

## 토끼에서 성선자극호르몬 처리법에 따른 난소반응, 배란 및 수정란 생산효율에 관한 연구

최창용 · 노규진\* · 최상용  
경상대학교 수의과대학

### Effect of Gonadotropin Treatments on Ovarian Response, Ovulation and Embryo Production in Rabbits

C. Y. Choe, G. J. Rho\* and S. Y. Choe

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

#### SUMMARY

This experiment was carried out to investigate the factors affecting superovulation in rabbits and to determine the effect of pFSH and PMSG on ovarian superovulatory responses and embryo production, and the effect of superovulation treatment with a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone on the ovarian responses and the embryo quality. The results obtained were summarized as follows:

Superovulatory response resulted in significantly ( $P < 0.05$ ) higher ovulation rates and more embryos in spring or autumn, compared with summer or winter. Repeated superovulatory treatments with PMSG led to a significantly ( $P < 0.05$ ) decreased number of total follicles and recovered ova. Superovulation with pFSH resulted in the higher number of ovulated follicles and recovered ova than with PMSG. A single subcutaneous injection of pFSH dissolved in 25% PVP resulted in the more ovulation points(33.2) and recovered embryos(30.2), which were comparable to the multiple injections of pFSH(44.8 vs 37.7). These results indicated that the treatment with a single injection of FSH dissolved in PVP was an efficient and simple alternative method to the conventional multiple FSH injections for superovulation in rabbits.

(Key words : superovulation, ovarian response, rabbit, FSH single injection)

#### 서 론

과배란방법을 이용하여 가축의 번식효율을 증진시키기 위하여 많은 연구가 행해져 왔으며 특히 최근에는 수정란이식의 산업적 의의와 그 활용성이 높아져 감에 따라 더욱 이 분야에 대한 관심이 높아

지고 있다. 현재 우수한 유전형질을 가진 암컷으로부터 보다 많은 양질의 수정란을 얻기 위하여 hormone 투여 방법과 채란방법이 개선되고 있다.

수정란이식에 의한 산자 생산은 Heape(1890)가 가토를 이용하여 포유동물에 있어 최초로 수정란이식에 성공한 이래 Nicolas(1933), Warwick(1934), Willet(1951) 등은 각각 쥐, 양, 소 등에서 성공하였

\*캐나다 구엘프대학교 온타리오 수의과대학(Department of Biomedical Sciences, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Canada)

다. 국내에서도 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 수정란 이식 과정 중 가장 기본적인 것, 중요한 문제는 과배란 유기 방법이라 하겠다.

성선자극 호르몬을 투여하여 과배란을 유기시키는 시험은 Engle(1927)이 뇌하수체전엽을 Mouse의 피하에 투여하여 과배란을 유기한 것이 보고된 이래 Cole(1936)이 Rat에 PMSG를 이용하여 과배란을 유기하는 것이 유효하다고 하였다.

가축과 실험동물에서 과배란 효과는 투여하는 호르몬제제의 종류와 투여량에 따라 차이가 있으며, 투여시의 나이(Zarrow와 Wilson, 1961), 투여계절(Gordon 등, 1987; Shea 등, 1984)에 따라서도 차이가 크게 나타나 있고 또한 배란수가 체중간에도 차이가 있는 것으로 보고되고 있다 (Vengo, 1950). 토끼의 과배란유기를 위하여 PMSG를 사용하여 많은 난자를 얻었으며, FSH를 사용하여서 양호한 결과를 얻은 바 있다(Kennelly와 Foote, 1965; Maurer 등, 1968).

과배란을 유기할 목적으로 동일한 개체에 PMSG를 반복투여하면 발육난포의 수나 배란수가 감소되며, 체란율도 떨어진다(Scanlon, 1972)고 하였는데 그 원인은 같은 호르몬제제의 연속투여에 따른 체내의 항체형성(Lubbadeh 등, 1980), 수정란의 체란과정에서 생길 수 있는 난소의 유착과 손상(Onuma 등, 1969), 반복투여에 따른 난소내에 있는 난포수의 감소(Maurer와 Foote, 1971) 등에 기인한다고 하였다.

일반적으로 FSH가 PMSG보다 배란이 많고, 배란되지 않은 난포의 수가 적으며, 수정란의 회수율이 높으며, 수정란의 quality에 있어서도 높다고 한다(Dattena 등, 1994).

현재 과배란유기를 위하여 FSH를 하루 두번 연속 투여하는 방법을 가장 보편적으로 사용하고 있는데, 이 방법은 PMSG에 비하여 난소반응과 수정란의 질에 있어서 높은 효과를 나타내고 있으나 반감기가 2~2.5시간으로 짧아 3~5일간 연속투여해야 하며, 매일 2회의 투여를 필요로 하는 번거로움이 있고 여러번 주사하게 되므로 동물에게 stress를 가중시킬 우려가 있는데, 이와 같은 stress를 유발할 경우 stress를 가한 군에서 cortisol의 농도가 높게 나타났고, cortisol의 농도가 높을수록 배란율이

감소한다고 한다(Edwards 등, 1987).

