

## 젖소의 초음파 유도 채란술에 대한 FSH 전처리 효과의 비교<sup>†</sup>

박충생 · 조성근 · 강태영\* · 최창용\* · 손우진\* · 박성재\*\*

공일근\*\*\* · 이정규 · 최민철\* · 이효종\* · 최상용\*

경상대학교 축산학과

## Effect of FSH Pretreatment on Follicle Development and Oocyte Recovery by Ultrasound-guided Aspiration in Holstein Heifers

Park, C. S., S. K. Cho, T. Y. Kang\*, C. Y. Choi\*, W. J. Son\*, S. J. Park\*

I. K. Kong\*\*\*, J. K. Lee, M. C. Choi\*, H. J. Lee\* and S. Y. Choi\*

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

### SUMMARY

Ultrasound-guided follicular aspiration was performed in Holstein heifers once weekly with or without pretreatment of single or multiple decreasing doses using a total of 400 mg FSH. Oocytes were aspirated with a 6.5 MHz convex-array ultrasound transducer designed for intravaginal use. All the visible follicles larger than 4 mm in diameter were punctured with a 17 gauge, 55 cm needle at each aspiration session and the follicular fluids containing oocytes were obtained by vacuum suction. The results obtained were as follows:

As a preliminary experiment, the recovery rates of follicular oocytes by ultrasound-guided aspiration from the isolated ovaries of Korean native cows were compared between suction methods using manual syringe or vacuum pump. The recovery rate of oocytes using vacuum pump (80.7%) was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than that using manual syringe (47.1%).

The follicles were counted by their size in diameter with ultrasound image, and recovery rates and grades of follicular oocytes collected by ultrasound-guided aspiration were investigated in Holstein heifers pretreated with or without FSH. A group of heifers were injected with multiple decreasing doses (twice a day for 3 days) of a total of 400 mg FSH. The other 2 groups were injected with a single dose of 400 mg FSH mixed with 25% PVP. Ultrasound observation of follicle population and/or ultrasound-guided transvaginal oocyte aspiration were performed 12 hrs

<sup>†</sup> 본 연구는 1995~1996년도 농림수산특정연구과제 현장애로 기술개발사업 연구비와 (주) 메디슨에서 기증해 준 초음파진단기 (SONOACE-1500)에 의하여 연구되었음.

\* 경상대학교 수의학과 (Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

\*\* 농촌진흥청 축산기술연구소 남원지소 (Nam-won Branch Station, National Livestock Research Institute, Office of Rural Development)

\*\*\* 경상대학교 축산진흥연구소 (Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University)

following the last FSH injection in the multiple dose group, and 48 or 60 hrs after FSH injection in the single dose groups.

Most of the visible follicles had small size of less than 3 mm in diameter in unstimulated heifers (71.0%), but medium size in all the heifers treated with FSH. (70.5 to 92.8%). The number of OPU follicles per session ( $4.6 \pm 1.9$ ) were much less, compared to the visible follicle counts ( $9.7 \pm 2.2$ ), in the unstimulated heifers due to the small dominant follicles. Among 4 groups of heifers the most visible as well as OPU follicles were observed in the heifers at 60 hrs following treatment of a single dose of 400 mg FSH ( $21.2 \pm 2.3$  and  $21.0 \pm 2.0$ ), and the differences in both the follicle counts between the groups was found significant ( $P < 0.05$ ).

The rates of oocyte recovery from the follicles by ultrasound-guided aspiration were varied 46.3 to 75.0% in the heifers unstimulated and treated with a single dose of 400 mg FSH, but the group difference was not significant. The number of recovered oocytes per session appeared to be highest at aspiration at 60 hrs following single FSH ( $10.6 \pm 2.2$ ) than at aspiration at 48 hrs after single FSH ( $7.8 \pm 2.7$ ) or in the unstimulated heifers ( $3.4 \pm 3.0$ ). The proportion of grade I and II oocytes to all oocytes collected was varied 31.8 to 64.0% between the groups. However, there was found no significant difference in both the number of oocytes recovered per session and the percentage of grade I and II oocytes.

From the above results it was concluded that the more oocytes of superior quality might be recovered economically by ultrasound-guided aspiration at 60 hrs following the pretreatment of a single dose of 400 mg FSH and by suction using a vacuum pump system of about negative pressure of 75 to 85 mmHg.

