

개에서 동결정액을 이용한 인공수정 — Methanol을 이용한 간이 동결방법 —

김용준 · 박영재 · 김병진 · 유일정

전북대학교 수의학대학
(1994년 8월 13일 접수)

Artificial insemination with frozen semen in the dog — Simple freezing method using methanol —

Yong-jun Kim, Young-jae Park, Byeong-jin Kim, Il-jeoung Yu

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Aug 13, 1994)

Abstract : The semen from four male dogs which had been proven to be fertile in the past were frozen in a deep freezer at -60°C by simple freezing method using methanol and preserved at the same temperature for from 7 to 10 days. The semen were inseminated to 7 female dogs in estrus to find out the usability of this freezing method in artificial insemination for dogs. In addition, post-thaw motility and viability of sperm from two male dogs which had been fertile were also evaluated to investigate individual difference. Successful pregnancy was obtained by artificial insemination with canine semen frozen at -60°C by simple freezing method using methanol, namely, 3 bitches among 7 bitches which had been inseminated delivered puppies(42.8%).

The average litter size of the whelping dogs were 4.3 puppies. The average post-thaw motility of canine sperm in the cases of conception was shown higher than those of non-conception(65.0% vs. 42.5%), along with the same result in the average post-thaw viability between the two groups(53.3% vs, 27.5%). Individual difference of post-thaw motility and viability was obtained between two fertile dogs($p<0.05$).

Key words : artificial insemination, simple freezing, methanol, post-thaw, motility, viability, canine sperm

서 론

개에서 인공수정은 번식효율을 높일 수 있다는 점에서 많은 관심의 대상이 되고 있고, 특히, 동결정액의 이용은 우수한 개체의 정자를 반 영구적으로 보존할 수 있는 점, 장소나 시간의 제한없이 동결정액을 이용한 번식이 가능할 수 있다는 점에서 애완동물 산업에 적지않은 기여를 할 수 있을 것으로 보인다.

개 정액의 동결방법으로는 현재까지 Seager와 Fletcher¹ 및 여러 연구자들^{2,3}이 사용한 dry ice 동결법, 그리고 Gill et al⁴ 및 여러 연구자들^{5,6,7}이 사용한 액체질소 가스 동결법이 주종을 이루어 왔고, 최근에는 cell freezer의 사용 가능성도 제시되고 있다. 그러나 아직까지 어떤 동결방법이 수태율을 높이는데 선택될 수 있는지 명확한 결론이 내려져 있지 않고, 한편, 상기 동결 방법들은 고가의 장비가 필요하거나 동결과정이 매우

번거로운 점이 있으므로 저자는 새롭고 간이한 동결방법으로서 methanol을 이용한 정액 동결방법을 시도하였으며, 이 방법에 의해 동결된 정자가 인공수정시 수태력을 나타내는지 알아보고자 본 실험을 수행하였다. 또한 methanol을 이용한 정액동결 방법에서 과거 수태력을 보인 犍犬들의 정액을 동결한 후 융해시 정자의 활력 및 생존율에서 개체간 차이가 있는지를 알아보기 위한 실험도 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 인공수정후 수태결과를 알아보기 위해 사용된 모견은 과거에 번식력을 나타낸 바 있는 개로서 체중이 6-23kg인 2.5-5세의 모견 4두를 이용하였고, 빈견은 체중이 3.5-19kg으로서 2.5-5세, 1-5산의 잡종 빈견 7두를 사용하였다.

정액의 채취 : 모견의 정액 채취는 정자 농도가 높은 2분획 중심으로 개체당 주 1회 오전 8-9시 사이에 채취하였고, 채취한 원정액의 일부를 취하여 정자의 활력, 정자수, 기형을 검사에 이용하였다.

동결정액 희석액의 제조 : 이 실험에서 정액 동결을 위한 희석액은 Foote⁸의 조성에 준하였으며, glycerol은 5%가 되도록 첨가하였다.