FSH 제제에 의한 과배란 유기법에서 문제점으로 대두되고 있는 다회 반복 주사에 의한 과도한 노력과 시간 및 그로 인한 동물의 스트레스 등을 경감시킬 수 있는 한 방안으로 투여횟수를 단순화시키는 방법이 연구되어 왔다(Takedomi 등, 1994; Suzuki, 1993). Dattena 등(1994)은 과배란 유기시 성선자극호르몬의 흡수를 지연시키는 PVP(polyvinylpyrrolidone)를 이용하여 과배란을 유도하여 양질의 수정란을 회수하였다고 하였으며, Lopez-Sebastian 등(1993)은 propylene glycol을 FSH와 같이 녹여서 single injection 으로 과배란시켜 수정란을 회수하여 좋은 결과를 얻었다고 하였다.

본 실험에서는 토끼에서 과배란 유기시 계절별 과배란유기 효과를 비교하였고, 동일한 성선자극호르몬을 이용하여 반복과배란처리를 실시할 경우 난소반응을 조사하였으며, 성선자극호르몬을 PMSG와 FSH로 달리 이용하였을 때의 과배란 반응을 비교조사하였고, 그중 효과가 우수한 pFSH를 선택하여 이를 PVP에 10% 및 25% 농도로 용해한 다음 토끼에 1회 투여로써 과배란을 유기하여 그 효과를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 동물

본 실험에 사용한 토끼는 New Zealand White종으로 암컷은 생후 3~6개월령의 체중이 2.5~3.5kg, 수컷은 생후 8개월령 이상의 체중 3.0kg 이상인 것을 공시하였고, 실험 전에 각 cage에 분리하여 경상대학교 실험동물 사육장에서 사육하였으며 사료와 물은 자유로이 급여하였다. Dark-light cycle 조절은 14시간은 light, 10시간은 dark로 조절하였다.

### 2. Hormone 제제의 준비

#### 1) 과배란 유기를 위한 gonadotropins의 준비

##### (1) Pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG)

PMSG 제제인 Serarumon (Denka Co., Japan)

을 saline에 ml당 100IU의 농도로 희석하였다.

## (2) Porcine follicular stimulating hormone (pFSH)

- ① pFSH 제제인 Folltropin-V® (Vetrepharm Co., Australia)를 saline에 ml당 20mg의 농도로 희석하였다.
- ② Folltropin-V®를 10% PVP에 ml당 5mg의 농도로 희석하였다.
- ③ Folltropin-V®를 25% PVP에 ml당 5mg의 농도로 희석하였다.

## (3) Human chorionic gonadotropin (hCG)

Yuhan HCG(Yuhan Co., Korea)를 saline에 ml당 100IU의 농도로 희석하였다.

### 3. 실험방법

#### 1) 계절에 따른 호르몬반응

Hormone의 계절적 반응을 조사하기 위해 PMSG를 이용하여 봄(4월~5월), 여름(7월~8월), 가을(10월~11월), 겨울(12~1월)로 구분하여 처리하였다.

#### 2) 반복 과배란 처리시의 호르몬 반응

반복 과배란 처리시의 영향을 알아보기 위해 PMSG와 hCG를 사용하여 과배란 유기와 채란한 후 30일이 경과한 토끼를 다시 PMSG를 이용하여 반복 투여하였다.

#### 3) 서로 다른 성선자극호르몬을 이용한 과배란유기 효과

- (1) Group 1(n=18): PMSG 100IU를 1회 근육 주사한 군
- (2) Group 2(n=11): 6.6mg의 Folltropin-V®를 하루에 두번씩 3일동안 근육주사한 군

#### 4) pFSH의 multiple injection과 single injection의 효과

- (1) pFSH 1일 2회 처리군 (n=15) : 6.6mg의 Folltropin-V®를 1일 2회 3일간(total 40mg)

#### 근육주사한 군

- (2) pFSH + 10% PVP 처리군 (n=9) : 40mg의 Folltropin-V를 10% PVP(Sigma, U.S.A.)에 용해하여 1회 피하주사한 군
- (3) pFSH + 25% PVP 처리군 (n=13) : 40mg의 Folltropin-V를 25% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군

### 4. 수정란과 난자의 회수

#### 1) 회수시간

수정란은 교미와 동시에 hCG투여후 20, 34 또는 48시간째에 회수하였으며, 난자는 hCG 투여후 15시간째에 회수하였다.

#### 2) 실험토끼의 마취

각 실험군의 토끼는 수술하기 24시간전에 절식시킨 후 진정제인 chlorpromazine HCl(Sepamine®, Samsung Co. Korea) 10mg/kg을 근육주사하여 진정시키고 10분후에 ketamine HCl(Yuhan Co. Korea) 25mg/kg을 이정맥에 주사하여 전신마취를 시켜서 실험에 공용하였다.

#### 3) 실험토끼의 수술

실험토끼의 하복부 털을 깨끗이 깎고 povidone 및 70% alcohol액으로 소독을 철저히 한 후 하복부 절개는 외과적인 수술방법에 따라 정중선을 15cm 절개하여 장의 일부를 절개부위 밖으로 노출시켜 노출된 장기가 건조되지 않게 생리적 식염수가 함유된 멸균거즈로 노출장기를 덮어 자궁의 확인과 채란을 편리하게 하였다.

#### 4) 수정란과 난자의 채란

암토끼의 생식기관을 절개부위로 유도하여 난관채 중심부에 있는 난관복강구내로 외경 2mm의 tygon tube를 삽입한 후 자궁각 전단부위에 21G needle로 천자하여 준비된 D-PBS(Sigma, U.S.A.) 및 TCM-199액(Sigma, U.S.A.)을 3ml 정도 주입하여 난관을 역관류시켜서 회수하였다.

