

## 복제 송아지의 임신 기간과 생시체중이 출생 후 생존율에 미치는 영향

양병철<sup>1</sup> · 임기순<sup>1</sup> · 김동훈<sup>1</sup> · 고응규<sup>1</sup> · 황성수<sup>1</sup> · 노환국<sup>2</sup> · 김명직<sup>1</sup> ·  
양보석<sup>1</sup> · 이상진<sup>1</sup> · 성환후<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학과, <sup>2</sup>한국농업대학 중소가축학과

## Effects of Gestation Length and Birth Weight on Survival Rate in Cloned Korean Native Calves

Byoung-Chul Yang<sup>1</sup>, Gi-Sun Im<sup>1</sup>, Dong-Hoon Kim<sup>1</sup>, Yeoung-Gyu Ko<sup>1</sup>, Seong-Soo Hwang<sup>1</sup>,  
Whan-Gook Nho<sup>2</sup>, Myung-Jick Kim<sup>1</sup>, Boh-Suck Yang<sup>1</sup>, Sang-Jin Lee<sup>1</sup> and Hwan-Hoo Seong<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Division of Animal Biotechnology, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon, Gyeonggi-do 441-350, Korea

<sup>2</sup>Department of Livestock, Korea National Agricultural College, Hwaseong-Si, Gyeonggi-do 445-760, Korea

### ABSTRACT

This study was performed to investigate the relation between birth weight and survivability on the production of cloned Hanwoo calves. The 580 cloned embryos were transferred into the 293 recipients. The pregnancy rate of the cloned embryos was 72.3% at 50 days after embryo transfer, and then the rate was dramatically decreased. The mean gestation lengths were 287 days in both clone (range of 279~295 days) and artificial insemination (AI, range of 255~293 days) calves, respectively. The mean birth weight of cloned calves (30.3kg) was significantly higher compared to that of AI calves (23.7kg) ( $p<0.05$ ). Among the cloned calves, the birth weight was not different in both normal delivery ( $n=17$ , 29.9kg) and caesarean section ( $n=14$ , 32.3kg). The weight, however, was significantly higher in the clones ( $n=18$ , 32.8kg) dead within 175 days than that of the clones ( $n=11$ , 28.3kg) alive more than 175 days after birth ( $p<0.05$ ). Interestingly, all the cloned calves weighed <15kg ( $n=5$ ) or >35kg ( $n=9$ ) at birth have been dead within 175 days from the date of birth. The causes of death in the cloned calves were premature birth ( $n=2$ , 10.0%), abnormal function of lung and liver ( $n=2$ , 10.0%), abnormal function of lung ( $n=4$ , 20.0%), malformation ( $n=4$ , 20.0%), unknown ( $n=4$ , 20.0%), and sudden death syndrome ( $n=4$ , 20.0%), respectively. Our findings suggest that normal birth weight is one of the most important factors to survive more than 6 months in cloned calves.

(Key words : Clone calves, Birth weight, Survival rate, Gestation length)

### 요 약

본 연구는 체세포 복제 한우 송아지의 생산에서 생시체중과 생존성과의 관계에 대하여 살펴보고자 실시하였다. 293두의 한우 대리모에 580개의 복제란을 이식하였다. 복제란의 임신율은 이식 후 50일까지 72.3%로 높았으나, 이후 급격하게 감소하였다. 평균 임신 기간은 복제 송아지에서 287일(279~295일)이었으며, 인공수정 송아지도 287일(255~293일)로 각각 나타났다. 복제 송아지의 생시체중(30.3kg)은 인공수정 송아지(23.7kg)에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다( $p<0.05$ ). 자연분만( $n=17$ , 29.9kg)과 제왕절개( $n=14$ , 32.3kg)로 태어난 복제 송아지의 생시체중은 차이가 없었다. 하지만, 생후 175일 이전에 사망한 복제 송아지( $n=18$ , 32.8kg)의 생시체중이 175일 이상 생존한 복제 송아지( $n=11$ , 28.3kg)보다 유의적으로 높게 나타났다( $p<0.05$ ). 흥미로운 점은 생시체중이 15kg 이하( $n=5$ ) 또는 35kg 이상( $n=9$ )인 복제 송아지들은 모두 생후 175일 이전에 폐사하였다. 생후 175일 이전에 폐사한 복제 송아지들( $n=20$ )의 사망 원인은 미성숙 개체 2두(10.0%), 폐와 간 이상 2두(10.0%), 폐의 원인 4두(20.0%), 기형 4두(20.0%), 출생 후 급사(sudden death syndrome) 4두(20.0%) 및 기타 원인불명이 4두(20.0%) 등으로 분류되었다. 이상의 결과를 종합하여보면, 복제 송아지의 정상 생시체중이 6개월 이상을 생존하는데 가장 중요한 요소들 중의 한 가지임을 확인하였다.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-31-290-1621, E-mail: seonghh@rda.go.kr

## 서 론

체세포를 이용하여 생산한 복제수정란의 임신율은 매우 낮은 효율을 보이고 있다. 1998년 복제 송아지가 처음 태어난 이후(Kato 등, 1998), 우리나라에서도 Im 등(2001)이 한우 복제소의 생산에 대하여 보고하는 등 다양한 임신율에 대한 보고가 있어 왔으나, 아직도 여전히 복제수정란의 이식 후 임신율과 분만율은 인공수정이나 일반 수정란에 비해 낮은 것으로 나타나고 있다.