정액의 희석 및 냉각 : 정액 검사를 한 후 산정된 정자수에 따라 원정액과 희석액이 비율이 1대 1-2이상이 되도록 하여 전체 희석액의 양을 조정하였다. 1차 희석은 원정액이 들어있는 시험관에 35℃로 가온된 희석액을 소량씩 분주하여 실시하였고 이 시험관을 35℃로 가온된 물이 들어있는 비이커에 넣어 5℃냉장고에서 2시간에 걸쳐 5℃로 서서히 냉각하였다. 2차 희석액 5℃로 유지시킨 glycerol 첨가 2차 희석액을 1차 희석액과 동량으로 1시간에 걸쳐 6-10회 분할 희석하였다.

Glycerol 평형 : 2차 희석을 마친 정액의 glycerol 평형은 5℃냉장고에서 2시간에 걸쳐 실시하였다.

동결 방법 : Methanol을 이용한 동결을 위하여 plastic 상자(15x10x5cm)안에 100% methanol 200ml를 넣고 5℃에서 냉장보관하였고 glycerol 평형된 희석 정액을 0.5ml straw에 충전하여 methanol이 들어 있는 plastic 상자에 넣은 다음 -60℃ 또는 -80℃의 deep freezer내에서 동결하였다.

동결 정액의 보존 : 동결된 정액은 사용시까지 -60℃의 deep freezer에서 계속 보존하였다.

동결 정액의 융해 : 동결된 straw를 37℃ 물이 들어 있는 비이커에 넣어 30초 동안 융해하였다.

실험 처리

실험 I : 개 인공수정에서 동결정액을 이용하여 수태정적을 알아 보고자 과거에 번식력을 보인 4두의 개 정액을 이용하였으며 정액이 들어 있는 straw를 -60℃에서 methanol을 이용하여 동결하였고 같은 온도에서 7-10일간 보존한 다음, 37℃ 수조안에서 30초 동안 융해하여 발정기 중에 있는 암캐에 인공수정하였다.

암캐는 7두를 대상으로 하였으며 정액은 1일 1회 2일 연속 주입하였다. 1회 주입정자수는 2×10^8 /ml 이상이 되도록 하였다.

실험 II : 과거 번식력을 보인 2두의 개 정액을 이용하여 동결정액의 융해후 활력 및 생존율에서 개체간 차이를 알아보기 위하여 -80℃에서 동결하여 같은 온도에서 보존하였고 동결후 2,7,15,30일에 각각 융해하여 비교하였다. 정액의 동결과 보존 및 융해는 2두의 정액을 동시에 처리하였으며, 동일한 실험을 6회 반복하였다.

정자의 활력 및 생존율의 판정 : 정자의 활력 및 생존율은 광학 현미경 하에서 400배로 경검하여 한 슬라이드에서 5개 시야의 평균을 구하였다. 활력은 정자의 전진운동의 최고치를 100%로 하였을 때 이와 비교된 전진운동의 평균 백분율을 구하였으며, 생존율은 살아서 움직이는 정자의 평균 백분율을 구하였다.

결과 분석 : 실험 II에서 얻은 성적을 T검정에 의해 실험군간 유의차를 구하였다.

결 과

과거 번식력을 나타낸 바 있는 숫캐 4두의 정액을 메타놀을 이용하여 -60℃에서 동결하여 같은 온도에서 7-10일간 보존한 후 발정기 중에 있는 암캐 7두에 인공수정한 결과는 Table 1과 같다.

암캐 7두에 인공수정시킨 결과 3두가 분만하여 42.8%의 수태율을 나타내었으며 분만전의 평균 산자수는 4.3두이었다. 분만시 사산은 1두도 없었다. 정액 채취시 평균 정자수는 3.9×10^8 /ml($2.0-6.2 \times 10^8$ /ml), 평균 활력은 82.9%(70-95%), 평균 기형율은 6.5%(4.0-9.4%)이었다.

