

초음파 유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 2. 임신우 유래 난포란으로 부터 산자생산에 관하여

이병천 · 윤기영 · 김정태 · 이강남* · 노상호 · 신태영 · 박종임 · 김남렬** · 주석천** · 백남용,
이은송*** · 임정목**** · 이우근**** · 황우석
서울대학교 수의과대학

Transvaginal Ultrasound-guided Ovum Pick-up(OPU) in Cattle 2. First OPU-IVF Derived Calves Born from Pregnant Cow in Korea

B. C. Lee, K. Y. Yoon, J. T. Kim, K. N. Lee, S. Roh, T. Y. Shin, J. Y. Park, N. R. Kim,
S. C. Joo, N. Y. Baek, E. S. Lee, J. M. Lim, W. K. Lee and W. S. Hwang
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

SUMMARY

A combined technology of transvaginal ovum pick-up(OPU) system with *in vitro*-oocyte manipulation technique can be used for improving reproductive efficiency in the cattle. The objective of this study was to establish a newly-conceived breeding program using OPU in the pregnant cows. The OPU trial was performed in pregnant cows every 10 days from 40 through 90 days of artificial insemination (AI), and number of follicles in ovary, number of retrieved oocytes and embryo development following *in vitro*-fertilization, were evaluated. Reduced number of follicles in the ovaries of pregnant cows was firstly detected from 70 days after AI and a significant ($P < 0.05$) decrease in the follicle number (5.4 follicles /donor) was found at 90 days than at 40, 50, 60 and 80 days after AI (8.0~9.2). A similar pattern was also observed in the number of oocytes retrieved by OPU apparatus during experimental period. When retrieved oocytes were matured and inseminated *in vitro* with frozen bull semen, development of the oocytes to the blastocyst stage was not significantly affected by the retrieval time. Four embryos (morula or blastocyst stage) derived from oocytes retrieved from pregnant cows were nonsurgically transferred to four recipient cows on day 7 of estrus cycle. For the first time in Korea, three of four transferred embryos developed to live calves with normal physiological parameters. In conclusion, an effective breeding program employing pregnant cow can be developed by use of OPU trial and *in vitro* culture techniques of oocytes; OPU system could be repeated in pregnant cows with no risk of abortion and viable offsprings were borne after transfer to the recipients.

본 논문은 1997년도 교육부 학술연구조성비(유전공학 GE 97-55)에 의하여 연구되었음.

*아산동물병원(Asan Animal Hospital)

**경기도종축장(Kyonggi-Do Livestock Breeding Station)

***강원대학교 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University)

****중문외과대학(College of Medicine, Pochon CHA University)

*****서울우유협동조합(Seoul Dairy Cow Cooperation)

(Key words : ovum pick-up(OPU), transvaginal ultrasound-guided, manipulation, fertilization)

서 론

현재까지 소 수정란이식 체계에 필요한 수정란을 대량 생산하기 위한 방법으로는 주로 과배란처리법이 이용되어 왔다. 과배란 처치법에 의한 소 수정란의 생산은 성선자극호르몬인 난포자극호르몬(FSH) 또는 임마혈청성 성선자극호르몬(PMSG)을 사용하여 일시에 다수의 난포발육 및 배란을 유도한 후 인공수정에 의하여 발생된 수정란을 수술적 또는 비수술적 방법에 의하여 회수하는 방법이다(Nicholas와 Smith, 1983). 이러한 과배란 처리법은 20 여년간 지속적으로 연구 발전되어 왔으나 기존의 결과를 획기적으로 개선시키지 못하고 한정된 수의 수정란만을 생산할 수 있다는 한계성을 가지고 있다. 즉 과배란 법은 고가의 호르몬제 사용 및 사용 후에 일정한 휴약기를 두어야 하는 등 경제성 및 간편성에서 개선되어야 할 문제점이 남아 있다(John, 1992).

이러한 OPU 가 실용화 된다면 동물 생식주기의 인위적 이용, 공란우에서 발생할 수 있는 경제성 감소의 방지 및 우량형질을 가진 개체에서 임신 여부에 관계없이 연속적으로 난자의 채취가 가능한 이점이 있으며, 이를 통하여 새로운 개념의 번식체계를 확립할 수 있을 것이다. 이에 대해 송아지(Fry, 1995; 이 등, 1996), 성우(Pieterse 등, 1992; Scott 등, 1994), 임신우(Meintjes 등, 1995; Guyader 등, 1997), 저수태우(Looney 등, 1994) 및 말(Brock과 Greve, 1994)에서 연구된 바 있다. 소에서 OPU기법이 개발되어(Pieterse 등, 1988) 실용화를 위한 연구들이 수행되고 있다(Scott 등, 1994; Meintjes 등, 1995). 국내에서도 OPU에 의한 수정란의 생산 기법이 소개되었으며(이 등, 1996), 효율을 증진시키기 위한 연구로 채취 시기 및 bST 처치 영향에 관하여(이병천 등, 1997), 과배란처리 후 미성숙난자의 채취(이효종 등, 1997) 및 OPU 기본기술의 개발(최 등, 1997a, 1997b)에 관한 연구가 있었다. 그러나 이러한 이점에도 불구하고, 임신우에서 OPU 의 응용발전을 위한 체계적인 연구는 아

직까지 이루어지지 않고 있다.

