

젖소의 수정란이식 기술

박 중 생

경상대학교 농과대학 축산학과 교수

I. 서 론

소의 인공수정은 정액의 동결보존법의 확립에 의해 널리 보급되어, 유우의 비유능력을 비약적으로 향상시켰고, 생식기 전염병을 구제하는 등 커다란 경제적 효과를 가져왔다. 인공수정은 종모우의 선발강도를 높여 소의 유전적 개량을 증진시키는 수단이다.

일반적으로 수정란이식이라고 부르는 이 기법은 다배란 수정란이식 또는 다배란 배이식(multiple ovulations and embryo transfer, MOET)을 칭하는 것으로서 종모우는 물론 종반우의 선발강도도 다같이 높여줄 수 있도록 개발된 기술이다. 또한 수정란이식은 쌍자생산, 산자의 성조절, 유전자전이 가축 생산등과 복제산자의 생산등으로 기술을 발전시키는 기초가 된다. 소의 경우 정상적으로 1회에 1개의 난자를 배란하고 있으나 다배란 처리를 함으로써 1회에 10~20개의 난자를 배란시키고 이때 우수한 능력의 종모우 정액으로

인공수정시키면 1회에 4~5개의 우수한 유전적 조성을 가진 이식 가능한 수정란을 얻을 수 있다. 그래서 인공수정에 비하여 수정란 이식은 유우의 유전적 개량을 위하여 매우 필요한 기술인 것이다.

이와 같은 수정란이식 기술의 현황과 실용화를 위한 문제점 및 앞으로의 연구동향 등에 관하여 간략히 소개하고자 한다.

II. 수정란의 제취

1. 공란우의 선정

최근에 소의 다배란처리 기술의 진전에 따라 공란우 1두로 부터 회수되는 정상란 수가 평균 6~8개로 향상되고, 이식 기술도 간편화 되어 수태율이 향상되게 되었다. 우군의 비유능력에 있어서 상위 10~20%를 공란우로 선택한다면, 2~3년 내에 우량우의 비율이 70%에 도달하여 우군 전체의 개량을 가능하게 한다.

공란우는 비유능력이 높고 건강하며 전염성 질환이 없는 개체를

선발하여야 한다. 또한 공란우로서의 직접적인 선정조건은 ① 산력(産歴)이 명료한 개체, ② 성주기가 정상인 개체, ③ 임신의 유지에 장애를 가져오는 질병이 없는 개체, ④ 노령이 아닌 개체 등이다.

일반적으로 두당 회수되는 수정란의 수는 젖소의 연령, 분만후의 일수, 비유량, 발정주기 중의 성선자극호르몬 투여 개시일, 계절, 품종, 산차 등에 관련된다. 공란우로 선택하는 연령은 10세가 초과하면 원시난포가 적어서 배란수가 감소하므로 초산부터 10세까지의 범위 내에서 선택하는 것이 좋다. 성성숙 과정에 있는 소는 외인성의 성선자극호르몬에 대해서 민감한 반응을 나타내지만 자궁이나 난관의 상태는 수정란을 정상적으로 발육시킬 수 없고 능력검정도 불가능하므로 공란우의 대상에서 제외하는 것이 좋다. 자궁내막염, 생식기 질병, 난소낭종, 장기공태등의 번식장애우 및 노령우 등은 공란우로서 부적합하다. 분만후 50일을 경과한 그리고 18~24일의 정상 발정

주기를 보이는 소를 선정하여 직장 촉진으로 황체가 건재한 것을 확인한 후 제2차 발정을 발현한 소를 공란우로 선정하여 다배란 처리를 실시한다.

2. 다배란 처리법

발정주기 8~13일의 소를 직장 촉진하여 황체를 확인하고 FSH를 12시간 간격으로 1일 2회 4시간 경산우의 경우는 40~20mg (제품에 따라 투여일에 따라 차등)씩 투여한다. 미경산우는 경산우의 75% 수준의 용량이면 적정하다. FSH처리 3일째에 prostagladin(Lutalyse의 경우 25mg)을 투여하여 48시간 후에 발정이 유지되도록 한다.

3. 공란우의 발정과 인공수정

다배란처리를 한 공란우는 주의 깊게 발정확인을 하여 발정개시 후 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시한다. 제2차 수정후에도 발정정후를 계속 보이면 GnRH를 주사하여 배란을 돕고 GnRH 주사 후 12시간에 제3차 수정을 실시한다.

