

토끼에서 FSH제의 Single Injection에 따른 과배란유기 효과

최상용 · 노규진 · 최창용 · 강태영 · 윤희준 · 손우진 · 이효종 · 박충생*

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소

Superovulation in Rabbits with a Single Injection of FSH Dissolved in Polyvinylpyrrolidone

S. Y. Choe, G. J. Rho, C. Y. Choe, T. Y. Kang, X. J. Yin, W. J. Son, H. J. Lee and C. S. Park*

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

A series of experiments were designed to determine the feasibility of single dose of FSH as an effective superovulation method in rabbits. The superovulation treatments examined comparatively were as follows: 1) a single injection of 100 IU PMSG, 2) Multiple injections of 1 IU Super-OV of 2X daily for 3 days, 3) Multiple injections of 6.6 mg Folltropin-V 2X daily for 3 days, 4) Multiple injections of 13.3 mg Folltropin-V 1X daily for 3 days, 5) Single injection of 40 mg Folltropin-V solved in 10% PVP, and 6) Single injection of 40 mg Folltropin-V dissolved in 25% PVP. The results obtained were as follows:

The number of ovulation points in the single injection of 40 mg Folltropin-V dissolved in 25% PVP and multiple injections of 6.6 mg Folltropin-V 2X daily for 3 days was averaged 44.6 and 39.2, respectively, which were significantly ($P < 0.05$) more than in a single dose of PMSG or multiple doses of Super-OV. The number of total ova recovered in the single injection of 40 mg Folltropin-V dissolved in 25% PVP and multiple injections of 6.6 mg Folltropin-V 2X daily for 3 days was averaged 30.4 and 25.9, respectively, which were significantly ($P < 0.05$) more than in the single dose of PMSG or multiple doses of Super-OV. A similar result was obtained for the number of fertilized ova recovered from the above six treatments. From the above results it was concluded that a single injection of 40 mg Folltropin-V dissolved in 25% PVP could be an effective and simple method for superovulation in rabbits.

(Key words : PVP, rabbit superovulation, FSH single dose)

서 론

근래에 동물의 번식에 있어서 수정란이식기술이 발달되어 실용화 단계에 이르렀으나, 특히 우수한

산자의 생산과 아울러 그 효율성을 높이기 위하여서는 우수한 암컷으로부터 가능한 많은 수의 수정란을 확보하는 것이 중요하므로 이를 위하여는 암컷에서 효율적이고 간편한 과배란유기 기술이 확립되어야 한다.

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

* 경상대학교 농과대학 축산학과(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

과배란유기는 성선자극호르몬인 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin)와 FSH(follicle stimulating hormone)제제를 주로 이용하고 있으나 PMSG는 생물학적 반감기가 길고 일부 LH의 작용도 하고 있어서 난자의 수정과 수정란의 초기 발달을 저해시키고 수정란의 회수율과 질에 있어서 FSH보다 떨어지는 것으로 보고되고 있다(Boland 등, 1991; Murphy 등, 1984; Monniaux 등, 1983). 그러나 FSH는 수정란의 회수율과 질에서는 PMSG보다 우수하나 반감기가 짧아 3~5일간 계속 투여해야 하며 매일 1~2회의 처치를 필요로 하는 번거로움이 있고 여러번 주사하게 되므로 동물에게 stress가 가증될 우려가 있으며, 또한 FSH와 LH의 함량비율에 따라 배란수와 난자의 질에 차이가 있었다고 한다(Willmott 등, 1990; Donaldson과 Ward, 1987; Donaldson, 1986; Donaldson, 1984).

FSH 제제에 의한 과배란 유기법에서 문제점으로 대두되고 있는 다회 반복 주사를 위한 과다한 노력과 시간 및 그로 인한 동물의 스트레스 등을 경감시킬 수 있는 한 방안으로 투여횟수를 단순화시키는 방법이 연구되어 왔다(Takedomi 등, 1994; Suzuki, 1993). Dattena 등(1994)은 과배란 유기시 성선자극호르몬의 흡수를 지연시키는 PVP(polyvinylpyrrolidone)를 이용하여 과배란을 유도하여 양질의 수정란을 회수하였다고 하였으며, Lopez-Sebastian 등(1993)은 propylene glycol을 FSH와 같이 녹여서 single injection 으로 과배란시켜 수정란을 회수하여 좋은 결과를 얻었다고 하였다. 한편 Kanayama 등(1994)은 토끼에 PVP를 이용하여 FSH를 single dose법으로 과배란을 유기시켜 양질의 수정란을 회수하였다고 보고한 바 있다.