본 연구에서는 임신우에서 OPU를 이용한 효과적인 번식 체계를 개발하기 위하여 임신일령에 따른 난소내 미성숙난포의 증감을 조사하였으며, OPU 기술이 임신 유지에 미치는 영향 및 회수난자의 체외발육능을 평가하였다. 또한 OPU 후 체외수정에 의하여 생산된 수정란을 수란우에 이식하여 산자의 가능성을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공란우 준비

1) 선발 기준

임신 공란우로는 인공수정 후 35 일에 직장검사 및 초음파 검사(전 등, 1996)를 통하여 자궁에 태수 및 태아의 존재가 확인되는 것만을 선발하였다. 대조군은 임상검사 및 초음파 검사에서 난소와 생식기도에 이상이 없으며 임신 공란우와 동일한 방법으로 임신이 확인된 개체만을 공여하였다. 실험군은 임신 40일부터 10일 간격으로 90일까지 OPU를 실시하였으며, 임신 95일에 최종 임신진단을 실시하였다. 대조군은 임신 40일부터 임신 90일까지 10일 간격으로 직장검사 및 초음파검사에 의해 임신 유지 및 난소상태를 검사하였다.

2. 초음파유도에 의한 미성숙난자의 흡인

초음파유도에 의한 미성숙난자의 흡인은 Pieterse 등(1991b), Bols(1995), Bols 등(1997) 및 이 등(1997)의 방법을 응용하여 실시하였다. 공란우는 보정틀 또는 stanchion에 고정시켜 움직임을 최소화 한 후 2% lidocaine 5 ml로 경막외마취를 실시하고 진정을 위해 2% xylazine을 0.25 ml /100 kg의 용량으로 미정맥을 통해 주사하였다. 외음부세척 및 소독을 위해 2% chlorhexidine액을 사용하였으며, 물기를 제거하고 꼬리를 묶어 고정하였다. 최종적으로 직장검사용 장갑으로 보호된 채취기기를 질내로 삽입하기 전에 음순교합부를 알콜스폰지로 닦아 소독하였다. 미성숙난자 흡인에는 일회용 주사

침(20G, TERUMO, Japan)을 사용하였으며, 난자 흡입용 배지(PBS, 2% fetal calf serum, 0.2% heparin)로 주사침 및 흡입관내를 충전하였다. 초음파 진단기는 sector scanner(Pie Medical, Netherlands)로 준비된 transducer guide내에 7.5 MHz transducer를 장착시키고, guide는 질내로 삽입하여 난소를 관찰할 수 있게 고안되었다. 직장을 통해 자궁을 transducer면에 끌어당기어 자궁각을 검사함으로써 임신 여부를 확인하였으며, 난소를 견인하여 transducer에 최대한 밀착시킨 후 미성숙난자를 채취하였다. 흡입은 regulated vacuum pump를 작동시켜 -62 mmHg의 압력을 유지하였으며, 미성숙난자의 채취를 위해 20 gauge 일회용 needle을 사용하였다. 초음파 상에서 난포를 확인한 후 needle을 삽입하여 monitor상의 biopsy line이 난포를 횡절단할 수 있도록 위치시켰다. 난소천자는 주사침으로 질벽을 관통하여 복강내로 들어가 난소에서 확인된 난포내에 주사침을 삽입한 후 regulated vacuum pump의 foot switch를 작동시켜 미성숙난자가 포함된 난포액을 흡입, 수정관 필터에 정치시켰다. 본 실험에서는 초음파상에서 확인되는 직경 2~3 mm 이상의 모든 난포에서 미성숙난자를 채취하였다. 난포가 초음파 화상에서 완전히 사라질 때까지 음압을 유지시켜 흡입하며 주사침을 좌우로 돌려주어 주사침 끝 경사각과 반대측에 있는 난자로 흡입되게 하였다. 난포천자 후 잔류된 난포액 회수를 위해 주사침과 연결튜브를 흡입용 배지로 세척하였다. 반대측 난소도 채취 가능한 경우에는 동일한 방법으로 미성숙난자를 직접 채취하였다. 본 실험에서는 공란우가 임신우이기 때문에 임신황체가 존재하는 난소에서는 황체를 관통한 OPU는 실시하지 않았다. 채취시에 연결된 수정관 필터는 술자의 작업복 속에 넣어 온도의 급격한 변화를 최소로 하였으며, 1두 채취 후 필터를 간이 실험실로 옮겨 검란을 실시한 후 미성숙난자만을 PBS가 포함된 튜브에 넣어 39°C 운반용 배양기(incubator LEC 960, LEC Instrument, Australia)로 배양시키며 운반하였다. 이 운반용 배양기는 CO₂는 공급할 수 없었으며, 온도만을 일정하게 유지해 주었다.