4. 수정란의 회수

1) 수정란의 발육과 난관하강

배란후 난관팽대부에서 수정한 수정란은 약 1일 후에 2세포, 2일 경과후에 4 세포기, 3~4일후에는 8~16세포기로 되어 난관협부로 하강하여 약 5일후에는 자궁각 선단부까지 하강한다(그림1). 따라서 비외과적 관류에서는 수정 후 5일 이후가 아니면 난회수가 불가능하다.

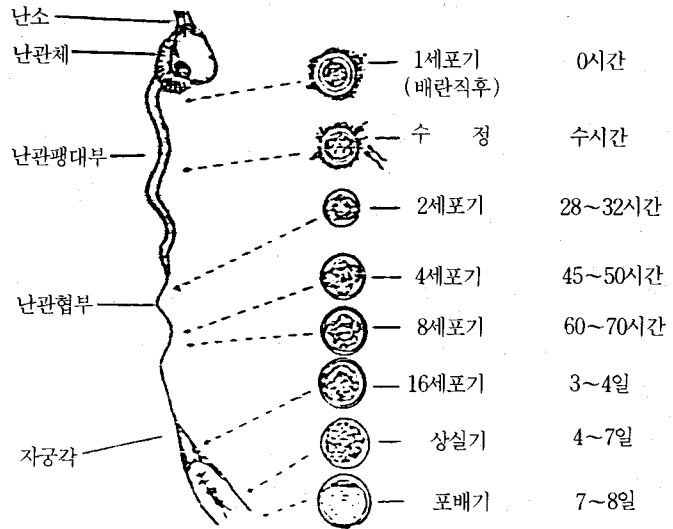


그림1. 수정란의 난관 하강

2) 수정란의 회수

(1) 수정란의 회수준비

인공수정후 5~6일째에 난소를 검사하여 황체수를 확인하고 그 수에 대한 수란우의 준비를 한다. 수정란의 회수에 있어서 준비해야 할 기재들은 수정의 방법에 따라 세척, 건조 및 멸균해 두어야 한다. 관류액은 수정란의 회수에 앞서 37℃의 항온수조에 넣어서 보온해야 한다.

(2) 공란우의 보정과 마취

공란우는 깨끗이 씻은 후 마른 수건으로 청결하게 한 후 보정한다. 전구는 상면보다 약 20cm 높게 하여 관류가 잘 되도록 한다. 보정한 후 직장을 통해 분변을 제거한다. 이어서 미근부의 털을 가위로 제거하고 알코올면으로 소독한 후 미추골간에 lidocaine 및 xylazine 등을 투여하여 마취시키고 꼬리가 처지게 됨을 확인한다.

(3) Foley catheter의 삽입

경산우에는 20ga. 그리고 미경산우에는 16ga의 Foley catheter를 선정하여 멸균된 stylet으로 보정하여 자궁경관을 경유하여 자궁각내로 삽입한다. Catheter를 자궁각 심부에 삽입할 때에는 직장을 통해 보정하고 있는 손의 내측에 catheter의 선단을 감싸듯 안전하게 삽입하여야 한다. Catheter의 선단이 자궁각 분기부의 중격으로부터 약 5cm 정도에 닿았을 때, 조수는 30ml 용량의 주사기로 공기를 주입하여 catheter 선단의 풍선을 팽창시킨다.

(4) 관류방법

관류액은 PBS를 이용하는데 보관병을 소의 외음부 보다 높게 걸어두어 낙차를 이용하여 관류하게 된다. 관류액의 양은 자궁각의 크기, 기술의 숙련도 등의 차이에

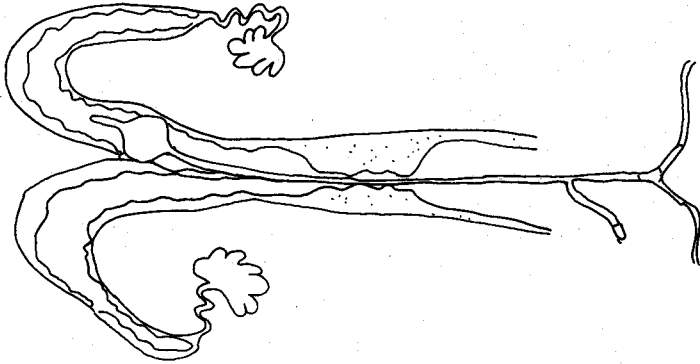


그림2. Foley catheter의 삽입 위치

따라 약 500ml 정도이면 충분하다. 관류는 난관-자궁 연결부로부터 하향하여 관류시킨다.