복제수정란은 발달과정에서 불완전한 reprogramming, DNA methylation 등으로 인해 비정상적인 태반 발생으로 임신 중 또는 생후 사망의 원인을 제공하고 있다(Hill 등, 1999; Kremensky 등, 2006). 이식 후 착상의 실패는 태반의 비정상과 관련있다고 보고하고 있다(Cibelli 등, 1998; Wakayama 등, 1999; De Lille 등, 2001). 그러나 분만율은 일정하게 낮은 것으로만 나타나고 있는 것 같다. 낮게는 3%에서부터 50%까지 다양하게 보고되고 있다(Kato 등, 1998; Eggen 등, 2001; Wakayama 등, 2001; Heyman 등, 2002).

또한, 임신 기간에 대한 보고도 일정하지 않다. 체세포 복제소의 임신 기간은 일반소와 비슷하거나(Kato 등, 1998; Heyman 등, 2002) 또는 길다고 보고 (Kubota 등, 2000)하고 있어 이에 대한 원인과 대비가 중요하다. 이것은 임신 말기 태아의 급격한 체중 증가가 일어나므로 분만예정일이 지날 경우 난산의 위험이 동반되며, 이것은 태아는 물론 대리모에도 위험하기 때문이다. 하지만 체외에서 배양된 수정란 유래의 복제소(Willut 등, 2002)와 체외수정란(Garry 등, 1996)의 이식 후 거대태아증후군(large offspring syndrome)이 나타난다는 보고가 있으며, 이를 극복하려는 체외배양 시스템의 개선과 공여세포의 처리에 대한 연구도 이루어지고 있으나, 수정란의 발생과 관련된 연구와 이해가 필요하다.

Willut 등(2002)에 의하면 복제동물은 분만 후 24시간 이내에 사망하는 비율이 높으며, 이는 호흡곤란, 거대태아 등과 관련된 심장 이상이 그 주요 원인이라고 보고하였다. 또한, 복제소는 주로 폐순환 부전, 급성폐렴, 신장이나 간의 이상, 거대산자 등 비정상적인 증상을 나타내고 있음을 보고하고 있다(Garry 등, 1996; Cibelli 등, 2002; Heyman 등, 2002; Panarace 등 2007). 이러한 문제들로 인하여 육질과 육량 등 우수한 유전능력을 가진 가축을 대량 생산하고자 하는 목적에 도달하기에는 아직 부족한 부분이 많은 것이 사실이다.

최근 유럽연합 식품안전청(2008-01-11, [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu))과 미국의 식품의약품안전청(2008-01-15, [www.fda.gov/cvm/cloning.htm](http://www.fda.gov/cvm/cloning.htm))에서 복제 소, 돼지, 양 및 그들의 후대로부터 생산된 식육과 우유가 정상동물로부터 생산된 식품들처럼 안전하다고 결론을 내려 향후 복제동물 생산 연구의 새로운 방향을 제시하였다고 할 수 있다.

하지만 아직까지 우리나라에서는 복제동물 생산에 관해 보고한 명확한 자료가 거의 없는 것이 사실이다. 따라서 본 연구에서는 복제동물 생산 효율을 증진시키기 위해 2001년부터 축산과학원에서 생산한 복제수정란을 이식하여 2003년까지 생산한 복제 송아지의 임신 기간과 생시체중 및 분만 후 생존율에 대한 연구 결과를 요약 정리하였다.

## 재료 및 방법

### 난자와 공여핵의 준비

본 시험에 공시된 난자는 도축장에서 도살된 소의 난소를 적출하여 직경 2~7 mm 난포로부터 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 실체현미경(Olympus, Japan) 하에서 양질의 난구세포가 부착된 난자만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 체외성숙은 10%의 FBS(fetal bovine serum, Gibco, USA)가 함유된 TCM199(Gibco, USA)를 사용하여 하였다. 선별된 난자는 배양액 500  $\mu$ l에 40개의 난자를 넣어 mineral oil(E. R. Squibb Sons, Inc., USA)로 피복하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 18~20시간 동안 성숙 배양하였다. 배양 후 성숙난자는 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)으로 난구세포를 제거하고, 실체현미경하에서 세포질이 균일하고 극체가 뚜렷하게 보이는 것만을 선별하여 핵이식에 이용하였다.

핵이식용 한우세포는 2~3년된 한우 암소의 귀세포(Korean bovine Skin Fibroblast, KbsF)로부터 채취하여 이용하였다. 귀로부터 직경 6 mm의 조직을 채취하여 D-PBS(Gibco, USA)로 3회 세척한 후 세절하여 38°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다. 배양 3~4일 후 조직으로부터 분리되어 나온 세포들은 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 회수하여 동결하였으며, 필요시 용해하여 핵이식에 공시하였다.

### 핵이식과 배양

본 실험에서 공여세포는 한우 암소의 귀세포를 이용하였으며, 핵이식 방법은 Im 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였으며, 제핵과 핵이식 및 융합 조건은 아래와 같다. 난자는 20% FBS와 50  $\mu$ g/ml phytohemagglutinin(PHA, Sigma, USA)이 포함된 TCM199 30  $\mu$ l의 drop에서 극체와 주변의 karyoplast를 제거하였다. 핵이 제거된 난자는 Hoechst 33342(Sigma, USA)를 이용하여 염색, 형광현미경을 통하여 제핵을 확인하였다. 이어서 준비된 귀세포를 제핵된 난자의 위관강으로 각각 미세 주입하였다. 미세주입된 난자는 Zimmerman's cell fusion medium이 놓여진 100 mm plastic dish 위에서 양쪽 전극이 연결된 needle을 이용하여 난자부분과 주입된 세포를 일직선상으로 맞춘 후 ET-3 GO KU(FHK, Japan)를 이용하여 융합하였으며, 조건은 25 V로 10  $\mu$ sec 동안 1회의 pulse를 가하여 융합하였다. 이어서 난자는 20% FBS가 포함된 TCM199에 옮겨 30분 동안 배양하였다. 세포질의 융합이 확인된 난자는 10  $\mu$ M Ca ionophore에서 5분, 이어서 2 mM 6-dimethylaminopurine(DMAP)에서 3시간 동안 활성화 처리를 하였다. 활성화 처리 후 수정란은 3일 동안 FBS가 첨가된 CR2aa에서, 이어서 3일 이후부터 FBS와 BSA가 첨가된 CR2aa에서 배양하였다. 배양조건은 CR2aa 배양액으로 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, 38.5°C의 조건에서 7~8일 배양하였다. 배양 1일령 (24hr)에 2세포기로 분할된 것을 확인하였고, 7일령에 배반포로 발달된 것을 확인하였다.

