

개에서 동결수정란의 이식

김용준¹ · 김병진* · 유일정** · 지동범***

전북대학교 수의과대학, *동부동물병원
ACRES연구소, *지동범동물병원

Embryo Transfer with Frozen Embryos in the Dog

Yong-Jun Kim¹, Byeong-Jin Kim* and Il-Jeong You**

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756,
*Dong-Bu Animal Clinic, Chonju, Korea
**Audubon Institute for Endangered Species, New Orleans, USA
***Ji Dong-Beom Animal Clinic, Busan, Korea

Abstract : To investigate the usability of frozen canine embryos for embryo transfer in the dog, 19 donors, 3 recipients, and 6 male dogs were used for the experiment. Natural mating or artificial insemination was performed for breeding the bitches in natural estrus. Vaginal smear test along with progesterone titre test were performed to detect the appropriate mating time and the bitches were bred twice during 3-6days following LH surge. Embryo collection was done on 8, 9-11, 12-13 days after the second mating to collect morula and blastocyst. Embryos were frozen using a programmable freezer and preserved in LN₂ tank. Embryos were thawed in 37°C water for 15 seconds and transferred into each uterine horn within 30 minutes. Embryos were collected from 13 bitches of 19 donors(68.4%) and the collected embryos were from between 9 and 13 days after 2nd mating. Embryos were produced both by natural mating(60.0%, 9/15) and AI with frozen semen(100.0%, 4/4). Embryos were collected from the donors weighed between 2.5 and 30 kg and their age was from 1.5 to 3 years. 52 embryos were collected from 13 donors and the mean number of embryos was four. The stage of embryos was from 2-cell to gastrula and morulae were collected mostly from 10 to 11 days after 2nd mating. Embryos were collected evenly from each uterine horn and the rate of embryo collection for the number of corpus luteum was 83.9%. Embryos were transferred to 3 recipients(morula 8, blastocyst 1, gastrula 8), however, no offspring was produced.

Key words : Embryo transfer, frozen embryos, morula, blastocyst, embryo collection

서 론

개에서 수정란 이식은 우수견의 생산성을 높일 수 있는 점과 수태가 어려운 개체에서 수란견을 통해 번식을 가능하게 할 수 있다는 점으로 인해 많은 관심이 집중되어 있다.

뿐만 아니라 동결 수정란을 이용할 수 있을 때 우수견 또는 순수혈통견의 가치를 영구적으로 보존할 수 있으므로 동결 수정란의 이식은 많은 개 애호가들에게 지대한 관심이 되고 있다.

개에서 수정란이식은 1979년 Kinney 등⁸에 의해 최초로 성공한 이래 Takeishi 등¹⁵과 Tsutsui 등¹⁹의 성공사례 정도만이 보고되어 있을 정도이며 국내에서는 김²²에 의해 최초의 성공사례가 보고되어 있다.

개에서 수정란 이식술이 발달되지 않은 원인으로서 Tsutsui¹⁹ 등은 과배란 유도가 어렵고 수정란회수시 자궁의 관류가 어려운 점을 지적하고 있고, 개는 발정기간이 길어 供

卵犬과 受卵犬의 발정동기화가 쉽지 않다는 점^{10,22}, 생식기의 크기 및 해부학적 구조상 수정란 회수 및 이식시 외과적인 방법에 의존해야 한다는 점^{1,18,19,22} 등이 어려운 요인으로 지적되고 있다. 이밖에도 개에서 수정란 이식이 어려운 점으로서 개에서 발정기의 내분비 변화를 지적한 보고들^{4,5,6,17,20}도 적지않다.

한편 개에서는 아직까지도 동결 수정란의 이식 성공 사례가 보고되고 있지 않아 저자는 과거 신선 수정란의 이식 성공방법을 토대로 하여 개 수정란의 동결, 융해방법, 융해 후 수정란의 배양, 융해후 이식방법을 확립하여 동결 수정란의 이식 후 산자 생산을 시도하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물

이 실험에서 공란견 또는 수란견으로 사용된 牝犬은 모두 잡종견으로서 연령은 1.5-3세의 미경산-5산이었다. 체중은 2.5-30 kg이었다. 供卵犬은 총 19두, 수란견은 총 3두이었다. 牝犬은 공란견에 대한 자연교배 또는 인공수정을 위해 이용되었으며, 과거 번식력을 보인 바 있는 모견으로서 도사 1두, 말티스 1두, 잡종견 4두, 모두 6두이었고 연령은 2-5세이었다.