본 실험에서는 동물에서 과배란유기에 많이 사용되고 있는 PMSG와 FSH제제인 Super-OV, Folltropin-V를 사용하여 이들간의 과배란유기 효과를 재확인하고, 나아가서 그중 효과가 우수한 Folltropin-V를 선택하여 이를 PVP에 10 및 25% 농도로 용해한 다음 토끼에 1회 투여로써 과배란을 유기하여 그 효과를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 토끼는 New-Zealand White 종으로 암컷은 생후 3~6개월령의 체중이 3.0(2.5~3.5) kg, 수컷은 생후 8개월령 이상의 체중 3.0~4.0kg인 것을 공시하였고, 실험전에 각 cage에 분리하여 경상대학교 실험동물 사육장에서 사육하였으며 농후사료, 조사료, 물 등은 자유로이 급식하였다.

Dark-Light Cycle 조절은 오전 7:00에서 오후 9:00까지 14시간은 Light로, 오후 9:00부터 다음날 오전 7:00까지 10시간은 Dark로 조절하였다.

2. 실험설계

50마리의 토끼를 각각 5 또는 10마리씩 5군으로 나누어 무작위로 배치하였다.

- ① PMSG처리군 (n=10) : PMSG(Serarumon^R, Japan) 100 IU 를 1회 근육주사한 군.
- ② Super-OV 처리군 (n=5) : 6 IU의 Super-OV(AUSA, Canada)를 1일 2회 3일간 근육주사한 군.
- ③ Folltropin-V 1일 2회 처리군 (n=10) : 40 mg의 Folltropin-V(Vetrepham, Ausatralia)를 1일 2회 3일간 근육주사한 군.
- ④ Folltropin-V 1일 1회 처리군 (n=5) : 40 mg의 Folltropin-V를 3등분하여 1일 1회 3일간 근육주사한 군.
- ⑤ Folltropine-V + 10% PVP 처리군 (n=10) : 40 mg의 Folltropin-V를 10% PVP(Sigma, U.S.A.)에 용해하여 1회 피하주사한 군.
- ⑥ Folltropine-V + 25% PVP 처리군 (n=10) : 40 mg의 Folltropin-V를 25% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군.

3. PVP용액 및 FSH제제의 준비

PVP 용액은 생리식염수로 PVP(Sigma, U.S.A.)를 20% 혹은 50% 농도가 되도록 용해하여 제조하였다.

생리적 식염수로 Folltropin-V를 10mg/ml가 되게 만든 용액 4와 4ml의 20% 혹은 50% PVP용액을 혼합하여 PVP의 최종농도는 10% 혹은 25%가

되도록 하고 8ml내에 Folltropin-V가 40mg이 용해 되도록 준비하여 1회 피하주사 하였다.

4. 과배란유기 및 교미

Multiple dose법에서는 FSH제제인 Super-OV와 Folltropin V의 마지막 투여로부터 12 시간 후에 100 IU의 hCG(Yuhan Co. Korea)를 이정맥내에 주사하였고, single dose법에서는 FSH+PVP 투여 후 84 시간 후에 100 IU의 hCG를 이정맥내에 주사하여 배란을 유기하였다. 수정란을 채란하기 위해서 hCG주사 직후에 스톱끼와 교미를 시켰다.

5. 수정란의 회수

1) 실험토끼의 마취

각 실험군의 토끼는 수술하기 24시간전에 절식시킨 후 진정제인 Chlorpromazine HCl(Sepamine^R, Samsung Co. Korea)을 10mg/kg 근육주사하여 진정시켜 10분후에 Ketamine HCl(Yuhan Co. Korea)을 25mg/kg 이정맥에 주사하여 전신마취를 시켜서 실험에 공용하였다.

2) 실험토끼의 수술

실험토끼의 하복부 털을 깨끗이 깎고 소독을 철저히 한 후 하복부 절개는 외과적인 수술방법에 따라 정중선을 15cm 절개하여 장의 일부를 절개부위 밖으로 노출시켜 노출된 장기가 건조되지 않게 생리식염수가 함유된 멸균기즈로 노출장기를 덮어 자궁의 확인과 채란을 편리하게 하였다.