회수한 미성숙난자는 실험현미경으로 검경하였으며, Kastrop 등(1990)의 기준에 준하여 분류하고

채취된 모든 난자를 체외성숙에 제공하였다.

3. 체외수정(*In vitro* fertilization; IVF)

1) 미성숙난자의 성숙배양

성숙배지로는 2.5 µg/ml의 FSH(Antrin, Denka Pharm., Japan) 및 1 µg/ml의 estradiol(Signa Co., USA)와 10% fetal calf serum(FCS)가 첨가된 TCM199을 준비하였다. 각 공란우별로 회수된 미성숙난자를 4-well plate의 각 well에 분리하여 넣고 공기 및 습도가 포화상태인 39°C, CO₂ incubator 내에서 24시간 배양하였다.

2) 정자의 처리

정자는 난자의 성숙배양 개시 24시간이 경과한 뒤 수정을 할 수 있도록 성숙배양 개시 후 22시간(수정을 실시하기 2시간 전)에 준비되었다. 운동성이 활발한 정자의 선별을 위해 plastic tube (11×55 mm) 8 개를 준비하여 capacitation 용 Tyrode를 1 ml씩 분주하였다. 동결정액을 용해한 후 현미경하에서 운동성을 확인한 다음 약 0.2 ml를 capacitation용 Tyrode액이 들어 있는 시험관의 저부에 분주하였으며, CO₂ incubator내에 1시간 정치하여 swim-up을 실시하였다. Swim-up 개시 1시간 후에 각 시험관의 상층액 약 0.8 ml를 pasteur pipette으로 흡입하여 원심관에 모은 다음 원심분리하였다(500×g, 10 min). 원심 후 상층액을 제거하고 새로운 Tyrode액으로 1회 더 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 정자부유액의 정자농도를 산정한 후 정자부유액에 동량의 heparin 용액(200 µl/ml)을 첨가하여 CO₂ incubator내에서 15분간 정치시킴으로써 수정능획득을 유도하였다(Parrish 등, 1986).

3) 난자의 준비

IVF용 Tyrode로 35 mm petri dish에 43 µl의 drop을 작성하고 mineral oil을 도포하여 사용 2~3 시간 전에 CO₂ incubator 내에 정치하였다. 정자를 swim-up 시키는 동안 체외성숙된 난자를 세정하면서 팽대된 난구세포를 1/3 정도 벗겼다. 세정이 끝난 난자를 각 수정 drop에 4 µl로 5개씩 첨가한 후 수정시까지 CO₂ incubator 내에 정치하였다.

4) 체외수정

수정능획득이 유도된 정자 부유액을 정자의 최종 농도가 2×10^6 /ml가 되도록 수정 drop내에 첨가한 후 CO₂ incubator 내에서 30시간 체외수정을 실시하였다.

4. 분할란의 체외배양

체외수정란은 8 mg /ml의 BSA가 함유된 체외수정용 TALP를 기본으로 2% essential amino acid 및 1% non-essential amino acid(Gibco BRL, U. S.A.)를 첨가하고 삼투압을 260mOsm로 낮추어 본 실험실에서 이용하고 있는 modified TALP(mTALP)를 이용, 배양을 실시하여 후기배로의 발육을 유도하였다.

수정란의 체외배양에는 35 mm plastic dish에 체외배양용 mTALP로 30 μ l의 미소적을 작성하고 light white oil을 도포하여 사용하였다. 체외수정후 난자를 수정용 TALP에서 3회 세정한 후 각각의 배양 미소적에 수정란을 6~10개씩 첨가하여 수정후 7일간 배양하였으며 수정후 7일째에 수정란을 관찰하여 후기배로의 발육률을 조사하였다.