(Key words : Ultrasound, Follicle aspiration, Oocyte, Bovine, FSH)

## I. 서 론

소의 체외수정란 생산과 이식 기술은 주로 도축우 난소에서 수정란을 저렴하게 생산하여 쌍태유기에 사용할 목적으로 연구해 오고 있으며, 국내에서도 체외수정란의 생산과 수정란이식에 관한 연구가 활발하게 진행되어 체외수정란 유래의 송아지가 생산된 바 있다 (황 등, 1993; 박 등, 1994; 한 등, 1994). 그러나 이 경우에는 종축의 개량에는 별로 도움이 되지 못한다. 체내수정란 이식은 유전적 능력이 우수한 암소의 선발 강도를 높여 유전적 개량 효과를 높이고자 함에 그 주된 목적을 두고 있다. 이 경우에도 종빈우의 선발 강도를 크게 제고할 수 있기 위하여는 이식 가능한 체내수정란의 생산효율이 높아야만 하는데 일정한 한계에 부딪히고 있다. 이러한 견지에서 그 대안의 하나로서 최근 우수한 암소로부터 가급적 저렴하게 많은 수의 난포란을 채취하여 체외수정란을 생산 이용해 보려는 연

구를 활발히 수행해 오고 있다.

소에서 초음파 유도 난포란의 채취와 이를 이용한 체외수정란 생산에 관하여 Piester 등(1988)이 처음으로 보고한 이후, 이에 관한 연구가 다양한 방법으로 활발하게 진행되어 왔다. 이러한 일련의 연구들은 성선자극호르몬을 처리했거나 또는 처리하지 않은 소에서 (Pieterse 등, 1988, 1991a, 1991b, 1992; Kruij 등, 1993; Walton 등, 1993; Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995; Meintjes 등, 1995; Stubbings와 Walton, 1995), 난소의 기능이 활성적이지 못한 소에서 (Bols 등, 1995), 미성숙 송아지에서 (Brogliatti와 Adams, 1996; DUBY 등, 1996; Presicce 등, 1997), 불임우에서 (Looney 등, 1994), 또는 임신초기 1/3 기간의 소에서 (Meintjes 등, 1995) 각각 난포란을 채취하는 연구를 수행한 바 있으며, 초음파진단기를 이용한 난포란의 채취에 사용할 일회용 needle의 개발 (Bols 등, 1995)과 발정후 주 1회 또는 2회 난포란 채취법의 비교 (Gibbons 등, 1994, 1995; Looney 등,

1994; Bungartz 등, 1995; Hasler 등, 1995) 및 채란 시 환경온도와 습도가 채취된 난포란의 체외발달에 미치는 영향 (Broussard 등, 1996) 등에 관한 연구를 실시해 오고 있다.

이에 따라 Holstein 젖소 육성우를 이용하여 초음파유도 난포란 채란을 위한 기본적 조건 확립을 위하여, FSH의 반복처리와 1회 처리 및 무처리우에 있어서의 난포수 조사 및 채란 가능한 난포수의 확인, 그리고 채란율과 채란된 난포란의 등급분류를 실시하여 체외수정에 공시될 난포란의 공급 가능성을 조사하여 체외수정란의 생산에 대한 기초자료로 이용하고자 본 연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

실험에 공시한 젖소는 번식장애가 없고 건강하고 정상적인 발정주기를 발현한 Holstein 젖소 육성우 7두를 사용하였다. 실험우의 사양은 경상남도 산청군 신안면 소재 셋별목장에서 사양표준에 준하여 위탁 관리하였으며, 정기적으로 질병과 건강상태 유무를 점검하였다.

### 2. FSH 처리

공시동물의 호르몬처리에는 FSH (Folltropin<sup>®</sup>-V, Australia)를 이용하였으며, 처리우는 3그룹으로 나누어 사용하였다.

그룹 I은 Meintjes 등(1995)의 방법에 준하여 multiple decreasing doses로 400 mg FSH (20 ml)를 12시간 간격으로 2회/1일 3일간 (4.5, 4.5; 3.5, 3.5; 2, 2) 근육주사 하였으며, 최종처리 후 12시간 만에 난포발달 조사 및 난포란 채란을 실시하였다. 그룹 II와 그룹 III은 single dose로 400 mg FSH를 25% PVP에 첨가하여 1회 근육주사하였으며, 각각 FSH 처리후 60시간과 48시간에 난포발달 조사 및 난포란 채란을 실시하였다.

### 3. 채란용 기자재

난포란 채란을 위한 장비는 국내 Medison사에서 제작한 SONOACE-1500 및 SONOACE-600을 사용하였고 탐촉자는 6.5 MHz convex scanner를 사용

하였다. Needle guide는 본사에서 제작한 탐촉자와 함께 장착하도록 되어 있고, needle (Cook<sup>®</sup>, Australia)은 17 gauge, 50 cm 길이의 50 ml tube를 장착하고, 몇 차례 반복적으로 채란에 사용할 수 있도록 하였다. Vacuum pump (THOMAS<sup>®</sup>, USA)는 75~85 mm Hg의 vacuum pressure (분당 흡입량: 27~29 ml)를 유지하도록 조절하여 사용하였다 (Gibbons 등, 1994).