#### 5) 난소반응의 확인 및 수정란 검사

(1) 난소반응 확인

실험토끼의 수정란을 채란한 후 양쪽 난소에서 육안적으로 보이는 난소의 배란점과 난포의 수 및 혈포의 수를 헤아려서 난소반응을 확인하였다.

(2) 수정란의 검사

회수된 수정란의 수를 확인하기 위하여 채란액을 petri dish에 놓고 입체현미경(Olympus, Japan, ×40)하에서 채란하여 회수된 수정란의 수를 헤아렸다.

난소반응에서 확인된 배란점의 수와 채란되어 회수된 수정란의 수를 백분율로 환산하였다.

5. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 SAS(Statistical Analysis System) package를 사용하여 GLM (General Linear Model) procedure를 실시하여 각 처리군의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 계절에 따른 호르몬 반응

성선자극 호르몬인 PMSG를 사용하여 과배란을 유도시켰을 때 계절에 따른 호르몬의 작용을 조사

하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 배란되지 않은 난포수에 있어서는 4계절에 걸쳐 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 배란수와 총 난포의 수에 있어서는 겨울이 16.0개와 23.5개로서 봄의 33.8개와 45.6개, 가을의 40.5개와 52.2개에 비하여 유의적으로 낮게 나타났고(P<0.05), 여름은 32.6개와 42.1개로서 중간수치를 나타내어 세 계절과 유의성을 띄지 않았다. 회수된 수정란의 수에 있어서는 겨울이 13.5개로서 봄의 30.9개와 가을의 27.8개에 비해서 낮게 나타났고(P<0.05), 기온이 극도로 높거나 낮은 여름과 겨울은 서로간에 유의성을 띄지 않았으며, 여름철이 봄철의 30.9개에 비해서는 18.9개로서 낮게 나타났다(P<0.05).

2. 반복과배란 처리에 따른 호르몬 반응

PMSG를 사용하여 반복과배란처리에 따른 호르몬 반응은 Table 2에서 보는 바와 같다. 배란되지 않은 난포수에 있어서 1차 과배란처리의 경우 9.9개로서 30일 간격의 2차 과배란처리의 8.6개에 비해 약간 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. 배란수는 각각 30.8개와 16.3개로서 2차 과배란 처리부터 낮게 나타났으며(P<0.05), 호르몬 반응을 받은 총 난포수에 있어서도 1차 과배란 처리의 40.7개에 비해 2차 과배란 처리에서는 24.9개로서 2번째

Table 1. Effect of a various seasons on production of rabbit embryos following superovulation with PMSG (Mean ± S.E.M)

| Seasons | No. of animals | No. of follicles      |                        |                        | No. of embryos recovered (%)  |
|---------|----------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|
|         |                | Unovulated            | Ovulated               | Total                  |                               |
| Spring  | 9              | 11.8±2.9 <sup>a</sup> | 33.8±5.3 <sup>a</sup>  | 45.6±6.2 <sup>a</sup>  | 30.9±3.4 <sup>b</sup> (67.8)  |
| Summer  | 7              | 9.6±3.3 <sup>a</sup>  | 32.6±6.0 <sup>ab</sup> | 42.1±7.0 <sup>ab</sup> | 18.9±3.8 <sup>ac</sup> (44.9) |
| Autumn  | 6              | 11.7±3.6 <sup>a</sup> | 40.5±6.5 <sup>a</sup>  | 52.2±7.6 <sup>a</sup>  | 27.8±4.1 <sup>ab</sup> (53.3) |
| Winter  | 6              | 7.5±3.6 <sup>a</sup>  | 16.0±6.5 <sup>b</sup>  | 23.5±7.6 <sup>b</sup>  | 13.5±4.1 <sup>c</sup> (57.4)  |

The values with different superscript were significantly different(P<0.05).

Table 2. Effect of repeated superovulation treatment on production of rabbit oocytes (Mean ± S.E.M)

| Treatment group | No. of animals | No. of follicles     |                       |                       | No. of ova recovered (%)     |
|-----------------|----------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|
|                 |                | Unovulated           | ovulated              | Total                 |                              |
| 1st             | 16             | 9.9±3.2 <sup>a</sup> | 30.8±2.9 <sup>a</sup> | 40.7±4.8 <sup>a</sup> | 25.3±2.2 <sup>a</sup> (62.2) |
| 2nd             | 16             | 8.6±3.2 <sup>a</sup> | 16.3±2.9 <sup>b</sup> | 24.9±4.8 <sup>b</sup> | 7.9±2.2 <sup>b</sup> (31.7)  |

The values with different superscript were significantly different(P<0.05).

과배란 처리부터 호르몬 반응 자체를 잘 받지 않음을 알 수 있다. 회수한 난자수에 있어서 1차 과배란 처리의 경우 25.3개를 회수하였으나 30일이 지난 2차 처리시 7.9개를 회수하여 첫 호르몬 처리시의 반응에 비해 낮게 나타났다( $P < 0.05$ ).