### 수정란 이식 및 인공수정

핵이식 수정란은 7~8일 배양 후 정상적인 모양을 나

타내는 배반포 수정란을 자연발정 한우 수란우 293두에 각각 1~2개의 배반포(총 580개)를 이식하였다. 대조군으로서 인공수정은 축산과학원에서 사육하고 있는 자연발정 한우 암소에 동결정액을 이용하여 인공수정하였다. 모든 수란우는 발정제귀를 통해 임신 여부를 확인하였으며, 120일 이후까지 발정이 재귀되지 않은 수란우는 직장검사를 통하여 임신을 확인하였다.

**분만과 태아처치**

수란우는 분만일 7일전부터 분만실에 옮겨 격리 사육하였으며, 분만에정일에 분만되지 않으면 직장검사를 통하여 태아의 상태를 확인하였고, 특이한 증상이 없을 경우 자연분만을 유도하였으나, 기대산자이거나 분만지연의 경우 보조하였다. 그러나 분만에정일에 분만징후를 보이지 않는 임신우중 태아의 크기가 크다고 판단하였을 때 제왕절개를 실시하였으며, 태아의 크기가 보통인 경우나 작은 경우는 자연분만할 때까지 기다렸다.

분만 시 태아는 체중을 측정하였으며, 외관상 이상 유무를 확인하였다. 또한, 분만 중 또는 분만 후 사망한 태아는 부검을 실시하여 원인을 분석하였다. 분만한 송아지는 자연 포유를 유도하였으나, 기립불능 등으로 자연포유가 어려울 경우 동결 보존한 초유로 인공포유를 하였다. 태어난 복제소와 수란우의 혈액 그리고 공여 체세포는 microsatellite를 분석하여 모두 공여 체세포로부터 복제된 한우인 것을 확인하였다.

**통계학적 분석**

본 연구의 결과, 얻어진 자료의 분석은 SAS package를 이용하였다. 복제소와 인공수정으로부터 태어난 한우의 체중의 비교, 자연분만과 제왕절개로 태어난 복제송아지의 체중과 생존율의 비교, 복제소의 생후 체중과 1~175일까지의 생존율 등은 t-test를 이용하여 분석하였다.

**결 과**

**임신 기간**

본 실험에서 조사한 복제소의 임신율은 Fig. 1과 같다. 293두의 복제수정란 이식우의 초기 임신율은 79.4%이었으나, 50일령 이후부터 급격히 떨어지기 시작하여 100일령에 34.0%로 떨어졌으며, 150일령에 17.0%까지 떨어졌다. 이후 완만한 곡선을 나타내어 200일령 12.1%, 240일령에 7.8%였으며, 복제소의 임신에서 안정적인 시기는 150일령 이후인 것으로 확인되었다. 최종적으로 분만까지 도달한 복제소는 7.8%였다.

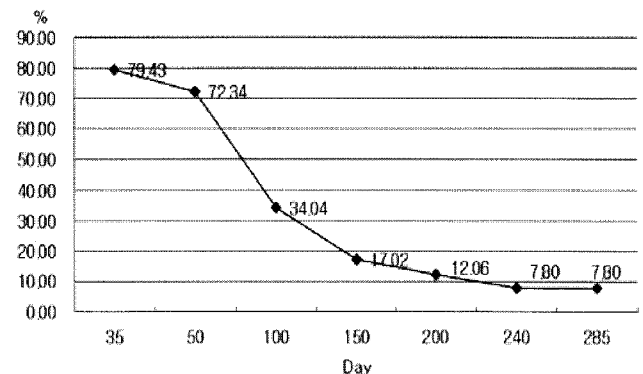
복제수정란을 이식한 소와 인공수정 한우 암소의 생식 체중 및 임신 기간(자연분만)에 대해 조사한 결과는 Table 1과 같다. 복제소의 체중은 평균 30.3 kg이고, 인공수정으로 태어난 한우의 평균체중은 23.7 kg으로 복제소의 체중은 인공수정 한우에 비하여 무거운 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 복제소의 임신 기간은 평균 287일이었으며, 최소 279일에서 295일까지의 범위에 있었다. 그 중 최소 279일과 최대 294일에 태어난 복제소는 분만 후 생존하였으며, 이후 태어난 복제소는 분만직후 사망하였다. 복

제소와 임신 기간을 비교하기 위하여 인공수정으로 태어난 소 중에서 암소의 임신 기간과 비교했을 때 평균 287일로 같은 것으로 나타났다. 인공수정 한우는 모두 자연분만으로 태어났다. 임신 기간의 범위는 최소 255일부터 최대 293일까지로 나타나 자연분만이 가능한 경우 복제소의 임신 기간은 인공수정 한우의 임신 기간과 차이가 없는 것으로 나타났다.