## 4. 난포란의 채란

초음파를 이용한 난포란의 채란은 호르몬 처리우와 무처리우에서 중난포 (4~10 mm) 이상의 난포에서 주 1회 실시하였다. 난포란의 채란을 위해서는 공시동물을 완전히 고정시켜서 채란시 일어날 수 있는 동물의 움직임을 방지하도록 하였다 (Rath, 1993). 채란우를 보정틀에 고정시킨 후 진정시키고, 질벽의 긴장을 완화시키기 위해서 1 mg/100 kg의 detomidine hydrochloride (Dormosedan<sup>®</sup>, Canada)를 미정맥에 주사하였다. 또한 복부의 긴장을 방지하기 위해서 2% Hostacain 4~6 ml (또는 2% Lidocain 3~6 ml + Adrenaline)을 미근부의 제 1, 2 미추간에 주사하여 진정을 유도하였다. 직장내의 분을 제거하고 회음부와 외음부의 오물을 깨끗하게 닦아내고 70% alcohol로 세척한 후, paper towel로 닦아서 건조시켰다.

탐촉자의 사용은 초음파의 전달이 용이하도록 초음파용 gel을 멸균된 콘돔의 내·외부에 바르고 콘돔을 탐촉자의 헤드부분에 씌운 후 needle guide를 장착하였다. 탐촉자의 조작자는 한손은 직장검사용 장갑을 끼고 윤활제를 바른 후 직장을 통해 삽입하여 난소의 위치를 파악하고 채란 가능한 난포의 유무를 확인한 후, 다른 한손으로는 탐촉자를 질을 통해서 질벽 가까이 위치시킨 후 난소와 탐촉자의 위치를 가능한한 가까이 밀착시키고 모니터를 통해서 위치를 재확인하였다. 채란 가능한 난포가 모니터상으로 나타나면 puncture line 부위로 난포를 이동시키고 needle의 끝부분이 모니터 상에 약간 비치도록 이동시킨 후 난포내로 needle을 진입시키고 동시에 vacuum pump의 음압을 사용하여 난포액과 난포란이 함께 흡입되도록 하였다. Tube에 난포액이 나오는 것을 확인하면서 난포내에 들어 있는 needle을 천천히 회전시켜서 난포에

있는 액을 가능한한 완전하게 흡입토록 하였다. 난소와 탐촉자를 동시에 이동시키면서 다른 난포의 위치를 확인한 후 위의 방법과 마찬가지로 난포액과 난포란을 흡입하도록 하였다. 작업이 완료된 후 탐촉자와 needle을 후퇴시키고, needle은 10 IU/ml heparin이 첨가된 기본배양액 (D-PBS + 10% FBS)으로 세척하여 needle속에 남아 있는 난포액을 완전히 흡입하였다. 채란작업은 가능한한 정확하고 신속하게 작업을 완료하도록 하였다.

### 5. 난포란의 회수

난포란과 난포액이 들어있는 tube를 채란 후 즉시 실험실로 운반하여 실온에서 약 25~30분간 정치시킨 후 침전된 하층액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 구획이 그려져 있는 60 mm 배양접시에 옮겨서 40× 배율의 도립현미경(Olympus, Japan) 하에서 난포란을 회수한 후 기본배양액 (D-PBS + 10% FBS)으로 4~5회 세척한 후 등급별로 분류·선발하였다.

### 6. 난포란의 등급분류

회수한 난포란의 등급분류는 난구세포와 세포질의 충실도에 따라서 아래와 같이 4등급으로 분류하였다:

- 1) Grade I: 4층 이상의 난구세포층이 층만하고 균일한 세포질을 가진 것.
- 2) Grade II: 1~3층의 난구세포층을 가진 것.
- 3) Grade III: 부분적으로 또는 완전히 나화된 것.
- 4) Grade IV: 난구세포층이 팽화되었거나 퇴화된 난포란.

### 7. 통계학적 분석

실험 결과치의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package의  $\chi^2$ -test 및 개체당 평균 난포수, 채란가능 난포수 및 1회당 채란 난포수에 대한 처리별 least square means와 유의성 검정을 위하여 아래의 선형모형으로 SAS proc GLM을 이용하여 다중검정을 실시하였다.

$$y_{ijkl} = \mu + t_i + I_j + R_k + e_{ijkl}$$

여기서  $y_{ijkl}$  = 각 조사치

$\mu$  = 조사치의 평균

$t_i$  = 처리방법의 효과 ( $i = 1, 4$ )

$I_j$  = 개체의 효과 ( $j = 1, \dots, 7$ )

$R_k$  = 반복회수의 효과 ( $k = 1, \dots, 5$ )