3. Gonadotropin의 종류에 따른 과배란 유기효과 서로 다른 성선자극 호르몬인 PMSG와 pFSH를 사용하여 과배란을 유기시킨 결과 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 배란수에 있어서 pFSH의 처리구가 45.1개로 PMSG 처리구의 26.2개에 비해서 높게 나타났다( $P < 0.05$ ), 배란되지 않은 난포의 수는 pFSH의 14.3개에 비해 PMSG의 경우 5.9개로 낮게 나타났다( $P < 0.05$ ). 회수된 난자의 수에 있어서도 PMSG의 16.9개에 비해서 pFSH를 처리한 경우 30.4개로 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

4. 과배란 유기방법에 따른 호르몬반응 pFSH제제인 Folltropin-V<sup>®</sup>를 사용하여 과배란의 유기방법을 일반적으로 사용하는 연속투여방법인 multiple injection과 투여 횟수를 단 한번으로 줄인 single injection으로 달리하여 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 배란되지 않은 난포수는 연속투여

군이 18.5개로서 Folltropin-V<sup>®</sup>를 10% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군의 11.0개에 비해서 유의적으로 높게 나타났으며( $P < 0.05$ ), Folltropin-V<sup>®</sup>를 25% PVP에 용해하여 1회 피하주사한군은 13.8개로서 위의 두 군과 유의성을 띄지 않았다. 난소의 배란점은 연속투여한 군에서 44.8개, Folltropin-V<sup>®</sup>를 10% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군에서 39.2개, Folltropin-V<sup>®</sup>를 25% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군에서 33.2개를 나타내어 연속투여군이 가장 많은 배란점의 수를 나타내었으나 세 처리구간에 유의성은 나타내지 않았다. 성선자극호르몬의 반응을 받은 총 난포수는 연속투여군이

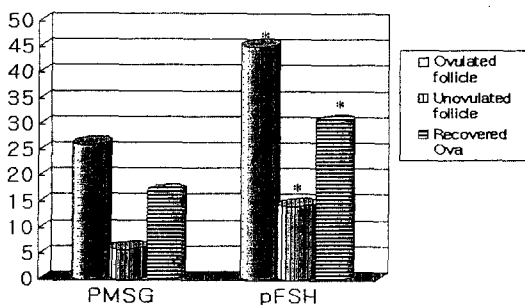


Fig. 1. Ovarian response following superovulation treatment with different gonadotropin in rabbits.

Table 3. Ovarian response following different superovulation treatment with pFSH in rabbits (Mean  $\pm$  S.E.M)

| Treatment groups | No. of animals | Ovarian response             |                             |                              |
|------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|                  |                | No. of unovulated follicles  | No. of ovulated follicles   | No. of total follicles       |
| Multiple         | 15             | 18.5 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>  | 44.8 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup> | 63.3 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>  |
| Single (10% PVP) | 9              | 11.1 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>  | 39.2 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup> | 50.3 $\pm$ 5.3 <sup>ab</sup> |
| Single (25% PVP) | 13             | 13.8 $\pm$ 2.3 <sup>ab</sup> | 33.2 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup> | 47.0 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>  |

The values with different superscript were significantly different ( $P < 0.05$ ).

Table 4. Effect of different hormonal treatments with pFSH on production of rabbit embryos (Mean  $\pm$  S.E.M)

| Treatment groups | No. of animals treated | No. of recovered embryos     |                                     |                                   |
|------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
|                  |                        | Total                        | Fertilized (%)                      | Unfertilized (%)                  |
| Multiple         | 15                     | 37.7 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>  | 34.1 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup> (90.5)  | 3.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup> (9.5)  |
| Single (10% PVP) | 9                      | 22.4 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>  | 21.4 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup> (95.5)  | 1.0 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup> (4.5)  |
| Single (25% PVP) | 13                     | 30.2 $\pm$ 4.1 <sup>ab</sup> | 28.4 $\pm$ 3.7 <sup>ab</sup> (94.0) | 1.8 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup> (6.0) |

The values with different superscript were significantly different ( $P < 0.05$ ).

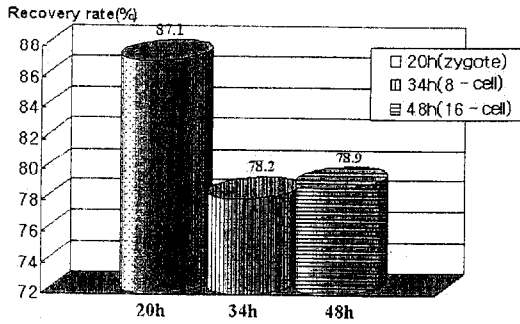


Fig. 2. Percentage of morphologically intact embryos collected following time course after hCG administration.

63.3개로서 Folltropin-V<sup>®</sup>를 25% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군의 47.0개에 비해서 높게 나타났고 ( $P < 0.05$ ), Folltropin-V<sup>®</sup>를 10% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군은 50.3개로 다른 두 처리군

과 유의성을 나타내지 않았다.