**분만 방법**

복제소와 인공수정 한우는 자연분만을 위주로 하였으나, 일부 상황에 따라 제왕절개를 이용하여 분만하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 자연분만 17두는 모두 295일령 이전에 분만을 하여 인공수정 분만일과 같은 것으로 나타났다. 그러나 분만에정일에 도달하였으나 분만징후가 없는 소는 직장검사를 통하여 태아의 크기가 크거나 외관적으로 양수과다증의 현상이 보이는 등 난산이 염려되는 14두에 대해서는 제왕절개를 실시하였다. 인공수정의 경우, 60%가 286~290일령 사이에 태어났으나, 자연분만 복제소의 경우 35%가 291~295일령에 태어나 복제소는 일반소보다 임신 기간이 길어지는 경향이 있었다.

제왕절개 방법과 자연분만 방법으로 태어난 복제소에 대한 결과는 Table 2에 정리하였다. 자연 분만한 17두의 체중은 29.9 kg이었고, 이중 8두가 175일 이후까지 생존하였다. 제왕절개술을 실시한 14두의 복제 송아지의 평균체중은 32.3 kg이었으며, 3두가 175일 이후까지 생존하였다.



**Fig. 1. Pregnancy rate of cloned calves from adult ear fibroblast cells.** 580 cloned embryos were transferred into the 293 recipients. Pregnancy diagnosis was determined by using ultrasonograph and rectal palpation.

**Table 1. Gestation lengths of cloned and artificial insemination calves**

Calves	Birth weight (kg)	Gestation lengths (days)		
		Average	Minimum	Maximum
Clone (♀, 17)	30.3 <sup>a</sup>	287	279	295
AI (♀, 15)	23.7 <sup>b</sup>	287	255	293

<sup>ab</sup> Values in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 2. Survivability of cloned calves according to delivery methods

Calving	Gestation (day)	Mean of		No.(%) of calves survived at >175 days
		Weight (kg)	Survived (day)	
Natural*	287	29.9	120 <sup>a</sup>	8/17(47.1)
C-section**	286	32.3	4.4 <sup>b</sup>	3/14(21.4)

\* Normal delivery; \*\* Caesarean section

<sup>ab</sup> Values in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

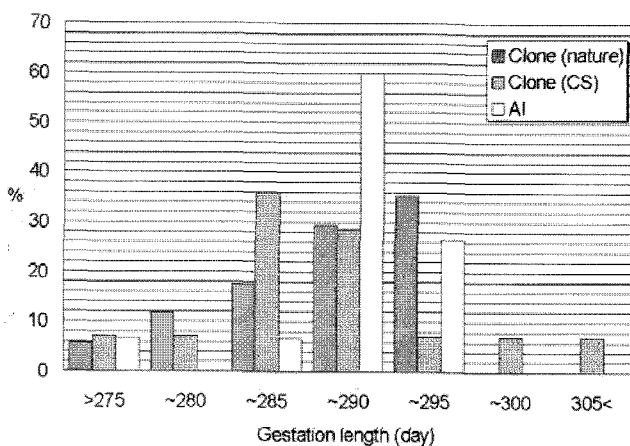


Fig. 2. The distribution of gestation lengths in clone and artificial insemination calves. Natural: normal delivery; CS: Caesarean section

자연분만에서 2두의 복제소가 분만 중 또는 분만직후 사망하였으며, 제왕절개의 경우는 분만 즉시 사망한 경우가 없었다. 복제소의 제왕절개는 최대 310일에 이루어진 것도 있었다. 이들의 175일 이상 생존율은 자연분만의 경우 47.1%(8두), 제왕절개의 경우는 21.4%(3두)이었다. 그리고 자연분만의 경우 175일 이전 생존기간도 120일령으로 제왕절개의 4.4일보다 매우 긴 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

#### 생시체중

복제한우와 인공수정 한우의 생시체중을 조사한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 모두 32두의 복제소가 분만하였으며, 이들 중 30두가 분만 시 24시간 이상 생존하였다. 이들 복제소의 체중은 31.1 kg이었으며, 최소 14 kg에서 최대 50 kg 사이인 것으로 조사되었다. 그러나 2두는 분만 즉시 또는 24시간 이내에 사망하였으며, 체중은 각각 20, 38 kg(평균 29.0 kg)이었다.

분만 후 생존한 30두 중 18두가 1일에서 175일 사이에 사망하였다. 이들의 체중은 평균 32.8 kg이었으며, 범위는 최소 6kg에서 최대 50 kg 사이였다. 그리고 175일 이상 생존한 복제소는 11두였으며, 이들의 체중은 평균 28.3 kg으로 (19~35 kg) 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 따라서 복제소의 분만시 체중이 높은 경우 175일 이내에 사망할 가능성이

Table 3. Survivability of calves produced by SCNT and artificial insemination

	Status	No.(%) of calves	Birth weight (kg, range)
Day 0 <sup>1</sup>	Live	29/31(93.6)	31.1(14~50)
	Dead	2/31(6.5)	29.0
Clone	Live	11/29(37.9)	28.3(19~35) <sup>a</sup>
	Dead	18/29(62.1)	32.8(6~50) <sup>b</sup>
AI	Live	15(86.7)	23.7(15~29)

<sup>1</sup> The cloned calves were died within 24 hours

<sup>a</sup> The body weight of the dead calves were 20 and 38kg, respectively.

<sup>ab</sup> Values in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

높다고 할 수 있다.

한편, 인공수정으로 태어난 한우 암소는 15두이며, 이들의 체중은 15 kg에서 29 kg 사이에 있었으며, 평균 23.7 kg이었다. 여기서 인공수정으로 태어난 한우의 자료는 암소의 자료만을 이용하였다.

