

한우 난포란의 채란방법에 따른 체외수정란의 생산효율

이경미 · 광대오* · 송상현 · 최양석 · 김운연** · 강다원 · 하란조 · 윤창현 · 박충생
경상대학교 농과대학 축산진흥연구소

Comparison of *In Vitro* Embryo Production with Follicular Oocytes Collected by Aspiration and Slicing in Korean Native Cows

K. M. Lee, D. O. Kwack*, S. H. Song, Y. S. Choi, Y. Y. Kim**, D. W. Kang,

L. J. Ha, C. H. Yun and C. S. Park

Institute for Development of Livestock Production, College of Agriculture,

Gyeongsang National University

SUMMARY

To improve the efficiency of *in vitro* production of embryos with follicular oocytes in Korean Native cows, the recovery rates, *in vitro* maturation, fertilization and development, and the time required for collecting and processing oocytes by aspiration with or without slicing were evaluated comparatively. The ovaries were obtained from a local abattoir and placed in physiological saline at 25~28°C and brought to the laboratory within 3 hrs. The oocytes were collected by aspiration of follicles(2~6mm) with or without slicing ovaries after aspiration, and classified into Grade I, Grade II, Denuded, Expanded oocytes by the morphology of cumulus cells attached and the homogeneity of cytoplasmic granules. Also the time required for each step of collecting and processing oocytes were measured. The cumulus cells were removed in some Grade I oocytes to measure their size and nuclear configuration before and after *in vitro* maturation. The Grade I oocytes were matured *in vitro*(IVM) for 24 hrs. in TCM-199 supplemented with 35µg/ml FSH, 10µg/ml LH, 1 µg/ml at 39°C under 5% CO₂ in air. They were fertilized *in vitro*(IVF) by epididymal spermatozoa treated with heparin for 24hrs. and then the zygotes were co-cultured *in vitro* (IVC) with bovine oviductal epithelial cells for 10 days. The results obtained were as follows:

The number of oocytes recovered per ovary was averaged 6.6 by aspiration and 11.2 by slicing post aspiration, which summed to 17.8. The number of Grade I oocytes recovered per ovary was averaged 3.1 by aspiration and 3.6 by slicing, which summed to 6.7. The percentage of Grade I to total oocytes recovered was significantly(P<0.05) higher as 48.0% in aspiration than 31.6% in slicing post aspiration.

The time required for recovering a Grade I oocyte by aspiration and slicing was 1.1 and 2.5 min, respectively. The mean diameter of Grade I oocytes by aspiration and slicing was

* 경상대학교 과학교육과(Department of Science Education, Gyeongsang National University)

** 경상대학교 생물학과(Department of Biology, Gyeongsang National University)

similar as 148.7 and 151.5 μ m, respectively. The percentage of Metaphase II stage oocytes after IVM for 24 hours was significantly ($P < 0.05$) lower in slicing(64.0%) than in aspiration(81.5%). Of the cleaved embryos, the percentage of embryos developed to blastocyst stage after culture for 10 days post insemination was similar as 23.3% and 20.5% in aspiration and slicing, respectively. These results suggest that the oocyte collection by slicing post aspiration could result in two fold increase in the yield of Grade I follicular oocytes and blastocysts from the bovine ovaries obtained at abattoirs, although the time required for collecting a Grade I oocyte was more than twice in slicing, compared with aspiration of oocytes from the visible follicles.

(Key word: IVF, oocyterecoverly, bovine embryo)

서 론

수정란 이식에 이용하는 수정란은 공란우의 과배란과 초유과 유도에 의해 채취된 재내성숙 난포란을 채취 수정시키는 방법 및 도살장에서 채취한 난소에서 난포란을 채란하여 체외성숙시킨 후 체외수정과 체외배양하는 방법 등에 의해 생산되고 있다. 그러나, 종축개량을 촉진시키기 위한 목적이 아닌 경우에는 과배란법과 초유과 유도법은 비용이 많이 드는 반면 수정란을 충분히 공급하지 못하므로 효율적이지 못하다. 그러므로 선진국에서는 적은 생산 비용으로 많은 수정란을 생산하여 산업적으로는 쌍자생산이나 타 품종간 수정란 이식을 위해서, 학문적으로는 핵이식에 의한 복제 동물 생산과 성관별에 의한 동성의 산자 생산 및 형질전환 동물 생산 등의 연구를 위하여 도살장에서 채취된 난소에서 난포란을 채란하여 체외수정란을 만드는 기술을 이용하고 있다. 현재 국내에서도 체외수정란 생산과 수정란이식에 대한 연구가 활발하게 수행되어 체외수정란 유래의 송아지 생산이 보고되고 있으나(황 등, 1993; 박 등, 1994; 한 등, 1994) 아직 실용화 단계에는 이르지 못하고 있는 실정이다.