① 관류액의 30ml 정도를 자궁내에 주입하고 자궁각선단의 난관, 자궁이행부를 잡고 위로 들어올리는 형태로 회수한다.

② 관류액의 30~50ml 정도를 자궁내로 주입하고 자궁선단부로부터 5~10cm 정도의 지점을 위로 향하여 2~3회 밀어올린 후 자궁각선단의 난관, 자궁이행부를 상행으로 향하여 회수한다. 자궁선단부를 밀어올리는 것은 자궁점막에 붙어 있는 수정란을 부유시키기 위한 때문이다.

③ 자궁각의 선단으로부터 자궁각을 마사지하면서 수정란을 회수한다. 마사지방법은 우자궁각을 씻어내릴 때는 좌측손으로 직장벽을 쥐어 자궁각선단으로부터 마사지 하면서 씻어내린다. 좌자궁각을 씻어내릴 때는 우측손

으로 조작한다.

관류가 끝나면 ballon catheter 선단의 풍선으로부터 공기를 뽑아낸 후 ballon catheter를 제거시킨다. 빼낸 catheter의 선단을 위로 들어올려 catheter내에 남아 있는 관류액을 회수한다.

Ⅲ. 수정란의 검사 및 처리

1. 수정란의 검사

수정란은 발육단계에 따라 형태가 달라지는데 현미경하에서 형태를 관찰하여 일정한 기준과 비교하여 수정란의 질을 판정하므로 수정란의 형태 관찰에 의한 평가에는 숙련이 필요하다. 즉 수정란의 윤곽, 색조, 분할구의 크기와 난황의 균일성, 세포의 밀도와 균일성, 세포와 투명대의 간격, 돌출한 세포수와 변성된 세포수 및 수포의 수와 크기 등을 면밀히 검사한다.

2. 수정란의 위생적 조작

수정란 자체 또는 이식기술 과정에서 미생물의 오염은 난의 발육장애나 불수태의 원인이 하나로

생각된다. 따라서 수정란이식기술을 성공시키기 위한 제일의 조건은 미생물오염의 예방이라고 해도 과언이 아니다. 오염의 원인으로는 기구, 관류액, 보존액 또는 체외배양액, 실험실 및 채란실의 공기, 시술자, 공란우 및 수란우 등이 있다.

수정란이식에 사용되는 기구, 관류액 및 보존액 등은 사용전에 반드시 멸균처리에 의해 미생물을 제거하여야 한다. 수정란이식 기술은 세균학적으로 무균의 상태에 있는 공란우의 자궁내로부터 수정란을 인위적으로 채란하여 다시 수란우의 자궁내에 이식하는 작업이다. 따라서 작업 과정에서 세균의 오염이 일어날 수 있기 때문에 항상 무균적으로 조작하도록 유의하여야 한다.

Ⅳ. 수정란 이식

1. 수란우의 선정

수정란이식을 위하여 먼저 수란우를 선발하여야 하는데 수란우는 공란우와 달라서 혈통이나 능력을 평가할 필요는 없지만 번식기능이 정상적인 것을 선발하여야 한다. 즉 정상적인 발정주기를 보이고, 영양상태가 양호하며, 각종 질환이 없음을 진단받거나 예방된 소를 엄격하게 선발하여 수정란이식 대상으로 이용하여야 한다.

엄격한 선발기준에 선발된 수란우는 자연발정 및 발정유기를 실시하여 이식을 위한 준비를 실시한다. 발정유기는 분만후 50~60일 경의 젖소에 prostaglandin을 대

상부에 근육주사한 후 2~3일 후에 발정이 발생되었을 경우에는 7~8일 후에 수정란이식을 실시하고, 2~3일 후에 발정이 발현안된 경우에는 11일 후에 2차로 prostaglandin을 재주사하여 2~3일 후 발정을 관찰하여 발정발현된 소에게는 7~8일 후에 수정란이식을 실시한다.