수태를 한 암캐에 제공된 숫캐의 정액 채취직후 평균 정자수는 4.5×10^8 /ml, 비수태 암캐에 제공된 숫캐의 평균 정자수는 3.5×10^8 /ml이었다. 또한, 수태전과 비수태전에 제공된 정자의 평균 활력은 정액 채취직후 각각 90.0%, 77.5%이었으며, 정자의 평균 기형율은 각각 6.4%, 6.6%로서 정액 채취직후 정자성상은 수태가 일어

Table 1. Production of offspring by artificial insemination* with canine semen frozen using methanol

Male** dog	SA at collection			SA at insemination		Bitch			Offspring		
	No of sperm/ml	Motility (%)	Abnormality (%)	Motility (%)	Viability (%)	Parity	Weight (Kg)	Still birth	Live Birth		
									male	female	total
A	3.3x10 ⁸	85	7.2	65	50	P	4.5	-	1	5	6
A	4.0x10 ⁸	90	5.5	70	60	2nd	5	-	2	2	4
A	2.5x10 ⁸	80	6.0	40	20	P	4.5	-	-	-	-
B	6.2x10 ⁸	95	6.5	60	50	2nd	19	-	1	2	3
B	5.9x10 ⁸	70	9.4	30	20	5th	18	-	-	-	-
C	2.0x10 ⁸	90	4.0	60	40	2nd	3.5	-	-	-	-
D	3.5x10 ⁸	70	7.0	40	30	3rd	4.3	-	-	-	-

Conception rate : 3/7 (42.8%)

SA : Semen analysis, P : Primiparous insemination

* : Artificial insemination was performed with canine semen frozen and stored at -60°C for 7-10 days

** : Age, breed and weight of male : A; 3 yrs, mixed, 7kg, B; 5 yrs, Jindo, 22kg, C; 3 yrs, Maltese, 6kg, D; 2.5 yrs, Pointer, 23kg

난 경우 수태가 일어나지 않은 경우보다 기형율을 제외한 정액검사에서 더 높은 수치를 나타내었다.

동결정액의 융해후 인공수정시 정자의 평균 활력은 52.1%(30-70%)이었으며, 정자의 평균 생존율은 38.6%(20-60%)이었다. 한편, 수태를 한 암캐에 제공된 수캐의 융해후 평균 정자활력은 65.0%, 비수태 암캐에 제공된 수캐의 평균 정자활력은 42.5%이었으며, 정자의 평

균 생존율은 각각 53.3, 27.5%로서 수태가 일어난 군의 정자 성상에서 더 높은 수치가 인정되었다.

과거 2년간 번식력이 인정된 수캐 2두의 정액을 -80°C에서 동결한 후 2,7,15,30일에 융해하여 정자의 활력 및 생존율에 따른 개체의 차이를 비교한 결과는 Table 2와 같다.

동결후 2, 7, 15, 30일째의 각 융해일에서 A개체는

Table 2. Individual difference of post-thaw motility and viability of canine sperm frozen at -80°C (Mean ± SD, n=6)

Individual*	Post - thaw index							
	Motility(%)				Viability(%)			
	Thawing - day				Thawing - day			
	2nd	7th	15th	30th	2th	7th	15th	30th
A	74.00±11.40 ^a	65.00±11.18 ^a	58.00±11.51 ^a	53.00±9.75 ^a	44.00±4.18 ^a	39.00±4.18 ^a	35.00±5.00 ^a	31.00±4.18 ^a
B	62.00±5.70 ^b	52.00±5.70 ^b	41.00±4.18 ^b	37.00±4.47 ^b	34.00±4.18 ^b	35.00±3.54 ^b	30.00±3.54 ^b	25.00±3.59 ^b

^{a, b} : Different superscripts denote significant differences within columns(p<0.05)

* : Those male dogs have been proven to be fertile during the previous 2 years

B개체보다 각각 모두 유의성 있게 높은 정자의 활력 및 생존율을 나타내었다($p < 0.05$).

고 찰

이 실험에서 개정액을 스트로에 충전한 후 메타놀을 이용한 간이 동결법을 사용하여 -60°C 에서 동결 보존하였고 이 정액을 암개 7두에 주입하여 3두가 분만함으로써 42.8%의 수태율을 얻었다. 메타놀을 이용한 동결법은 세포 동결 및 수정란 동결에서 최근 소수 이용되고 있으나 개정액 동결시 사용되어 수태성적을 보고한 것은 최초의 결과로 보여진다.

