

개에서 내시경을 이용한 동결정액의 인공수정

신남식 · 문유식¹ · 정동희 · 김용준*
삼성에버랜드, 전북대 수의과대학*

Artificial Insemination with Frozen Canine Semen Using Vaginal Endoscope

Nam-shik Shin, You-sik Moon¹, Dong-hee Chung and Yong-jun Kim*

Samsung Everland Zoological Garden, *College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

ABSTRACT : Artificial insemination with frozen canine semen using vaginal endoscope was performed in a two years old Golden Retriever to investigate the feasibility of this technique. The bitch was in her second estrus. Blood progesterone concentration was evaluated every two days to decide the timing of insemination since vaginal bleeding was observed. Insemination was performed twice in 48 hours interval on the fourth and sixth posterior to LH surge, respectively. The volume of frozen semen injected was 1.5 ml (1×10^8 sperms/ml of semen). The bitch was pregnant and she whelped a female pup on sixty one days after first insemination.

Key word : artificial insemination, frozen semen, vaginal endoscope, blood progesterone concentration

서 론

동결정액을 이용한 인공수정은 정액 주입방법에 따라 수태율에서 많은 차이를 나타내고 있다. 질내 주입의 경우에는 10~20%의 수태율이 보고된 반면 자궁내 직접 주입은 80% 이상의 수태율이 보고된 바 있어 질내 주입에 비해 월등한 성적을 보이고 있다¹. 그 이유는 융해된 동결정액은 신선정액에 비하여 활력도, 생존시간, 그리고 생존율이 낮아 정액을 질내 주입할 경우 정자가 난자까지 도달하는데 필요한 운동성을 갖지 못하거나 수정시키기에 충분한 수의 정자가 도달하지 못하기 때문이다. 한편 정액의 자궁내 주입은 외과적 기술을 통한 주입과 비외과적 주입의 두 방법으로 분류된다. Olar⁶와 Smith⁹는 개에서 외과적 기술에 의한 인공수정으로 60~80%의 수태율을 보고하였다. 외과적 기술은 일반적 개복술로 자궁을 노출하여 정액을 주입하는 방법으로 일반 임상가들도 쉽게 활용할 수 있는 기법이나 인공수정 횟수가 제한되고 마취의 부담이 있는 단점이 있다¹. 비외과적 주입은 기구를 활용해 외음부로부터 접근하여 자궁경을 관통해

자궁내로 정액을 주입하는 기법으로 인공수정을 여러 차례 할 수 있어 수태율 향상을 위해 외과적 기술보다 유리하나 자궁경 위치 확인과 기구를 사용하는데 있어 전문적인 기술이 요구된다. 1973년 Fougner⁴는 여우를 대상으로 특별히 고안된 급속성 카테타를 사용해 복벽촉진으로 자궁경의 위치를 확인하여 고정후 카테타를 통해 정액을 자궁내 주입하는 기법을 소개하였다. 그리고 위와 같은 기법을 개에 적용하여 Anderson¹과 Farstad³, 그리고 Linde-Forberg⁵는 40~90%의 수태율을 보고하였다. 그러나 이 방법은 복부촉진으로 자궁경 위치 확인이 불가능한 대형견과 비만견에서 활용이 어려운 단점이 있다고 하였다¹. 한편 Concannon과 Battista²는 내시경과 카테타를 사용하는 비외과적 인공수정 기법을 소개하였고 Wilson¹⁰은 이 기법으로 개에서 83%의 수태율을 보고하였다. 내시경을 이용한 인공수정은 비외과적 기법으로 직접 질내부를 관찰하여 자궁경 입구를 확인하고 카테타를 통해 자궁내로 정액을 주입하는 방식으로 복벽촉진으로 자궁경 위치를 확인하는 것에 비해 비교적 수월한 기법이 될 수 있다고 한다. 최근 국내에서도 개의 정액동결 및 인공수정에 관한 많은 연구와 실험이 진행되고 있다¹¹⁻¹³. 그러나 정액동결에 관한 연구에 비해 인공수정 기법

¹Corresponding author.