¹Corresponding author.

E-mail : yjk@moak.chonbuk.ac.kr

이 논문은 한국학술진흥재단의 공모과제(1997) 및 2001년 전북대학교 생체안전성연구소 학술연구비의 일부 지원으로 이루어졌음(CNU-BSRI No. 2001-14)

공란견의 발정시기 판정을 위한 질세포검사

공란견은 자연 발정을 나타내는 개체에 대하여 발정전기부터 매일 또는 격일간으로 질점액 도말 검사를 통해 발정시기를 판정하였다. 이때 슬라이드의 염색은 Roberts¹³의 방법에 의한 Diff Quick염색을 하였다. 발정기의 판정은 Feldman 과 Nelson⁷의 발정기 판정기준에 준하여 질상피세포의 각화 및 핵의 존재 여부를 광학현미경하에서 200배로 검사하여 확인하였고, 상피세포의 핵이 별로 관찰되지 않으면서 각화상을 보이는 상피세포가 시야의 90% 이상에서 관찰될때를 발정기의 시작일로 판정하였다.

발정기 판정 progesterone 검사

특히, 동결정액 사용을 위한 배란시기 판정을 위해 일부 실험견에 대하여 progesterone측정 kit(canine ovulation timing test, Synbiotics, USA)를 사용하여 progesterone치를 특정하였다. 발정전기 중기부터 발정후기 까지 매일 또는 격일간으로 실험동물의 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 검사하였으며 three blue spots으로부터 two blue spots을 보였을때 LH surge후 1일 시기로 판정하였다(Fig 1-3.).

발정견의 외부증상 판정

발정견은 매일 1일 2회 출혈 및 외음부의 종대 및 경도를 조사하였고, 동시에 약 10-20분 동안 모견과 함께 있게 함으로써 모견이 승가행위를 시도하는 등, 모견의 courtship 행동에 따른 빈견의 male attraction여부를 확인하였다. 이때 모견은 사람에 의해 쉽게 제어될 수 있도록 하였다.

공란견의 자연교배 또는 인공수정

자연교배: 공란견의 자연교배는 질점액 검사결과 발정개시일로부터 1일후와 3일후 2회에 걸쳐 실시하였다.

인공수정: 동결정액을 이용한 인공수정은 질점액검사시는 발정개시일로부터 4일과 6일에 실시하였고, progesterone 검사시는 two blue spots로 변한 날 부터 3일과 5일 두번에 걸쳐서 실시하였다. 인공수정시 정자는 살아있는 정자가 1억 이상이 되도록 4-6개의 straw(50×10⁶/straw)를 용해하여 주입하였다.

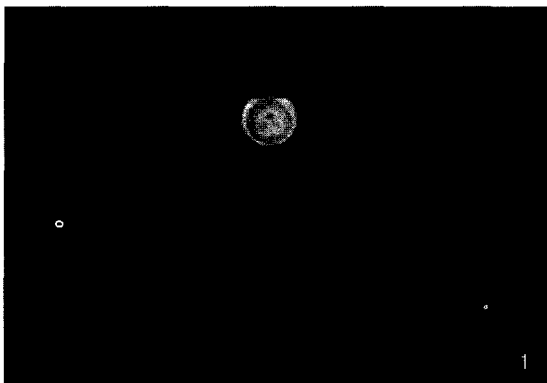


Fig 1. Progesterone titer test. Three blue spots.

수정란 회수 및 이식 배지

이 실험에서 수정란 회수 및 이식에 사용된 배지는 Dulbecco's phosphate-buffered saline(PBS, Gibco) 이었고, 이 배지에 fetal calf serum(FCS, Gibco)은 20%가 되도록, 그리고 bovine serum albumin(BSA, Sigma)은 3.5%가 되도록 첨가하였다. 또한, penicillin과 streptomycin을 배지 100 ml당 각각 10,000 IU, 10 mg이 되도록 혼합하였고, 수정란회수 또는 이식전에 상기배지를 37.5°C, 5% CO₂ incubator 내 보관하였다.

수정란의 회수시기

공란견으로 부터 수정란의 회수는 상실배, 배반포, 부화배반포를 얻기 위하여 2회째 수정시기로부터 각각 8일, 9-11일, 12-13일에 실시하였다.

수정란 회수 방법

수정란의 회수는 공란견의 복벽을 외과적으로 절개한 후 자궁비적출 상태에서 자궁을 관류하였다.