체외수정란을 이용한 수정란 이식의 실용화를 이루기 위해서는 여러 가지의 문제점들이 해결되어야 하겠지만 우선적으로는 요구되는 만큼의 배반포배의 공급이 충분히 이뤄져야 할 것이다. 현재 체외수정란 생산 기술이 상당한 수준으로까지 향상되어 배반포기로의 발달율이 향상되었다고 하나 필요로 하는 만큼의 배반포배의 공급을 충족할 수준까지 이른 것은 아니다. 그래서 한 개의 난소에서 가능한

한 많은 난포란을 획득하기 위해 난포란의 흡입법 외에 세절법을 이용한 연구가 Suss와 Madison (1983)에 의해 이뤄진 후 여러 연구자들이(Kay와 Frylink, 1992; Carolan 등, 1992; Takagi 등, 1992; Choi 등, 1993; Steyn 등, 1993) 수행하여 흡입법보다 많은 난포란을 채란할 수 있었다고 하며, 체외발달율도 두 방법간에 유의적 차이를 보이지 않으므로 세절법을 사용할 경우에 보다 많은 배반포배를 얻을 수 있다고 보고하였다. 그러나 세절법에 의해 채란된 난포란의 등급이나 핵성숙 및 Grade I 난포란 생산당 소요시간 등에 관한 연구가 부족하여 이를 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난소의 채취

본 실험에 사용된 난소는 도축장에서 도살된 한우의 암소에서 즉시 적출하여 항생제(100 units/ml의 penicillin G + 100 μ g/ml의 streptomycin)가 함유된 생리식염수에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하였다. 이때 온도가 25~28 $^{\circ}$ C로 유지되도록 하기 위해 보온병을 이용하였다. 운반된 난소는 불필요한 조직을 잘라 낸 후 항생제가 첨가된 새로운 생리식염수(37~39 $^{\circ}$ C)로 3~4회 세척하였다.

2. 난포란의 채란

1) 흡입법

실험실로 운반 후 생리식염수로 세척한 난소 표면의 난포를 18 gauge 바늘이 부착되고 1ml의 기본 배양액(TCM-199 + 10% FBS)이 들어 있는 10ml

주사기를 이용하여 난포액과 함께 난포란을 흡입하였다. 흡입된 난포액을 60mm 배양 접시에 옮기고 도립 현미경(Olympus, 일본)의 40배율 하에서 난포란을 채란하였다.

2) 세절법

난소 표면의 난포란(직경 2~6mm)을 흡입한 후의 난소에서 황체, 혈포 및 불필요한 조직을 잘라내고, 난포란 채란을 어렵게 하는 난포액의 gel 현상을 막기 위해 난포란의 직경이 6mm 초과인 난포는 미리 터뜨렸다. 그 후 난소를 절개하여 항생제가 들어 있는 생리식염수로 4회 세척하고 30ml의 기본 배양액(TCM-199 + 5% FBS)이 담겨 있는 플라스틱 배양 접시에 펼친 후 세절용 칼(6개의 blade를 평행하게 부착시켜 만듦)로 난소의 표면과 내면을 가로와 세로로 길게 선을 긋듯이 slicing 하였다.

3) 흡입과 세절에 소요되는 시간 측정

흡입과 세절에 의한 난포란의 채란시에 다음과 같이 각각의 난포란 회수법에 의해 난포란을 채란하는데 소요되는 시간을 각 단계별로 조사·비교하였다.

- ① • 흡입법 - 10ml 주사기로 한 개의 난소 표면의 난포란(2~6mm)을 흡입하는데 소요되는 시간(분)
 - 세절법 - 난소를 기본 배양액(TCM-199+5% FBS)이 30ml이 담긴 100mm 배양 접시에 놓은 후 세절용 칼로 난소의 내면과 표면을 긁어 난포란을 채란하는데 소요되는 시간(분)
- ② Picking-up: 흡입된 난포액을 60mm 배양접시에 옮긴 후 mouth pipette으로 난포란을 도립현미경의 40 배율 하에서 회수하는데 소요되는 시간(분)
- ③ Grading and washing: 회수된 난포란을 100mm 배양접시의 미세소적에서 4~5회 세척하면서 등급별 난포란의 등급판정 참조)로 나누는데 소요되는 시간(분)

4) 난포란의 등급판정

흡입법과 세절법에 의해 채란된 난포란을 체외성숙 배양액(TCM-199 + 10% FBS + 10 μ g/ml

LH + 35 μ g/ml FSH + 1 μ g/ml estradiol-17 β)으로 4~5회 세척을 하면서 난포란의 등급을 판정한 후 Grade I 난포란을 실험에 공시하였다. 즉, 난포란 주위의 난구세포층 수와 세포질의 균질성에 따라 난구세포가 4층 이상이고 세포질이 균일한 것을 Grade I, 난구세포가 3층 이하인 것은 Grade II, 난구세포가 완전히 나화된 것은 Denuded, 그리고 난구세포가 팽화된 것은 Expanded 난포란으로 분류하여 그 수를 측정하였다.