3) 수정란의 채란

암토끼의 생식기관을 절개부위로 유도하여 난관채 중심부에 있는 난관복강구내로 외경 2mm의 tygon tube를 삽입한 후 자궁각 전단부위에 21G needle로 천자하여 준비된 D-PBS(Sigma, U.S.A.) 및 TCM-199(Sigma, U.S.A.)을 3ml 정도 주입하여 난관을 역관류시켜서 수정란을 회수하였다.

6. 난소반응 확인 및 수정란 검사

1) 난소반응 확인

실험토끼의 수정란을 채란한 후 양쪽 난소에서 육안적으로 보이는 난소의 배란점과 난포의 수 및 혈포의 수를 헤아려서 난소반응을 확인하였다.

2) 수정란의 조사

회수된 수정란의 수를 확인하기 위하여 채란액을 petri dish에 놓고 입체현미경(Olympus, Japan)($\times 40$)하에서 채란하여 회수된 수정란의 수를 헤아렸다.

난소반응에서 확인된 배란점의 수와 채란되어 회수된 수정란의 수를 백분율로 환산하였다.

7. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 Chi-Square test를 실시하여 각 처리군의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 과배란 유기법에 따른 난소반응

성선자극 호르몬인 PMSG, Super-OV, Folltropin-V를 사용하여 토끼에 과배란을 유기시켜서 난포수, 혈포수 및 배란점을 조사하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 배란되지 않은 난포의 수는 Super-OV를 1일 2회 3일간 주사한 방법이 18.4 ± 8.5 개로서 다른 유기방법보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다. 혈포수는 각 유기방법에 따른 유의적인 차이가 없이 적게 나타났다. 난포의 배란점은 Folltropin-V를 25% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군에서 44.6 ± 15.2 개로서 가장 높게 나타나 유의성($P < 0.05$)이 인정되었으며 그 다음이 Folltropin-V를 1일 2회 3일간 근육주사한 군이 39.2 ± 12.1 개였다.

PMSG와 FSH제제를 과배란에 사용하면 난소의 작은 난포란의 퇴행을 억제시키며, LH가 많이 존재하면 미성숙 난포의 배란과 FSH 자극에 의하여 형성된 난포의 황체화가 나타나게 된다. 이러한 난포의 형성은 FSH와 LH의 상호협력작용에 의해서 형성된다고 하였는데(Boland 등, 1993), 본 실험에서는 이러한 단점을 보완하고자 single dose법을 이용하여 과배란을 유기한 결과 Folltropin-V의 25%용액에서 많은 배란점을 확인할 수 있었다.

Table 1. Ovarian response following superovulation with different gonadotropin treatment in rabbits*
(Mean ± S.D.)

| Treatment group | No. of animals treated | Ovarian response | | |
|-----------------|------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | | No. of unovulated follicles | No. of hemorrhagic follicles | No. of ovulation points |
| 1 | 10 | 3.5 ± 4.8 ^a | 6.9 ± 8.1 ^a | 22.7 ± 9.0 ^a |
| 2 | 5 | 18.4 ± 8.5 ^b | — | 22.4 ± 7.9 ^a |
| 3 | 10 | 9.3 ± 11.7 ^a | 4.0 ± 3.9 ^a | 39.2 ± 12.1 ^b |
| 4 | 5 | 9.6 ± 7.9 ^a | — | 28.6 ± 16.0 ^a |
| 5 | 10 | 7.8 ± 3.6 ^a | 2.1 ± 4.3 ^a | 29.0 ± 12.2 ^a |
| 6 | 10 | 8.2 ± 7.0 ^a | 1.3 ± 1.7 ^a | 44.6 ± 15.2 ^b |

* Group 1: 100 IU PMSG in saline single i.m. injection.

Group 2: 1 IU Super-OV in saline twice daily for 3 days i.m. injection.

Group 3: 6.6 mg Folltropin-V in saline twice daily for 3 days i.m. injection.

Group 4: 13.3mg Folltropin-V in saline once daily for 3 days i.m. injection.

Group 5: 40 mg Folltropin-V in 10% PVP single s.c. injection.

Group 6: 40 mg Folltropin-V in 25% PVP single s.c. injection.

The values with different superscripts were significantly ($P < 0.05$) different.