발정발현이 완료되고 7~8일이 경과한 수란우의 직장내의 분비물을 제거한 후 외음부를 깨끗하게 세척한다. 수정란이식 5~10분 전에 미근부에 국소마취로 수란우를 진정시키고 이식을 위한 준비를 실시한다. 0.25ml Cassou rod에 수정란이 주입된 straw를 장착하고 Cassou rod의 오염을 방지하기 위하여 sheath를 씌우고 그 위에 외음부와 질에서의 오염방지를 위하여 sheath cover를 장착하여 질을 통과시킨다. 자궁경관 입구에서 sheath cover를 제거하고 sheath와 Cassou rod만 자궁경관을 통과시킨다. 자궁경관을 통과한 후에는 배란이 확인된 자궁쪽으로 Cassou rod를 유도하여 자궁선단 부위까지 전진시킨 후 수정란이 안전하게 이식될 수 있도록 sheath를 약간 뒤로 후퇴시켜 수정란을 주입한다. 이식 후 직장축진이나 초음파 임신진단기를 이용하여 임신감정을 실시한다.

2. 수정란의 이식

수정란을 수란우의 자궁내에 이식하는 방법은 수술적 방법과 비수술적 방법이 있으나 근래에는 인공수정의 직장절법에 준한 자궁경관



경유법으로 이식하는 방법이 개발되어 널리 이용되고 있다. 이 방법은 수란우에 상처를 주지 않고 농가나 목장등의 야외에서 실시가 가능하며 1~2인의 기술자로서 간단히 행할 수 있는 비수술적 이식방법으로 수술적방법에 비해 대단히 실용적이다. 자궁경관 경유법은 인공수정의 요령으로서 이식기구를 자궁경관으로부터 자궁내에 삽입하여 수정란을 주입하는 방법이다.

1) 수란우의 보정과 이식

보정대에 수란우를 보정하고 직장으로 부터 분변을 제거한 후에 lidocaine과 xylazine등으로 미추골간에 국소마취를 한다. 이어서 외음부를 잘 세척한 후에 타올로 깨끗이 닦고 알코올면으로 소독한 후 수정란이 장착된 이식기를 질내로 삽입한다.

2) 이식의 위치

· 외통의 선단이 자궁경관의 외구부에 닿했을 때 이식기를 자궁경관을 경유하여 자궁체까지 밀어넣어 자궁각을 2~3회 전방으로 확장시킨 후 손으로 자궁각을 감싸듯이

하여 이식기 선단을 그 속으로 밀어넣어 가능한 한 자궁각심부에 삽입한다.

자궁경관에서는 가능한 한 출혈이 되지 않도록 부드럽게 조작하고 이식기가 자궁각에 삽입된 후에는 곧바로 수정란을 이식하는 것이 좋다. 또한 자궁각에서 이식기를 좌우-상하로 움직이지 않도록 하고 이식기의 선단이 가능한 한 자궁벽에 접촉되지 않도록 한다.

V. 수정란이식 기술의 실용화 과제

수정란이식 기술은 가축의 증식과 개량에 대단히 유익한 기법이지만 이 기술이 인공수정과 같이 널리 실용화되지 못하고 있다. 이를 실용화하기 위해 과제들을 기술하면 다음과 같다.

1) 소의 수정란 이식과 관련된 관계 법규를 정비해야 한다.

현재 농수산부에서는 소의 수정란이식에 관한 법규를 마련하고 있는데 수의사와 가축인공 수정사가 일정한 교육을 이수하면 수정란이

식을 할 수 있도록 하고 있으나 구체적으로 어느 기관에서 어느 정도의 교육훈련을 받게 할 것인지 등에 관한 세부지침이 마련되지 않고 있어 실질적으로 수정란이식을 실용화할 수 없도록 되어 있다. 조속히 이를 완비하고 교육훈련을 이수토록하여 수정란이식 면허를 하도록 해야 할 것이다.

2) 우량 종빈우의 등록과 검정을 통한 선발이 체계화 되어야 한다.

공란우의 활용을 위하여 종빈우의 능력검정 결과를 보증하고 이에 따라 수정란의 가격을 차등화함으로써 우수한 공란우를 확보하고 수정란 공급에 활용될 수 있도록 농수산부와 축협중앙회를 중심으로 이를 체계화시켜 추진해 나가야 한다.