### 5. 과배란 유기방법에 따른 수정란의 채란수

과배란 유기방법에 따른 수정란의 채란수는 연속투여군이 37.7개로서 Folltropin-V<sup>®</sup>를 10% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군의 22.4개에 비해서 높게 나타났으며 ( $P < 0.05$ ), Folltropin-V<sup>®</sup>를 25% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군은 30.2개로서 앞의 두 처리군과 유의성을 띄지 않았다. 회수된 정상 수정란의 수는 연속투여군이 34.1개를 나타내어 Folltropin-V<sup>®</sup>를 10% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군의 21.4개에 비해서 높게 나타났으며 ( $P < 0.05$ ), Folltropin-V<sup>®</sup>를 25% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군에서는 28.4개를 나타내어 연속투여군과 Folltropin-V<sup>®</sup>를 25% PVP에 용해하여 1회 피하주사한 군의 사이에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

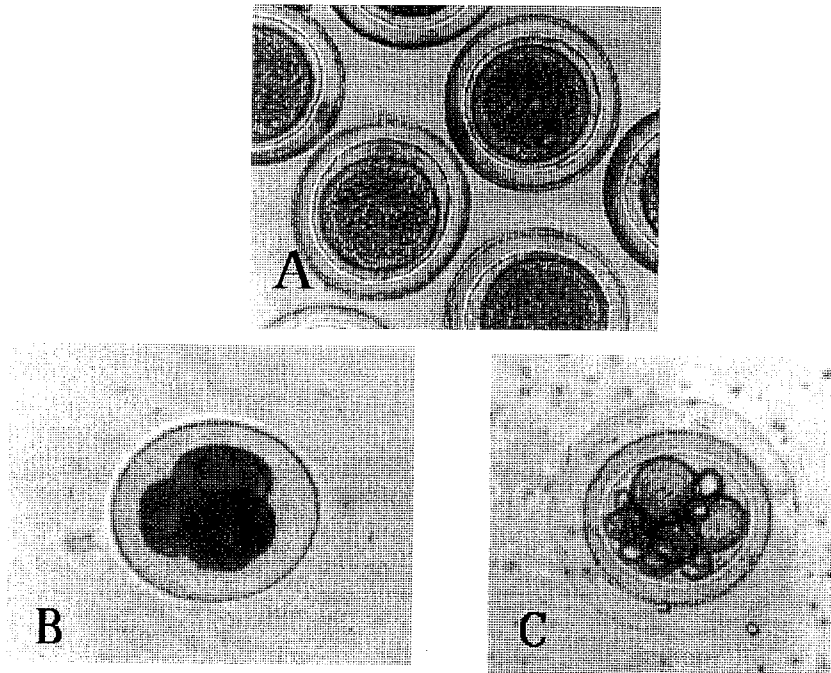


Fig. 3. Morphology of rabbit embryos following superovulation treatment and mating. ( $\times 100$ )

A : normal zygotes.

B : dark cytoplasm

C : fragmented

## 6. 교미후 경과시간에 따른 수정란의 발달

hCG의 투여와 동시에 교미를 시킨 후 각각 20, 34, 48시간째에 수정란을 회수한 결과 Fig. 3과 같은 성적을 얻었다. 교미후 20시간이 경과하여 수정란을 채란하였을 경우 zygote는 87.1%의 회수율을 보였고, 34시간째에는 8-cell 수정란이 78.1% 였으며, 48시간째에는 16-cell 수정란을 78.9% 회수하였다.

## 7. 회수된 수정란의 morphology 평가

교미와 동시에 hCG 투여후 20, 34, 48시간 째에 회수된 수정란은 형태학적으로 많은 variation을 가지고 있다. 각기 다른 토끼에서 회수된 수정란은 회수한 시간별로 다양한 세포 단계를 나타내고 있으며, *in vivo*에서 발달하는 동안 퇴화된 것, 세포분열 단계에서 발달을 멈춘 것, 세포분열 동안에 분절이 일어난 것 등의 비정상 수정란이 회수되었다.

# 고 찰

## 1. 계절에 따른 과배란유기 효과

Wolfenson 등(1997)은 steroid 농도의 계절적인 요인과 heat stress는 난포의 발달에 있어서 많은 영향을 미친다고 보고하고 있는데, 여름, 가을, 겨울의 세 계절로 나누어 계절별 반응을 비교해 보았을 때 난포액에서  $17\beta$ -estradiol의 농도는 겨울이 가을과 여름에 비해서 높았다고 한다. Androstenedione의 농도는 여름에 유의적으로 높았으며, 가을에는 낮았고, 겨울에는 중간을 나타낸다고 한다. 겨울동안에 *in vivo*에서 heat stress를 가했을 경우 androstenedione의 농도는 높아지고,  $17\beta$ -estradiol의 농도는 낮아진다고 한다. Granulosa cell에서 생산되는 estradiol은 겨울과 가을에 높고, 여름에 유의적으로 낮았다고 한다.

소에서 여름철의 낮은 수정율은 여러가지 요인이 있는데, 그중에서 고체온증에 기인한 체내의 각 기관에서의 기능적인 변화에 의한 것도 큰 영향을 미친다. 배란전 난포는 번식체계에서 중요한 요소인데 온도 stress동안에 이것의 기능이 손상받을 수도 있으며 gonadotropin의 분비나 황체와 수정란의 발

달에도 영향을 미쳐서 결국은 낮은 번식율을 초래하게 된다.

Ingraham 등(1976)은 난포기 동안에 기온의 변화는 젖소에서 수태율에 부정적인 영향을 미친다고 하였으며, Wolfenson 등(1995)은 난포의 발달은 온도 stress에 민감하다고 하였다.

Ledwitz-Rigby와 Rigby(1987)는 돼지에서 과립막세포에서 progesterone의 분비가 여름철에는 감소한다고 하였다.