5. 실험설계

본 실험은 대조군과 실험군으로 구분하였으며, 대조군 각각의 공시우는 실험군과 동일한 임신일령에 초음파 진단기 및 직장검사를 통하여 임신진단 및 난소검사를 하였고, 실험군은 임신일령(40, 50, 60, 70, 80 및 90일)에 따라 OPU를 실시하여 채취 가능 난포수, 채취된 난자수, 채취율, 채취된 난자의 발생률을 조사하였으며, 실험군의 OPU조작이 대조군과 비교하여 임신유지에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 생산된 수정란은 공란우에 이식후 수태율 및 산자수를 조사하였다.

6. 수정란이식 및 임신진단

OPU-IVF 유래의 이식가능한 수정란의 수란우에 이식은 황 등(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. OPU에서 얻어 체외에서 생산된 수정란중 완전한 좌우대칭을 이루며, 동일한 할구형성을 보이고 선명한 외곽선과 할구의 돌출이 없는 발육단계가 정

상인 것을 이식 가능한 수정란으로 판별하여 수란우에 이식하였다. 수란우에 이식한 수정란은 동결하지 않은 신선수정란이었다. 초음파를 통한 임신진단은 전 등(1996)의 방법으로 실시하였다.

7. 결과의 분석

임신 일령이 난소내 난포수, 채취된 미성숙난자수 및 채취난자의 체외발육에 미치는 영향은 SAS program을 이용하여 통계학적인 유의성을 검증하였다. 즉, 본 실험 design 의 model effect를 검증하기 위하여 임신일령이 각각의 parameter에 미치는 main effect 를 one-way analysis of variance 법에 의하여 우선 검증하였다. 각 parameter 에 대한 model effect가 유의적으로 발견되는 경우, least square method 를 이용하여 임신 일령간의 유의차를 검증하였다.

결 과

인공수정 후 35일에 임신을 확진하여 임신 40일부터 10일 간격으로 OPU를 실시한 결과 채취 가능한 난포수는 다음과 같았다 (Table 1). 임신 40일에 총 6두를 대상으로 OPU를 실시하였으나 이중 1두의 공란우에서 임신 50일에 태막의 촉진과 초음파상에서 자궁각내 태수 및 태아의 존재가 인정되지 않아 태아사가 발생한 것으로 판정하였으며 이후의 실험에서 제외하였다. 임신 40일에는 공란우 6두로부터 49개의 채취 가능한 난포가 확인되어 1두당 평균 8.2개의 난포를 초음파 상으로 관찰할 수 있었다. 임신 50일에는 5 두에서 44개 (평균 8.8개)의 채취 가능한 난포가 관찰되었고, 임신 60일에는 공란우 5두에서 46개 (평균 9.2)의 채취 가능한 난포가 관찰되어 가장 높은 수치를 나타내었다. 임신 70일과 80일에는 5두의 공란우에서 각각 34개 (평균 6.8개) 및 40개 (평균 8.0개)의 채취 가능한 난포가 확인되었으며, 임신 90일에는 27개 (평균 2.7개)의 난포가 관찰되어 최저치를 나타내었다. 본 실험의 결과 임신 40일에서 90일 사이에는 OPU가 가능하였으며, 임신기간은 OPU채취 가능한 난포수에 현저한($P < 0.04$) 영향을 미치는 사실을 밝혀내었다. 처리기간의 난포수의 증감은 임신 80일을 제외한

Table 1. Number of antral follicles in ovaries of pregnant cows* at various times after artificial insemination

Days after AI**	No. of pregnant*** cows examined	No. of follicles aspirated (no. /donor)
40	6	49(8.2) ^{ab}
50	5	44(8.8) ^{ab}
60	5	46(9.2) ^a
70	5	34(6.8) ^{bd}
80	5	40(8.0) ^{ab}
90	5	27(5.4) ^{cd}

* The pregnancy diagnosis was confirmed by rectal palpation and ultrasonography at 35 days post artificial insemination.

**Artificial insemination.

***One donor cow aborted between day 40 and 60 of gestation.

Model effect = $P < 0.04$, a-d; $P < 0.05$.

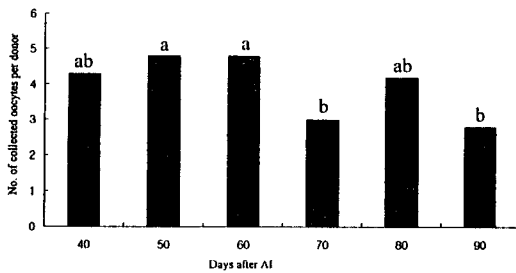


Fig. 1. Number of oocytes collected from the ovaries of the pregnant cows at various times after artificial insemination(AI).

임신 70일 이후의 군에서 이전의 군에 비해 유의적으로 낮은 ($P < 0.05$) 수치를 나타내었다.