3. 난포란의 핵발달과 크기 측정

흡입과 세절법에 의해 회수된 각각의 Grade I의 난포란은 체외 성숙으로 4~5회 세척한 후 1/3는 채란 즉시 난구세포를 hyaluronidase로 제거한 후 micrometer($\times 100$)를 이용하여 난포란의 직경(투명대 포함)을 측정한다. 다음 Aceto-orcein 염색법에 따라 염색하여 핵의 발달상태를 조사하고, 2/3는 한 well당 0.5ml의 체외성숙배양액(TCM-199 + 10% FBS + 10 μ g/ml LH + 35 μ g/ml FSH + 1 μ g/ml estradiol-17 β)이 들어 있는 4-well dish에서 24시간 동안 체외 성숙시킨 후 난구세포를 제거한 다음 난포란의 직경(투명대 포함)을 측정하였다. 그 후 체외성숙된 난자의 1/2은 Aceto-orcein 염색법에 따라 염색하여 핵의 발달 상태를 조사하였으며, 그 외 나머지는 체외수정 후 체외배양을 하였다.

4. 난포란의 체외성숙

1) 난포란의 체외성숙 배양액

기본배양액은 TCM-199(Earle's salt + 25mM Hepes, Sigma Chem, Co., 미국)에 sodium pyruvate(56 μ g/ml), streptomycin(100 μ g/ml) 및 penicillin G(100 units/ml)을 첨가한 후 1/의 물로 제조하였다. FBS는 사용시에 10%와 5%를 첨가하였다.

체외성숙배양액은 기본배양액에 10% FBS와 호르몬으로는 LH(10 μ g/ml), FSH(35 μ g/ml) 및 estradiol-17 β (1 μ g/ml)를 첨가하였다. 이때 사용된 FBS(Ginco Chem. Co., 미국)는 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화시켜 0.22 μ m filter로 여과한 후 10ml씩 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동보관하면서 사용하였다.

2) 난포란의 체외성숙

회수된 각각의 Grade 1의 난포란은 체외 성숙 배양액으로 4~5회 세척한 후 배양액이 0.5ml씩 분주된 4-well dish에 넣고 24시간 동안 배양하였다. 이때의 배양액은 5% CO₂, 98~99% 습도 및 39℃ CO₂ 배양기에서 18시간 이상 전배양시켰다.

5. 난포란의 체외수정

체외수정을 위한 정자는 정소상체 미부의 정자를 사용하기 위하여 도축장에서 도살 직후의 한우 수소에서 정소상체 미부를 채취한 후 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin(100µg/ml)이 첨가된 생리식염수로 2~3회 세척한 후 멸균된 종이로 표면을 닦고 정소상체 미부의 표피를 절개하고 일부분을 절취하여 caffeine (10mM)이 첨가된 세척용 B.O. medium이 담겨 있는 dish에서 농후 정자를 채취하였다. 채취한 정자 1ml과 caffeine (10mM)이 첨가된 세척용 B.O. medium 2ml을 13ml tube에 조심스럽게 층이 형성되도록 분주한 후 60분 동안 swim-up을 유도하였다. 그 후 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500×g로 5분간 2회 원심분리한 후 수정능획득을 위하여 BSA(5mg/ml), caffeine(5mM) 및 heparin(10µg/ml)이 첨가된 수정용 B.O. medium 5ml를 분주하여 다시 500×g로 5분간 1회 원심분리를 실시하였다. 그 후 분리된 정자에 약 1ml의 수정용 B.O. medium을 분주하여 5% CO₂, 98~99% 습도 및 39℃ CO₂ 배양기에서 10~15 분간 정치하여 수정능획득을 유도하였다.

1) 체외수정

체외성숙된 난포란을 수정용 B.O. medium으로 3~4회 세척한 다음 수정용 B.O. 배양액 100µl 미세소적 당 10~15개의 난자를 옮긴 후 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종 농도가 2~3 × 10⁶ sperms/ml이 되게 첨가시켰다. 정자와 난자의 매정 후 약 24시간 동안 5% CO₂, 98~99% 습도 및 39℃ CO₂ 배양기에서 수정을 유도하였다. 이때 mineral oil(Sigma, USA)로 덮인 수정용 미세소적은 적어도 사용 2시간 전에 CO₂ 배양기에서 전배양시켜 평형을 유도하였다.