3) 수정란이식 후의 수태율 향상을 위한 기술개발이 필요하다.

다배란 수정란이식을 위하여는 수정란을 동결보존하거나 수란우를 발정 동기화시켜야 하며 공란우 및 수란우의 번식관리도 개선되어야 한다. 이러한 분야에 관련된 기술개발이 확립되어야만 수정란이식이 실용화될 수 있다. 현재 일부 기관에서 수란우를 엄격하게 선정하여 실시하고 있는 수정란이식의 수태율은 50%에 달하는 수준인 것으로 보고되고 있으나 이를 확대 실시할 경우 상기한 수준의 수태율을 얻기 위하여는 관련기술의 개발과 훈련을 통한 숙달이 필요하다.

4) 공란우의 선발강도를 향상시

키는 기술개발이 필요하다.

인공수정은 우수한 종모우의 선발강도를 20배 이상 향상시킬 수 있으나 현재 수정란이식은 종빈우의 선발강도를 20배 이상 향상시키지 못하고 있다. 이를 해결하기 위하여는 다배란 기술개선, 체외수정란 및 복제수정란의 이용기법 개발 등이 필요하다.

5) 수정란의 가격이 보다 저렴해야 한다.

수정란이식이 가축의 개량과 증식에 효과적인 기술이지만 이를 실용화하기 위하여는 종축의 가격에 대비하여 수정란의 공급가격이 보다 저렴해야 한다. 이를 해결하기 위하여는 상기한 다배란 기술개선, 체외수정란 및 복제수정란의 이용기법 개발 뿐만 아니라 수정란의 성감별 기법개발 등이 필요하다.

VI. 수정란이식 관련기술의 연구동향

1. 체외수정란 이용

1982년 미국의 Brackett 등이 체내성숙 난자를 이용하여 만든 체외수정란을 이식하여 첫 송아지를 생산하였고, 1988년 Goto등이 처음으로 체외성숙-체외수정란을 이식하여 송아지를 생산하였다. 우리나라에서도 본 대학을 포함한 3개 연구기관에서 시험관 송아지 생산에 성공하고 있다. 1995년 미국의 Hasler 등은 초음파유도로 채란한 소의 체외수정란을 1,884두에 이식하여 56%의 수태율을 얻고 있다.

2. 정자 미세주입 체외수정란 이식

사람에 있어서 남성불임의 주요 원인의 하나인 과소정자증의 경우는 인공수정이나 일반 체외수정을 시도할 만큼의 정자를 얻지 못하는 경우가 있는데 이에 대한 치료 대책으로는 난자에 1개의 정자를 직접 난자에 미세주입하는 기법에 의존할 수 밖에 없는데 이 기법으로 우리나라에서도 1994년 PL 불임 클리닉에서 첫 애기를 탄생시켰다. 수정능 획득 정자를 전기적으로 활성화 시킨 성숙한 난자의 세포질에 직접 주입하는데 성공율은 아직 매우 낮으며 유전적 질환 발생의 우려 등 문제가 남아 있다.

3. 태아, 수정란 혹은 정자의 성감별

태아의 양수내에 부유하고 있는 세포를 이용하거나 이식하기 전의 수정란의 일부를 biopsy하여 성염색체 검사 또는 PCR 기법으로 성감별을 할 수는 있으나 사람의 경우는 이 기법의 응용에 윤리적인 문제가 따를 것이다. 젓소의 경우에 암송아지를 생산해야만 우유를 생산하므로 수정란의 성감별 기법을 응용하려고 할 것이며 외국에서는 실험적으로 성공하고 있다. PCR 기법은 소의 경우 Lab. kit를 판매하고 있으나 저조한 수태율 등 실용화를 위한 문제들이 남아 있다.

정자의 성감별 역시 그 기법이 성공적으로 개발된다 하더라도 인체에는 윤리상 응용되어서는 안될 것이다. 연구되고 있는 기법은 2가

지 방법이 있다. 첫째는 알부민 농도차 선별법인데 이는 그 정확도가 85%에 불과하다. 두번째 기법은 XY염색체의 DNA함량 차이(소: 4%, 사람: 2%)를 응용하여 형광 물질을 tagging시켜 그 형광의 차이로써 cell sorter로 X Y정자를 선별하는 방법인데 그 정확성은 소에서는 100%이다. 이 검사를 받은 정자의 수정율은 정상이나 시간당 선별가능 수가 적어 인공수정(1회에 1,000만 이상 필요함)으로 활용하기는 어렵고, 체외수정(1회에 1만 정도 소요됨)에서는 가능하다. 그러나 이 수정란의 이식에 의한 수태율이 낮은점 등은 아직 과제로 남아 있다.