Andersen⁹은 straw 및 LN gas를 이용하여 25%의 수태율을 보고하였고, 다시 그후의 연구에서 같은 방법으로 80%의 수태율을 보고하였다. 또한, Bowen et al⁶과 Farstod⁷도 동일한 방법을 사용하여 각각 15%와 72%의 수태율을 보고하였다. Pellet 및 dry ice를 이용한 연구에서 Seager와 Fletcher¹는 46%, Lees와 Castleberry²는 57%, Platz와 Seager³는 92%의 수태율을 보고하였다.

메타놀을 이용한 동결방법을 접하지 못해 이 실험의 수태율과 비교하기 어려우나 이 실험에서의 수태율은 상기 보고들의 수태성과 비교해 볼 때 중간정도의 성적으로 보여진다. 한편, 인공수정시 정액주입의 부위로서 Andersen¹⁰, Smith¹¹는 외과적인 방법으로 자궁내 정액을 주입하여 각각 76%, 66-83%의 수태율을 보고하였고 Gill et al⁴과 Lees와 Castleberry²는 질내 주입법을 이용하여 각각 0%, 57%의 수태성적을 보고하였으며, Platz와 Seager³는 동일한 방법으로 92%의 높은 수태율을 보고하였다.

본 실험에서 사용된 질내 주입법에서 43%의 수태율을 나타낸 것은 상기 성적들과 비교하여 중등도의 성적으로 보여지며, 개에서 질내 주입법을 사용하는 것이 사용방법의 편이성에서 선택되었거나 앞으로 수태율을 높일 수 있는 방법이 더욱 연구되어야 할 것으로 사료된다.

이 실험에서 분만개의 평균 산자수는 4.3두이었고, 2회 주입한 총정자수는 평균 4×10^8 이었다. 동결정액을 이용한 개의 인공수정에서 50%이상의 수태율을 보고한 Andersen¹⁰, Lees와 Castleberry²는 각각 1회 주입시 2×10^8 , 1×10^8 - 1.5×10^8 의 주입 정자수를 보고하였고 Gill et al⁴도 2×10^8 의 주입정자수를 보고하였다. 또한 Feldman과 Nelson¹²이 주입정자수는 인공수정 1회당 최소 1.2×10^6 이어야 된다고 보고한 것은 이 실험의 주입정자수와 일치되는 것으로 보인다.

이 실험에서 수태를 일으킨 개정자의 융해 후 인공수정시 평균활력 및 생존율은 각각 65.0%, 53.3%이었으며, 수태를 일으키지 못한 정자의 평균 활력 및 생존율은 42.5%, 27.5%이었다. 개정액 동결정액을 이용하여 수태성적을 보고한 Andersen¹⁰은 50-70%의 융해후 정자 활력을 보고하였고, Takeishi et al¹³은 35-70%, Lees와 Castleberry²는 34-53%, Seager는 48.7%를 각각 보고하였다. 그리고 Olar¹⁴는 40-60%를 보고하였다. 한편, 동결정액을 사용하여 수태성적을 전혀 얻지 못한 것으로 보고한 Gill et al⁴은 융해후 정자의 활력을 28%로 보고한 바, 이 실험에서 수태 및 비수태정자의 융해후 활력 및 생존율과 다소 일치되는 것으로 보인다.