#### 생시체중과 생존율과의 관계

본 연구에서 체중과 생존율과의 관계는 Fig. 3에서 나타내는 바와 같다. 분만 시 생시체중이 15~20 kg, 35~40 kg인 복제소에서 각각 1두가 분만 24시간 이내에 사망하였다. 그리고 24시간 이상 생존한 복제소중 175일 이상 생존율을 나타내는 것은 20~35 kg 사이인 것으로 나타났다으며, 특히 분만 시 체중이 15 kg 이하 3두와 35 kg 이상인 9두 복제소는 모두 175일 이내에 사망하였다. 따라서 생시체중과 출생 후 사망률과의 관계는 Table 3과 관련하여 밀접한 연관이 있는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 한편, 인공수정으로 태어난 한우의 생시체중은 15~30 kg 사이인 것으로 나타났으며, 20 kg 이하에서 1두가 사망하였을 뿐이다.

#### 복제한우의 사망 원인

분만 후 사망한 20두의 복제소에 대하여 사망 원인별 조사 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 31두의 복제소중 175일까지 11두(35.5%)가 생존하였고, 20두(64.5%)는 사망하였는데 사망한 복제소의 원인은 다음과 같이 다양하게 나타나고 있다. 원인별로는 미성숙 10.0%(2두), 폐와 간의 이상 10.0%(2두), 폐의 원인 20.0%(4두), 기형 20.0%(4두), 출생 후 급사(sudden death syndrome) 20.0%(4두) 및 기타 원인불명이 20.0%(4두)로 나타났다.

#### 고찰

복제소의 발달효율이 낮은 이유는 이식 후 초기배 사망, 착상 실패, 또는 불완전한 착상으로 인해 분만까지의

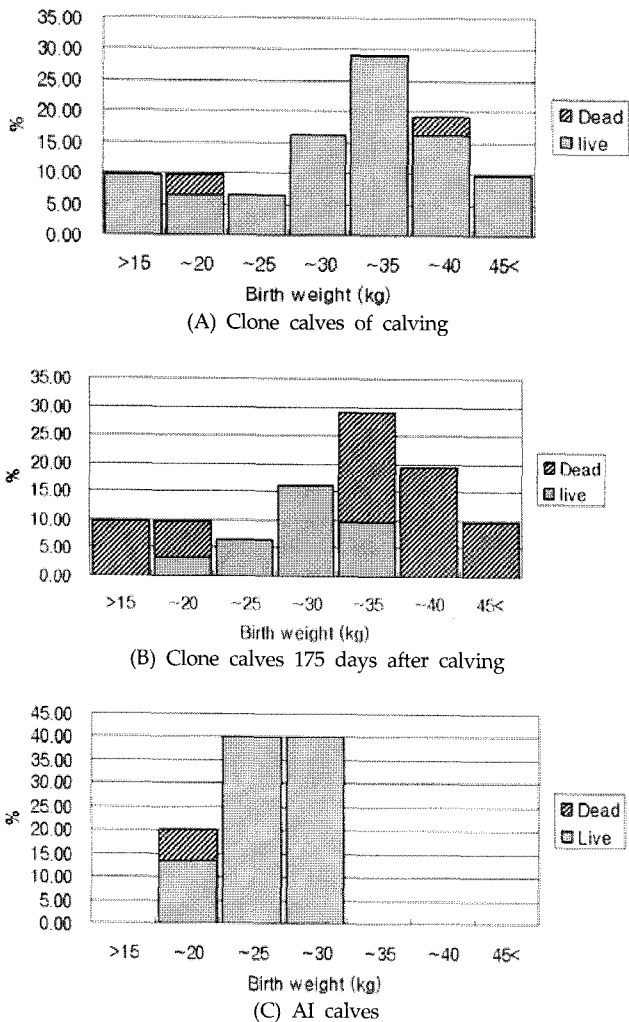


Fig. 3. The relations between birth weight and survival rate in cloned calves. Survival rate of 31 cloned calves within 24 hours(A); within 175 days from the date of birth (B); Survival rate of the calves produced by artificial insemination (C)

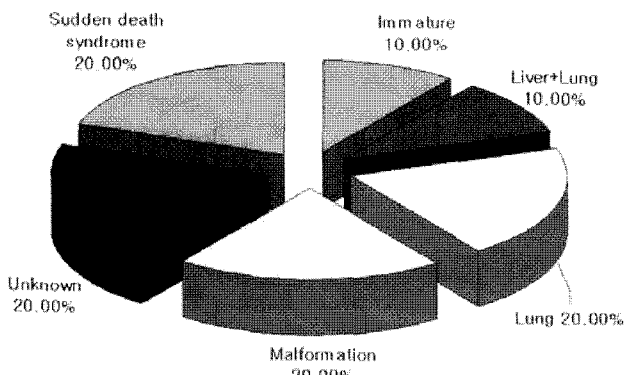


Fig. 4. The causes of death in cloned calves died within 175 days after birth.

비율이 낮은데서 찾을 수 있다. 그러나 복제 수정란이 가지고 있는 여러 가지 문제점, 즉 불완전한 reprogramm-

ing, DNA methylation의 이상 등이 태반 및 태아 발달과 분화에 영향을 주는 것으로 보고(Hill 등, 1999; Yanagimachi, 2002; Kremensky 등, 2006)되고 있다.

본 연구에서 복제수정란을 이식하였을 때 초기 임신율은 79.4%를 나타냈으나, 50일(72.3%) 이후 150일령(17.1%)까지 매우 급격히 떨어져 최종 분만까지 도달한 비율은 7.8%였다. 이는 착상 전후의 시기에 착상의 실패 등으로 인해 초기임신율 저하가 나타나고 있다. 이와 관련하여 Wakayama 등(1999)은 이것은 태반의 비정상과 관련있다고 보고하고 있다(Cibelli 등, 1998; Wakayama 등, 1999; De Lille 등, 2001). 이를 극복하기 위하여 초기 복제과정에서 공여세포의 세포주기를 조절하여 M기보다 G1기에서 더 양질의 높은 배반포 발달율을 나타냈다고 보고하였으며(Ideta 등, 2005), 또한 혈청배양보다 roscovitine 등을 처리하여 세포주기를 조절함으로써 복제소의 생존율을 높일 수 있었다(Gibbons 등, 2002)고 하였다.

