

초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구

I. 발정주기, 계절 및 bST처치 영향에 관하여

이병천 · 윤기영 · 김현일* · 노상호 · 이강남 · 황우석

서울대학교 수의과대학

제일화학(주)*

(1997년 11월 20일 접수)

Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle

I. Effects of estrus cycle, season and bST treatment on ovum pick-up in cattle

Byeong-chun Lee, Ki-young Yoon, Hyun-il Kim* , Sang-ho Roh, Kang-nam Lee,
Woo-suk Hwang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

*Cheil Chem. Co., Ansan, Korea**

(Received Nov 20, 1997)

Abstract : Estrus cycle of cow, season and follicular stimulating treatment, having an effect on the number of follicle, are investigated for the oocyte recovery rate in ovum pick-up(OPU). The number of follicle aspirated and oocyte collected on the different days of estrus cycle(D 4~5, D 9~10 and D 14~15) were not significantly different among the groups. The higher number of viable oocytes were produced on Jan~May(79.0%) than Jun~Aug(33.3%) by OPU in cow. The number of follicle and aspirated oocyte in cows treated FSH or PMSG combined with bovine somatotropin(bST) were 1.2~1.5 times higher than in cows treated alone follicular stimulating hormone(FSH) or pregnant mare serum gonadotropin(PMSG).

In conclusion, OPU can be repeatedly practiced 2 or 3 times in an estrus cycle. In addition, the high environmental temperature is not good for ovarian function of cow and the bST co-treatment with FSH or PMSG is increasing the number of aspiratable follicle.

Key words : ovum pick-up, bovine somatotropin, bovine, embryo.

본 논문은 1996년도 교육부 학술연구조성비(유전공학 GE 96-55)에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Byeong-chun Lee, Veterinary Teaching Hospital, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea.

서 론

소의 수정란이식은 유전형질 개선 및 생산성향상을 위한 방법으로 이용되어 왔다. 수정란의 체외생산은 미성숙난자의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 의한 수정란의 생산 및 수정란의 비외과적 이식 등의 연구발견으로 그 중요성이 강조되어 왔을 뿐만 아니라 핵이식이나 형질전환동물의 생산 등 새로운 응용가능성을 내포하고 있는 분야이다¹.

수정란이식 및 관련학문의 발전으로 공란우로부터 난자를 반복적이고도 안정적으로 다량 채취하여 이용할 수 있는 방법의 개발이 요구되어 왔다^{2,3}. 이들 방법중 수정란의 비외과적 채란은 현재까지 발전을 거듭하여 목장현장에서 어려움 없이 실시하고 있다¹. 또한 난소에서 미성숙난자를 채취하여 체외성숙 및 체외수정을 실시하고 이를 체외배양하는 것이 수정란을 대량으로 생산할 수 있는 획기적인 방법으로 여겨져 주 연구대상 분야가 되어 왔다⁴. 특히 난소에서 체외성숙 및 체외수정에 이용할 미성숙난자를 채취하는 방법으로는 도축후 난소의 난포절개(dissection), 도축후 난소의 난포에서 주사침으로 흡인(needle aspiration), 면도날을 사용하여 난소를 잘게 잘라서 채취(maceration) 그리고 복강수술 또는 복강경으로 살아 있는 소 난소에서 배란직전 난포 및 자란 폐쇄난포내 미성숙 난자의 직접채취법 등이 있으나 주사침에 의한 흡입법이 일반적으로 상용되어 왔다⁵. 이러한 방법은 대량의 난자를 얻는 가장 일반적인 수단으로 여겨져 왔으나 우수형질의 선별문제 및 난포의 반복이용이 불가능하다는 단점이 있다. 또한 살아있는 소의 난소에서 복강수술 및 복강경을 이용하여 난자를 채취할 경우 수술로 인한 창상, 수술후 난소와 장기간의 유착 및 반흔생성 등으로 인해 이어지는 번식능력에 영향을 미칠 수 있다. 또한 난소 피질표면의 큰 난포는 용이하게 관찰되어 채취가 가능하나 표면에 노출되지 않은 소 난포는 외관상으로 볼 수 없어 채취가 어려운 단점이 있어 이에 대한 개선방법이 또한 모색되어 왔다⁶. 유전적으로 우수한 형질을 보유한 소의 이용효율을 극대화하기 위해서는 그 소의 수태능력에 영향을 끼치지 않으며, 재이용 간격이 짧고, 난회수시 성적저하가 없이 반복적으로 채취할 수 있는 방법이 개발되어야 한다. 또한 정상 생리현상인 발정, 임신 그리고 분만의 리듬에 전혀