$e_{ijkl}$  = 조사에 따른 오차 효과

## III. 결과 및 고찰

### 1. 도축난소에서 초음파 유도 채란 성적

생체에서 초음파 유도로 난포란을 채취하기 위한 예비적 실험으로서 도축 한우 난소로부터 초음파 진단기로 채란하여 채란율을 조사한 성적은 Table 1에서 보는 바와 같다. 즉 초음파 유도로 syringe를 사용하여 수동적으로 채란한 경우에는 47.1%의 채란율을 얻었으나, 이에 비하여 초음파 유도 vacuum pump (vacuum pressure: 75 mmHg, 26 ml/min)를 이용한 경우에는 80.7%의 채란율을 보여 현저하게 좋은 성적을 얻을 수 있었다. 그러나 체외수정에 공시할 수 있는 Grade I, II의 난포란 비율(%)에 있어서는 manual syringe와 vacuum pump 사용법 간에 유의적 차이가 없었다. 그래서 Grade I, II의 난포란 채취수에 있어서 vacuum pump 사용법이 보다 효과적이는데, 이 경우 vacuum pressure는 75~100 mmHg 수준 (Gibbons 등, 1994, 1995; Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995; Meintjes 등, 1995; Konish 등, 1996; Giorgio 등, 1997)이 적당하다고 본 연구와 비슷한 경향을 보고하였다. 본 연구의 계속성을 감안한다면 본 실험에서 사용한 vacuum pump는 40~150 mmHg vacuum pressure를 조절할 수 있었으며, 또한 염가로 제작·구비하여 채란해 본 결과 높은 채란효율을 얻을 수 있어 매우 실용적인 것으로 판단되었다.

### 2. 초음파 진단에 의한 난포발달 성적

초음파 진단에 의한 생체 난포란의 채란을 위하여 호르몬 처리우와 무처리우의 난소에서 난포발달 상태를 조사한 바 그 결과는 Table 2와 같다. 즉 FSH를 처리한 3군 ① 400 mg을 multiple decreasing doses로 최종 처리후 12 시간, ② 400 mg을 single dose로 처리후 60 시간, ③ 400 mg을 single dose로 처리후 48 시간에 조사한 두당 총 가시난포의 수는 각각 16.4±2.4, 21.2±2.3 및 13.9±2.6개로서 무처리우의 9.7±2.2개에 비하여 많은 경향이였으며, 특히 FSH 400 mg을 single dose로 처리한 60 시간후의 경우는

**Table 1. Recovery rates of follicular oocytes collected from isolated ovaries of Korean native cows by ultrasound-guided aspiration using syringe or vacuum pump\***

Ultrasoundguided aspiration using	No. of follicles aspirated	No. (%) of oocytes recovered	No. (%) of follicles aspirated				
			G I	G II	G III	G IV	G I + G II
Manual syringe	68	32(47.1) <sup>a</sup>	3( 9.4)	18(56.3)	7(21.2)	4(12.5)	21(65.7) <sup>c</sup>
Vacuum pump	83	67(80.7) <sup>b</sup>	8(12.0)	38(56.7)	18(26.7)	3( 4.5)	46(68.7) <sup>c</sup>

\* Classification of cumulus-oocyte complexes (COCs); Grade I :  $\geq 4$  layers of compact cumulus cells, Grade II : 1 to 3 cumulus layers, Grade III : denuded, Grade IV : expanded or degenerated cumulus. Different superscripts within the same column denote significant ( $P < 0.05$ ) difference.

**Table 2. Number of follicles by size observed by ultrasound image in Holstein heifers pretreated with or without single or multiple doses of FSH\***

Aspiration time & hormone treatment	No. of aspiration sessions	No. (%) of follicles by size in diameter				No. of visible follicles per session	No. of OPU follicles per session**
		Large ( $\geq 11$ mm)	Medium (4~10 mm)	Small ( $\leq 3$ mm)	Total		
Spontaneous without FSH	26	8(2.9)	72(26.1)	196(71.0)	276	9.7 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	4.6 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
12 hrs after multiple 400 mg FSH**	16	17(5.9)	245(85.4)	25( 8.7)	287	16.4 $\pm$ 2.4 <sup>ab</sup>	15.8 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
60 hrs after single 400mg FSH	14	7(1.9)	350(92.8)	20( 5.3)	377	21.2 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	21.0 $\pm$ 2.0 <sup>c</sup>
48 hrs after single 400mg FSH	8	1(0.8)	86(70.5)	35(28.7)	122	13.9 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	12.1 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>

\* LS Mean $\pm$ SE. Different superscripts within the same column denote significant ( $P < 0.05$ ) difference.

\*\* A total of 400 mg FSH (Folltropin<sup>R</sup>) was given twice a day for 3 days in decreasing dose.

\*\*\* Follicles larger than 4 mm in diameter.

유의적( $P < 0.05$ )으로 많이 나타났다. 또한 채란이 용이한 중난포 (4~10 mm) 이상의 난포수에 있어서는 FSH 처리우에서 각각 15.8 $\pm$ 2.2, 21.0 $\pm$ 2.0 및 12.1 $\pm$ 2.3개로 어느 처리구에서도 무처리구의 4.6 $\pm$ 1.9개보다 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높게 나타났으며, 그 중에서도 FSH 1회 처리후 60시간에서 가장 많은 난포수를 나타내었다.