4. 핵이식에 의한 복제동물 생산

핵이식 기술은 발생 초기 수정란의 전능한 할구세포를 탈핵된 난자 혹은 초기 수정란에 이식하여 유전적으로 동일한 형질을 가지는 복제산자를 생산하는 기술이다. 핵이식 기술은 하나의 수정란으로부터 동일한 성과 유전형질을 가진 복제 수정란을 만들 수 있고, 수정란 이식기법으로 복제동물을 생산할 수 있다. 복제동물은 우량 유전자를 가진 동물을 복제하여 단 시간에 우수한 종축을 증식시킬 수 있다. 또한 동물의 성을 인위적으로 지배할 수 있게 하고, 실험동물 개체간의 차이를 줄임으로써 정확한 결과를 얻는데 매우 유익하게 사용될 수 있다. 복제동물은 개체간의 차이를 줄임으로써 정확한 결과를 얻는데 매우 유익하게 사용될

수 있다. 복제동물은 장기이식 및 면역학적 실험에도 널리 사용될 수 있으며, gene therapy를 위한 형질전환 동물의 생산에 관한 연구에도 응용될 수 있는 등 그 이용도가 매우 높다.

유전적으로 동일한 복제동물을 생산하기 위한 방법으로서 핵이식을 통한 복제동물의 생산은 1952년 Brigs와 King이 개구리에서 배 발생을 유도하는데 성공한 이후 1981년 Illemense와 Hoppe에 의해 포유동물에서 그 가능성이 입증되었는데 1986년 Willadsen이 면양에서 핵이식에 의한 산자 생산을 보고한 이래 포유동물의 핵이식 기술은 지난 10여년 동안 눈부신 발전을 이루어 왔다. 우리나라에서도 본 대학에서 생쥐와 토끼의 복제산자 생산에 성공하였고, 서울대에서는 복제송아지 생산에 성공하였다.

그러나 아직도 복제배의 작출효율은 동물에 따라 30~60% 수준에 있으며 복제동물의 생산효율은 10% 수준에 미치지 못하고 있고, 또한 생산된 복제산자는 거대증후군 및 기형의 발생이 문제점으로 대두되고 있다.

5. 형질전환 동물의 생산

형질전환동물은 다른 동물종의 외부 유전자를 수정직후의 수정란에 미세주입하는 기술이다. 형질전환 생쥐는 생쥐 수정란의 진행기에 있는 암컷 전핵에 외부의 유전자를 미세주입하여 1980년 Gurdon 등이 처음으로 생산하였다. 이러한 기술은 포유동물의 발달단계에서

특이한 유전자의 발현에 관한 연구, 유용한 가축의 생산, 유전적 질병과 동물의 생리를 연구하는데 유용하다. 형질전환동물의 생산을 위해서는 유전자의 조작과 유전자를 다룰 수 있는 미세조작 기술 및 주입된 유전자의 발현을 증명하는 기술이 필요하다. 1982년 Palmiter 등은 성장호르몬의 주입으로 정상적인 크기보다 거의 두배나 더 큰 대형 생쥐를 생산하였다. 그러나 이 기술은 가축에서 불임, 연골의 비대성장 등 부작용이 나타나 실용적이지는 못하다. 그후 수많은 형질전환동물이 설치류 뿐만 아니라 가축에서도 생산되고 있다. 이러한 형질전환 동물의 연구는 TPA등과 같은 약리적 우유 성분을 분비하는 젖소를 작출하거나 성장과 체형의 크기를 증대시키며 근육의 특성을 변화시키고 가축의 질병 저항을 증진시키거나 사료효율을 높이는 분야에서 계속 진행되고 있다.

현재로서는 소의 육종과 번식을 위한 가장 실용적인 수단은 생산능력 검정과 인공수정이며 수정란이식의 실용화를 위한 여러가지 문제점들을 해결하기 위하여 많은 연구를 해 나감으로써 불임 장애에 종축개량과 번식효율을 가속화시킬 수 있을 것이다.