영향을 미치지 않고 공란우의 채란이 가능한 방법이 개발된다면 이는 수정란이식 분야의 새로운 기법으로 여겨질 수 있다^{3,7,8}.

초음파 진단기의 보급과 함께 이러한 조건들을 모두 충족시키면서 목장에서 쉽게 행하여질 수 있는 방법으로 초음파유도에 의한 난포액 및 난자의 채취가 시도되었다⁹. 초음파유도에 의한 소 난포란의 직접채취법이 Pieterse *et al*⁹에 의해 소개된 이후 관련연구는 반복되는 발정주기 동안 매주 1회씩의 초음파유도에 의한 채란이 발정주기의 기간에 미치는 영향^{10,11}, 난포자극호르몬 투여시 회수된 난자의 질 및 발육능의 평가¹², 난포흡인을 위한 일회용 주사침의 개발¹³, 임신우에서 난포란의 채취¹⁴, 다양한 transducer의 사용¹⁵, 번식장애우에 있어 상업적 이용 및 PMSG의 병용가능성^{3,16}, 외기온도에 따른 채취율의 관련성¹⁷, 미성숙 송아지에 적용 등¹⁸ 많은 관련 연구가 있으며¹⁹, Bruck과 Greve²⁰는 초음파 진단기를 사용, 대수까지 채취하는 기법을 개발하였다. 초음파유도에 의한 난포란의 흡인은 우수한 유전능력을 지닌 공란우에서 반복적으로 난자의 채취를 가능하게 할 뿐만 아니라 이를 체외성숙, 체외수정과 연계시켜 대량의 이식가능한 수정란을 얻을 수 있다^{6,20}.

본 연구는 초음파유도에 의한 난포란의 채취시 공란우의 이용효율을 높이기 위하여 짧은 반복주기로 반복적 미성숙난자를 채취할 수 있는 방법을 연구개발하고자 한다. 또한 번식능력이나 공란우의 정상 생리리듬에 영향을 미치지 않는 채취방법을 모색하며, 공란우에 성선자극호르몬의 투여방법 및 투여량이 미성숙난자의 채취에 미치는 결과를 분석한다. 이를 기반으로 체외성숙, 체외수정 및 체외발육과 연계하여 다량의 수정란을 안정적으로 공급할 수 있는 system을 구축함으로써 소 수정란이식의 효율을 증진시킬 수 있는 방법을 알아보기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

공란우 준비 :

1) 선발기준 : 임상적 검사 및 혈액, 혈청학적 검사에 의해 건강하다고 인정되고 직장검사를 통하여 난소와 생식기도에 이상이 없으며 2회 이상 정상 발정주기를 보이는 경산우 및 미경산우를 선발하였다. 발정주기동안 2일에서 3일 간격으로 직장을 통해 초음파로써 난소의

활력 및 생식기도의 이상유무를 검사하여 정상인 개체만을 공란우로 최종 선발하였다.