Bungartz 등(1995)도 FSH 처리우가 무처리우보다 채란된 난포의 수가 많았다고 (10.6 $\pm$ 0.7 vs. 8.9 $\pm$ 0.5) 보고하였고, Stubbing과 Walton (1995)은 무처리우에서 채란 빈도를 주 2회로 하면 주 1회 FSH

처리 채란할 경우와 비슷한 수준의 채란가능 난포수를 나타낸다고 하였으며 (15.7 $\pm$ 3.3 vs. 14.2 $\pm$ 1.9), 무처리우에 있어서 주 2회 반복적 채란을 실시하면 점진적으로 채란 가능한 난포수가 증가하나, 호르몬 처리우에 있어서는 채란 가능 난포수가 변하지 않는다고 하였다. 그리고 Meintjes 등(1995)은 비임신우에 40 mg FSH 처리와 임신우에 40 mg FSH 처리에서 각각 31.0 $\pm$ 4.9, 25.3 $\pm$ 11.2개의 난포를 관찰하여 본 연구의 FSH 처리우 중에서 25% PVP가 첨가된 FSH 1회 처리후 60시간에 조사된 군에서 나타난 21.2 $\pm$ 2.3개 보다 높은 난포수를 나타내었다. Goodhand 등

(1996)은 무처리우와 FSH single dose 및 multiple doses 처리우에서 각각 16.7, 20.0 및 24.6개의 난포를 관찰하여 본 연구의 무처리우와 multiple doses 처리우 및 FSH single dose (48 hrs)의 난포수 9.7±2.2, 16.4±2.4 및 13.9±2.6개보다는 높게 나타났으나, FSH 처리우 중에서 FSH single dose (60 hrs)에서의 난포수 21.2±2.3개와는 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 본 연구에서 채란 가능 난포수는 FSH 처리우와 무처리우 간에 유의적 ( $p < 0.05$ )인 차이를 나타내고 있으며, FSH 처리우 중에서도 처리 방법에 따라 즉 FSH single dose 60 시간에서 21.0±2.0개로 나타나 multiple doses 및 FSH single dose (48 hrs)의 15.8±2.2, 12.1±2.3개 보다 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 많은 결과를 얻었다. 이러한 결과를 미루어 보아 초음파를 이용한 난포란 채란을 위하여는 FSH single dose (60 hrs)의 방법을 이용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

### 3. 초음파 유도 채란 및 난자등급에 미치는 FSH 처리의 효과

초음파 유도 난포란 채취를 위하여 FSH를 전처리하는 방법에 관한 전향의 결과에서 25% PVP에 혼합하여 1회 근육주사하고 60시간에 채란하는 방법이 multiple decreasing doses에 비하여 유의적으로 많은 채란 가능 가시난포를 발달시킬 수 있었고 또한 이

방법은 매우 간편하기 때문에 초음파 유도 채란에서는 1회 처리법과 무처리법 만을 비교 실험하였다. 즉 FSH 400 mg을 25% PVP에 혼합하여 1회 근육주사한 우군에서 처리후 60시간과 48시간에 각각 난소에서 초음파 유도로 채취한 난포란의 채란율 및 등급평가의 결과를 무처리 우군과 비교해 보면 Table 3과 같다. 즉 호르몬 처리우에 있어서의 채란율은 60시간에서 46.3%, 48시간에서 75.0%로 나타나 무처리군의 62.9%와 비슷하게 나타났다. 그래서 1회 채란에서 얻은 두당 평균 채란수는 호르몬 처리후 60시간과 48시간군에서 각각 10.6±2.2 및 7.8±2.7개로 나타나 무처리군의 3.4±3.0개 보다 높은 경향이었으나 처리군간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다.

그리고 채란된 난포란 중 체외수정에 이용할 수 있다고 평가되는 Grade I 과 II 등급의 회수율을 보면 호르몬 처리후 60시간군에서 64.0%, 48시간군에서는 51.7%로서, 무처리군의 31.8% 보다는 높은 경향이었으나 역시 처리군 간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다.

본 연구에서 무처리우와 호르몬 처리우의 총 난포란 채란율은 54.3%로 나타났으며, 이러한 결과는 Pieterse 등(1992), Kruip 등(1993), Fry 등(1994), Gibbons 등(1994), Bols 등(1995) 및 Becker 등(1997)들의 초음파 유도 채란율과 비슷한 수준이었으나, Van der Schans 등(1991)과 Loony 등(1994)의 채

**Table 3. Recovery rates and grades of follicular oocytes collected by ultrasound-guided aspiration in Holstein heifers treated with or without FSH\***

Aspiration time & hormone treatment	No. of heifers used	No. of aspiration sessions	No. of follicles aspirated	No. of oocytes recovered (%)	No. (%) of oocytes by grade				No. of oocytes per session
					G I	G II	G III	G IV	
Spontaneous without FSH	3	5	35	22(62.9) <sup>a</sup>	2(9.1)	5(22.7)	9(40.9)	6(27.3)	3.4±3.0 <sup>b</sup>
60 hrs after single 400 mg FSH	5	10	246	114(46.3) <sup>a</sup>	29(25.4)	44(38.6)	16(14.0)	25(21.9)	10.6±2.2 <sup>b</sup>
48 hrs after single 400 mg FSH	5	6	80	60(75.0) <sup>a</sup>	20(33.3)	11(18.3)	15(25.0)	14(23.3)	7.8±2.7 <sup>b</sup>

\* LS Mean±SE. Values with same superscripts in the column were not significantly ( $P < 0.05$ ) different. All the visible follicles of larger than 4 mm in diameter were aspirated.

