-surgical transfer of bovine eggs : Investigation of some factors affecting embryo survival. *Vet Rec* 1980; 106 : 190~193.
5. Newcomb R, Rowson LEA. Investigation of physiological factors affecting non-surgical transfer. *Theriogenology* 1980; 13 : 41~49.
6. Willadsen S, Polge C, Rowson LEA. The viability of deep-frozen cow embryos. *J Reprod Fert* 1978; 52 : 391~393.
7. Renard JP, Heyman Y, Leymonie P, et al. Sucrose dilution : A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology* 1983; 19 : 145 (Abst).
8. Christie WB. Deep freezing of cattle embryos. *Proc 5th Annu Conv Am Embryo Transfer Assoc* 1986; 33~42.

9. Foote RH. *In vitro* fertilization and embryo transfer in domestic animals: Applications in animals and implications for humans. *J In vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1987;4:73~88.
10. Wittingham DG, Leibo SP, Mazur. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 1972;178:411.
11. Wilmut I, Rowson LEA. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973;92:686~690.
12. Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LEA. The influence of *in vitro* culture and cooling on the survival and development of cow embryos. *J Reprod Fert* 1976;47:367~370.
13. Bilton RJ, Moore NW. Factors affecting the viability of frozen stored cattle embryos. *Aust J Biol Sci* 1979;32:101~107.
14. Lehn-Jensen H, Greve T, Navas AP. Two step freezing of cow embryos. *Theriogenology* 1981;15:427~432.
15. Elsdén RP, Seidel GE, Takeda T, et al. Field experiment with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. *Theriogenology* 1982;17:1~10.
16. Lehn-Jensen H, Rall WF. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology* 1983;19:263~277.
17. Schneider U. Cryobiological principles of embryo freezing. *J In vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1986;3:3~9.
18. Richards DW, Sikes JD, Murphy CN. Nonsurgical transfer and the survival of frozen-thawed bovine embryos supplemented with raffinose. *Theriogenology* 1988;29:295(Abst).
19. Nelson CF, Nelson LD. Cryopreservation of 7-to 9-day bovine embryos. *Theriogenology* 1988;29:281(Abst).
20. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, et al. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 1987;27:139~168.
21. Looney CR, Oden AJ, Massey JM, et al. Pregnancy rates following HCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology* 1984;21:246(Abst).
22. Humblot P, Perrin J, Jeanguyot N, et al. Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology* 1987;27:240(Abst).
23. Donaldson LE. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. *Vet Rec* 1985;117:489~491.
24. 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.
25. Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984;21:767~790.
26. Kitto GP. Tips and considerations in embryo transfer. *Proc Ann Meeting Soc Theriogenology Sept* 1984;201~210.
27. Broadbent PJ, Stewart M, Dolman DF. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* 1991;35:125~139.
28. 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.
29. Shea BF, Janzen RE, McDermand DP. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in ALBERTA over a nine year period. *Theriogenology* 1984;21:186~195.
30. Prather RS, Spire MF, Schalles RR. Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos. *Theriogenology* 1987;28:195~204.
31. Farrand GD, Elsdén RP, Seidel GE. Effect of slow cooling and point temperature on survival of frozen bovine embryos. *J Anim Sci* 1985;61:460~465.
32. Massip A, Van der Zwalmen P. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Vet Rec* 1984;115:327~328.
33. Franks GC, Coley SL, Betterbed B, et al. The effect of freezer type, cryoprotectant, and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology* 1986;26:135~144.
34. Takeda T, Elsdén RP, Seidel GE. Survival of cryopreserved bovine embryos cooled at 0.5 or 1°C/minute. *Theriogenology* 1985;23:232(Abst).
35. 具滋弘, 鄭昌國. 젖소의 非手術의 受精卵回收 및 移植試驗. 大韓獸醫師會誌 1982;18:45~52.
36. 高光斗, 鄭吉生, 李基萬. 韓牛의 受精卵移植에 關한 研究. 第三報. 受精卵의 非外科的 採取와 移植. 韓畜誌 1981;23:331~337.
37. Newcomb R, Christie WB, Rowson LEA. Non-surgical recovery of bovine embryos. *Vet Rec* 1978;102:414~

- 417.
38. Linder GM, Wright RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 1983;20 : 407~416.
 39. Alexander AM, Markus AN. A modified technique for the transplantation of embryos into recipient cows. *Vet Rec* 1977;100 : 73~74.
 40. 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.
 41. Etherington WG, Kilmer BA, Burke JE, et al. Pregnancy rates related to stage of estrus cycle at prostaglandin treatment in an embryo transfer recipient herd. *Theriogenology* 1986;25 : 845~854.
 42. Garcia MB, Menard DP. A new method of non-surgical embryo transfer in the bovine. *Theriogenology* 1986;25 : 137(Abst).
 43. Almeida AP. Nonsurgical embryo transfer in cattle : The effect of clenbuterol on pregnancy rates. *Theriogenology* 1989;31 : 166(Abst).
 44. Greve T. Bovine egg transplantation : Superovulation, non-surgical recoveries and transfers. *Nord Vet Med* 1980;32 : 513~522.
 45. Mapletoft RJ, Linsell CE, Pawlyshyn V. Effect of clenbuterol, body condition and non-surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients. *Theriogenology* 1986;25 : 172(Abst).
 46. Bowen RA, Elsden RP, Seidel GE. Embryo transfer for cows with reproductive problems. *J Am Vet Med Assoc* 1978;172 : 1303~1307.
 47. Wright JM. Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology* 1985;23 : 17~29.
 48. Leibo SP. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1986;25 : 166(Abst).
 49. Chupin D, Florin B, Procureur R. Comparison of two methods. *Theriogenology* 1984;21 : 455~459.
 50. Trounson AO, Shea BF, Ollis GW, et al. Frozen storage and transfer of bovine embryos. *J Anim Sci* 1978;47 : 677~681.
 51. Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozenthawed embryos. *Theriogenology* 1984;21 : 68~79.
 52. Lehn-Jensen H. Survival fo cow blastocysts using cooling rates of 1°C/min to -25°C before plunging. *Theriogenology* 1983;19 : 138(Abst).
 53. Elsden RP, Nelson LD, Seidel GE. Embryo transfer in fertile and infertile cows. *Theriogenology* 1979;11 : 17~25.
 54. Shea BF, Janzen RE, McAlister RJ, et al. Freezing of bovine embryos : Effects of embryo quality, time from thawing to transfer and number frozen per vial. *Theriogenology* 1983;20 : 205~212.
 55. Elsden RP, Nelson LD, Seidel GE. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology* 1978;9 : 17~26.
 56. 梁甫錫, 吳成宗, 柳承煥 등. 韓牛에 있어서 多排卵의 反復處理 및 凍結受精卵 移植에 關한 研究. 韓國受精卵移植研究會誌 1988;3 : 38~42.
 57. 吳成宗, 梁甫錫, 金熙錫 등. 소의 發情同期化 및 凍結受精卵 移植에 關한 研究. 韓畜誌 1986;28 : 468~473.
 58. Kennedy LG, Boland MP, Gordon I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology* 1983;19 : 823~832.
 59. Garcia MA, Fahning ML, Graham EF. *In vitro* culture, freezing, thawing, and transfer of bovine embryos versus transfer of fresh embryos from the same collection : Preliminary results. *Theriogenology* 1986;26 : 803~812.
 60. 石湖峰, 李光源, 申溶植 등. 소의 凍結受精卵이 受胎에 미치는 影響. I. 그리세롤 浮遊液에 衣한 六段階 平衡의 影響. 韓畜誌 1983;25 : 369~374.