에 관한 연구가 많지 않아 저자들은 인공수정 기법중 내시경과 카테타를 이용해 동결정액을 자궁내로 주입하는 비외과적 기법을 실험해 보았고 수태에 성공하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 동일 사육장에서 사육된 골든레트리버 암,수 각 1두였으며 수컷은 체중이 32 kg인 5년생 이었고 암컷은 체중이 27 kg의 2년생인 미경산견으로서 출생 후 2번째 발정기에서 본 실험에 사용되었다.

정액의 동결

인공수정에 사용된 동결정액은 96년 9월에 동결되었으며 동결을 위해 채취된 신선정액의 정액량은 5.5 ml, 총 정자수는 8.6억마리, 정자 활력도는 90% 이상 (정자 활력도는 10단계 로 구분하여 평가되었음), 정자 기형률은 2%, 정자 생존율은 93% 이었다. 정액동결을 위한 희석액과 희석방법은 김, 등^{11,12}의 방법에 준하였다. glycerol평형이 끝난 정액스트로는 스티로폼상자내 채워진 액체질소표면보다 5 cm가 높은 철제 rack위에 올려놓아 30분간에 걸쳐 동결하였다. 그리고 나서 액체질소에 보관하였다. 정액의 용해는 70°C 온수에서 약 10초간에 걸쳐서 실시하였다. 용해한 정자의 활력도는 70% 이상 그리고, 정자의 생존율은 60% 를 나타내었다.

발정주기검사

외음부 출혈이 발견된 후 6일째부터 48시간 간격으로 질도말검사 및 혈중 프로제스테론(progesterone) 농

도를 측정하였다. 질도말검사는 생리식염수로 적신 20 cm 길이의 면봉을 질벽 배측을 따라 접근 가능한 최대의 깊이로 삽입한 후 질 상피세포를 채취하였고, Quick Staining 법으로 도말표본을 염색하여 100배 비율로 관찰하였고, 혈중 프로제스테론 농도 측정을 위해 검사용 kit(Status-Pro, International Canine Genitics, USA)(Fig 1)를 사용하였다. 인공수정시기는 질도말검사소견 및 혈중 프로제스테론 농도 변화에 근거하여 결정하였다. 즉 혈중 프로제스테론농도가 5 ng 이상인 때를 수정시기로 택하였다.

인공수정

실험동물을 보조자에 의해 실험대 위에 기립자세로 고정시킨 상태에서 내시경을 질내로 삽입하고 질내부를 관찰하면서 자궁경 입구를 확인 한 후 폴리프로필렌 카테타를 사용하여 자궁경을 관통시켜 카테타를 통해 자궁내로 정액을 주입하였다(Fig 2). 사용된 내시경을 rigid cysto-urethroscope(Karl Storz, Germany)였



Fig 2. Bitch restrained for endoscopic AI.



Fig 1. Rapid ELISA Progesterone kit (Status-Pro, ICG).

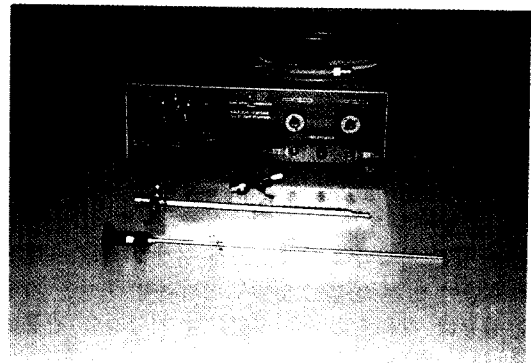


Fig 3. Endoscopic equipment consisting of light source.

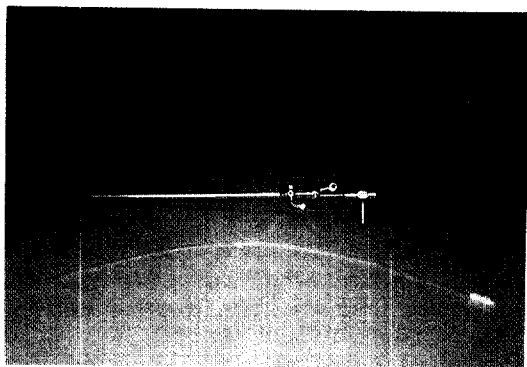


Fig 4. Polypropylene catheter with stainless steel sheath.