2) 난포 발육을 위한 처치 : 선발된 공란우 제 1군을 발정주기 4~5, 9~10 및 14~15일에 미성숙난자의 직접 채취를 실시하기 위해 미리 follicular stimulating hormone (FSH) 또는 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG)을 처치하였다. 난포 발육을 위해 FSH는 12시간 간격으로 1회 25IU를 3일간 6회 근육주사하며, 처치종료 12시간 후에 미성숙난자를 흡입하였다. 또한 PMSG는 1,000IU를 근육주사하고 72시간 후에 ovum pick up(OPU)를 실시하였다. 병용처치로 FSH 및 PMSG 각각에 bovine somatotropin(bST; BOOSTIN-S, LG Chem, Korea)을 처리시 bST는 10일 간격으로 500mg을 투여하였다. 발정주기 단계에 따른 미성숙난자의 채취효율을 보기 위한 실험에서는 FSH, PMSG 및 bST 처치를 하지 않고 발정주기 4~5, 9~10, 14~15일에 질을 통하여 초음파유도에 의한 미성숙난자를 직접 채취하였다.

초음파유도에 의한 미성숙난자의 흡인 : 초음파유도에 의한 미성숙난자의 흡인은 Pieterse *et al*²¹, Bols *et al*¹⁴ 및 Bols *et al*²³의 방법을 변형하여 실시하였다. 공란우는 보정틀에 고정시키고, 움직임을 최소화시켰다. 공란우는 2% lidocaine 5ml로 경막외마취를 실시하고 자궁의 이완과 진정을 위해 2% xylazine 0.25ml/100kg의 용량으로 정맥주사하였다. 외음부 세척 및 소독을 위해 2% chlorhexidine으로 깨끗이 닦은 후 물기를 제거하고, 꼬리를 묶어 고정하였다. 미성숙난자 흡인은 long non-disposable needle(55cm, COOK®, Australia)를 사용하였으며, dead space를 줄이고 COC(cumulus-oocyte complex)에 적합한 환경을 조성하기 위해 aspiration medium(TCM199, 2% serum, 0.2% heparin)을 needle 및 흡입관내에 채웠다. 채취를 용이하게 하기 위해서 needle guide가 장착된 50cm의 transducer holder를 준비하였다. 초음파 진단기는 convex scanner (SonoVet 600, Medison, Korea)로 준비된 transducer guide 내에 6.5MHz transvaginal transducer를 장착시키고, guide를 질에 깊이 삽입하였다. 직장을 통해 자궁을 끌어당기며 난소를 견인하여 transducer와 최대한 밀착할 수 있도록 위치시켰다. 흡인은 regulated vacuum pump를 작동시켜 17 gauge needle의 경우는 -70mmHg 상태를, 18 gauge needle의 경우는 -105mmHg 상태를 유지하였다. 초음파상에서 난포를 확인한 후 needle을 삽입하여 monitor상의 puncture line이 난포를 횡으로 통과할 수 있도록 위치시

켰다. 난소천자는 aspiration needle로 질벽을 관통하여 복강내로 들어가 난포내에 주사침이 들어간 것을 확인하고 regulated vacuum pump를 foot switch로 작동시켜 미성숙난자가 포함된 난포액을 흡입하였다. 난포내에 needle 끝이 보일 때 -70 또는 -105mmHg(water flow rate 22ml/min)의 압력으로 최소 직경 3mm 이상의 모든 난포를 흡입하였다. 난포가 collapse 될 때까지 계속적으로 흡입하며 puncture needle의 끝이 난포벽에 닿아 음압이 차단될 때까지 실시하였다. 이때 주사침은 난포강내에서 한바퀴 움직여 주사침의 입구와 반대각도에 있는 미성숙난자의 흡인을 시도하였다. 흡입후 needle 내에 잔류된 난포액 회수를 위해 주사침의 내강을 aspiration medium으로 세척하였다. 반대측 난소는 동일한 방법으로 미성숙난자를 직접 채취하였다. 흡입후 난포액과 혈액응고물을 분리하고 검경의 용이함을 위해 filter 하였다. 회수한 미성숙난자는 실체 현미경하에서 검경하였다. 채취한 난자는 Kastrop *et al*⁷의 분류기준에 준하여 다층의 치밀한 난구세포를 가지며 세포질이 균질한 난자만을 선별하며 체외성숙에 공여하였다.