6. 체외 수정란의 체외배양

1) 체외배양을 위한 난관 상피 세포의 monolayer 형성

체외 수정란의 체외배양을 위한 난관은 도축장에서 도살되는 암소의 난관을 도살 직후 채취하여 penicillin G(500 units/ml)와 streptomycin (500µg/ml)이 첨가된 4℃의 생리식염수에 담아 실험실로 운반한 후 생리식염수(4℃)로 세척한 다음 멸균된 종이로 난관 표면을 닦고 멸균된 가위와 핀셋으로 결합조직과 지방을 완전히 제거하였다. 그 후 난관 상피세포를 채취하여 500×g에서 5분간 원심분리시켜 상층액은 제거하고 pellet 부분을 다시 2회 원심분리하였다. 그런 다음 기본 배양액(TCM-199 + 10% FBS)을 1ml씩 분주하여 CO₂ 배양기에서 18시간 이상 전배양하여 평형을 시킨 24-well dish에 최종 농도가 1~2 × 10⁶ cells/ml 되도록 조정. 분주하여 48시간 동안 배양시킴으로써 난관 상피세포의 monolayer 형성을 유도하였다.

2) 체외 수정란의 체외배양

체외수정 24시간 후에 체외 성숙, 체외 수정된 수정란을 기본 배양액(TCM-199 + 10% FBS)으로 4~5회 세척하여 남아 있는 난구세포와 정자를 제거시킨 다음 난관 상피세포 monolayer가 형성된 24-well dish에 한 well 당 15~20개의 수정란을 넣어 CO₂ 배양기에서 10일 동안 체외배양을 유도하였다. 이때 24-well dish의 배양액은 수정란을 넣기 전에 신선한 기본 배양액(TCM-199 + 10% FBS)으로 교환한 후 약 2시간 동안 전배양하여 평형시켰다. 수정란을 배양하는 동안 기본 배양액(TCM-199 + 10% FBS)을 48시간마다 신선 배양액으로 교환하였다.

체외 수정란을 체외 배양하는 동안 난자와 정자의 매정 후 72시간 후에 2-세포기 이상으로 난할을 한 것을 체외 수정된 것으로 간주하여 수정율을 측정하였으며, 10일(240시간)째에 배반포로의 발달을 조사하였다.

7. 통계학적 분석

실험 결과치의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package의 χ^2 -test 및 t-test를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 난포란의 채취수 및 등급

흡입법으로 2~6mm의 난포에서 채란한 후 난소를 세절하여 난포란을 채취하여 형태적으로 Grade I, Grade II, Denuded, Expanded 난포란으로 분류, 조사한 결과는 Table 1과 같았다. 총 74개의 난소에서 채란 방법에 따라 회수된 난포란은 각각 총 485개와 831개로서 난소당 6.6개 및 11.2개로서 세절법을 추가함으로써 약 3배 정도인 총 17.8개의 난자가 채란되었다.

그래서 난소당 채취된 Grade I 난포란 수는 흡입법으로 3.1개와 세절하여 3.6개를 얻어서 세절법을 병행함으로써 2배 정도인 총 6.7개를 채란할 수 있었다.

도축우의 난소에서 난포란을 채란하는 보편적 방법은 피펫 혹은 주사기에 바늘을 부착하여 난포내에서 난자를 흡입하는 흡입법이었다(Sreenan, 1968 ; Hunter 등, 1972 ; Mayr 등, 1986 ; Xu 등, 1988). 그러나 이 흡입법의 결점은 난자 회수율이 30~60% 정도로 낮아 난소당 평균 11개의 난포란이 채란된다는 점이다(Iwasaki 등, 1987 ; Katska

등, 1984 ; Lu 등, 1987). 이를 해결하기 위해 Suss와 Madison(1983)이 최초로 세절법으로 난소당 20~30개를 채란한 후, 여러 연구자들이 세절법을 이용한 채란 결과를 보고하였다. Leibfried-Rutledge 등(1985)은 한쌍의 난소에서 5~8개의 우량란을, Suss 등(1988)은 한 난소에서 평균 5.3개의 우량란을 얻었다고 보고하여 본 연구 결과도 이들과 유사하였다. Xu 등(1992)은 세절법만으로 채취한 55.2개의 난자를 등급 판정한 결과 우량란이 70.3%였다고 보고하였다. 한편 Hamano와 Kuwayama(1993)는 한 난소당 15.8개의 난포란을, Carolan 등(1994)은 44.2개의 난포란을 얻었다고 보고하였다. 흡입법과 세절법을 병용하였을 때 Iwasaki 등(1987)은 한 난소에서 채취된 난포란 중 우량란이 29.7%인 3.8개였으며, Sato 등(1990)은 12.3개, Takagi 등(1992)은 16.1개로서 본 연구 결과도 이들과 유사하였다.

