

## 한우에 있어서 초음파기기를 이용한 생체내 난자 채취에 관한 연구 II. 난포란의 반복 채취가 난자 회수 및 발정주기에 미치는 영향

박성재 · 양보석 · 임기순 · 성환후 · 장원경 · 박충생\*  
축산기술연구소

## Studies on the Ultrasound-guided Transvaginal Retrieval of Oocytes in Korean Native, Hanwoo Heifers II. Effects of Repeated Ovum Pick-up on Oocyte Recovery and Estrous Cycle

Park, S. J., B. S. Yang, G. S. Im, H. H. Seong, W. K. Chang and C. S. Park\*  
National Livestock Research Institute, R.D.A.

### ABSTRACT

This study was conducted to determine the effect of repeated ultrasound-guided transvaginal retrieval of oocytes recovery, estrous cycle and ovarian adhesion in Korean native, Hanwoo heifers. Heifers were at unknown stages of the estrous cycle at the start of experiments in which all follicles  $\geq 6$ mm in diameter were ablated.

The results obtained in this study were as follows;

Follicle developing number and oocytes collected number were no effected to repeated OPU to nine session, 4 e.a range oocytes collected to repeated OPU session.

Oocytes were observated follicles were  $8.7 \pm 4.2$  e.a, collected oocytes were  $4.1 \pm 3.4$  e.a to two times collected per week and observated follicles was  $10.2 \pm 6.1$  e.a, collected oocytes were  $4.3 \pm 2.9$  e.a to one times collected per week, but no difference significantly ( $P < 0.05$ ).

Ovaries adhesive percentage to repeated OPU was eight ovaries adhesived(20%) of forty ovaries, three ovaries(7.5%) to 1~3 times oocytes collected, four ovaries(10%) to 4~6 times, one ovaries(2.5%) to 7~9 times oocytes collected session.

To repeated OPU effecton, ovaries adhesive heifers were long estrous cycle(>25 day) to 7 heads(87.5%) of 8 head, non-adhesive ovaries heifers were 5 heads(41.7%) were long estrous cycle to repeated OPU 12 heads.

Although, now unknown about the dynamics of follicles wave and about functional changes to repeated OPU ovaries, more question about ovaries adhesive cause remain.

(Key words: Ultrasound-guided, Hanwoo heifer, OPU, Follicular wave)

## I. 서 론

최근 20여년간 번식기술의 발달로 수정란이식 기술이 소의 개량을 위하여 우리나라를 포함한 많은 나라에서 실용화되어 있다. 그러나 이 기술은 수정란 생산을 위한 과배란 처리 기술에 개체간에 변이가 심하다는 문제점을 가지고 있으며, 이를 해결하기 위하여 많은 연구가 진행되어 왔으나 그 발전은 미미한 실정이다. 이러한 수정란 생산의 문제점을 해결하기 위하여 도축 암소의 난소를 이용 체외 성숙·수정·배양에 의한 수정란의 대량생산 기술이 산업화되기에 이르렀다. 그러나 이 기술은 수정란의 대량생산이 가능하다는 측면에는 획기적인 기술이나 유전 능력을 확인할 수 없는 도축 암소로부터 난자를 회수하므로 생산된 자축의 능력을 파악하기 곤란하여 개량을 위하여 이용할 수 없다는 단점을 가지고 있다.

최근에는 치료·진단기기의 발달로 과배란 처리와 체외수정의 단점을 보완하는 기술로 고능력우로부터 복강경을 이용하여 난자를 채취하고 이를 체외수정 기술로 과배란 처리시와 같은 고능력 수정란을 생산하기에 이르렀으나 (Lambert, 1983), 이 기술도 반복 시술시 조직의 유착 등으로 고능력 공란우의 이용 극대화에는 장애가 있는 단점이었다.

따라서 Pieterse 등(1988)에 의해 사람의 불임 크리에서 난자를 회수하는 방법과 같이 초음파기기를 이용하여 공란우로부터 난포란을 회수하는 기술이 개발된 이래 이 방법은 공란우에 대하여 손상이 적고 높은 반복력을 가지고 있어 유럽의 축산 선진국에서 소의 개량에 널리 이용되고 있다 (Pieterse 등, 1991; Looney 등, 1994; Hasler 등, 1995).