체외수정 :

1) 미성숙난자의 성숙배양 : 성숙배지는 0.01unit/ml의 FSH 및 LH와 10% fetal bovine serum(FBS)가 첨가된 TCM199을 준비하였다. 배양은 각 공란우별로 회수된 미성숙난자를 4-well에 분리하여 넣고 공기 및 습도가 포화상태인 39℃, CO₂ incubator 내에서 실시하였다.

2) 정자의 처리 : 정자는 난자의 성숙배양 개시후 24시간이 경과한 뒤 수정을 실시할 수 있도록 성숙배양 개시후 22시간(수정을 실시하기 2시간전)에 준비하였다. 정액은 Pasteur pipette으로 0.2ml씩 꺼내 capacitation용 Tyrode가 들어 있는 시험관의 저부에 분주하였다. 활력 정자의 선별은 정액을 넣은 capacitation용 Tyrode를 CO₂ incubator 내에 1시간 정치하는 swim-up 과정을 거쳐 실시하였다. 정자는 swim-up 개시 1시간 후에 각 시험관의 상층액 0.8ml를 Pasteur pipette으로 흡입하여 하나의 원심관에 모은 다음, 원심분리하였다(500g, 10분). 원심관의 하부에 가라앉은 정자가 빨리 올라오지 않도록 주의하여 상층액을 제거하고 동량의 새로운 capacitation용 Tyrode를 보충하였다. 동일한 방법으로 1회 더 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 정자를 pepetting하여 4% HCl 100μl와 capacitation용 Tyrode 90μl를 넣은 시험관에 정자함유액 10μl를 넣어 잘 pepetting 하여 정자를 고정시켰다. 고

정된 정자액은 혈구계산판에서 산정된 후 그 결과값에 따라 첨가할 정자의 농도를 조절하였다. 수정능획득과정은 heparin 용액(200 μ l/ml)을 정자의 농도에 준하여 첨가한 후 pepetting을 실시한 다음 15분간 CO₂ incubator내에 정치하여 이루어졌다.

3) 난자의 준비 : 본 실험의 IVF용 Tyrode는 CO₂ incubator 내에서 8~18시간 전배양하였다. 작성된 IVF용 Tyrode 43 μ l의 drop은 35mm petridish에 mineral oil을 도포하여 실험실시 2~3시간 전에 CO₂ incubator내에 정치해 두었다. 성숙난자는 정자를 swim-up 시키는 동안 세정과정을 통해 팽대된 난구세포를 1/3 정도 벗겼다. 세정이 끝난 난자는 각 drop에 4 μ l로 5개씩 첨가하였다.

4) 체외수정 : 수정능획득이 유도된 정자는 drop내에 최종농도가 2.5 \times 10⁶개/ml가 되도록 첨가한 후, CO₂ incubator내에서 30시간 배양되었다.

분할란의 체외배양 :

1) 난관상피세포와의 공배양 : 도축장에서 출혈체를 보이거나 2g 미만의 황체조직을 나타내는 초기황체기의 소 난관을 절제하여 4 $^{\circ}$ C로 냉장보관하여 실험실로 운반한 후, 여분의 결체조직을 제거하고 난관을 5% FBS 첨가 TCM199으로 관류하여 난관상피세포를 채취하였다. 원심분리(500g, 5분간)하여 상층액을 제거하는 과정을 3회 반복하였다. 배양액은 10% FBS첨가 TCM199을 0.5ml씩 분주하여 준비하였다. 난관상피세포는 3일간 배양하여 monolayer를 형성시킨 후 초기배(4-, 8- cell 이상)를 넣어 공배양하였다. 수정후 5일경에 발육정도를 검사한 후 16-cell 이상을 선별하여 배양하였고, 수정후 8일경에 다시 검사하여 기록하였다.