임신 단계별 채취된 난자의 수는 Fig. 1과 같다. 임신 40일에 6두의 공란우로부터 26개의 난자를 채취할 수 있었으며 1두당 평균 4.3개였다. 또한 임신 50일에는 공란우 5두로부터 44개의 미성숙난자를 얻었으며 1두당 평균 4.8개였다. 임신 60일에는 5두로부터 24개의 미성숙 난자를 채취하여 1두에서 평균 4.8개를 얻을 수 있었다. 임신 70, 80 및 90일에는 공란우 5두로부터 각각 15, 21, 14개의 미성숙난자를 얻어 공란우 1두당 3.0, 4.2 및 2.8개의 미성숙 난자를 채취할 수 있었다. 임신기간이 회수란의 수에 미치는 유의적인 영향 ($P < 0.09$) 을 발견할 수 있었으며 각 구간에서의 회수란 수의 증감을 비교한 결과

임신 70일 이후에는 80일을 제외하고 이전의 임신 단계에 비해 채취되는 미성숙 난자의 수가 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮았다.

임신 일령에 따라 채취된 미성숙 난자의 체외 발육율을 Table 2 에 나타내었다. 임신 40일에서 임신 90일까지 채취한 미성숙 난자를 체외배양 하였을 때 모든 실험군에서 상실배 및 배반포로의 발육이 관찰되었으며, 발육률의 차이는 인정되지 않았다. 채취된 미성숙난자의 2-세포기로의 발육률은 임신 일령에 따라 27~38% 를 보였으며, 8-세포기 및 상실배/배반포기까지의 발육률은 14~29% 및 13~21% 이었다. 또한 임신우에서 OPU에 의해 생산할 수 있는 이식 가능한 수정란의 수는 임신 40~90일 사이에서 1두당 0.4~1.0개였다.

각각의 공란우에서 임신 40일째부터 90일째까지 10일 간격으로 OPU를 실시하고 5일 후 최종 임신을 확인하여, OPU에 의한 임신유지에 영향을 알아본 결과는 Table 3과 같다.

대조군에서 임신 40~90일 사이에 10일 간격으로 직장검사와 질을 통한 초음파 검사로 임신진단, 난소의 축진 및 난소를 검사한 결과 10두중 1두에서 태아의 손실이 관찰되어 90%의 소에서 임신이 유지되었으며 OPU를 실시한 군에서도 6두중 1두에서 태아 손실을 보여 83%에서 임신이 유지되어 두군간에 유의적인 차이는 발견할 수 없었다.

임신우에서 OPU에 의해 생산된 미성숙난자를 체외수정하여 생산한 수정란을 수란우에 이식한 결

Table 2. Development of oocytes retrieved from pregnant cows at various times after artificial insemination following *in vitro*-maturation and *in vitro*-fertilization

Days after AI	No. of collected oocytes(No. of donor cow)	No. (%) of oocytes developed to			Transferable embryos (embros /donor)
		2-cell	8-cell	Morula / blastocysts	
40	26(6)	8(31)	6(23)	5(19)	5(0.8)
50	24(5)	6(25)	6(25)	3(13)	3(0.6)
60	24(5)	9(38)	7(29)	5(21)	5(1.0)
70	15(5)	4(27)	2(13)	2(13)	2(0.4)
80	21(5)	6(29)	5(24)	4(19)	3(0.6)
90	14(5)	4(29)	2(14)	2(14)	2(0.4)

Table 3. Effects of pregnancy diagnosis on the maintenance of pregnancy in cows received embryos derived from pregnant donor cows

Treatment	No. pregnant at 35 days after AI	No. pregnant at 95 days after AI	Rate(%) of pregnant maintenance
Control*	10	9	90.0
OPU	6	5	83.3

* Pregnancy diagnosis was performed in the recipient cows by rectal palpation and ultrasonography every 10 days from 40 to 90 days of gestation.

과는 다음과 같다(Table 4). 공란우 SI-1으로부터 생산된 2개의 수정란을 2두의 수란우에 이식한 결과 2두 모두 임신하였으나 1두는 임신 80일에 유산 되었으며 다른 1두는 정상적으로 분만하였다. 또한 KLI-1 및 KLI-2에서 생산된 수정란을 이식하여 각각 1두씩의 산자를 생산하였다 (Table 4).

논 의

본 실험의 결과 임신우에서도 OPU 및 체외배양

기법을 통한 수정란의 생산이 가능하였으며, 임신우에 OPU를 적용하여 미성숙난자를 채취하고 체외에서 발육한 수정란을 이식하여 국내에서 처음으로 OPU유래 난자로부터 송아지를 생산하였다. 또한 수태 후 90일까지의 임신우에서 자연발정주기를 이용한 난자의 회수가 가능하였으나, 임신일령에 따른 난포수의 증감을 고려하여 OPU 실시 적기를 선택하는 것이 필요하다.