본 연구에서 채취한 난포란의 등급평가 결과 Grade I은 직경 2~6 mm의 난포에서 흡입법으로 채취한 난포란에서는 48.0%이었으나 흡입후 세절 채취한 난포란에서는 이보다 유의적($P < 0.05$)으로 낮은 31.6%이었고, Grade II와 Denuded oocytes의 비율은 흡입법에서 각각 38.4 및 4.1%였는데 비하여 흡입 후 세절 채취한 난포란에서는 유의적($P < 0.05$)으로 높은 49.2 및 10.3%로 나타났다. 이러한 결과는 2~6 mm의 난포내에 있는 난자들을 흡입법으로 채란한 후 세절법으로 채취된 난자들은 보다 미성숙 혹은 폐쇄과정의 난포들에서 기원되었

Table 1. Effect of collection method on yield and grade of bovine follicular oocytes*

Collection method	No. (%) of oocytes by morphological grade					No. of oocytes recovered per ovary	
	Grade I	Grade II	Denuded	Expanded	Total	Grade I	Total
Aspiration (2~6 mm)	233 (48.0) ^a	186 (38.4) ^b	20 (4.1) ^b	46 (9.5) ^a	485 (100.0)	3.1	6.6
Slicing post aspiration	263 (31.7) ^b	409 (49.2) ^a	86 (10.3) ^a	73 (8.8) ^a	831 (100.0)	3.6	11.2
Aspiration and slicing	496 (37.7)	595 (45.2)	106 (8.1)	119 (9.0)	1316 (100.0)	6.7	17.8

* A total of 74 ovaries were used. Values with different superscripts in the same column were significantly ($P < 0.05$) different.

을 가능성이 높기 때문일 것으로 사료된다.

2. 채란과정의 소요시간

실험실로 운반된 난소에서 흡입과 세절법에 의해 난포란을 채취할 경우 ① 흡입 혹은 세절과정, ② picking-up, ③ grading and washing에 소요되는 시간을 측정하여 비교한 결과는 Table 2와 같았다. 한 개의 난소를 세절해서 washing과 grading하는데 까지 소요되는 총 시간은 8.7분으로서 흡입에서 washing과 grading하는데 까지의 총 소요시간인 3.5분보다 많았으나, 채취된 난자당 소요시간은 각각 0.8분과 0.5분으로서 큰 차이가 없었다. 그리고 채취된 Grade I 난자당 소요시간은 세절과 흡입

법에서 각각 2.5분 및 1.1분으로서 세절에 의해 난포란을 채취할 경우에 흡입할 경우보다 2배 이상의 시간이 소요되었다. 세절법은 흡입법에 비하여 난자를 picking-up하는 과정에 소요되는 시간이 난소당 평균 4.4분대 1.3분으로 3배 이상 많이 소요되었으므로 세절할 때 불필요한 난소조직이 적게 생성 혼입되도록 하여 난자 picking-up이 보다 용이하도록 개선한다면 총 채란 소요시간이 크게 절감될 수 있을 것이다.

3. 난포란의 크기와 체외성숙시 핵발달율

흡입법과 세절법에 의해 채란된 Grade I 난포란을 체외성숙 배양액이 들어있는 4-well dish에서 채

Table 2. Time required for recovery and grading of follicular oocytes by collection method*

Time required for(min.)	Collection method	
	Aspiration (2~6 mm)	Slicing post aspiration
Aspiration / ovary	1.2	—
Aspiration / oocyte	0.2	—
Slicing post aspiration / ovary	—	2.8
Slicing post aspiration / oocyte	—	0.3
Picking-up oocyte / ovary	1.3	4.4
Picking-up oocyte / oocyte	0.2	0.4
Washing and grading / ovary	1.0	1.5
Washing and grading / oocyte	0.2	0.1
Both collections and grading / ovary	3.5	8.7
Both collections and grading / oocyte	0.5	0.8
Both collections and grading / Grade I oocyte	1.1	2.5

* A total of 485 and 831 oocytes were collected by aspiration and slicing post aspiration, respectively, from 74 ovaries used.