2) Synthetic oviductal fluid(SOF)를 이용한 체외배양 : 배양용, 세정용 SOF를 작성한 후 incubator내에 8~18시간 전배양하였다. 배지는 24-well plate에 배양용 SOF를 0.5ml씩 분주하고 mineral oil을 도포하여 준비하였다. 수정후 작성된 초기배는 세정용 SOF로 3회 세정하고 배양용 SOF가 분주되어 있는 well에 옮긴 후 5% CO₂ incubator내에서 배양하였다. 수정후 5일경에 발육정도를 검사한 다음, 16-cell 이상을 선별하여 배양하고, 수정후 8일경에 다시 검사하여 기록하였다.

통계학적 분석 : 실험결과의 통계학적 유의성 검정에는 x²-test를 실시하였다.

발정 한주기 동안 초음파에 의한 소 난포란채취가 적당한 날짜를 알아보기 위하여 발정후 4~5, 9~10 그리고 14~15일에 OPU를 실시한 결과는 Table 1과 같았다. 흡입난포수, 회수 난자수 그리고 분할란의 수는 발정 4~5일에는 각각 31, 16 및 7개로 그리고 발정 9~10일에는 각각 38, 17 및 7개로 나타나 발정 14~15일의 22, 9 및 3개보다 1.4~2.3배 높게 나타나는 경향을 보였다. 후기배로의 발육율은 세 군에서 각각 28.6, 28.6 및 33.3%를 보여 발정 주기의 각 발육단계별 차이는 인정되지 않았다.

외기온도가 초음파에 의한 소 미성숙난자의 채취에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1월에서 3월까지와 6월에서 8월까지 조사한 회수 난자수와 분할란 및 후기배로의 발육률을 검토한 결과는 다음과 같았다(Table 2). 초음파 진단기에 의한 OPU에서 1월에서 3월까지의 회수된 난자수는 17두에서 81개로 6월에서 8월까지의 14두에서 27개 보다 높은 경향을 보였다. 또한 분할란의 수도 1월에서 3월까지의 81개중 64개로서 6월에서 8월까지의 27개중 9개보다 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05). 후기배로의 발육률은 각각 28.1 및 22.2%를 보였다.

Table 1. The number of follicle aspirated and oocyte collected on the different day of estrus cycle

Day of estrus	No. of cow	No. of follicle aspirated	No. of oocyte collected(%)	No. of oocyte cleaved(%)	No. of embryos morulae \leq /cleaved(%)
D 4~5	5	31	16(51.6)	7(43.8)	2(28.6)
D 9~10	5	38	17(44.7)	7(41.2)	2(28.6)
D 14~15	5	22	9(40.9)	3(33.3)	1(33.3)

* Day 0 = estrus.

Table 2. Oocytes collected and oocyte cleavage rates during different periods of the year

Treatment	No. of cow	No. of oocyte collected	No. of oocyte cleaved(%)	No. of embryos morulae \leq /cleaved(%)
Jan~May	17	81	64(79.0) ^a	18(28.1)
Jun~Aug	14	27	9(33.3) ^b	2(22.2)

^{ab}Different superscripts denote significant differences(p < 0.05).

초음파 유도에 의한 소 미성숙난자 채취의 효율을 증진시키기 위하여 FSH 또는 PMSG 단독처리 및 BST의 병용처리하였을 때의 발육난포의 수, 흡입난포수, 회수난

결 과

Table 3. Effect of bovine somatotropin treatment on number of follicle, follicle aspirated and oocyte collected in cows

Treated group	No. of donor	No. of follicle*	No. of aspirated (%)	No. of oocyte collected(%)	No. of oocyte cleaved(%)	No. of embryos developed to morulae ≤ / cleaved(%)
FSH	4	110	87(79.1)	35(40.2) ^a	15(42.9)	4(26.4)
FSH + bST	4	149	112(75.2)	60(53.6)	26(43.3)	7(26.9)
PMSG	4	122	94(77.0)	44(46.8)	25(56.8)	8(32.0)
PMSG + bST	4	165	124(75.2)	71(57.3) ^b	33(46.5)	9(27.3)

*Aspirated over 2 weeks.