소에서 생리 상태에 따라 일정한 난포의 생성과 폐쇄가 보일 뿐만 아니라(Dufour와 Roy, 1985;

Table 4. Development and production of calves following embryo transfer of morulae and blastocysts derived from pregnant cows

Name of donor cow*	Number of embryos produced	Number of embryos transferred	Number of pregnancies	Number of offsprings
SI-1	2	2	2**	1
KLI-1	1	1	1	1
KLI-2	2	1	1	1

* Follicular oocytes were aspirated from between day 40 to 90 of gestation.

** Fetal loss was observed on day 80 of gestation from a recipient after transfer of an embryo.

Adams 등, 1992; Badinga 등, 1992; Stubbings와 Walton, 1995) 임신 전반기에는 비 배란성 난포가 주기적으로 발육한다는 것이 알려져 있으며 (이 등, 1997; Gergfelt 등, 1991; Ginter 등, 1989), 임신우에서 외인성 성선자극호르몬 투여시의 난소의 난포 발육이 증가한다는 연구도 있다(Ryan 등, 1993). 또한 임신된 도축우의 난소로부터 정상 생식주기의 소보다 많은 수의 질 좋은 미성숙난자를 얻을 수 있었으며, 체외성숙 및 체외수정을 실시한 결과 수정란의 생산에는 차이가 없었다고 하였다 (Moreno 등, 1993; Behboodi 등, 1992). 이러한 실험들의 결과, OPU 기법을 활용한 미성숙난자의 채취는 정상 생식주기의 소 뿐만 아니라 임신 중의 소에서도 가능한 것으로 보고되었는데(Meintjes 등, 1995; Guyader 등, 1997), 이는 본 실험의 결과에서도 재입증되었다. 단, 임신일령에 따른 채취 가능한 난포수는 임신 40~60일 사이가 이후 시기에 비해 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 감소는 임신 90일에서 현저하게 관찰되었다 ($P < 0.05$). 이는 임신기간의 전반 1/3 중에는 난포의 생성과 폐쇄가 이어진다는 Gergfelt 등(1991) 및 Ginter 등 (1989)의 보고와 일치한다. 소에서 임신 90일 이후에는 난소가 복강으로 하강하는 경향이 있고, 확장된 임신자궁이 난소의 조작에 방해가 되므로 본 실험에서 임신 90일 이후에는 OPU를 실시하지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 최소한 임신 90일령까지는 OPU가 가능할 것으로 판단되며, 효율면에서는 임신 60일 이전이 유리할 것으로 판단된다.

본 실험에서는 국내 목장 여건에서 OPU에 의한 미성숙난자의 채취를 용이하게 수행할 수 있는 방법을 강구하기 위해 보정틀이 없는 목장에서는 소를 stanchion에 보정한 채로 OPU를 실시하였다. 본 실험에서 1두에서 OPU를 수행하는데 필요한 시간은 10~15 분이였다. 목장에서 5두 미만을 채취할 경우 미리 직장검사를 통하여 공란우를 선발한 후 일시에 경막외 마취 및 xylazine 진정을 유도하고 꼬리를 묶어 고정 후 연속적으로 OPU를 실시하였다. 본 연구에서는 채취 주사침과 연결된 튜브에 수정란 필터를 부착시켰는데, 수정란 필터에 의해 채취액 중에 포함된 혈액이 효과적으로 제거되었으며 검란에 필요한 시간도 단축되었다. 수정란 필터를

통과시키지 않으면 미성숙난자를 선별해 낼 수 없을 정도로 출혈이 발생하는 경우도 있었으나 필터를 부착시키면 이러한 문제를 해결할 수 있었다. 수정란 필터는 술자의 작업복 속에 넣어 온도의 급격한 변화를 최소로 하였으며 1두 채취 후 필터를 실험실로 운반하여 검란을 실시하였다. 또한 실험실이 없는 조건에서는 미성숙난자만을 선별하여 PBS에 넣고 39℃의 운반용 배양기(ELS, Australia)에 넣어 체외성숙시 까지 보관 운반하였다.