란을 60~70%보다는 약간 낮은 성적이었다. 그러나 초음파를 이용한 채란에 있어서 정확하게 채란율을 비교 평가하기는 어렵다. 그 이유는 가시난포로서 중난포 (4~10 mm) 이상의 난포를 채란할 경우에도 실제로는 소난포 ( $\leq 3$  mm)들로 부터도 채란될 수 있기 때문이라고 하였다 (Becker 등, 1996).

다배란 유도-체내 수정란 생산법과 달리 초음파 유도 채란-체외수정란 생산법에서는 주 1회 혹은 주 2회 자연채란이 가능하다는 점이 중요한 이점의 하나일 수 있다. 다만 유용한 등급의 난포란을 얼마나 채취할 수 있는지가 실용화의 가부를 결정짓는 중요한 요인이 될 것이다. 본 연구에서는 미경산 Holstein 소에서 주 1회 간격으로 자연채란한 경우 평균  $3.4 \pm 3.0$ 개의 난포란을 얻을 수 있었는데, Gibbons 등(1994)은 주 1회 채란에서  $6.8 \pm 2.0 \sim 7.7 \pm 1.8$ 개를, 그리고 주 2회 채란에서는 1회당  $9.5 \pm 1.1$ 개, 1주당  $19.0 \pm 2.2$  개를 얻었으며, 1회당 Looney 등(1994)은 6.3개, Bungartz 등(1995)은  $8.9 \pm 0.5$ 개의 난포란을 얻고 있으나, Hasler 등(1995)은  $4.9 \pm 4.5$ 개, Goodhand 등(1996)은  $3.5 \sim 4.7$ 개의 난포란을 얻어 본 연구와 비슷한 결과를 보고하고 있다. 그리고 FSH 400 mg을 25% PVP에 혼합하여 single dose로 전처리하였을 경우 본 연구에서는 60 시간 후에 채란한 경우 평균  $10.6 \pm 2.2$ 개의 난포란을 얻어 Goodhand 등(1996)의  $5.0 \sim 5.5$ 개보다 높은 성적을 나타내었다. 또한 FSH를 multiple decreasing doses로 전처리하였을 경우 1회 채란 당 Gibbons 등(1994)은  $6.2 \pm 1.1$ 개, Looney 등(1994)은 8.6개, Goodhand 등(1996)은  $5.7 \sim 6.2$ 개의 난포란을 채란하여 본 연구의 single dose 처리군에서의 난포란 수보다는 약간 낮은 경향이었으나, Bungartz 등(1995)은  $10.6 \pm 0.7$ 개의 난포란을 얻어 본 연구의 single dose 처리군과 비슷한 결과를 보고하였다.

그리고 본 연구에서 자연채란하여 얻은 난포란 중 IVF에 사용할 수 있는 등급이 31.8%에 불과하였다. 그러나 Gibbons 등(1994)은 75.8~91.5%, Looney 등(1994)은 83.7%, Bungartz 등(1995)은 65.2%, Hasler 등(1995)은 82.0%로서 상당히 높게 보고되고 있으나, Gibbons 등(1995)은 52.5%로 상당히 낮은 결과를 보고하고 있는데 이러한 차이는 적용한 등급기준과 채란기술 숙련도의 차이에 기인될 것으로 생각된다. 또한 FSH 400 mg을 single dose로 전처리하였

을 경우 본 연구에서는 60 시간과 48시간 후에 채란한 경우 각각 64.0, 51.7%의 체외수정 가능 난포란을 채란하여 Goodhand 등(1996)의 48.0%와 비슷한 성적을 나타내었다. 그리고 FSH를 multiple doses로 전처리하였을 경우에 Bungartz 등(1995)은 66.0%, Meintjes 등(1995)은 48.0~56.0%, Goodhand 등(1996)은 49.1~63.0%로 나타나 본 연구의 single dose 처리군에서의 성적과 비슷한 경향이었으나, Gibbons 등(1994)은 84.2%, Looney 등(1994)은 83.7%로서 높은 결과를 보고하였다.

결론적으로 초음파 유도로 난포란을 채란하는 방법으로서 본 연구의 범위에서는 FSH 400 mg을 25% PVP 용액에 혼합하여 1회 전처리한 후 60시간에  $75 \sim 85$  mmHg의 음압을 유지하는 진공펌프로 흡입함이 가장 효율적인 것으로 판단되었다. 그러나 FSH를 전처리하지 않는 자연채란법에 관한 추가 연구와 채란도구의 개선 등에 관하여 더욱 많은 연구를 함으로써 과배란 채란에 비하여 훨씬 경제적인 방법으로 발전될 수 있을 것으로 기대된다.