최근 미국, 아르헨티나, 브라질에서 연구된 복제소 연구의 결과에 의하면 30일령 임신율은 각각 37, 35, 43%로 나라별로 차이가 없었으나, 60일령 이후 임신율은 각각 23, 15, 38%이었고, 150일령은 15, 11, 29% 그리고 분만율은 12, 7, 22%로서 나라별로 유의적인 차이가 있음이 나타났다(Panarace 등, 2007). 복제수정란을 이식했을 때 초기 임신율이 급격한 하향 곡선을 나타내고 있는 것(Heyman 등, 2002)은 본 연구의 결과와 비슷한 경향을 나타내고 있다. Kato 등(1998)은 10두에 체세포 복제수정란을 이식하여 8마리의 산자를 생산하였다고 보고하여 매우 높은 성공률을 보고하고 있으나, 그중 4두가 생후 또는 3일후에 사망했다고 보고하였다. 또한, Heyman 등(2002)은 6.8% 분만율을 보고하고 있어 본 연구의 결과와 비슷한 경향을 나타낸다. 이외에 마우스에서 난구세포를 공여세포로 이용하였을 때 분만율은 3% 내외였으나, ES cell을 공여세포로 하여 최소 10%에서 12%의 분만율을 보고하고 있다(Eggan 등, 2001; Wakayama 등, 2001).

Kato 등(1998)에 의하면 복제소의 임신 기간이 242일부터 287일까지로 다양하게 나타나고 있다고 하였다. 하지만 Kubota 등(2000)은 복제소의 임신 기간은 9일 정도 더 긴 것으로 보고하였고, Kruij 등(1997)과 Heyman 등(2002)은 체세포 복제소의 임신 기간은 차이가 없는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 복제소의 임신 기간은 인공수정 한우와 비교하였을 때 차이가 없는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 14두의 복제소 임신우에서 분만예정일에 도달했으나, 분만 징후를 보이지 않아 제왕절개를 이용한 분만을 시도했다. 이와 같이 복제수정란을 이식한 수정란우가 분만예정일에 분만징후를 보이지 않는 것은 호르몬의 불균형 등 내분비적인 영향이 있을 것으로 생각된다. 즉, 분만을 위해 모체의 progesterone 수준이 떨어지지 않는 것으로 보아 태반에서 어떤 신호 전달 체계의 실패가 그 원인인 것으로 생각된다.

Panarace 등(2007)이 조사한 미국, 아르헨티나, 브라질 3국의 복제 연구에 의하면 2000년부터 2002년까지는 분만 1주일 전에 제왕절개술을 이용하여 분만을 하였고, 2003년부터 현재까지는 임신 282일에 분만되지 않으면 3~5일 동안 기다린 후 2 ml의 PGF<sub>2</sub>α와 30 mg의 dexamethasone을 주사하여 자연분만을 유도하거나 또는 제왕절개를 하는 것으로 조사되었다. 제왕절개시 제대는 태어난 후 1~3분에 고정시키는데, 이것은 태아의 총 혈액량

의 25~40%를 태반으로부터 흐르도록 하기 위함이나, 과도한 혈액의 흐름은 태아 심장에 부하를 주는 원인이 된다고 하였다.

자연분만 복제한우와 인공수정 한우 암소의 생시체중에 대해 Table 1에서 나타내는 바와 같이 복제소의 체중은 평균 30.3 kg이고, 인공수정으로 태어난 한우의 평균체중은 23.7 kg으로 복제소의 체중이 인공수정 한우에 비하여 무거운 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 이는 인공수정과 복제수정란으로 태어난 소의 생시체중이 비슷하다는 Kruip 등(1997)의 결과와는 다르다. 그러나 복제소의 생시체중은 수정란 이식 또는 인공수정을 통하여 태어난 소와 비교하여 유의적으로 높았다고 보고하는 연구자(Heyman 등, 2002)들도 있어 본 연구의 결과를 뒷받침해 주고 있다.

분만과 관련된 본 연구의 결과에서 자연분만 17두 중 사망한 2두의 체중은 각각 20과 38 kg이었고, 이들의 임신 기간은 각각 279, 294일이었으며, 미숙한 상태를 보이진 않았으나 난산 등으로 사산하였다. 하지만, 자연분만의 경우 47.1%가, 제왕절개의 경우는 21.4%가 175일 이상 생존하였다. 그리고 자연분만의 경우 175일 이전 생존기간도 120일령으로 제왕절개의 4.4일보다 매우 긴 것으로 나타났다. Kato 등(1998)에 의하면 242일에 분만한 복제소의 생시체중이 17.3, 18.2 kg으로서 미성숙인 상태로 태어난 복제소도 건강한 것으로 보고하고 있다. 오히려, 266일 또는 287일의 정상적인 임신 기간을 나타내고 있는 복제소 중에서 출생일 또는 3일 이내에 사망하였다고 보고하였다. 그리고 Wells 등(1999)도 10두의 복제소를 제왕절개로 분만하였으나 모두 100일 이전에 사망하였다고 보고하고 있다. 체세포 복제소의 생후 사망 원인은 다양하다. Kato 등(1998)은 복제한 소에서 2두는 양수 과다 섭취로 사망하였으며, 1두는 난산과 분만지연으로 사망하였고, 1두는 3일후 폐렴으로 사망하였다고 보고하였다. 이들의 보고에 의하면 이들은 8두의 복제소 중에서 체중이 적거나 또는 많은 소에서 사망한 것으로 보고하였고, 평균 범위의 생시체중을 가지고 태어난 복제소들은 생존한 것으로 보고하여 사망 원인과 상관없이 체중은 복제소의 출생 후 생존율과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다. 이와 같은 것은 본 연구의 결과에서도 나타난다.