2. 과배란 유기법에 따른 수정란 회수율

유기방법에 따른 정상 난자의 채란수는 Folltropin-V를 25% PVP에 용해하여 1회 주사한 군이 30.4 ± 9.9 개로서 많은 난자가 회수되어 다른 유기방법보다 유의적($P < 0.05$)으로 높았으며, Folltropin-V를 1일 2회 3일간 주사한 군과 Folltropin-V를 10% PVP에 용해하여 1회 주사한 군은 각각 25.9 ± 9.6 개, 23.3 ± 6.4 개로서 많이 채란되었다. 수정된 난자의 회수율은 Folltropin-V를 1일 2회 3일간 주사한 군에서 채란된 난자 모두가 수정란이 회수되어 100%의 회수율을 나타내었다. 그리고 Folltropin-V를 10% PVP에 용해하여 1회 주사한 군이 99.6%, Folltropin-V를 1일 1회 3일간 주사한 군이 97.5%, Folltropin-V를 25% PVP에 용해하여 1회 주사한 군이 96.1%로서 PMSG와 Super-OV를 주사한 군에 비하여 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다.

이상의 결과로 보아 PMSG와 Super-OV 처리군보다 Folltropin-V 처리군이 수정란의 회수율이 높음을 알 수 있었는데 이러한 결과는 Quik 등(1995)과 Ryan 등(1984)이 배란되지 않고 남아있는 난포가 많은 난소에서는 수정란의 회수율이 저조하다는 보고와 본 연구와는 일치하는 경향을 보였다.

따라서 PMSG와 Super-OV보다는 Folltropin-V 제제가 양질의 수정란을 채란하는데 효과적이라고 사료된다.

PVP는 물과 유기용매에 잘 녹으며 색소, 요오드, 항생제 그리고 인슐린 등과 같은 여러 물질과 결합능력이 강한 것으로 알려져 있다. 그리고 PVP는 생체내에서 기능적 시간을 지속시켜 그러한 화학물질들의 독성을 줄이는데 사용된다(Yamamoto 등, 1994). 본 실험에서도 이러한 PVP의 특성을 이용하여 FSH의 체내 순환 시간을 지연시켜 성선호르몬의 기능을 더욱 유효하게 하고자 하였다. Smith 등(1973)의 보고에서는 30% PVP에 FSH를 녹여 주사한 후 소에서 산자를 생산하였다. 그러나 그의 실험에서 예시하듯이, 일괄적인 배란율이 나타나지 않고, 쌍자 생산율도 낮았다고 한다. 이러한 결과는 FSH의 농도와 관련이 있을런지도 모른다. 이는 본 실험의 결과처럼 PVP에 녹여 single dose법으로 주사한 토끼에서의 채란율이 1일에 1회 FSH를 주사한 토끼에서 채란율보다 높게 나타난 것은 PVP가 FSH의 혈중농도를 지속적으로 유지시켰다고 볼 수 있다.

Takedomi 등(1994)은 소에서 혈장 FSH의 농도는 생리식염수에 녹여 multiple dose 방법으로 처음

Table 2. Embryo recovery following superovulation with different gonadotropin treatments in rabbits
(Mean \pm S.D.)

| Treatment group ^{a*} | No. of animals treated | Number of total embryos recovered | Number of(%) fertilized embryos recovered |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------------------|---|
| 1 | 10 | 16.8 \pm 6.1 ^a | 15.0 \pm 6.2 ^a (89.3) |
| 2 | 5 | 19.6 \pm 6.1 ^a | 15.2 \pm 3.6 ^a (77.6) |
| 3 | 10 | 25.9 \pm 9.6 ^b | 25.9 \pm 9.6 ^b (100.0) |
| 4 | 5 | 15.8 \pm 8.5 ^a | 15.4 \pm 8.9 ^a (97.5) |
| 5 | 9 | 23.3 \pm 6.4 ^b | 23.2 \pm 6.4 ^b (99.6) |
| 6 | 9 | 30.4 \pm 9.9 ^b | 29.2 \pm 8.0 ^c (96.1) |

* Group 1: 100 IU PMSG in saline single i.m. injection.

Group 2: 1 IU Super-OV in saline twice daily for 3 days i.m. injection.

Group 3: 6.6 mg Folltropin-V in saline twice daily for 3 days i.m. injection.

Group 4: 13.3mg Folltropin-V in saline once daily for 3 days i.m. injection.

Group 5: 40 mg Folltropin-V in 10% PVP single s.c. injection.

Group 6: 40 mg Folltropin-V in 25% PVP single s.c. injection.

The values with different superscripts were significantly ($P < 0.05$) different.

투여한 후 3에서 66시간에 40에서 80 ng/ml 수준으로 유지된다고 하였다. 반면에 생리식염수에 녹인 FSH를 single dose한 것은 처음에는 혈장 FSH의 농도가 갑작스런 증가를 보이다가 갑자기 농도가 하강하여서 기존의 방법보다 처음에는 더 낮은 농도가 유지된다. 이렇게 하므로써 난포발육과 배란에 좋지 않은 영향을 주게 된다.