임신 황체가 존재하는 난소에는 채취 가능한 난포의 수가 0~3개에 불과하였다. 특히 임신 황체를 관통하여야만 채취 가능하거나 노책이 심해 무리한 조작이 필요한 경우의 난포는 OPU조작이 임신에 미치는 영향을 최소화 하기 위해 천자하지 않았다. 그러나 임신황체가 존재하는 난소의 반대측 난소에서는 일반적인 OPU 에서와 마찬가지로 초음파상에서 확인되는 모든 난포 (최소 2~3 mm)를 천자하였다. 각 임신 단계별 채취된 미성숙난자의 수는 채취 과정의 개체에 따른 마취의 정도 및 시술의 난이도가 결과에 영향을 미쳤을 것으로 판단되나 채취 가능한 난포의 수와 밀접한 관련성을 보여, 임신일령에 따른 난포수에 따른 채취된 미성숙난자의 비율은 유사하였다. 그러므로 채취 가능한 난포수가 많은 임신일령에서는 더 많은 미성숙난자를 채취할 수 있었다. 이때 공란우 1두당 2.8~4.8개의 미성숙난자를 채취할 수 있었다.

채취된 미성숙난자를 체외성숙 및 체외수정 후 체외배양에 공여하였을 때 상실배 및 배반포로의 발육률은 13~19% 로 임신 단계에 따른 유의적 차이는 인정되지 않았다. 또한 이러한 상실배 및 배반포로의 발육률은 도축장유래 미성숙난자에서 얻은 이 등(1995)의 상실배 49.0% 및 확장배반포 30.7% 등의 결과보다 낮은 성적이었으며, OPU에서 얻은 Pieterse 등(1995)의 초기배반포로의 발육율 28%보다도 낮은 것이었다. 본 실험에서는 미성숙난자를 채취하여 2시간 이내에 실험실까지 운반하여 체외성숙에 공여하였으나 도축장에서 난소를 직접 운반하거나 실험실에서 OPU 후에 직접 체외성숙에 공여하는 Pieterse 등(1995)등의 방법에 비해 외기의 온도(Broussard 등, 1996), 운반중 온도 및 pH 변동으로 미성숙난자에 다양한 영향(Brackett와

Zuelke, 1993)을 미친 것으로 판단되며, 야외에서 OPU 후 운반에 관한 사항은 심도깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 제한된 수의 실험우에서 OPU가 임신유지에 미치는 영향을 조사하였는데 대한 임신유지의 영향을 조사하였는데 대조군의 경우 10두중 1두에서 조기 태아사 및 태아손실이 관찰되어 90.0%의 소에서 임신을 유지하였다. OPU를 실시한 군에서는 6두중 1두에서 태아의 손실이 진단되었으나 더 이상의 직접적 영향은 발견되지 않아 83.3%의 실험우에서 임신이 유지되었다. 이러한 결과는 OPU 실시 후 이어지는 생식에 영향이나 생식기에 유해한 영향을 미치지 않았다는 Pieterse 등(1988)의 보고와 일치하는 결과였다. 또한 본 실험에서는 실험방법에서 제시한 진정 및 경막의 마취를 위한 약제이외에 임신자궁의 조작 후 영향을 최소화 하기 위한 약제는 사용하지 않았다. 그러므로 적절한 기기와 자궁 및 난소의 조작을 통한 OPU는 임신유지에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 또한, 임신우에서 OPU 및 체외수정란의 생산체계를 연관시켜 수정란을 생산할 수 있었으며, 4두의 수란우에 각각 1개씩의 수정란을 이식하여 1997년 2월 27일에 경기도 안성군 성원목장에서 국내 처음으로 송아지가 태어난 것을 비롯하여 3두의 산자를 생산하였다.

본 실험의 결과, 국내 사양환경에 적용할 수 있는 OPU 방법을 제시할 수 있었으며, 임신우에서 임신 90일까지 OPU를 통한 수정란을 생산 및 수란우에 이식하여 산자 생산이 가능함을 입증하였다. 임신우 1두당 약 0.4~1개의 이식 가능 수정란이 10일간격으로 추가로 작출된 결과로부터, 가까운 장래에 경제적 가치가 높은 공란우의 번식효율을 크게 증진시킬 수 있는 OPU-난자체외배양법이용 breeding program 의 확립이 기대되어진다.

적 요

임신우에서 다양한 임신일령에서 OPU를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 임신 90일까지는 OPU를 실시할 수 있었으나, 임신 90 일에는 유적으로 채취 가능한 난포의 수가 감소하는 ($P < 0.$

05) 결과로 부터, 효율적으로 미성숙 난자를 회수하기 위하여 임신 30일에서 60일 사이의 OPU 시행이 권장된다. 임신 40일부터 90일까지 OPU를 실시하였을 때 처치군에서는 83.3%를 그리고 대조군에서는 90.0%의 임신유지를 보여 차이를 발견할 수 없는 결과로부터 OPU 가 임신유지에 유해한 영향을 주지 않는 것으로 판명되었다. 본 실험에서는 임신우에서 OPU 를 실시한 후 체외성숙 및 체외배양을 통해 수정란을 생산하였으며 이식 후 산자를 생산하였다. 이는 고능력우를 임신기간 중에도 공란우로 이용할 수 있다는 새로운 개념의 breeding program 의 개발을 시사한다.