자연분만 복제한우와 인공수정 한우 암소의 생시체중에서 복제소의 체중은 평균 30.3 kg이고, 인공수정으로 태어난 한우의 평균체중은 23.7 kg으로 복제소의 체중은 인공수정 한우에 비하여 무거운 것으로 나타났다(Table 1,  $p < 0.05$ ). 또한, 175일령 이전에 사망한 복제소의 생시체중(32.8kg)은 그렇지 않은 것(29.3 kg)에 비하여 무거운 것으로 나타났다(Table 3,  $p < 0.05$ ). 그리고 Fig. 3 (B)에서 보는 바와 같이 마찬가지로 생시체중이 무겁거나 가벼운 복제소는 생후 175일령 이전에 사망하는 것으로 나타났다. Heyman 등(2002)의 보고에 의하면 복제소의 생시체중은 수정란 이식 또는 인공수정을 통하여 태어난 소와 비교하여 유의적으로 높았다고 하였다. 미국의 복제소 출생에 대한 보고에 의하면(Panarace 등 2007) 261두의 복제소중 생후 24시간 이내 사망하는 비율은 12%였고, 150일령까지 사망하는 비율은 30%였다고 보고하였다. 본 연구에서도 31두의 복제소중 생후 24시간 이내 사망하는 비율은 6%였고, 175일령까지 사망하는 비율은 62.07%로 나타났다(Table 3). 이외에도 복제수정란으로부터 생산된 면양(McCreath 등, 2000), 마우스(Eggan 등 2001; Waka-

yama 등, 2001; Gao 등, 2003)에서 생후 사망률이 높다고 일반적으로 보고되고 있다.

복제소의 사망 원인 중 태아의 크기가 비정상적으로 크게 나타나는 거대산자증후군(large offspring syndrome)은 일반 수정란에서도 발생했었다. 그러나 복제수정란에서 더 많이 발생되고 있으며, 이와 같은 경우 출생 후 높은 사망률의 원인이 되고 있다. Lee 등(2004)은 임신 150일령에 복제소의 체중은 체외수정란과 인공수정의 경우보다 11~17% 정도 무겁다고 하였으며, Garry 등(1996)의 보고에 의하면 체세포가 아닌 수정란의 할구를 이용하여 복제한 소에서도 거대산자와 기형 송아지가 출생하는 것으로 보아 이는 체세포 복제만의 문제는 아니며, 체외배양 또는 복제과정 중에서 발생하는 여러 가지 원인인 것으로 생각된다. 이와 관련하여 체외생산된 수정란은 혈청 등의 배양조건을 개선하여 일부 극복되고 있는 부분도 있었으나, 이것은 mouse 등 중에 따라 다른 결과를 가져오기도 한다. 복제수정란의 초기 발달과정에서 염색질의 변화는 태아와 태반의 성장과 발달 조절을 저해하는 원인(Farin 등, 2004)으로 알려지고 있으며, 근본적인 원인은 핵의 부적절한 reprogramming의 결과와 관련되어 있다는 것이 알려지고 있다(Dean 등, 2001; Reik 등, 2003). 또한, 중요한 유전자를 조절하는 promoter 지역의 비정상적인 methylation으로 인해 조직특이적인 유전자의 조절과 관련되어 있으며, 복제동물의 효율 저하로 이어진다고 하였다(Kremenskoy 등 2006). 이외에도 최근 많은 연구자들이 진전된 연구 결과를 발표하고 있으며, 본 과학원에서도 태어난 복제소와 초기 수정란의 유전자 발현 조절과 관련된 연구를 진행하고 있다.

본 연구에서 복제수정란의 사망 원인은 미성숙 10.0%, 폐와 간의 이상 10.0%, 폐의 원인 20.0%, 기형 20.0%, 출생 후 급사(sudden death syndrome) 20.0% 및 기타 원인 불명이 20.0%로 나타났다. 하지만 출생 후 급사도 역시 원인을 정확히 알 수 없는 것이므로 복제소의 사망 원인은 부검과 외과적 소견으로만 판단하기엔 다소 어려움이 있었다. 일부의 거대 산자로 태어난 복제소는 외부의 도움 없이 일어설 수 없는 것도 있었으며, 앞다리가 약간 휘어진 것도 있었다. 또한, 혼자 스스로 초유를 흡유 할 수 없어 인공포유를 해야 하는 개체도 있었다. 이러한 개체들은 결국 일주일 이내에 사망하는 비율이 높았다.

Garry 등(1996)은 출생 후 1개월 이내의 사망은 갑상선종, 호흡, 패혈증 등이 주원인으로 나타났고, 그 이후에 사망한 것은 박테리아 등의 감염에 의한 폐렴, 로타바이러스 감염, 제대에 농의 발생, 섬유소성 다발성 동맥염 그리고 아무 원인을 알 수 없는 개체 2두, 그리고 선천적 심장 기형이 없음에도 불구하고 심장의 원인으로 9주에 사망하였다고 보고하였다. Panarace 등(2007)에 의하면 미국, 아르헨티나, 브라질에서 5년 동안 이루어진 실험을 조사한 결과, 복제소에서 나타나는 일반적인 현상은 비정상적인 제대의 확장(37%), 호흡곤란(19%), 기운이 없거나 길게 늘어지며(20%), 건굴곡중(21%)이 나타남을 보고하였다. 이중 다른 징후나 이유 없이 호흡곤란으로 사망하는 복제소가 19%로 나타났다. 복제소에서 나타나는 또 하나의 특징은 양수과다증(hydrops syndrome)이라고 할 수 있다. Lee 등(2004)의 보고에 의하면 임신 150일령에서 총 양수의 양은 인공수정이나 체외수정란을 이식한 소에서 보다 많았다고 보고하고 있으며, Wells 등(1999)에 의