Table 3. Size of pre- and post-matured Grade I oocytes recovered by aspiration and slicing post aspiration*

Collection method	IVM time (hours)	No. of oocytes examined	Mean diameter \pm SEM (μ m)
Aspiration (2~6 mm)	0	75	148.7 \pm 8.2 ^a
	24	131	152.4 \pm 6.0 ^a
Slicing post aspiration	0	66	151.5 \pm 10.1 ^a
	24	120	152.8 \pm 6.8 ^a

* The outer diameter of the oocytes enveloped with zona pellucida was measured. Values with same superscripts in the same column were not significantly different.

Table 4. Configuration of nuclei of *in vitro* matured Grade I oocytes recovered by aspiration and slicing post aspiration*

Collection method	Time for IVM (hours)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes developed to				
			GV	GVBD	M I	A I - P I	M II
Aspiration (2~6 mm)	0	56	54(96.0)	1	0	0(0.0)	0(0.0)
	24	108	0(0.0)	0	3	17(15.7)	88(81.5) ^a
Slicing post aspiration	0	53	53(100)	0	0	0(0.0)	0(0.0)
	24	100	1(1.0)	0	11	24(24.0)	64(64.0) ^b

* Values with different superscripts in the same column were significantly different ($P < 0.05$). GV: Germinal vesicle, GVBD: Germinal vesicle breakdown

외성숙 전과 24시간의 체외성숙 후에 hyaluronidase로 난포란의 난구세포를 제거한 다음 micrometer 를 이용하여 난포란의 투명대를 포함한 직경을 측정하고 aceto-orcein 염색에 의해 핵의 발달상태를 조사한 결과는 Tables 3 및 4와 같다.

흡입과 세절에 의해 회수된 Grade I 난포란의 체외성숙 전 난자의 직경은 각각 148.7과 151.5 μ m, 그리고 24시간 체외성숙 후의 직경은 각각 152.4와 152.8 μ m로서 체외성숙 전후 그리고 채란 방법간에 유의적인 차이가 없었다. Carolan 등(1994)과 Arlotto 등(1990)도 본 연구의 결과와 같이 흡입법과 세절법 간에 채란된 난포란 직경은 유의적 차이가 없다고 보고한 바 있다.

체외성숙율을 조사하기 위해 aceto-orcein 염색을 하여 핵발달을 조사한 결과, 체외성숙 전에는 각각 96.0 및 100%가 germinal vesicle(GV) 상태를 나타내어 채란방법 간에 차이가 없었다. 그러나 24시간 체외성숙 후에는 각각 81.5%와 64.0%가 수정기인 Metaphase II (M II)에 도달해 흡입법에 의해 회수된 Grade I 난포란이 유의적 ($P < 0.05$)으로 빨리 성숙되었다. Arlotto 등(1990); Sato 등(1990 및 Iwasaki 등(1987)도 흡입법으로 채란된 난포란의 체외성숙율이 세절법의 경우보다 높았다고 보고한 바 있다. 또한 Stubbings 등(1990) 및 Schellander 등(1989)도 직경 2mm 미만의 작은 난포란들에서 채취한 난포란의 체외성숙율이 낮았다고 하였다. Erickson과 Sorensen(1974)은 난포강형성전의 난포란에서, Motlik와 Fulka(1986) 및 Tsafriri와 Channing(1975) 등도 미숙한 난포란에

서 낮은 성숙율을 보고한 바 있으나, 본 연구에서는 세절법으로 채란된 난포란들의 크기가 흡입법의 경우와 유사하므로 양 채란법 간 성숙율 차이가 난자의 미숙에 기인된 것은 아니고 난자의 비형태적 질적 불량에 그 원인이 있을 것으로 사료된다. Iwamastu와 Yanagimachi(1975)도 햄스터에서 직경 80 μ m 이상인 난포란은 체외에서도 성숙할 능력이 있다고 하였으며, 소에서도 Sato 등(1990)도 직경이 120 μ m 이상인 난포란들은 체외성숙율이 높았다고 하였다.

그리고 본 연구에서 M I 단계 이상으로 발달된 난자의 비율은 양 채란법간에 별 차이가 없어 성숙배양 시간에 연장되는 체외수정 시간에도 성숙과정이 속행되면 그 후에 관찰될 성숙율에 있어서는 양 채란법에서 유사할 수도 있을 것이다.