으며, flexible fiberglass cable을 통해 빛이 전달되는 할로겐 광원 장치를 이용하였다. 내시경의 길이는 30 cm, 경사각도 25°이었고 두께가 23Fr gauge인 stainless steel sheath를 함께 사용하였다(Fig 3). 카테타는 두께가 8Fr gauge, 길이 60 cm의 폴리프로필렌 카테타였다(Fig 4). Stainless steel sheath는 질의 손상을 줄이기 위해 그 표면에 K-Y jelly로 도포되어 사용되었다. 인공수정은 48시간 간격으로 2회에 걸쳐 시행되었으며 1회에 용해된 동결정액 1.5 ml(정자수 1.5억)를 주입하였다.

결과 및 고찰

Shillie⁶는 암개에서 배란은 LH surge가 있는 후 48시간이 지나서 일어나고 배란된 난자가 정자와 수정되기 위해서는 48~72시간의 감수분열기를 보내야 하며 이후 난자의 수정이 가능한 시간은 약 48시간 정도라고 하였다. 따라서 인공수정의 최적 시기는 LH surge가 있는 후 4~7일이라고 하였다⁹. 혈중 프로세스테론 농도는 LH surge 전에는 0 ng 상태이다가 LH surge와 동시에 증가되는데 이런 프로세스테론의 농도 변화를 기초로 LH surge 발생 시간을 측정하여 인공수정시기를 결정하였다. 최초의 혈중 프로세스테론 농도는 외음부 출혈이 발견된 후 6일째에 검사되었으며 이때 농도는 0 ng 이었고 이후 48시간 간격의 검사에서 외음부 출혈 발견 후 10일째에 최초의 혈중 프로세스테론 농도 증가가 관찰되었다. 따라서 LH surge의 발생은 외음부 출혈 후 8~9일째에 있었던 것으로 판단하고 9일째를 LH 0일로 하여 LH 4일(외음부 출혈 발생 후 13일째), LH 6일(외음부 출혈 발생 후 15일째)에서 인공수정을 실시하였다. 한편, 본 연구에서 실시된 질도말 검사에서 외음부 출혈이 발견된 후 6일째

에 90% 이상의 비각화세포들이 관찰되다가 9일째에서는 적혈구가 존재하면서 80% 이상의 각화세포들이 관찰되었고 11일째에 90% 이상의 각화세포가 관찰되었으며 14일째부터 백혈구가 관찰되기 시작하였다. 내시경의 조작은 내시경의 기구관(instrument cannal)에 카테타를 장착하고 외음부에서 진입하여 외음부로부터 질내로 약 25 cm가 되는 지점의 질벽 배측에서 자궁경 입구를 발견하고 카테타를 조작하여 자궁경 입구를 통해 자궁내로 삽입하였다. 카테타가 자궁내에 삽입되어 고정된 상태에서 카테타를 통해 정액을 주입하였으며 1 회의 인공수정에서 동결융해시킨 정액 1.5 ml(정자수 1.5억)를 주입하였다.

동결정액을 이용한 인공수정에서 Seager⁷는 수태율을 높이기 위해 인공수정 횟수를 늘리고 많은 수의 정자를 주입하였다. 한편 Anderson¹ 및 Farstad³는 1회당 1.5~2억개의 정자주입과 2회의 인공수정으로 비교적 좋은 수태율을 보고하였다. Wilson¹⁰은 내시경과 카테타를 이용한 자궁내 주입 인공수정에서 1회에 5천만 개의 정액을 주입하고 48시간 간격으로 2회 인공수정하여 83%의 높은 수태율을 보고하였다.