공란견에 대한 복벽절개를 위한 마취로서는 Lumb와 Jones¹¹의 방법에 준하여 atropine sulphate(0.05mg/kg, S.C)로 전마취후 ketamine HCl(10-21 mg/kg, IM)으로 마취를 유지하였다.

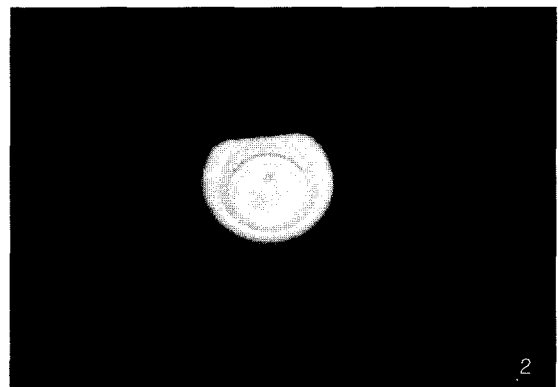


Fig 2. Progesterone titer test. Two blue spots.

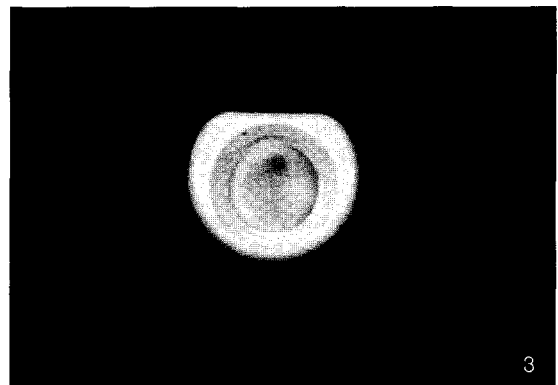


Fig 3. Progesterone titer test. One blue spots.

복벽절개후 자궁을 확보하고나서 자궁각 관류를 위하여 상기 수정란 회수배지를 각 자궁각 마다 약 30 ml를 사용하여 수정란을 회수하였다. 아울러, 황체수를 확인하기 위하여 난소낭을 scissor로 절개하고 나서 황체수를 확인하였다.

수정란의 검사 및 판정

자궁각을 관류한 배지는 35×10 mm petri dish 내 옮겨 실체현미경하에서 경검하여 수정란을 회수하였고, 회수된 수정란은 petri dish내에서 수정란 배지 droplet 약 200 μl를 연속 통과하는 방법으로 5회 washing 하였다. Washing 후 실체현미경하에서 수정란의 발달단계 및 상태를 경검하였고, 정상 발육단계 및 양호한 상태를 보이는 수정란만을 선별하였다. 수정란은 다시 35×10 mm petri dish 내 배지에 옮긴 후 동결처리까지 37.5°C, 5% CO₂ incubator 내 보존하였다.

수정란 동결 배지

수정란의 동결을 위한 동결배지는 상기 수정란 회수 배지에 glycerol을 0.33, 0.67, 1 M이 되도록 3단계로 조성하였다.

동결전 스트로내 수정란 충전

수정란을 상기 3단계 동결배지, 즉 0.33 M에서 1 M의 glycerol 조성 배지까지 차례로 5분씩 정치하였다. 최종 1 M에서는 10분을 경과시킨후 0.25 ml straw를 이용하여 수정란을 중심에 위치하도록 하고 좌우로 공기층과 배지층을 각각 2층이상 형성하게 한후 polyvinyl alcohol로써 끝부분을 밀봉하였다.

수정란 동결 방법

수정란 스트로는 실온에서 20분 정도 놓아둔 후 Program freezer(Eyela, FHK)로 옮겨서 -30°C까지 동결하였다. 수정란 동결을 위한 동결속도는 Table 1과 같다.

수정란 보존

동결을 마친 수정란은 액체질소내 넣어 이식시까지 보존하였다.

수정란 융해

동결된 수정란이 들어있는 스트로를 액체질소에서 꺼낸후 37°C 온수에 15초 정도 넣어 융해하였다.

글리세롤 제거 및 이식 스트로 준비

융해후 수정란은 1, 0.67, 0.33 mol의 glycerol이 첨가된 PBS 배지내를 순차적으로 5분씩 통과시킨후 glycerol이 전혀 첨가되지 않은 PBS배지(FCS 20% 첨가)에 정치시켜 이식을 위한 straw내 충전하였다.

수란건의 준비

수란건은 수정란의 일령과 성주기 동기화를 위해 발정개시 시기를 질점액 도말 검사로 판정하였다. 발정으로 판정된 후 별도로 격리하였고 수정란과의 성주기 동기화를 위한 판정은 질점액 도말 검사상 발정개시일을 기준으로 하여 발정개시후 4일을 수정란 일령의 1일로 산정하였다.