본 실험에 나타난 바와 같이 기존의 방법인 생리식염수에 FSH를 녹여 multiple dose 방법과 PVP에 녹여 single dose 방법간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이는 Takedomi 등(1994)이 소에서 multiple dose와 single dose 하여 수정란의 회수율에 유의적 차이를 보이지 않은 결과와 거의 같았다. 또 그들은 PVP를 25와 50%로 만들어 FSH를 single dose 하였던 바 역시 농도의 차이에 의한 회수율의 변화는 없었다. 그러므로 실험동물인 토끼에서도 소에서와 마찬가지로 PVP를 이용한 single dose법을 이용하면 실험동물에게 적은 고통과 stress를 주고 실험자 역시 많은 시간과 노력을 줄일 수 있고 양질의 수정란을 회수할 수 있을 것이라 생각된다.

적 요

동물의 과배란유기에 상용되는 과배란처리 hor-

mone인 PMSG(100 IU), Super-OV(6 IU) 및 Folltropin-V(40 mg)를 사용하여 토끼에서 과배란을 유지시켰던 바, Folltropin-V를 식염수에 용해하여 매일 2회씩 투여한 군과 25% PVP에 용해하여 피하로 1회 투여한 군에서 각각 평균 39.2 및 44.6개의 배란점과, 25.9 및 30.4 개의 수정란이 회수되어 다른 처리군에 비하여 유의적으로 ($P < 0.05$) 높게 나타났다. 그리고 수정란의 상태 역시 Folltropin-V 제제 처리군에서 정상 수정란의 회수율이 높게 나타났다. 이상의 결과로 보아 Folltropin-V는 토끼의 과배란 유기를 위한 hormone 처리에 있어서 Super-OV나 PMSG보다 더욱 효과적이며, 25% PVP에 희석하여 single dose로 처리할 때 기존의 multiple dose 방법과 같은 효과를 나타내어 간편하고 실용적인 방법인 것으로 사료된다.

참고문헌

- Boland MP, Goulding D and Roche JF. 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35:5-17.
- Boland MP and Roche JF. 1993. Embryo production: Alternative methods. *Mol. Rep. Dev.*, 36:266-270.
- Dattena M, Vespignani S, Branca A, Gallus M,

- Ledda S, Naitana S and Cappai P. 1994. Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 42:235-239.
- Donaldson LE and Ward DN. 1987. LH effects on superovulation and fertilization rates. *Theriogenology*, 27:225.
- Donaldson LE. 1984. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology*, 22:205.
- Donaldson LE. 1986. Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle. *Vet. Rec.*, 118:661-663.
- Kanayama K, Sankai T, Nariar K, Endo T and Sakuma Y. 1994. Simplification of superovulation induction by using polyvinylpyrrolidone as a solvent for FSH in rabbits. *J. Vet. Med. Sci.*, 56(3):599-600.
- Lopez-Sebastian A, Gomez-Brunet A, Lishman AW, Johnson SK And Inskeep. 1993. Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH. *J. Reprod. Fertl.*, 99:437-442.
- Monniaux D, Chupin D and Saumande J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19:55-81.
- Murphy BD, Mapletoft RJ, Manns J and Humphrey WD. 1984. Variability in gonadotropin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 21:117-125.
- Quirke JF and Hanrahan JP. 1975. Effect of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on the responses of the ewe to pregnant mare serum gonadotropin. *J. Repro. Fertl.*, 43:167-170.
- Ryan JP, Bilton RJ, Hunton JR and Maxwell WMC. 1984. Superovulation in ewes with a combination of PMSG and p-FSH. In Lindsay DR, Pearce DT(eds), *Reproduction in sheep*. Cambridge University Press, Cambridge, 338-341.
- Smith Jr LE, Sitton GD and Vincent CK. 1973. Limited injections of follicle stimulating hormone for multiple births in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 37:523-527.
- Suzuki T. 1993. Bovine embryo transfer and Related techniques. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:236-237.
- Takedomi T, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Taya K, Watanabe G and Sasamoto S. 1994. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 42:1259-1268.
- Willmott N, Saundres J, Bo GA, Palasy A, Pierson RA and Mapletoft RJ. 1990. The effect of FSH-LH ratio in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. *Theriogenology*, 33:347.
- Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M And Suzuki T. 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 41:747-755.