본 연구에서는 한우에 있어서 초음파기기를 이용하여 반복적으로 생체내 난자를 회수시 난자 회수에 미치는 영향과 시술후의 난소 유착과 같은 부작용을 조사하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

축산기술연구소 축산기술부에서 사육하고 있는 번식기관이 정상이고 발정이 주기적으로 반복되는 3~4

세의 미경산 한우 20두를 공시하였는데, 공란우의 체중은  $300 \pm 10\text{kg}$ 으로 체중의 차가 많이 나지 않도록 개체를 이용하였고 총 224회의 난자채란에 이용하였다.

### 2. 초음파 난포란 채취기구

생체내 난자채취에 이용된 초음파기기는 가축용으로 6.5 MHz (convex type) 탐촉자가 부착된 휴대용 SA 600 (Medison 사, 한국)기기 또는 인체용 질내 6.5 MHz (convex type) 탐촉자가 부착된 SA 1500 (Medison Co., Korea) 기기를 이용하였다.

난포액의 흡입은 음압조절이 가능한 micro-suction pump (WISAP®, 독일)를 이용하였으며 채취용 바늘은 55cm 길이의 17 Gauge 또는 18 Gauge의 바늘 끝에 초음파 반향부가 있고 50ml 원심분리관과 연결된 Echo-Tip® (Cook Co., 호주)을 사용하였다.

### 3. 초음파 채란방법

공란우를 보정틀에 보정시킨 후 약간의 진정을 유도하기 위해 0.3ml/300kg 기준으로 2% xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer, 한국)를 근육 주사하고, 부가적으로 5ml의 lidocaine HCl (광명, 한국)을 이용 경막의 마취를 하였다. 또한 자궁경부 주변에 마취를 유도하여 주사바늘 통과시 고통을 줄이기 위해 lidocaine HCl을 2ml을 도포하였다.

마취가 완료된 공란우는 외음부 주위를 깨끗이 세척한 후 탐촉자의 선단을 Sonogel (삼립의료(주), 한국)로 도포한 다음 직장검사용 비닐장갑을 씌운 탐촉자를 질내로 삽입하여 자궁경부의 좌측이나 우측에 위치한 다음 손으로 직장벽을 통해서 난소를 탐촉자의 앞에 위치시켜 난소를 초음파기기의 화면상에 정확히 나타내었다. 난소를 조작하여 난포가 초음파진단기의 바늘유도선에 위치하도록 하여 채취바늘을 자궁경부 옆을 통과하여 화면상의 난포(혹점)로 삽입하였다. 난포내로 주사바늘이 안으로 들어가면 화면에 채취바늘의 선단에 있는 반향부에 의하여 흰점으로 나타나며 이를 기준으로 micro suction-pump를 작동시켜 난포액을 흡입하였다. 난포액이 모두 흡입된 경우는 음압의 발생에 장애를 받는 느낌이 오고 화면상에 난포의 혹점이 없어지므로 이때를 난포액의 흡입완료시점이라고 단정하고 다른 난포를 채란하기 위해 난소를 조

작하였다. 난자회수시 음압은 80mmHg를 이용하였다.

난자의 회수는 1%(v/v)의 소태아 혈청(FBS; Gibco, USA)과 0.2%(v/v) heparin sodium (녹십자, 한국)이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; Gibco, USA)액을 이용하였다.

#### 4. 통계학적 분석

모든 자료는  $\chi^2$ -분석법과 Student t-test 검정법으로 분석하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 반복초음파 채란시의 난포수 및 채란성적

반복적으로 난포란을 채란할 경우 난포의 발달수와 채란수를 조사한 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 한우에 있어서 숙련된 자가 생체로부터 난포란을 채취하는 경우 5회 반복 채란까지는 난포란의 채란수에 큰차이가 없이 일정하였으나 그 이상으로 반복이용 회수가 많을 경우에도 채란 난포수에서 유의적인 차이는 없었다( $P < 0.05$ ).

본 연구에서 얻어진 반복 OPU 기술의 결과는 Hasler 등(1995)이 보고한 6두의 공란우를 24주에서 111주간 16회에서 78회 시술을 한 결과 회수난자수는 평균 1.5~10.9개로 개체간의 변이가 심하였으나 유의적인 차는 보고하지 않았다. 따라서 초음파기기에 의한 생체내 난자채취 기술이 점차 발전한다면 다배란처리법을 이용한 수정란의 생산 기술을 대체할 수 있을 것이라 사료된다.