하면 임신말기 태아의 소실은 양수의 증가가 원인으로 보고하고 있다. 본 연구에서도 제왕절개의 과정에서 양수의 양이 지나치게 많은 경우를 발견할 수 있었으며, 이런 경우의 태아는 거대체중과 기형의 형태를 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 임신말기의 양수과다증은 임신부의 식욕 저하와 몸의 상태를 보고 판단하여야 하므로 측정하기는 매우 어렵다.

이상의 결과를 종합해 보면 복제 송아지의 정상 생시체중이 6개월 이상을 생존하는데 가장 중요한 요소들 중의 한 가지임이 확인되었다. 또한, 복제소에서 임신율이 낮고 생후 사망률이 높게 나타나는 결과들은 복제분야에서 초기 발생뿐만 아니라 임신과 분만 과정에서도 해결해야 할 많은 문제점들이 있음을 나타내 주고 있다. 이와 같은 것을 해결하기 위해서는 수정란의 발생 과정과 세포에 대한 기본적인 연구와 유전자 조절 및 발현 기전 등에 대하여 깊이 있는 연구를 진행하여야 할 것이다. 따라서 본 과학원에서도 초기 수정란에서 유전자의 발현 조절 등의 연구를 진행하고 있으며, 생산된 복제소는 후대를 생산하여 생식기능 및 복제소의 안전성과 관련된 연구를 추진하고 있다.

## 인용문헌

1. Chung YG, Ratnam S, Chaillet JR, Latham KE (2003): Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. *Biol Reprod* 69: 146-153.
2. Cibelli JB, Stice SL, Goleuke PJ, Kane JK, Jerry J, Balackwell C, de Leon A, Robl JM (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
3. De Lille AJ, Anthony RV, Seidel GE (2001): Characteristics of placental and fetal tissues from Day 75 nuclear cloned bovine pregnancies. *Theriogenology* 55:263.
4. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W (2001): Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl Acad Sci USA* 98:13734-13738.
5. Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM, Yanagimachi R, Jaenisch R (2001): Hybrid-vigor, fetal overgrowth and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6209-6214.
6. Farin CE, Farin PW, Piedrahita JA (2004): Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. *J Anim Sci* 82:E53-E62.
7. Gao S, McGarry M, Ferrier T, Pallante B, Priddle H, Gasparrini B, Fletcher J, Harkness L, De Sousa P, McWhir J, Wilmot I (2003): Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line. *Biol Reprod* 68(2): 595-603.
8. Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG (1996): Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 41:141-152.
9. Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, Venable A, Stice S (2002): Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol Reprod* 66(4):895-900.
10. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP (2002): Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 66:6-13.
11. Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL (1999): Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 51:1451-65.
12. Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R (2002): Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci* 99(20): 12889-12894.
13. Ideta A, Urakawa M, Aoyagi Y, Saeki K (2005): Early morphological nuclear events and developmental capacity of embryos reconstructed with fetal fibroblasts at the M or G1 phase after intracytoplasmic nuclear injection in cattle. *J Reprod Dev* 51(2):187-194.
14. Im GS, Yang BS, Park SJ, Im SK, Yang BC, Yi YJ, Park CS (2001): Effect of protein supplementation, O<sub>2</sub> concentration and co-culture on the development of embryos produced by nuclear transfer using cultured cumulus cells in Hanwoo (Korean cattle). *Asian-Aust J Anim Sci* 14(9):1260-1266.
15. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1998): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
16. Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S, Shiota K (2006): DNA methylation profiles of donor nuclei cells and tissues of cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev* 52 (2):277-85.
17. Kruip Th AM, Daas JHG (1997): *In vitro* produced and cloned embryos : Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47:43-52.
18. Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X (2000): Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci* 97:990-995.
19. Lee RS, Peterson AJ, Donnison MJ, Ravelich S, Ledgard AM, Li N, Oliver JE, Miller AL, Tucker FC, Breier B, Wells DN (2004): Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more va-

- riable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. *Biol Reprod* 70(1):1-11.
20. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell HS, Colman S, Schneike AE, Kind AJ (2000): Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405:1066-1069.
  21. Panarace M, Agüero JL, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cane L, Gutierrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Forte Pontes JE, Ereno Junio JC, Mower S, Medina M (2007): How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 67:142-151.
  22. Reik W, Santos F, Dean W (2003): Mammalian epigenomics: Reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology* 59:21-32.
  23. Shijie Li, Yanxin Li, Weihua Du, Lei Zhang, Shuyang Yu, Yunping Dai, Chunjiang Zhao, Ning Li (2005): Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. *Biol Reprod* 72:258-265.
  24. Shiota K, Yanagimachi R (2002): Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. *Differentiation* 69:162-166.
  25. Wakayama T, Yanagimachi R (2001): Mouse cloning with nucleus of donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev* 58:376-383.
  26. Wakayama T, Yanagimachi R (1999): Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat Genet* 22: 127-128.
  27. Wells DN, Misica PM, Tervit HR (1999): Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60(4):996-1005.
  28. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE (2002): Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419:583-586
  29. Yanagimachi R (2003): Cloning: experience from the mouse and other animals *Mole. & Cell. Endo* 187: 241-248.

(접수일자: 2008. 3. 3 / 채택일자: 2008. 3. 11)