수정란 이식 방법

수란건은 복벽 절개 후 자궁각을 노출시켰고 융해시킨 수정란을 양쪽 자궁각에 균등한 숫자로 이식하였다. 이때 수정란은 가능한 체중이 비슷한 공란건의 수정란을 이식하였다. 이식부위는 상실배의 경우 자궁각 선단부위를 택했고, 배반포 및 부화배반포의 경우 자궁각 선단부에서 중앙부위 쪽을 선택하였다.

이식방법은 유지침(indwelling needle)을 이용하여 자궁강을 확보하였고, pasteur pipette 내 수정란을 넣어 유지침내로 삽입하여 자궁강내 이식하였다. 이식을 끝낸 수란건은 복벽을 봉합한 후 별도 격리하여 관리하였다.

임신의 진단

수란건의 임신 진단은 임신 30일 이후 복부촉진 및 초음파 진단기를 이용하였다.

분만의 확인

분만여부 및 자건의 수를 확인하였다.

결 과

수정란 회수 시기에 따른 수정란 회수동물의 율은 Table 2와 같다. Table 2에서와 같이 발정기중 2회째 교배후 9일후부터 수정란이 회수되었다.

교배방법에 따른 수정란 회수 동물의 비율은 Table 3과 같다.

Table 1. Cooling rate of freezing canine embryos

Segment	Cooling Temperature(°C) (From → To)	Time Required (minutes)	CoolingRate	Remarks
1	20 → 5.5	5	2.9°C/min	
2	5.5 → -5.5	10	1°C/min	
3	-5.5 → -5.5	10	0°C/min	Seeding
4	-5.5 → -30	82	0.3°C/min	
5	-30 → -30	10	0°C/min	Holding

Table 2. Rate of embryos-collected dogs according to the days after the second mating

No. of Donors	Totalno. of embryos-collected animals	Embryo-collected animals according to days after 2nd mating		
		Days		
		8	9-10	11-13
19	13/19(68.4%)	0/3(0%)	10/12(83.3%)	3/4(75.0%)

Table 3. No. of embryo-collected animals according to method of mating

No. of donors	No. of animals according to mating method		No. of embryo-collected animals		C/A	D/B
	Natural breeding(A)	AI*(B)	Natural breeding(C)	AI*(D)		
19	15	4	9	4	9/15(60.0%)	4/4(100.0%)

*AI : Artificial insemination was performed using frozen semen

Table 4. Embryo collection according to body weight and age of donors

No. of donors	No. of embryos-collected animals	Body weight (kg)			Age (year)		
		(No. of embryo-collected animals/No. of animals)			(No. of embryo-collected animals/No. of animals)		
		2.5-7	10-15	20-30	1	1-2	3
19	13	5/7 (71.4%)	5/9 (55.6%)	3/3 (100.0%)	1/3 (33.3%)	10/14 (71.4%)	2/2 (100.0%)

Table 5. Classification of embryos collected according to embryo stage

No. of donors	No. of embryo-collected animals(A)	Total no. of embryos collected(B)	B/A	Embryo stage								
				2cell	3cell	4cell	8cell	Morula	BL	Hatched BL	Gastrula	Degenerated
19	13	52	52/13(4.0)	14	2	3	3	13	1	6	8	2

BL: Blastocyst

Table 3에서와 같이 자연교배 방법에 의한 수정란 회수율은 60.0%, 인공수정에 의한 방법은 100.0%이었다.

동물의 체중 및 연령별 수정란 회수율은 Table 4와 같다.

Table 4에서와 같이 공란견의 체중은 2.5-7 kg, 10-15 kg, 20-30 kg으로 구분하였을 때 수정란이 회수된 동물의 비율은 71.4%, 55.6%, 100.0%를 각각 나타내었다.

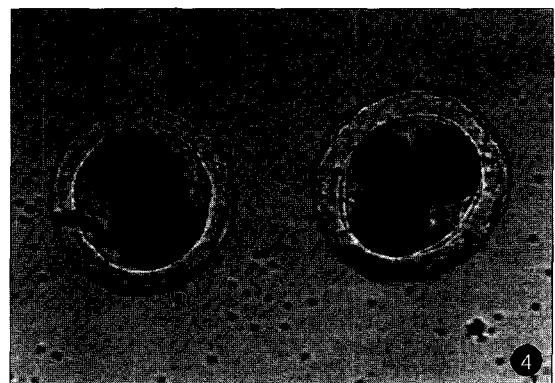
연령에 있어서는 1세, 1-2세, 3세의 경우 수정란이 회수된 동물의 율은 각각 33.3%, 71.4%, 100.0%를 나타내어 3세 까지 연령이 증가할수록 수정란 회수 동물의 비율이 증가되는 경향을 나타내었다.