#### IV. 적 요

Holstein 육성우에서 초음파 유도로 난포란을 채란하는 기법을 확립하고자 관련 요인에 관한 연구를 실시하였다. 사용한 초음파 진단기는 SONOACE-1500 및 SONOACE-600이었으며, 6.5 MHz convex scanner에 58 cm, 17 gauge needle을 사용하였고, vacuum pump는  $75 \sim 85$  mmHg의 vacuum pressure를 유지하도록 조절하여 사용하였다. 난포발달을 촉진하기 위하여 FSH를 다회 사용한 경우는 총 400 mg FSH를 1일 2회 3일간 나누어 90, 90; 70, 70; 40, 40 mg 씩 6회 근육주사하였으며, 최종처리 후 12시간에 난포발달 조사 및 채란을 실시하였다. 그리고 FSH 1회 처리군은 400 mg FSH를 25% PVP에 혼합하여 근육주사하였으며, 처리후 60시간과 48시간에 난포발달 조사 및 채란을 실시하였다. 자연채란군은 발정주기 중 임의의 시기에 FSH 전처리없이 난포 조사 및 채란하였다. 채란은 주 1회로 하였는데, 먼저 동물을 진정시키기고 질벽을 완화시키기 위해서 1 mg / 체중 100 kg 수준의 detomidine hydrochloride (Dormosedan<sup>R</sup>, Canada)를 미정맥에 투여하였으며, 또한 복

부의 긴장을 방지하기 위해서 2% Hostacain 4~6 ml (또는 2% Lidocain 3~6 ml + Adrenaline)을 미근부의 제 1, 2 미추간에 주사한 후 채란하였으며, 실험의 결과는 다음과 같다.

예비 실험으로서 도축 한우 난소로부터 초음파 진단기로 채란하여 채란율을 조사한 성적은 vacuum pump를 이용한 경우에 80.7%로 나타나 manual syringe를 사용한 경우의 47.1% 보다 높은 유의적 ( $P < 0.05$ ) 차이를 나타내었다.

초음파 진단에 의한 FSH 전처리우와 무처리우의 난소에서 난포발달 상태를 조사한 바 무처리군에서는 71.3%의 소 난포가 관찰되었으나, FSH 처리군에서는 70.5~92.8%의 중난포가 관찰되었다. 특히 무처리군에서 소 난포의 우점에 의해 채란이 용이한 중난포 이상의 난포수는  $4.6 \pm 1.9$ 개로 총 가시난포수  $9.7 \pm 2.2$ 개에 비하여 훨씬 적었다. 그리고 처리군과 무처리군 중에서 FSH 400 mg을 single dose로 전처리후 60시간에 채란 가능 난포수는 총 가시난포  $21.2 \pm 2.3$ 개 중  $21.0 \pm 2.0$ 개로 가장 높게 나타났으며, 각 처리군간에는 유의차 ( $P < 0.05$ )가 인정되었다.

초음파 유도에 의한 난포란의 채란율은 FSH 400 mg single dose 처리군과 무처리군에서 46.3~75.0%로 나타났으나, 처리군간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다. 그리고 1회당 채란된 난포란의 수는 FSH 처리후 60시간에서  $10.6 \pm 2.2$ 개로서 FSH 처리후 48시간의  $7.8 \pm 2.7$ 개 및 무처리군의  $3.4 \pm 3.0$ 개 보다 높게 나타났으며, 채란된 난포란 중 Grade I과 II 등급의 회수율은 각 처리군 간에 31.8~64.0%로 나타났으나 역시 처리군 간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다.

이상의 결과를 종합해 보면 초음파 유도로 난포란을 채란하는 방법으로서 본 연구의 범위에서는 FSH 400 mg을 25% PVP 용액에 혼합하여 1회 전처리한 후 60시간에 75~85 mmHg의 음압을 유지하는 진공펌프로 흡입함이 가장 효율적인 것으로 판단되었다. 그러나 FSH를 전처리하지 않는 자연채란법에 관한 추가 연구와 채란도구의 개선 등에 관하여 더욱 많은 연구를 함으로써 파배란 채란에 비하여 훨씬 경제적인 방법으로 발전될 수 있을 것으로 기대된다.

## 사 사

본 연구를 수행함에 있어서 초음파 진단기 (SONOACE-1500)를 기증하여 주신 (주) 메디슨사의 이인화 대표이사님과 임직원 여러분께 깊은 감사를 드리며, 아울러 공시동물의 사육에 협조하여 주신 셋별농장의 가족 여러분께도 감사를 드립니다.