Lucy 등(1992)과 Wolfenson 등(1993)은 기온 stress는 직접적으로 조직에 고체온증을 일으키고, 간접적으로는 사료섭취량을 줄여서 결국은 난포에서의 steroid 생산에 영향을 미치고 난포의 발달에 영향을 미친다고 하였다. Badinga 등(1993)과 Wolfenson 등(1995)은 계절적인 요소, 갑작스런 기온 stress는 난포의 발달에 변화를 일으킨다고 하였다. 소의 난포액에서 estradiol의 낮은 농도는 androstenedione의 낮은 생산때문에 일어나며, 일반적으로 난포액에서 progesterone의 증가와 estradiol: progesterone 비가 1이거나 1보다 낮을시는 atresia의 평가기준으로 고려(Ireland와 Roche, 1983; Spicer 등, 1987)된다. 결론적으로 계절적인 온도 stress는 Theca interna cell에서의 androstenedione 생산을 줄이므로 호르몬의 생리적 활성을 낮춘다고 할 수 있다. 동물의 번식과 수정란의 생산에 있어서 계절적인 요인이 영향을 미치는데 높은 온도는 발정주기를 연장시키거나 단축시키고 발정의 강도가 낮아져서 번식기능에 영향을 미치며, 배란전 LH surge를 감소시킨다(Madan과 Johnson, 1973)고 하였다.

계절에 따른 영향은 사료섭취량과도 관계가 있는데, 고온은 사료섭취량을 적게 하며 이 경우 생산수준을 유지하기 위해서는 낮은 섬유소원과 높은 탄수화물을 요구한다(Fuquay, 1981). 반면에 저온의 경우 사료섭취량이 많아야 건강상태를 유지할 수 있는데(Rzepakowski 등, 1982), Harrison 등(1982)은 배란전 LH surge와 황체조직에서 progesterone의 농도를 유지하기 위해서는 영양소의 섭취가 중요한 역할을 한다고 하였다. Shea 등(1984)은 기온이  $27^{\circ}\text{C}$  이하일 경우는 거의 heat stress를 받지 않으나 겨울철 온도가  $0^{\circ}\text{C}$  이하로 떨어지는 cold str-

ess의 경우 수정란 이식에 나쁜 영향을 미친다고 하였다.

Shea 등(1984)과 Massey 등(1984)은 겨울철이 과배란유기에 저조한 성적을 나타냈으며, Gordon 등(1987)과 Almeida(1987)는 여름철이 저조한 성적을 가졌다고 하였는데, 본 실험에서는 배란수에 있어서는 겨울철이 봄, 여름, 가을에 비해서 유의적으로 낮게 나타났으며, 회수된 수정란의 수에 있어서는 겨울이 여름과는 차이를 나타내지 않았으나 봄과 가을에 비해서는 유의적으로 낮게 나타났다. 그러므로 성선자극호르몬을 투여하여 과배란을 유기시킬경우 겨울철은 적절하지 못하므로 과배란 유기를 위해서는 환경의 온도조절이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

## 2. 반복 과배란 토끼의 호르몬 반응

수정란이식의 산업적 의의는 이 기술에 의하여 생산성이 높은 유전형질을 가진 다수의 수정란을 얻어 그것을 평범한 개체에 이식하는 것인데 이때 유전형질이 뛰어난 암컷의 숫자는 제한되어 있으므로 많은 수정란을 획득하기 위해서는 동일 개체에 대한 반복과배란처리 방법이 요구된다. 최근 채란방법의 개발로 이러한 문제가 더욱 용이해졌지만 아직 동일 개체에서 호르몬 투여가 반복될 때 난소반응이 약화되어 발육난포수나 배란수가 크게 감소되는 현상이 과배란의 반복시도에 있어서 가장 큰 문제점으로 남아있다.

과배란의 유기에 많이 이용되는 성선자극 hormone은 PMSG와 FSH이다. 이 두 hormone은 모두 glycoprotein(당단백질)인데 peptide hormone은 sugar와 sialic acid가 접합된 두 개의 polypeptide chain( $\alpha$  and  $\beta$  subunits)으로 구성되었다. 이러한 당단백질은 간에서 분해되고 신장에서 여과된다. PMSG는 sialic acid를 많이 함유하고 있어서 반감기가 매우 길므로 근육주사후 10일까지 혈장에서 검출된다(Demoustier 등, 1988)고 하였는데 이러한 긴 반감기는 5~6일 이상 혈장에서 높은 농도를 유지하기 때문에 과배란에 따른 발정 이후에도 estrogen의 높은 농도를 유지하므로 난소자극작용을 계속 발현시키는 부작용을 일으키게 되는데 Pedersen(1969)은 배란효과가 난소내에 존재하는 큰

포상난포수에 따라 좌우된다고 하였다.

Dielman 등(1987)은 소에서 과배란 유기시 PMSG는 반감기가 길므로 배란이후에도 second follicular wave가 발달되므로 이 second wave는 estradiol의 함량이 높아서 이식 이전의 초기 수정란의 발달에 영향을 미친다고 하였다.