회수된 수정란의 수정란 발달단계에 따른 수정란 회수 결과는 Table 5와 같다.

회수된 수정란은 2 cell(Fig 4), 3 cell(Fig 4), 4 cell, 8 cell, morula(Fig 5,6), Blastocyst(Fig 7), Hatched blastocyst, Gastrula(Fig 8)이었다.

수정란의 단계를 수정란의 회수시기에 따라 조사한 결과는 Table 6과 같다.

Table 6에서와 같이 2-8cell은 2회째 교배후 9-10일에서 나타났고 Morula는 10-11일, 배반포는 10일, 부화배반포는

**Fig 4.** A canine two-cell embryo(left) and a three-cell embryo (right)

11-12일, 장배는 13일에 회수되었다.

개복후 난소에서 확인한 황체수에 따른 수정란 회수율은 Table 7과 같다.

Table 7에서와 같이 총 수정란 52개는 좌측 및 우측 자궁

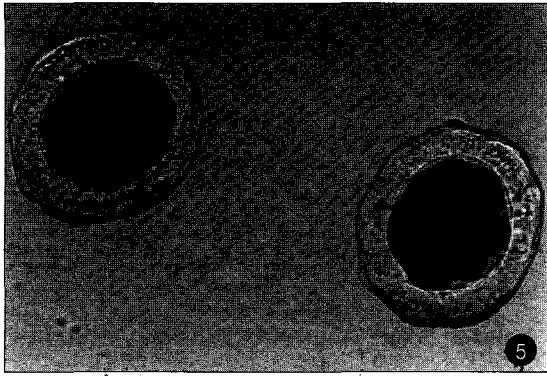


Fig 5. Two canine morula.

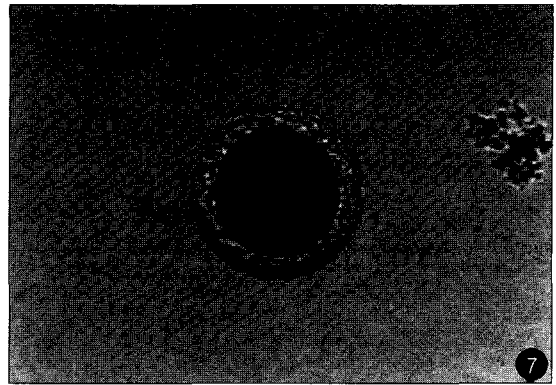


Fig 7. A canine blastocyst.

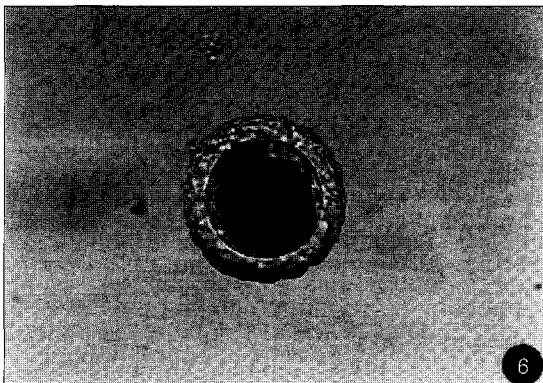


Fig 6. A canine compact morula

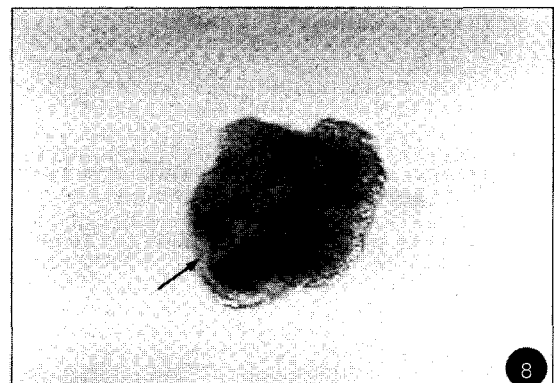


Fig 8. A canine gastrula. Primitive streak(arrow)