4. 체외수정란의 체외배양 성적

체외 성숙된 난자의 체외수정 율은 각각 65.2%와 79.4%로서 세절법에 의해 회수된 난포란의 체외수정 율이 높았으나 유의적인 차이는 보이지 않았다 (Table 5). 이러한 결과는 Carolan 등(1994)이 흡입과 Dissection시 각각 82.3%와 84.7%의 수정율을 얻어 유의적 차이가 없었으며, Hamano와 Kuwayama(1993)가 흡입시에는 79.7%, cutting시에는 82.4%의 수정율을 얻었으나 유의적 차이가 없었는 보고와 일치하였다. 그러나 Takagi 등(1992)은 흡입에 의해 채란된 난포란의 체외 수정율이 mincing에 의해 채란된 난포란의 체외수정율 보다 유의적으로 높다고 보고한 바 있다. 체외수정된 수정란

Table 5. *In Vitro* development of bovine IVF embryos using Grade I oocytes recovered by aspiration or slicing post aspiration*

Collection method	No. of oocytes examined	Cleavage (%)	No. (%) of embryos developed to ^c			
			2~4 cell	8~16 cell	Morula	Blastocyst
Aspiration (2~6 mm)	112	73 (65.2) ^a	15	28	4	17 (23.3) ^a
Slicing post aspiration	160	122 (79.4) ^a	22	19	6	25 (20.5) ^a
Aspiration and slicing	272	195 (71.7)	37	47	10	42 (21.5)

* Values with same superscripts in the same column were not significantly different. The cleavage rate and the developmental rate were examined 72 hours and 10 days following insemination, respectively. The embryos developed were determined as a percentage of cleaved oocytes.

을 제외 발달시킨 결과 채란 방법간에 배반포로의 발달율에는 유의적인 차이가 없어 제외 발달 능력은 유의적인 차이가 없음을 알 수 있었다. Takagi 등(1992)은 흡입된 난포란 중에서는 21%, mincing 하여 얻은 난포란 중에서는 14%가 배반포로 발달하여 유의적 차이를 보였으나, 제외 수정된 수정란 중에서 배반포로 발달된 비율을 비교해 본 결과로는 유의적 차이가 없어 흡입시에 제외수정율이 mincing할 경우보다 높으나 배반포로의 발달율간에는 차이가 없다고 보고하였다. Carolan 등(1994)도 배 발달율에는 유의적 차이가 없다고 보고한 바 있다. 그러나 획득되는 배반포의 수는 세절을 실시함으로써 3배 이상으로 많았다는 Hamano와 Kuwayama (1993)와 Carolan 등(1994)의 결과와 같이 본 연구에서도 흡입만으로 난포란을 채란할 경우, 보다 많은 배반포를 얻을 수 있었다. 그러므로 도살되는소에서 채취된 난소에서 난포란을 채란할 경우에는 흡입법 외에 세절법을 추가적으로 실시하는 것이 더 유익할 것으로 사료된다.

적 요

도축된 한우의 난소에서 보다 많은 우량한 제외 수정란을 생산하기 위하여 채란방법을 개선하고자 흡입법과 세절법을 비교 평가하고자 하였다. 난소 74개를 도살장에서 채취하여 25~28℃의 항생제가 첨가되어 있는 생리식염수에 넣어 3시간 이내로 실험실로 운반하였다. 이들 난소로부터 흡입법과 세

절법에 의해 채란된 난포란을 Grade I, Grade II, Denuded, Expanded 난포란으로 분류하면서 각각의 채란과정(① 흡입 혹은 세절, ② picking-up, ③ washing과 grading)에 소요되는 시간을 측정하였다. 그리고 각각의 채란방법에 의해 회수된 Grade I 난포란 중 1/3은 채란 직후에 난구세포를 제거한 후 직경과 핵상태를 측정하고, 2/3는 제외성숙에 사용하였다. 제외성숙 후 난자의 1/2은 난구세포를 제거한 후 직경 및 핵상태를 측정하고, 나머지는 제외수정, 제외배양에 사용하였다. 제외성숙은 35µg/ml FSH, 10µg/ml LH, 1µg/ml estradiol-17β 그리고 10% FCS가 들어있는 TCM-199 배양액에서 24시간 동안 배양하여 유도하였다. 그 후 한우 정소상체 미부 정자를 B.O. 배양액으로 수정능 획득시켜서 24시간 동안 수정을 유도하여 얻은 수정란을 얻었다. 이들 수정란을 기본 배양액으로 세척한 후 제외배양액에 넣어 난관상피세포와 10 일 동안 공배양을 실시하여 후기배로의 발달을 유도한 실험의 결과는 다음과 같다.