#### 2. 난포란의 채란빈도에 따른 난포란의 회수

난포란의 채란빈도에 따른 난포란의 회수 결과는 Table 1과 같다.

난포란을 1주에 1회 시술과 2회 시술과는 유의적인 차이가 인정되지 않았으며, 주 1회 채란시는 10.2±

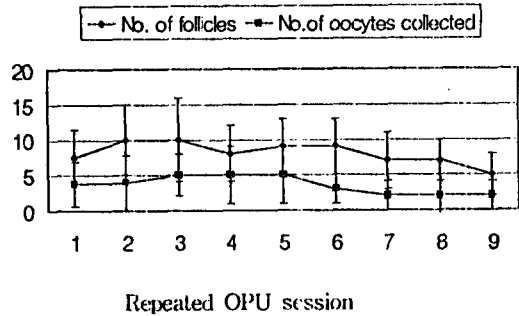


Fig. 1. Effect of repeated OPU until 9 sessions on number of visible follicles and oocytes collected per session.

6.1개의 난포중 4.3±2.9개를 채란하였고, 주 2회 채란한 경우는 8.7±4.2개의 난포중 4.1±3.4개를 채란하였으며, 주당 2회 연속 채란시는 난소로부터 약간의 연결감을 느낄 수 있었다.

주 1회 채란 성적과 주 2회 채란 성적을 비교하였을 때 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, 단시간에 많은 수의 난포란을 얻고자 할 경우 주 2회 채란법을 실시하는 것이 효과적이라 사료되며, 연속적으로 장기간 공란우로 선정되어 실험에 공시될 경우는 주 1회에 채란하는 것이 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다. Gibbons 등(1994)은 주 2회 채란하는 것이 주 1회 채란하는 것보다 난포란의 채란수가 많았다고 하였고, Pieterse 등(1991)은 발정주기 중 3회 채란을 실시하였을 때 1회 평균 5.1±0.3개의 채란이 가능하였으며, 55%의 채란율을 나타내었다고 하였다.

본 연구에서 얻어진 OPU빈도에 따른 난자회수에 차이가 없었던 결과는 Simon 등(1993)이 보고한 65일동안 48시간 또는 96시간 간격으로 시술한 결과 난자 회수율은 차이가 인정되지 않았다는 결과와 Gibbons 등(1994)이 보고한 발정주기 3~4일에 시술을 시작하여 5주 동안 1주에 1회 또는 2회 OPU시술을

Table 1. Effect of OPU frequency on oocytes recovery in Hanwoo

Aspiration frequency	No. of session	No. of follicle /head	No. of oocyte collected /head	Recovery rate(%)
Once /week	23	10.2±6.1	4.3±2.9	42.2
Twice /week	60	8.7±4.2	4.1±3.4	46.7

한 결과 시술당 회수 난자수는 차이가 없었다는 결과와 일치하는 결과였다. 이와 같이 난포란의 채란 간격이 난자회수 성적에 차이를 나타내지 않는 결과는 시술빈도가 짧은 경우 난포의 고갈의 발생보다는 난포들이 대난포나 우위난포로의 발달까지 진행되기 이전에 채란하기 때문에 우위난포로부터 분비하는 inhibin의 작용을 덜 받아 소난포의 발육에 큰 장애를 나타내지 못했기 때문이라고 사료된다.

본 연구에서 얻어진 회수빈도에 따른 난자회수 성적에 차이가 인정되지 않은 결과는 1주에 2회 시술하는 것이 주당 총 회수난자수를 증가시킬 수 있다는 것을 의미한다.

### 3. 반복 초음파유도 채란에 따른 공란우의 효과

초음파 유도 난포란의 반복채란에 따른 난소의 유착 발생에 대하여 조사한 결과는 Table 2와 같다.