Table 6. Stage of embryos collected according to the days after the 2nd mating

Collection day after 2nd mating	Embryo stage							Total No. of embryos collected
	2-3cell	4-8cell	Morula	Blastocyst	HatchedBL	Gastrula	Degenerated	
8								0
9	8	2						10
10	8	4	10	1			2	25
11			3		1			4
12					5			5
13						8		8
Total	16	6	13	1	6	8	2	52

Table 7. Rate of embryo collection according to number of corpus luteum

No. of embryos collected(A)	No. of embryos from different site of uterus		No. of corpus luteum			A/B
	Leftuterine horn	Rightuterine horn	Left	Right	Total(B)	
52	25	27	30	32	62	52/62(83.9%)

각에서 각각 25, 27개가 회수되었고, 이 때 황체수는 좌·우 측 난소 각각 30과 32였다. 따라서 총 황체수에 대한 수정란 회수율은 83.9%를 나타내었다.

동결시킨 개 수정란을 융해후 수란견에 이식시킨 결과는

Table 8과 같다.

동결 수정란의 융해후 이식은 3두 마리의 수란견에 대하여 실시되었고, morula에서 gastrula stage의 수정란을 이식한 결과 생산된 산자는 없었다.

Table 8. Result of canine embryo transfer in recipient bitches

Recipient no.	Embryos transferred			Total	Offspring delivered	
	Morula	Blastocyst	Gastrula		Male	Female
A	4			-	-	-
B			8	-	-	-
C	4	1		-	-	-

고찰

이 실험에서 수정란 회수시기에 따른 수정란의 회수율은 전체 공란우 19두에 대하여 13두에서 수정란이 회수됨으로써 68.4%의 회수율을 나타내었다. 이것은 김²²의 자궁비적출시 회수율 85.7% 보다는 낮고 Tsutsui등¹⁹의 결과보다 낮은 회수율이나 김²²과 Tsutui등¹⁹의 결과는 모두 실험동물이 절대적 숫자에서 적었다. 또한 이 실험에서 실험초기보다 실험 후기에 갈수록 회수율이 높았던 점을 볼 때 충분히 개선 가능한 점으로 판단된다. 한편, 김²²의 결과에서 자궁적출시 수정란 회수율이 66.7%였던 것은 이 실험의 결과와 비교가 된다고 하겠다.

이 실험에서 수정란 회수 시기는 2회째 교배후 9일부터 회수가 가능하였다. 따라서 개에서 수정란 회수는 2회째 교배후 9일 이후를 선택해야 할 것으로 보인다.

이 실험에서 자연교배와 인공수정에 따른 수정란 회수율은 비율상으로는 인공수정의 경우가 높았으나 실험동물의 수가 자연교배의 경우보다 절대적으로 적었다는 점이 고려되어야 할 것 같다. 그러나, 이 실험에서 인공수정시 이용된 정액은 동결정액이었는데, 동결정액의 경우 정자의 수명이 짧은 점을 감안할 때 정자수명이 긴 신선정액을 이용한 인공수정의 경우도 공란우에서 수정란 생산에 이용될 수 있는 방법으로 판단된다.

이 실험에서 체중 및 연령에 따른 수정란 회수율에서 체중은 2.5 kg에서 30 kg까지 범위의 모든 수란견에서 수정란이 회수되었으므로 체중은 수정란 회수를 위해 문제가 되지 않는 점으로 판단된다.

한편 연령에서는 1세의 경우 33.3%로서 가장 회수율이 낮았고 3세까지 나이가 들수록 회수율이 증가하는 것을 볼 수 있었는데, 이 결과에서 볼 때 수정란 회수는 적어도 1.5세 이상의 개를 공란견으로 이용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

이 실험에서 수정란의 발달단계에 따른 수정란 회수 결과에서 2 cell에서 8 cell까지의 세포가 46%에 이르렀다. 아직까지 동결수정란이 어떤 수정란의 단계에서 이식될 때 수태가 가능한지에 대한 다른 연구보고가 없으므로 이를 비교하기는 어려우나 개의 경우는 상실배 이상의 수정란의 회수에 보다 주력해야 할 것으로 보인다. 그것은 신선 수정란이기는 하나 Tsutsui등¹⁹, Kinney등⁸ 그리고 김²²이 주로 상실배 또는 배반포만을 이식하여 산자 생산결과를 나타낸 것에서도 감안 할 수 있는 사항으로 생각된다. 따라서, 이 실험에서

수정란 발달 단계별 회수시기를 보았을 때 상실배는 10일 또는 11일에 집중되어 있는 것으로 보아 상실배를 회수하기 위하여는 2회째 교배후 10-11일에 수정란을 회수하는 것이 바람직 할 것으로 보인다.