^{ab}Different superscripts denote significant differences($p < 0.05$).

자수 및 분할란의 수는 다음과 같았다(Table 3). 회수된 난자는 PMSG와 bST를 병용투여한 경우(57.3%)에 FSH를 단독투여한 경우(40.2%)보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 난포의 발육을 촉진하는 호르몬 처치시의 난포수 및 흡입난포수는 FSH 또는 PMSG를 단독투여한 경우보다 bST를 병용투여시에 1.2~1.5배 정도 더 높게 나타나는 경향을 보였으나 유의적 차이는 인정되지 않았다. 또한 후기배로의 발육율은 26.4~32.0%를 보여 처치군에 따른 유의성은 나타나지 않았다.

고 찰

본 실험에서는 공란우의 효율을 극대화 하기 위하여 한 발정주기동안 3회 초음파에 의한 소 미성숙난자의 채취를 실시한 결과 한마리당 평균 18.2개의 난포에서 평균 8.4개의 난자를 회수하였으며, 3.4개의 분할란 및 1개의 후기배를 얻었다. 이 결과는 비외과적 난회수법의 1회 회수시 이식가능한 수정란수 평균 5개에 비하여 낮은 수준이었으나 호르몬제제의 투여가 필요없고 공란우를 연속하여 사용할 수 있는 이점이 있다. 초음파 진단기를 활용하여 미성숙난자를 채취하는 방법은 현재 개발중인 기술로 장래에는 현재 가장 보편적인 과배란후 비외과적 수정란 회수법을 충분히 대체할 수 있을 것으로 사료된다. 본 실험에서 발정주기 단계별 채취시기의 결정은 발정주기중 연속적 초음파 검사에 의한 난소의 검사와 관련 연구보문의 호르몬 분비양상 및 난포의 성장과 폐쇄의 주기를 근간으로 결정하였다²³⁻²⁶. 또한 발정주기중 각 단계별 난 회수율은 발정후 4~5일 51.6%, 9~10일 44.7% 및 14~15일 40.9%로 나타났는데 이것은 Pieterse *et al*¹⁰의 보고에 따른 발정후 3~4일 55%, 9~10일

56%, 15~16일 53%의 수치보다 낮게 나타났는데 이는 실험조건이 다르고 공란우의 영양상태, 나이, 산차, 연구자의 숙련도 그리고 환경온도 등 여러가지 원인에 기인된 것으로 사료된다. 또한 발정주기 단계에 따른 회수율의 차이점도 인정되지 않아 Bols²²의 결과와 유사한 경향을 보였다.