난포란 채란 공란우 20두의 난소 40개에 대하여 초음파 진단기를 이용하여 난포란 채란후 난소의 유착상태를 조사한 결과 반복채란 9회까지 8개(20.0%)의 난소에서 유착이 확인되었으며, 반복채란 회수에 따른 난소의 유착 발생은 1~3회 채란에서는 3두, 4~6회에서는 4두, 9회에서 1두가 발생하였다. 유착의 판단은 채란시 직장을 통하여 난소를 촉지하였을 때 정상적인 난소는 손바닥내에서 채란이 자유로우나, 손바닥내에서 채란이 불편하면 유착으로 판단하였다.

본 연구에서 얻어진 난포란의 반복 채란에 따라

**Table 2. Incidence of ovarian adhesion following repeated OPU**

Number of heifers	20		
No. of ovary	40		
No. of adhesive ovary(%)	8(20)		
No. of OPU session	1~3	4~6	7~9
No. of adhesive ovary(%)	3(7.5)	4(10.0)	1(2.5)

20%의 난소에서 유착이 나타난 결과는 초음파 유도에 의하여 반복적으로 난포란을 채란하는 경우에 공란우의 난소로부터 출혈 및 난포액이 유출되어 유착이 발생하는 것으로 사료된다. 그러나 Reinders와 van Wagendonk-de Leeuw(1997)는 동일한 공란우에 대하여 초음파 유도로 3~17회에 걸쳐 반복채란하여도 난소의 유착이 발생하지 않았다고 보고하여 본 연구의 결과와는 일치하지 않았는데, 이러한 차이는 시술자의 숙련도, 공시축의 마취·보정 정도 등 여러 요인들의 차이에서 기인된 것으로 사료된다.

따라서 난포란의 반복 회수에 따른 난소의 유착을 줄이기 위해서는 채란용 바늘이 난소의 실질에 침투하여 채란시 출혈이 발생하지 않도록 하는 것이 중요하며, 초음파기기의 화면상에 바늘인식용 작업선에 정확히 일치하는 경우에만 난포란을 채란하도록 하는 기술의 습득이 필요하며, 또한 채란에 있어 소를 다루는 기술이나 채란시 기계조작의 숙련도와 난소로부터 난포란을 흡입작업시 바늘조작의 숙달의 정도가 부족하거나, 공란우의 마취 정도가 불량할 경우는 많은 요동으로 인해 출혈이 많이 일어날 수가 있어 이로 인하여 유착의 원인이 될 수 있으므로 채란시 제반과정의 숙달이 무엇보다 중요하다고 사료된다.

초음파 유도로 반복채란에 의하여 난소 유착이 발생한 공란우의 발정주기를 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

초음파 진단기를 이용하여 난포란을 채란시 유착이 발생한 공란우 8두중에서 정상적인 발정주기(18~21일)에 발정이 발현되는 개체는 없었는데 이는 아마도 채란으로 인해 난소에 많은 영향이 있었다고 사료되며, 공란우 중 7두(87.5%)가 25일 이상의 발정주기를 나타내어 난소 유착이 발생한 개체는 발정주기가 정상보다 길어지는 경향을 나타내었다. 또한 난소의 유착이 발생한 공란우는 난포의 발달이 미약하였고, 채란시 난소의 조작이 용이하지 않았다.

**Table 3. Effect of ovarian adhesion induced from repeated OPU on subsequent estrus cycles in Hanwoo heifers**

Ovary condition for OPU	No. of head	Length of estrus cycle(day)		
		18~21	>10	25<
Adhesion(%)	8	0( 0.0)	1(12.5)	7(87.5)
Non-adhesion(%)	12	6(50.0)	1( 8.3)	5(41.7)

한편 난소 유착이 발생하지 않은 공란우 12두에서는 정상적인 발정주기를 나타내는 개체는 50%였고 발정주기가 긴 개체도 41.7%였다. 이러한 결과는 반복 채란에 의하여 난소의 실질조직에 영향을 주어 난포의 생성, 발달, 성숙이 지연되는 것으로 사료된다.