## V. 인용문헌

1. Becker, F., W. Kanitz, G. Nurnberg, J. Kurth and M. Spitschak. 1996. Comparison of repeated transvaginal ovum pick up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments. *Theriogenology*, 46:999-1007.
2. Bols, P. E. J., J. M. M. Vandenheede, A. Van Soom and A. de Kriuf. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43:677-687.
3. Brigliatti, G. M. and G. P. Adams. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, 45:1163-1176.
4. Broussard, J. R., A. Rocha, J. M. Lim, R. M. Blair, J. D. Roussel and W. Hansel. 1996. The effect of environmental temperature and humidity on the quality and developmental competence of bovine oocytes obtained by transvaginal ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology*, 45:351. Abstr.
5. Bungartz, L., A. Lucas-Hahn, D. Rath and H. Niemann. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 43:667-675.
6. Duby, R. T., P. Damiani, C. R. Looney, R. A. Fissore and J. M. Robl. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology*, 45:121-130.
7. Fry, R. C., T. L. Simpson, T. J. Squires, R.



- A. Parr and R. M. Damanik. 1994. Factors affecting transvaginal oocyte pick-up in heifers. *Theriogenology*, 41:197. Abstr.
8. Gibbons, J. R., W. E. Beal, R. L. Krisher, E. G. Faber, R. E. Pearson and F. G. Gwazdauskas. 1994. Effects of once-versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 42:405-419.
  9. Gibbons, J. R., R. L. Krisher, S. K. Carlin, R. E. Pearson and F. C. Gwazdauskas. 1995. *In vitro* embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular oocyte aspiration. *Theriogenology*, 43:1129-1139.
  10. Goodhand, K. L., P. J. Broadbent, J. S. M. Hutchinson, R. G. Watt, M. E. Staines and L. C. Higgins. 1996. *In-vivo* oocyte recovery and in-vitro embryo production in cattle pre-treated with FSH, progesterone and estradiol. *Theriogenology*, 45:355. Abstr.
  11. Hasler, J. F., W. B. Henderson, P. J. Hurtgen, Z. Q. Jin, A. D. McCauley, S. A. Mower, B. Neely, L. S. Shuey, J. E. Stokes and S. A. Trimmer. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-159.
  12. Konishi, M., Y. Aoyagi, T. Takedomi, H. Itakura, T. Itoh and S. Yazawa. 1996. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, 45:573-581.
  13. Kruip, Th. A. M., R. Boni, M. W. M. Roelofsens, Y. A. Wurth and M. C. Pieterse. 1993. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 39:251. Abstr.
  14. Looney, C. R., B. R. Lindsey, C. L. Gonseth and D. L. Johanson. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
  15. Meintjes, M., M. S. Bellow, J. R. Broussard, J. B. Paul and R. A. Godke. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.* 73:967-974.
  16. Pieterse, M. C., K. A. Kappen, Th. A. M. Kruip and M. A. M. Taverne. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762.
  17. Pieterse, M. C., P. L. A. M. Vos, Th. A. M. Kruip, Y. A. Wurth, T. H. van Beneden, A. M. Willemse and M. A. M. Taverne. 1991a. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24.
  18. Pieterse, M. C., P. L. A. M. Vos, Th. A. M. Kruip, A. M. Willemse and M. A. M. Taverne. 1991b. Characteristics of bovine estrus cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles from ovum pick-up. *Theriogenology*, 35:401-413.
  19. Pieterse, M. C., P. L. A. M. Vos, Th. A. M. Kruip, Y. A. Wurth, T. H. van Beneden, A. H. Willemse and M. A. M. Taverne. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG-treated cows. *Theriogenology*, 37:273. Abstr.
  20. Presicce, G. A., S. Jiang, M. Simken, L. Zhang, C. R. Looney, R. A. Godke and X. Yang. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.*, 56:386-392.
  21. Rath, D. 1993. Featured article: Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. *Embryo Transfer Newsletter*, 11:

- 10-15.
22. Stubbings, R. B. and J. S. Walton. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 43:705-712.
23. van der Schans, A., L. A. J. van der Weat-erlaken, A. A. X. de Wit, W. H. I. Eyestone and H. A. de Boer. 1991. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, 35:288. Abstr.
24. Walton, J. S., K. A. Christie and R. B. Stub-bings. 1993. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on bovine ovarian dynamics. *Theriogenology*, 39:336. Abstr.
24. 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 8:143-149.
25. 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤 희준, 최민철, 광대오, 이효중, 최상용. 1994. 체외성숙·수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우의 이식에 의한 산자의 생산. *한국가축번식학회지*, 18:47-54.
26. 한용만, 이철상, 이정호, 김선정, 신상태, 김동훈, 이훈택, 정병현, 정길생, 김영수, 김영훈, 이곤세, 김교국, 황윤식, 이경광. 1994. 체외수정란 유래의 송아지 생산. *한국가축번식학회지*, 18:713.
- (접수일자 : 1997. 5. 3. / 채택일자 : 1997. 5. 30.)