계절기온에 따른 OPU의 성적 변화를 보기 위한 실험 결과는 회수 난자수, 난 분할율에서 모두 6~8월 성적이 1~3월의 성적에 비해 낮았는데 이것은 6~8월의 높은 기온이 난소의 내분비상에 해로운 영향을 미쳐 난소의 기능이 저하된 결과로 사료된다. 이에 대하여 Gordon²⁷은 소의 번식에 영향을 미치는 요인들로 높은 환경온도, 비유기, 영양, 사양관리, 호르몬, 개체상태 및 나이 등이 있는데 이중 높은 환경온도는 번식에 큰 영향을 끼친다고 하였다. 기온이 낮은 겨울의 수태율은 52%였는데 기온이 높은 여름에는 24%로 줄어들었다는 보고도 있었다²⁸. 이러한 하계불임증(summer sterility; summer heat stress)은 낮은 progesterone 수치, 비정상적인 progesterone 분비, 짧은 황체기, 높은 estrogen 수치를 배란전 시기에 나타내고, 외부증상으로는 발정증상의 소실, 유선의 위축, 송아지의 체중감소 및 유량의 감소 등을 보이는데 이와같은 증상들은 체내 혈류가 고온시 생식도관에서 말초혈관으로 재배치됨에 따라 나타난다^{28,29}. 이러한 하계불임증은 또한 FSH의 분비와 혈장 oestradiol 농도를 감소시켜 난포의 발육개시 시점과 기간을 변경시키고, 난소내 난포의 질에 영향을 미치게 된다²⁵. 하계불임증에 의한 난포의 변화는 progesterone의 투여로 어느 정도 개선 가능하다고 보고되었으나³⁰ 실제 임상에서는 이용되고 있지 않다. 이와같이 난소가 기온에 영향을 받으므로 기온이 높은 계절에는 초음파에 의한 난포란의 채취를 피하는 것

이 권장된다.

초음파 진단기를 활용한 미성숙난자의 채취에 있어 공란우의 난포수는 가장 주요한 요소라 할 수 있다. 공란우에 많은 난포가 존재시에는 효율적으로 미성숙난자를 채취할 수 있기 때문이다. 일시에 많은 난자를 얻기 위해 FSH 또는 PMSG로 난포의 발육을 촉진하였을 경우 FSH, PMSG 단독처리 및 bST의 병용처치시 두 군간의 통계학적 유의성은 인정되지 않았으나 채취가능한 bST 병용처리군에서 난포수가 증가하는 경향을 보였다. 이는 bST의 효과에 기인하는 바, Bols *et al.*²²은 bST를 단독으로 투여하였을 때에도 유의적인 효과가 있는 것으로 보고하였다. 난소가 직접 bST에 반응하거나 bST에 의해 고지방 혈증이 유발되며, 이내 체내 및 난포액내에 insulin-like growth factor-1을 증가시켜 난소의 활성 증가를 초래한다고 알려져 있다^{31,32}. 그러므로 초음파 유도에 의한 이러한 난소반응과 기전에 따라 난포발육 촉진을 위한 FSH나 PMSG의 투여시에도 bST의 상승효과가 있다고 사료된다.

본 실험의 결과, 초음파 유도에 의한 소 난포란의 채취는 한 주기에 3회 실시 가능하였으며, 외기온도가 높은 여름철에는 난포수의 유의적인 감소를 볼 수 있었다. 또한 호르몬제제를 이용하여 난포의 발육수를 증가시킬 때에는 bST를 병용 처치하면 채취효율을 증가시킬 수 있음이 판명되었다.

결 론

초음파유도에 의한 미성숙난자의 채취를 위해 발정주기 및 계절적 영향과 bST 병용처리 효과에 관한 연구를 수행한 결과는 다음과 같다.

1. 소의 발정주기중 발정후 4~5일, 9~10일의 흡입난포수, 회수 난자수 그리고 분할란의 수가 발정 14~15일 보다 1.4~2.3배 높게 나타났으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취는 발정주기당 3회 가능하였다.

2. 계절적 요인으로는 1월에서 3월까지의 회수 난자수와 분할란의 수가 6월에서 8월까지의 성적보다 높은 경향을 나타내므로 외기온도가 높은 시기는 소 미성숙난자채취에 적합하지 못하였다.

3. 난포의 발육을 촉진시 FSH 또는 PMSG 단독처리보다 bST 병용투여하는 방법이 더 많은 미성숙난자를 채

취할 수 있었다.