과거 번식력을 보인 숫개 2두 정액의 개체간 비교에서 동결된 A개체의 정자는 B개체의 정자보다 융해후 유의성있게 높은 활력 및 생존율을 나타내었는데, 이 결과는 정자의 동결시 내동성에서 개체간 차이가 있음을 시사하는 것으로 사료된다. 이것은 정액채취시의 정자의 활력 및 생존율이 A개체에서 각각 평균 88.3%, 86.7%, B개체에서 각각 86.7%, 85.8%로서 A개체와 B개체간 서로 큰 차이가 없었던 사실과 두 숫개가 모두 과거에 번식력을 나타낸 사실을 보아서도 정자동결시 개체간 차이가 나타날 수 있는 것으로 보여진다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 개에서 메타놀을 이용하여 동결한 정액에 의해 수태가 가능하게 된 상기의 결과로 비추어 보아 메타놀을 이용한 간이정액 동결법을 개의 인공수정에 사용할 수 있을 것으로 판단되며, 또한 과거 번식력을 나타낸 개에서도 정액은 동결시 내동성에서 개체간 차이를 나타낼 수 있는 것으로 보인다.

결 론

개정액 동결정액을 이용하여 수태성적을 알아보고 간이 동결방법의 사용가능성을 알아보고자 과거 번식력을 보인 숫개 4두의 정액 스트로를 메타놀을 이용하여 -60°C 에서 동결하였고 7-10일동안 동일온도에서 보존하여 융해후 발정기중에 있는 암개 7두에 주입하여 수태성적을 알아보았으며 또한, 개체간의 차이에 따른 융해후 정자의 활력 및 생존율을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 메타놀을 이용한 간이 동결방법을 사용 -60°C 에서 동결하여 7-10일간 보존된 개정액을 인공수정한 결과 7두중 3두가 분만하여 42.8%의 수태율을 나타내었다.

2. 분만개의 평균 산자수는 4.3두 이었고, 수태를 일

오킨 경우의 숫캐정자의 용해후 인공수정시 평균 활력 및 생존율은 각각 65.0%, 53.3%, 비수태시 정자의 용해후 평균활력 및 생존율은 각각 42.5%, 27.5%로서 수태를 일으킨 정자의 활력 및 생존율이 더 높은 율을 나타내었다.

3. 과거번식력을 보인 숫캐 2두의 동결정액은 용해후 활력 및 생존율에서 개체간 차이가 인정되었다($p < 0.05$)

이상의 결과 methanol을 이용한 정액의 동결은 개 인공수정에서 사용 가능하며 과거 번식력을 나타낸 개에서도 동결정액은 용해후 정자성상에서 개체간 차이를 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Seager SWJ, Fletcher WS. Collection, storage, and insemination of canine semen. *Lab Anim Sci* 1972; 22: 177-182.
2. Lees GE, Castleberry MW The use of frozen semen of artificial insemination of German shepherd dogs. *JAAHA* 1977; 13: 382-386.
3. Platz CC, Seager SWJ. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab Anim Sci* 1977; 17: 1013-1016.
4. Gill HP, Kaufman CF, Foote RH, et al. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen semen. *Am JV et Res* 1986; 31: 1807-1813.
5. Andersen K. Fertility of frozen dog semen. *Proc 7th Int Cong Anim Reprod* AI, Munich, 1972; 1703-1706.
6. Bowen RA, Amann RP, Frome DP, et al. Artificial insemination with frozen semen in the dog. *Dog World* 1984; 69: 66-57.
7. Farstad W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh and frozen semen. *J Small Anim Pract* 1981;25: 561.
8. Foote RH. Extenders for freezing dog semen, *Am J Vet Res* 1964; 25: 37.
9. Andersen K. Artificial insemination and storage of canine semen. In Morrow, D.A.(ed): *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1980; 661-665.
10. Andersen K. Insemination with frozen dog semen based on a new technique. *Zuchthygiene*. 1975; 10: 1.
11. Smith FO. Update on freezing canine semen. *Proceedings of the Annual Meeting of the Society of Theriogenology*, Denver, 1984; 61-73.
12. Feldman EC, Nelson RW. Artificial insemination. In: Feldman EC and Nelson RW ed. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1987; 519-524.
13. Takeishi M, Mikami T, Kodama Y, et al. Studies on reproduction in the dog. VIII. Artificial insemination using frozen semen. *Jpn J Anim Reprod* 1976; 22: 28.
14. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. Influence of extender, Cryoperservative and Seminal processing procedures on post thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Therogenology* 1989; 31: 451-461.