한편, 이 실험에서 2회째 교배후 9-10일에서도 2-4세포가 많이 나타났는데, 이식을 목표로하는 수정란을 회수하기 위해 보다 정확한 발정시기를 인위적으로 조정하기 위해서는 1회 교배시에 HCG를 사용하는 방법^{23,16}도 강구될 수 있을 것으로 보인다. 그것은 Kraemer와 Bowen^{9,10}의 보고에서와 같이 개에서는 발정전기 및 발정기가 길고 또한 개체의 발정지속시간의 변이도 크기 때문인 것으로 생각된다.

이 실험에서 황체수에 따른 수정란 회수 숫자에서 수정란 회수 수는 좌·우 자궁각을 비교하였을 때 거의 동수가 회수되었고, 난소의 황체수도 좌·우 거의 동일한 수를 보였다. 그러나, 이것은 수정란이 회수된 공란견 13두의 성적을 종합한 결과이며 개체적으로는 좌우 수정란의 회수 수나, 황체수가 매우 범위가 큰 경우도 인정되었다.

황체수 전체수 62개에 대하여 수정란은 52개가 회수되어 황체수에 대하여 83.9%의 회수율을 나타내었는데 이것은 앞으로 더욱 개선해야 할 점으로 사료된다.

수정란을 용해후 3회에 걸쳐 이식한 결과 생산된 산자수는 1두도 없었다. 이것은 이식시 수란견의 상태도 중요한 인자가 되겠지만 이식시 수란견의 황체를 확인하였고, 이식 방법이 만족할 만한 것이어서 수정란이 동결과정중 사멸된 것으로 추정된다. 따라서, 동결수정란의 이식 성공을 위해서는 철저한 실험동물 관리는 물론이고, 많은 수정란을 회수하여 개 수정란 동결에 가장 적합한 동결조건을 확보하기 위한 보다 많은 실험이 수행되어야 할 것이다. 아울러 동결수정란을 용해후 이식전 *In-vitro*에서 생존여부를 확인하기 위한 많은 실험을 통해서 동결시 개 수정란이 용해후 생존할 수 있는 조건을 확립하는 것이 선행되어야 할 것으로 판단된다.

이 실험에서 공란견에 대한 수정란 회수시간은 약 30-40분, 수란견에 대한 이식시 소요되는 시간은 약 20-30분이 소요됨으로써 수정란 회수 및 이식시 시간이 지나치게 소요되는 문제점은 없다고 판단된다.

이상의 결과 개 수정란 회수시 바람직한 수정란 회수시기는 2회째 수정후 10-11일이 선택된다는 점, 수정란 생산을 위하여는 인공수정도 가능하다는 점, 수정란 회수는 자궁비적출상태에서 더욱 개선해야 한다는 점, 수정란 회수시 공란견의 체중은 크게 문제가 되지 않으나 연령은 1.5세 이상이어야 한다는 점, 등을 확인 할 수 있었다.

결 론

개에서 동결 수정란의 이용은 우수품종을 영구적으로 보존할 수 있는 점, 불임견의 치료에 이용할 수 있는 점이 있으므로 19두의 공란견, 3두의 수란견, 6두의 종모견을 이용하여 수정란이식 실험을 수행하였다. 공란견으로부터 수정란을 회수하기 위해서는 자연교배 또는 인공수정의 방법으로 자연발정이 온 빈견에 대하여 수정을 시켰다. 질점액 검사 및 progesterone 검사를 실시하여 발정기중 LH surge시기를 파악한 후 그로부터 3-6일에 두번의 수정을 시켰다. 수정란 회수는 2회째의 교배일로부터 8, 9-11, 12-13일에 실시하였고, 회수된 수정란은 program freezer를 이용하여 동결한후 액체질소중에 보존하였고, 이식시 37°C 온수에 용해하여 수란견의 복벽을 절개한 후 이식하였다.