Stubbings와 Walton(1995)은 초음파 유도 반복채란 공란우의 발정주기가 25.0일을 나타내었다고 하였으며, Klossok 등(1997)은 62.5%의 공란우에서 불규칙한 발정주기를 나타내었고, 8.3%의 공란우는 발정징후를 나타내지 않았다고 하였다. 그러나 Pieterse 등(1992)은 3회 반복 채란한 공란우의 발정주기는 22.2일로 반복채란이 공란우의 발정주기에 영향을 미치지 않는 것으로 보고하였다. 이러한 연구자간의 차이는 시술자간에 숙련도의 차이에 의하여 반복 채란에 따른 난소의 유착 정도의 차이에 기인된 것으로 사료되며, 본 연구에서 유착이 일어난 소의 경우는 발정주기가 25일 이상으로 길어진 것은 난소의 유착으로 인해 난포의 발육이 양호하지 못하므로 인해 배란될 난포의 부족 및 발달의 미약으로 발정주기에 영향을 주는 것으로 사료되며, 이와 같은 경향은 유착이 일어나지 않은 개체에서도 관찰이 되었다.

#### IV. 요약

본 연구는 한우에 있어서 초음파기기를 이용하여 반복적으로 생체내 난자를 회수시 난자회수에 미치는 영향과 시술후의 난소 유착과 같은 부작용을 조사하기 위하여 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 난포란의 채란빈도에 따른 채란수에서는 주 2회 시술시 난포수는  $8.7 \pm 4.2$ 개로 주 1회 시술의  $10.2 \pm 6.1$ 개보다 다소 적었으나 유의적인 차이는 인정되지 않았으며, 채란수도 각각  $4.1 \pm 3.4$ 개 및  $4.3 \pm 2.9$  개로 유의적인 차이가 인정되지 않았다( $P < 0.05$ ).
2. 반복적으로 9회 난포란을 채란한 경우 40개의 난소중 8개(20%)가 유착이 발생하였으며 1~3회 채란시 3개(37.5%), 4~6회 채란시 4개(50%), 7~9회 채란시 1개(12.5%)가 유착이 발생하였다.
3. 반복적인 난포란 채란후 난소의 유착 여부에 따른 공란우의 발정주기를 조사한 결과 난소 유착

을 보인 공란우의 8두중 7두(87.5%)가 25일 이상의 장발정주기를 보였으며, 유착이 일어나지 않은 12두중 정상 발정주기는 6두(50.0%), 단 발정주기는 1두(8.3%), 장발정주기는 5두(41.7%)였다.

#### V. 인용문헌

1. Gibbons, J. R., W. E. Beal, R. L. Krisher, E. G. Faber, R. E. Pearson, F. C. and Gwadauskas. 1994. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 41:206(abstr.).
2. Hasler, J. F., W. B. Hendderson, P. J. Hurtgen, Z. Q. Jin, A. D. McCauly, 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*, 43:141-152.
3. Klossok, G., K. G. Haderler, E. Lemme, D. Rath, L. Schindler and H. Niemann. 1997. Estrus cyclicity and pregnancy establishment during ultrasound-guided follicular aspiration in dairy cows. *Theriogenology*, 48:160(abstr.).
4. Lambert, R. D., C. Memard, J. E. Rioux, R. Eeland, D. D'Amours and A. Montreuil. 1983. Endoscopy in cattle by the perelumbur rout: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*, 20:149-161.
5. Loony, C. R., B. R. Lindsey, C. L. Gonseth and D. L. Johnson. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
6. Pieterse, M. C., K. A. Kappen, ThAM. Kruip and MAM. Taverne. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultras-

- ound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 33:751-762.
7. Pieterse, M. C., PLAM. Vos, ThAM. Kruip, Y. A. Wurth, ThM. Van Beneden, A. H. Willemse and MAM. Taverne. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24.
  8. Pieterse, M. C., PLAM. Vos, ThAM. Kruip, Y. A. Wurth, ThH. Van Beneden, A. H. Willemse and MAM. Taverne. 1992. Repeated transvaginal ultrasoundguided ovum pick-up in eCG-treated cows. *Theriogenology*, 37: 273(abstr.).
  9. Reinders, J. M. C. and A. M. van Wagten-donk-de Leeuw. 1997. Improvement of a MOET program by addition of *in vitro* production of embryos after ovum pick-up from pregnant donor heifers. *Theriogenology*, 47: 354(abstr.).
  10. Simon, L., L. Bungarts, D. Rath and H. Niemann. 1993. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology*, 39:312(abstr.).
  11. 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: 713-721.
- (접수일자 : 2000. 2. 1. /채택일자 : 2000. 3. 14.)