본 실험의 결과 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취는 한 주기에 3회 실시 가능하였으며, 외기온도가 높은 여름철에는 미성숙난자의 채취에 적합하지 못하였다. 또한 난포의 발육을 촉진을 증가시키기 위해서는 bST를 병용처치하는 것이 채취효율을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 황우석, 조충호, 이병천 등. 한우정액유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 8:143-149, 1993.
2. Van der Schans A, Van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, *et al.* Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, 35:288(abst.), 1991.
3. 이병천, 이강남, 김남렬 등. 송아지 난소에서 초음파 유도에 의한 한우의 미성숙난자 채취시에 bST-FSH 처리효과에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 11:103-109, 1996.
4. Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39:43-64, 1993.
5. Carolan C, Monaghan P, Gallagher M. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*, 41: 1061-1068, 1994.
6. Callesen H, Greve T, Christensen F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 27:217(abst.), 1987.
7. Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ, *et al.* Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 26:222-226, 1990.
8. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, *et al.* Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization(IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72, 1994.
9. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, *et al.* As-

- piration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762, 1988.
10. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, *et al.* Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, 35:401-413, 1991.
 11. Stubbings RB, Walton JS. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology*, 43: 705-712, 1995.
 12. Vos PLAM, de Loos FAM, Pieterse MC, *et al.* Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG-treated cows. *Theriogenology*, 41:829-840, 1994.
 13. Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, *et al.* Transvaginal ovum pick-up(OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43:677-687, 1995.
 14. Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, *et al.* Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J Anim Sci*, 73:967-974, 1995.
 15. Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, *et al.* Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet Rec*, 134:440-443, 1994.
 16. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, *et al.* Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows. *Theriogenology*, 37:273(abst.), 1992.
 17. Broussard JR, Rocha A, Lim JM, *et al.* 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(abst.), 1996.
 18. Fry RC. Transvaginal oocyte recovery in cows and calves Proceedings of the Twenty-seventy annual conference, Australian society for Reproductive biology, 3, 1995.
 19. Rocha A, Broussard RR, Blair RM, *et al.* Effects of unilateral ovariectomy, gonadotropin stimulation and immunization against a synthetic peptide of the bovine inhibin *ac*-subunit on oocyte recovery using transvaginal, ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology*, 45: 353(abst.), 1996.
 20. Kinghorn BP, Smith C, Dekkers JCM. Potential genetic gains in dairy cattle with gamete harvesting and *in vitro* fertilization. *J Dairy Sci*, 74:611-622, 1991.
 21. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, *et al.* Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24, 1991.
 22. Bols PEJ, Ysebaert MT, Lein A, *et al.* Effects of long term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield during an OPU-IVF program : In Transvaginal ovum pick-up in the cow: Technical and biological modifications(Thesis). *Universiteit Gent*, 155-173, 1997.
 23. Dufour JJ, Roy GL. Distribution of ovarian follicular populations in the dairy cow within 35 days after parturition. *J Reprod Fert*, 73:229-235, 1985.
 24. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, *et al.* Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fert*, 94:177-188, 1992.
 25. Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, *et al.* Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, 47:871-883, 1992.
 26. Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D, *et al.* 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, 1995.
 27. Gordon I. Introduction to controlled reproduction in cattle. In *Controlled reproduction in cattle and Buffaloes*, CAB International, Wallingford:1-99, 1996.
 28. Barker R, Risco C, Donovan GA. Low palpation pregnancy rate resulting from low conception rate in a dairy herd with adequate estrus detection intensity. *Compendium on Continuing Education for the Practis-*

- ing Veterinarian* , 16:801-806, 1994.
29. Berman A. Reproductive responses under high temperature conditions. In *Animal Husbandry in Warm Climates* . EAAP Publication No. 55, Pudoc Wageningen:23-30, 1991.
 30. Wolfenson D, Kaim M, Rosenberg M. Conception rate of cows supplemented with progesterone post-insemination in the summer. *J Anim Sci* , 72(Suppl. 1):280, 1994.
 31. Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod. Fert* , 81:301-307, 1987.
 32. Gong JG, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fert*, 97: 247-254, 1993.
-