참고문헌

- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH and Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Fertil., 94:177-188.
- Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, de La Sota RL and Thatcher WW. 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. Biol. Reprod., 47: 871-883.
- Bols PEJ, Vandenhede JMM, Van Soom A. and de Kruip A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow : A new disposable needle guidance system. Theriogenology, 43:677-687.
- Bols PEJ, Ysebaert MT, Lein A, Coryn M, Van Soom and de Kruif A. 1997. 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.
- Brackett BG and Zuelke KA. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of

- bovine embryos. *Theriogenology*, 39:43-64.
- Broussard JR, Rocha A, Lim JM, Blar RM, Roussel JD and Hansel W. 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.
- Brück I and Greve T. 1994. Transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicular fluid in the mare. *Theriogenology*, 41:170 abstr.
- Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D and Niemann H. 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.
- Callesen H, Greve T and Christensen F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 27:217 abstr.
- Dufour JJ and Roy GL. 1985. Distribution of ovarian follicular populations in the dairy cow within 35 days after parturition. *J. Reprod. Fertil.*, 73:229-235.
- Fry RC. 1995. Transvaginal Oocyte Recovery in cows and Calves Proceedings of the Twenty-seventy annual conference. Australian Society for Reproductive Biology, 3.
- Guyader Joly C, Ponchon S, Thuard JM, Durand M, Nibart M, Marquant-Le Guienne B and Hombolt P. 1997. Effects of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and *in vitro* embryo production in pregnant heifers. *Theriogenology*, 47:157 (Abst.).
- John FH. 1992. Reproductive technology and genetic improvement. *Dairy Sci*, 75:2857-2879.
- Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ and Kruip ThAM. 1990. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:222-226.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
- Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB and Godke RA. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.*, 73:967-974.
- Nicholas FW and Smith C. 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Animal Production*, 36:341.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM and Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Willemse AH and Taverne MAM. 1991a. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, 35:401-413.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willemse AH and Taverne MAM. 1991b. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willemse AH and

- Taverne MAM. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in EC-G-treated cows. *Theriogenology*, 37:273.
- Rocha A, Broussard RR, Blair RM, Lim JM, Roussel JD and Hansel W. 1996. Effects of unilateral ovariectomy, gonadotropin stimulation and immunization against a synthetic peptide of the bovine inhibin α -subunit on oocyte recovery using transvaginal, ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology*, 45:353.
- Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Paterson C and Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet. Rec.*, 134:440-443.
- Stubbings RB and Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology*, 43:705-712.
- Van der Schans A, Van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, Eyestone WH and de Boer HA. 1991. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, 35:288.
- Vos PLAM, de Loos FAM, Pieterse MC, Bevers MM, Taverne MAM and Dieleman SJ. 1994. 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.
- 이병천, 윤기영, 김현일, 노상호, 이강남, 황우석. 1997. 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 II. 발정주기, 계절 및 bST 처치 영향에 관하여. *대한수의학회지*, 37(4):917-924.
- 이병천, 이강남, 김남렬, 황우석. 1996. 송아지 난소에서 초음파 유도에 의한 한우의 미성숙난자 채취시에 bST-FSH 처리효과에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 11(2):103-109.
- 이은송, 이병천, 황우석. 1995. 체외수정배약액내에 첨가된 필수·비필수아미노산, Taurine 또는 Glycine이 소 난자의 분할 및 체외발육에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 10(2):131-138.
- 이효종, 강태영, 조성근, 박준규, 손우진, 최민철, 최상용, 박충생. 1997. 과배란처리 한우에서 초음파 유도에 의한 난자채란에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 12(2):195-202.
- 전병준, 윤기영, 이은송, 이우근, 이병천, 황우석. 1996. 초음파를 이용한 한우의 조기임신진단에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 11(3):291-300.
- 최민철, 강태영, 조성근, 최상용, 손우진, 이효종. 1997. 초음파유도 난포란 채취를 위한 기본 기술의 개발 I. 초음파상에 나타난 한우 난소, 난포 및 황체의 크기 측정. *한국수정란이식학회지*, 12(2):203-210.
- 최민철, 강태영, 조성근, 최상용, 손우진, 이효종. 1997. 초음파유도 난포란 채취를 위한 기본 기술의 개발 II. 소의 마취방법과 채란기구의 개발
- 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신연익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 8(2):143-149.

(접수일자 : 1998. 1. 12 / 채택일자 : 1998. 3. 11)