1. 공란견 19두에 대하여 13두에서 수정란이 회수되었고 (68.4%) 2회째 교배후 9-10일 이후부터 수정란이 회수되었다.
2. 수정란 생산 방법은 자연교배 및 동결정액을 이용한 인공수정을 실시하여 각각 60.0%(9/15), 100.0%(4/4)의 수정란 회수율을 나타내었다.
3. 공란견은 2.5 kg에서 30 kg까지 모든 체중의 범위에서 수정란이 회수되었으며, 연령은 1.5세 이후부터 수정란 회수가 가능하였다.
4. 수정란은 수란견 13두에서 52개가 회수되어 평균 수정란 회수 수는 4이었고 2 cell에서 Gastrula까지 회수되었다.
5. 상실배의 경우 수정란 회수시기는 10-11일에 주로 생산되었다.
6. 수정란은 좌우 자궁각에서 거의 동일하게 생산되었고, 황체수에 대한 수정란 회수율은 83.9%이었다(52/62).
7. 용해후 수정란 이식은 3회 실시되었고 morula 8, blastocyst 1, gastrula 8개가 3두에 이식되었으나 생산된 산자는 없었다.

참 고 문 헌

1. Archbald LF, Baker BA, Clooney LL, et al: A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet.Med. Small Anim Clin.* 1980; 75: 228-238.
2. Cain JL, Cain GR, Feldman EC, et al. Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1993-1996.
3. Cain JL. Induction of estrus and ovulation in the bitch. In : Kirk RW and Bonagura JD ed. *Current Veterinary therapy XE small animal practice*. W.B. Saunders Company 1992; 1288-1291.
4. Chakraborty PK, Panko WB, Seager SWJ. Hormone Levels during the estrous cycle, pregnancy and pseudopregnancy in the Labrador bitch(abstract). *Proceedings of the American Society of Animal Science*. 1978; 337: 349.
5. Drost M. Embryo transfer in dogs and cats. In: Roberts SJ ed *verterinary obstetrics and genital diseases(theriogenology)*. 1986: 938-939.
6. Evans LE. Induction estrus in the bitch. In: Morrow DA es. *Current therapy in theriogenology*. W.B. Saunders Company 1980: 618-620.
7. Feldman EC and Nelson RW. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. W.B. Saunders Company. 1987: 399-413, 465-466.
8. Kinney GM, Pennycook JW, Schriver MD, et al. Surgical collection and transfer of canine embryos. *Biol Reprod Suppl* 1979; 1: 20.96A.
9. Kraemer. DC and Bowen MJ. Embryo transfer in laboratory animals. in: Morrow DA ed. *Current therapy in theriogenology 2*. W.B. Saunders Company 1986: 73-78.
10. Kraemer DC, Flow BI, Schriver MD, et al. Embryo transfer in the non-human primate, feline and canine. *Theriogenology* 1979; 11: 51.
11. Lumb WV and Jones EW. *Veterinary anesthesia*. 2nd ed. Lea & Febiger 1984: 309.
12. Nakao T, Aoto Y, Fukushima S, et al. Induction of estrus in bitches with exogenous gonadotropins, and pregnancy rate and blood progesterone profiles. *Jpn. J Vet. Sci.* 1985; 47(1): 17-24.
13. Roberts. SJ. *Vetrinary obstetrics and genital disease(thero-genology)*. 1986: 677-678.
14. Shillie VM, Thatcher MJ, Simmons KJ. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *JAVMA* 1984; 184: 1469-1473.
15. Takeishi M, Akai R, Tsunekane T, et al. Studies on the reproduction in the dog. A trial of ova transplantation in dogs. *Jpn J Anim Reprod* 1980; 26: 151-153.
16. Thun R, Watson P and Jackson GL. Induction of estrus and ovulation in the bitch, using exogenous gonadotropins *Am J Vet Res* 1977; 38: 483-486.
17. Tsutsui T, Kawakami E, Orima H, et al. Effects of prostaglandin F2 α -analogue administration on luteal function, implantation of embryos and maintenance of pregnancy in bitches. *Jpn.J.Vet.Sci.* 1989; 51: 496-504.
18. Tsutsui T, Sato M, Kurosawa N, et al. Embryo transfer in the cat during the non-breeding Season. *Jpn.J.Vet.Sci.* 1989; 51: 871-877.
19. Tsutsui T, Shimada K, Nichi M, et al. An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jpn.J.Vet.Sci.* 1989; 51: 797-800.
20. Tsutsui T, Takatani H, Hirose O, et al. Effects of prostaglandin F2 α on implantation and maintenance of pregnancy in the dog. *Jpn.J.Vet. Sci.* 1982; 44: 403-410.
21. Zajc I, Mellersh C, Kelly EP, Sampson J. A new method of paternity testing for dog, based on miocrosatellite sequences. *Vet Rec* 1994 Dec 3; 135(23): 545-547.
22. 김용준. 자연발정견 및 인공발정 유도견에서 수정란이식. *대한수의학회지*. 1994; 34(2): 395-406.