토끼에서 반복 과배란은 배란율의 저하가 보고(Foote와 Onuma, 1970) 되었는데, 특히 2회 연속 투여에서도 배란율의 감소가 나타났다(Lubbadeh 등, 1980). 이와 유사한 결과들이 다른 동물에서도 많이 보고되었는데, 소(Willet 등, 1953), 면양(Palsson, 1962), 생쥐(Lin과 Balley, 1965) 등에서 각각 배란수의 감소현상이 보고되었다. 반복과배란시의 이와같은 배란수의 감소 원인에 대해 여러 가지로 설명되고 있는데 같은 호르몬체계의 연속투여에 따른 체내의 항체형성(Lubbadeh 등, 1980), 수정란의 채란과정에서 생길 수 있는 난소의 유착과 손상(Onuma 등, 1969), 반복투여에 따른 난소내의 난포수의 감소(Maurer와 Foote, 1971)등에 기인될 것이라고 생각하고 있다. 본 연구에서도 1차 과배란 처리후 30일이 경과한 토끼를 동일한 PMSG체제를 이용하여 반복과배란처리한 결과 배란수, 총난포수, 회수된 난자의 수가 1차 과배란 투여시보다 현저히 떨어지는 것을 알 수 있었다.

## 3. 성선자극호르몬의 종류에 따른 과배란 유기효과

과배란유기를 위해서는 현재 PMSG와 FSH체제를 일반적으로 사용하고 있는데 이러한 성선자극호르몬의 투여는 미성숙 난포를 발달시켜 과배란을 유기하게 된다. 그러나 PMSG는 반감기가 길므로 배란 이후에도 잔존 난포의 성장을 유기하여 초기 수정란의 발달을 저해시키고 낭종의 원인이 되며(Boland와 Roche, 1993), PMSG에 대한 항호르몬을 형성(Dielman 등, 1987; Boland와 Roche, 1993)하므로 PMSG를 사용하여 과배란을 유기할 경우에는 배란전 LH peak 이후 PMSG에 대한 antibody를 투여하여 PMSG를 중화(Boland와 Roche, 1993) 시키므로서 부작용을 줄여주고 있다. 최근에는 PMSG보다는 FSH체제를 많이 사용하여 과배란을 유기하고 있는데, 일반적으로 FSH가 P-



MSG보다 배란수가 많으며, 수정란의 회수율이 높고 수정란의 질에 있어서도 우수하다(김 등, 1986; Dattena 등, 1994)고 보고되고 있다. 본 실험에서 성선자극호르몬을 PMSG와 FSH를 이용하여 과배란을 유지시킨 결과 배란수와 회수된 난자의 수에서 FSH를 투여하였을 경우가 PMSG의 투여보다 높게 나타났는데 이것은 Dattena(1994), Boland와 Roche(1993), 김 등(1986)의 결과와 일치하였다.

#### 4. FSH 제제의 Multiple injection과 Single injection

가축과 실험동물에서 과배란 유기는 수정란 이식에서 가장 기본적인 기술로서 현재 FSH를 과배란 유지에서 난포의 성장을 위해서 일반적으로 사용되고 있다. 그러나 FSH는 생물학적 반감기가 2~2.5시간으로 짧으므로 과배란유기시 적어도 하루에 두 번 이상 투여해야 하는 단점을 가지고 있다. 토끼에서 과배란을 유지하기 위해서 가장 일반적으로 사용하는 방법은 FSH를 3일 동안 하루에 두번씩 투여하는 multiple dose법이다. 그러나 multiple dose법은 앞에서 언급한 바와 같이 자주 투여해야 하는 번거로움이 있으므로 동물에게 과중한 stress를 유발할 뿐만 아니라 hormone을 투여하는 당사자에게도 많은 시간과 energy를 소모하게 한다. 이러한 이유로 인해 FSH의 회색용매를 이용하여 FSH의 흡수를 지연시켜 hormone 투여방법을 단순화시키는 방법이 연구자들에 의해서 수행되어져 왔다.

Lopez 등(1993)은 양에서 FSH의 용매로 propylene glycol을 사용하여 연속투여시와 동등한 과배란유기 반응을 보고하였는데, 이전에 Morell 등(1971)은 propylene glycol이 FSH의 주요대사부위인 간에서 효소활성의 변화를 일으켜서 hormone의 반감기를 증가시켜주는 작용을 할지도 모른다고 추측하였다.

Takedomi 등(1994)과 Yamamoto 등(1994)는 소에서 FSH의 용매로 polyvinylpyrrolidone(PVP)을 이용하였는데, 이 물질은 백색 또는 크림색을 띠는 무취 분말의 합성중합체로서 기본적으로는 직쇄의 1-vinyl-2-pyrrolidone기로 구성되며, 평균 분자량이 10,000~700,000을 갖는 일련의 생성물이며 분산제, 현탁제, 혈장증량제로 예전부터 사용되어지

고 있는 물질이다. Takedomi 등(1994)은 pFSH를 25%, 50% PVP에 용해하여 단일투여하였을 경우 호르몬 처리기간동안 FSH의 혈중농도를 효과적으로 유지시켜 연속투여 방법과 동일한 황체수와 이식 가능한 수정란의 수를 획득하였다고 보고하였으며, Yamamoto 등(1994)은 pFSH의 용매로 30% PVP를 이용하여 난포수, 회수한 수정란의 수, 이식 가능한 수정란의 수가 연속투여시와 유의적 차이를 나타내지 않았다고 하였다. 본 실험에서도 25% PVP를 용매로 이용하여 과배란을 유지시킨 결과 배란수와 회수된 수정란의 수 그리고 회수된 수정란의 질에 있어서 FSH제제의 연속투여 방법과 동일한 효과를 나타내므로 좀더 효율적이고 간편하게 사용할 수 있는 개선된 호르몬 처리 방법이라 사료된다.