난소 74개를 공시하여 흡입법으로 2~6mm의 난포에서 485개의 난포란을 채취하였고 흡입 후 다시 세절하여 831개의 난포란을 채취하였다. 채취된 난소당 평균 Grade I 난포란 수는 흡입법으로 3.1개와 세절법으로 3.6개 총 6.7개이었다. 채취된 난포란 중 Grade I의 비율은 흡입법에서 48.0%로서 세절법의 경우 31.6% 보다 유의적(P<0.05)으로 높았다. 흡입과 세절시에 한 개의 Grade I 난포란을 채란하는데 소요된 시간은 각각 1.1분과 2.5분이

었으며, 이러한 큰 차이는 세절법에서 난자 pick-up하는데 많은 시간이 소요된 때문이었다. 회수된 난포란의 직경은 흡입과 세절시에 각각 148.7과 151.5 μm 로서 유의적 차이를 보이지 않았다. 채란된 난포란을 24시간 동안 체외성숙을 유도한 후 metaphase II로의 발달율은 세절시 64.0%로서 흡입시의 81.5% 보다 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다. 체외수정을 유도한 후 10일 동안 체외배양하여 수정란 중 배반포배로 발달한 비율은 흡입과 세절시에 각각 23.3%와 20.5%로서 유사하였다.

이상의 결과로 부터 난포란을 채란하기 위해 난소에서 난포란을 흡입한 후 세절하여 추가 채란할 경우 채란된 Grade I 난포란 당 소요되는 시간은 흡입시 보다 2배 이상 요구되지만, 난소당 Grade I 난포란 채취수 및 배반포배 생산수를 2배로 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Arlotto TM, Leibfried-Rutledge ML, First NL. 1990. Size distribution and competence of bovine ovaries from two locations in the ovary. *Theriogenology*. 33:188.
- Carolan CP, Monaghan Gallagher M and Gordon I. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their development competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*. 41: 1061-1068.
- Erickson GF and Sorensen RA. 1974. *In vitro* maturation of mouse oocytes isolated from late middle and prenatal Graafian follicles. *J. Exp. Zool.* 190:123.
- Hamano, S and Kuwayama, M. 1993. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. 39:703-712.
- Hunter RHF, Lawson RAS and Rowson, LEA. 1972. Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 30:325-328.
- Iwamatsu T and Yanagimachi R. 1975. Maturation *in vitro* of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters. *J. Reprod Fertil.* 45:83.
- Iwasaki ST, Kono Nakahara T, Shioya Y, Fukushima M and Hanada, A. 1987. New methods for the recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to *in vitro* maturation and fertilization. *Japanese J. Anim. Reprod.* 33:188-192.
- Katska L. 1984. Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 7:461-463.
- Lazzari G., Galli C. 1993. *In vitro* embryo production from valuable cow slaughtered for reproductive failure or terminal illness. *Theriogenology*. 39:256.
- Leibfried-Rutledge, ML, Crister ES and First NL. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology*. 23:753-759.
- Lu KH, Gordon I, Gallagher M and McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Rec.* 121:259-260.
- Mayr, B., et al. 1986. Bovine oocytes: *in vitro* maturation and IVF study Proc Cong. on Future Aspects in Human *In Vitro* Fertil. (Vienna). *J. In Vitro Fertil. Embryo. Transfer.* 3:76-77.
- Motlik, J and Fulka J. 1988. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25:87-96.
- Sato, Matsuo MM and Miyamoto, H. 1990. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cycle adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Am. Sci.* 68:1182-1187.

- Sreenan, JM. 1968. *In vivo* and *in vitro* culture of cattle eggs. Proc. 6th Intern. Cong., Anim. Reprod. Art. Insem.(Paris) 1:577-580.
- Stubbings RB., Walton JS, Armstrong DT, Basur. PK. 1990. Recovery of bovine oocytes from small vesicular follicles for *in vitro* maturation and fertilization. Vet. Res. Comm. 14:71-81.
- Suss U and Madison V. 1983. Morphology and meiotic development of bovine oocytes cultured *in vitro*. Arch. Androl. 11:217-218.
- Takagi TK, Mori T, Takahashi S, Sugawara and J, Masaki. 1992. Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by minicing. J. Anim. Sci. 70:1923-1927.
- Xu, KP, Greve T, Callesen H and Hyttel P. 1988. Birth of a calf following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes J. Reprod. Fertil. Abstr. Series No. 1:18.
- Xu, KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ and King WA. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilization *in vitro* and co-cultured with bovine epithelial cells. J. Reprod. Fertil. 94:33-43.
- 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신연익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지. 8:143-149.
- 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 광대오, 이효종, 최상용. 1994. 체외성숙·수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우의 이식에 의한 산자의 생산. 한국가축번식학회지. 18:47-54.
- 한용만, 이철상, 이정호, 김선정, 신상태, 김동훈, 이훈택, 정병현, 정길생, 김영수, 김영훈, 이관세, 김교국, 황윤식, 이경광. 1994. 체외수정란 유래의 송아지 생산. 한국가축번식학회지. 18:7-13.