본 실험에서는 첫번째 인공수정일로부터 61일째에 암컷 1두가 분만되었다. 이와같이 적은 산자수 생산과 관련하여 Seager와 Pletcher⁷는 개에서 동결정액을 이용한 인공수정시 산자수가 감소된다고 하였다. 그리고 산자수 감소는 동결정액의 생존력과 활력의 저하와 관련된다고 하였다¹. 한편 Linde-Forsberg⁵와 Wilson¹⁰은 산자수에서 동결정액을 이용한 인공수정에서도 신선정액을 이용할때의 산자수와 큰 차이가 없었다고 보고하였다. 따라서 콜든레트리버종의 평균 산자수가 7두 정도이므로 본 실험에서의 적은 산자수는 동결정액으로 인한 산자수 감소라고 판단할 수 있다. 그러나 산자수는 개체별로 많은 차이가 나며 특히 본 실험에 사용된 암컷은 혈통적으로 산자수가 적은 상태였으므로 유전적으로 배란된 난자가 적었을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 결과적으로 내시경을 이용한 인공수정은 자궁내 정액을 주입할 수 있는 기법이므로 동결정액의 주입시 성공률이 높을 것으로 기대되며, 보다 높은 수태율을 올리기 위하여 내시경을 이용한 인공수정기술의 숙달은 물론이고, 인공수정적기판정, 주입정자수, 주입정액량 등에 대하여 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

결 론

동결정액을 사용한 인공수정 기법중 내시경을 이용

한 인공수정기법을 미경산견으로서 두번째 발정기에 있는 골든레트리버 2년생 1두에 사용하고자 하였다. 동결정액은 동종의 5년생 수컷에서 96년 9월 채취되어 동결되었으며 3개월 후인 96년 12월에 본 실험을 위해 사용되었다. 인공수정 시기는 혈중 프로제스테론 농도 검사 결과를 주로하여 결정하였으며, LH surge 후 4일째와 6일째에 해당하는 날에 각각 인공수정을 실시하였다. 인공수정은 내시경을 질내에 주입하여 자궁경 입구를 육안으로 확인하고 카테타를 자궁경 입구를 통해 자궁내로 삽입하여 카테타를 통해 정액을 주입하므로써 실시되었다. 주입된 정액량은 인공수정 1회당 1.5 ml(정자수 1.5억)였으며 용해된 정자의 활력은 70% 이상, 생존율은 65%였다. 인공수정에 실험된 암컷은 첫번째 인공수정일로부터 61일째에 암컷 1두를 분만하였으며 이로써 개에서 내시경을 이용한 동결정액을 인공수정하여 산자를 생산할 수 있었다.

참고문헌

1. Anderson K. Insemination with frozen semen based a new insemination technique 1976; 185.
2. Concannon PW, Battiata M. Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy* X. W. B. Saunders, Philadelphia, 1989; 1253.
3. Farstad W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *Journal of Small Animal Practice* 1984; 25: 211-217.
4. Fougner JA. Artificial insemination in fox breeding. *Nordisk Veterinary Medicine* 1973; 25: 144-149.
5. Linde-Forsberg C, Forsberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility supplement* 1989; 39: 299-310.
6. Olar TT. Using frozen semen: A guide for practitioners. *Veterinary Medicine* 1985; March pp22-30.
7. Seager S, Pletcher WS. Conception rates and related data using frozen dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975; 45: 189-192.
8. Shillie VM. Reproductive physiology and endocrinology of the female and male. *Textbook of Veterinary Internal Medicine* 3rd ed., Callifornia. 1982; 1798-1800.
9. Smith FO. Update on freezing canine semen. *Current Veterinary Therapy IX*, W.B. Saunders, Philadelphia, 1986; 1243-1248.
10. Wilson MS. Artificial insemination in the bitch using frozen semen. 1992; 32-56.
11. 김용준, 박영재, 김병진, 유일정. 개에서 동결정액을 이용한 인공수정-Methanol을 이용한 간이동결방법. *대한수의학회지* 1993; 34(4): 851-855.
12. 김병진, 김용준. Methanol을 이용 동결후 액체질소 내 보존된 犬精液의 인공수정에 관한 연구. *한국임상수의학회지* 1995; 12(2): 207-214.
13. 신남식, 문유식, 최윤주, 정동희, 김용준, 권오경. 개에서 내시경을 이용한 발정주기 검사 및 인공수정기법의 실험조사. *한국임상수의학회지* 1997; 14(1): 93-98.