현대문명의 발달과 더불어 인류에게 야기되고 있는 불임증의 치료를 위해서 현재 체외수정에 의한 시험관 아기 시술이 널리 이용되고 있다. 시험관 아기의 시술을 위해서는 가장 먼저 과배란을 유지하여야 한다. 과배란 유기는 불임환자에서 체외수정 및 자궁내 배아의 이식에 있어서 보다 수정율을 높이기 위하여 널리 사용되고 있다. 불임환자에게 사용하는 성선자극호르몬은 동물에서와 마찬가지로 FSH제제를 많이 사용하고 있다. 이때 사용하는 FSH도 동물에서 추출한 FSH와 마찬가지로 반감기가 짧으므로 과배란 유기를 위해서는 하루에 두 번 이상 내원해야 하므로 시술을 받는 당사자에게는 무척 번거로운 과정이라 할 수 있다. 이러한 번거로움을 해소할 방법으로 PVP를 이용하여 동물에서와 같이 FSH의 단일투여 방법이 활용되면 좋지 않을까 조심스럽게 예측해 본다. 다만 이러한 방법을 도입하기전에 PVP제제 자체가 수정란의 발달과 임신유지에 영향을 미치지 않는지, 사람에게 유해한 작용을 하지 않는지 등의 엄밀하고 정확한 조사가 선행되어야만 하겠다.

## 적 요

본 연구는 성선자극호르몬의 투여에 의한 동물의 과배란 유지방법을 개선하여 더욱 효율적으로 난자와 수정란을 생산하는데 그 목적을 두고, New Ze-

aland White종의 토끼를 사용하여 성선자극호르몬의 투여제질, 반복과배란유기, 호르몬제제별 차이 및 회석용매에 따른 투여후 난소반응과 난자 또는 수정란의 생산효율을 조사하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 성선자극호르몬 투여에 의한 과배란유기시 토끼에서는 봄과 가을이 여름과 겨울보다 유의적으로 많은 난포발육(45.6개 및 52.2개 / 42.1개 및 23.5개)과 높은 수정란회수율(30.9개 및 27.8개 / 18.9개 및 13.5개)을 보였다( $P < 0.05$ ).
2. 성선자극호르몬인 PMSG를 토끼에서 4주 간격으로 2회 연속투여하였던 바, 유의적으로 낮은 난포발육(40.7개 / 24.9개)과 난자회수율(62.2% / 31.7%)을 보였다( $P < 0.05$ ).
3. 성선자극호르몬으로서 pFSH는 PMSG보다 많은 난포발육(45.1개 / 26.2개) 및 난자회수(30.4개 / 16.9개)를 보였다( $P < 0.05$ ).
4. pFSH를 25% PVP에 용해하여 single injection 하였을 경우 배란수와 회수된 수정란의 수가 33.2개와 30.2개를 나타내어 multiple injection 하였을 경우의 44.8개와 37.7개 보다 다소 낮게 나타났으나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러므로 pFSH의 용매로 PVP를 사용하여 single injection 하는방법이 투여횟수를 줄일 수 있어 보다 간편하고 효율적으로 개선된 과배란유기 방법이라 사료된다.

### 참고문헌

- Boland MR, Goulding D and Roche JF. 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35:5-17.
- Boland MP and Roche JF. 1993. Embryo production: Alternative methods. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:266-270.
- Dattena M, Vespignani S, Branca A, Gallus M, Ledda S, Naitana S and Cappai P. 1994. Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 42:235-239.
- Donaldson LE, Ward DN. 1987. LH effects on superovulation and fertilization rates. *Theriogenology*, 27:225.
- Donaldson LE. 1984. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology*, 22:205.
- Donaldson LE. 1986. Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle. *Vet. Rec.*, 118:661-663.
- Kanayama K, Sankai T, Nariar K, Endo T, and Sakuma Y. 1994. Simplification of superovulation induction by using polyvinylpyrrolidone as a solvent for FSH in rabbits. *J. Vet. Med. Sci.*, 56(3): 599-600.
- Lopez-Sebastian A, Gomez-Brunet A, Lishman AW, Johnson SK and Inskeep EK. 1993. Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH. *J. Reprod. Fert.*, 99:437-442.
- Monniaux D, Chupin D and Saumande J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19:55-81.
- Murphy BD, Mapletoft RJ, Manns J and Humphrey WD. 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 21: 117-125.
- Quirke JF, Hanrahan JP. 1975. Effect of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on the responses of the ewe to pregnant mare serum gonadotropin. *J. Reprod. Fert.*, 43:167-170.
- Ryan JP, Bilton RJ, Hunton JR, Maxwell WMC. 1984. Superovulation in ewes with a combination of PMSG and p-FSH. In Lindsay DR, Pearce DT(eds), *Reproduction in sheep*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 338-341.

- Smith Jr LE, Sitton GD, Vincent CK. 1973. Limited injections of follicle stimulating hormone for multiple births in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 37:523-527.
- Suzuki T. 1993. Bovine embryo transfer and Related techniques. *Mol. Reprod. Dev.*, 36: 236-237.
- Takedomi T, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Taya K, Watanabe G and Sasamoto S. 1994. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 42: 1259-1268.
- Willmott N, Saundres J, Bo GA, Palasy A, Pierson RA and Mapletoft RJ. 1990. The effect of FSH-LH ratio in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. *Theriogenology*, 34:347.
- Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M and Suzuki T. 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 41:747-755.
- 

(접수일자 : 1998. 5. 18 / 채택일자 : 1998. 7. 13)