

반복적인 과배란 처치 경험이 있는 한국흑염소에서 난포 자극 및 복강경을 이용한 난포란 채취(LOPU)

이용범^a · 이두수^a · 조상철 · 신상태[†]

충남대학교 수의과대학

Follicular Stimulation and Laparoscopic Ovum Pick-up (LOPU) in Repeatedly Superovulated Korean Black Goats

Yong-Boum Lee^a, Doo-Soo Lee^a, Sang-Cheol Cho and Sang Tae Shin[†]

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT

Laparoscopic ovum pick-up (LOPU) is a convenient method for collecting oocytes in small ruminants. LOPU has the advantage of being a less invasive means of oocyte collection, thereby allowing for a repeated usage of the oocyte donor animals. A total of 25 Korean black goats were used in the winter season (December to February) and LOPU was applied to the goats which had been treated for superovulation more than two times during the last twelve months. Estrus was synchronized with an intravaginal insert containing 0.3 g progesterone for 10 to 12 days. Ovaries were hyperstimulated with eCG 1,000 IU oneshot, FSH with eCG (50 mg / 1,000 IU; 70 mg / 500 IU; 70 mg / 1,000 IU) oneshot or FSH multiple-shot with eCG oneshot (20 mg × 6 / 300 IU) given intramuscularly 72 h prior to LOPU. For these groups, the number of follicles (mean ± SEM) observed which developed to larger than 2 mm in diameter were 1.6 ± 2.5, 4.3 ± 3.1, 5.5 ± 4.2, 6.6 ± 2.1 and 8.8 ± 7.8, respectively. Oocytes were aspirated by using OPU needles and a vacuum pump. The overall oocyte retrieval rates were 41.4%. Oocytes were matured in TCM-199 supplemented with 10% (w/v) bovine serum albumin + 10 µg/ml FSH + 1 µg/ml 17β-estradiol for 27 h at 39°C in 5% CO₂ in air. Oocytes were parthenogenetically activated by ionomycin combined with 6-diethylaminopurine (6-DMAP). Total oocyte maturation and cleavage rate were 67.3% and 78.8%, respectively. In summary, LOPU is a useful oocyte collection method in Korean black goats that can provide immature oocytes for transgenesis or nuclear transfer.

(Key words : oocyte, laparoscopic ovum pick-up (LOPU), superovulation, Korean black goat)

서 론

소형 반추동물에서의 복강경을 이용한 난포란 채취(laparoscopic ovum pick-up, LOPU)는 1970년대 Snyder와 Dukelow (1974)에 의해 양에서 처음 실시되었으나, 20년이 지난 1990 년대에 이르러서야 Tervit(1996)과 Baldassarre(1996) 등에 의해 난포 자극 방법과 수술 장비 및 회수 방법 등이 개선되어, 복제 동물이나 형질 전환 동물의 생산을 위한 난자의 회수에 사용되기 시작하였다(Baldassarre 등, 2002; Baldassarre 등, 2003).

소형 반추동물에서의 난자 회수는 소와 같은 대형 반추동물에서 사용하는 질을 통한 관류가 어렵기 때문에, 전신마취 하에 개복하는 수술적 방법(Earl 등, 1994; Ledda 등, 1999), 복강경을 이용한 난포란 채취(Snyder와 Dukelow, 1974; Graff 등, 1995; Baldassarre 등, 1996; Santl 등, 1998; Baldassarre 등, 2002; Baldassarre 등, 2003; Koeman 등, 2003; Cuginé 등, 2004; Abdullah 등, 2008), 초음파 유도 하에 질을 통한 난포란 채취 (Graff 등, 1995; Santl 등, 1998; Graff 등, 1999), 그리고 도축장 유래의 난소에서 회수하는 방법을 통해 이루어진다(Ledda 등, 1999).

* This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2012R1A1A2004838).

^a Co-first authors

[†] Correspondence : E-mail : stshin@cnu.ac.kr

복강경을 이용한 난포란 채취는 수술적인 방법에 비해 비침습적으로 같은 개체에서 여러 번 반복이 가능하다(Stangl 등, 1999; Baldassarre 등, 2002). 그리고 성숙숙 이전의 어린 개체에서 적용 가능하며(Baldassarre 등, 1996; Ledda 등, 1999; Koeman 등, 2003), 원하는 시점에 채취된 난포란을 체외 성숙시킬 수 있어 난자의 성숙 단계 조절이 용이하다(Baldassarre 등, 2002). 또한 초음파 유도하의 난포란 채취보다 많은 난자를 얻을 수 있다(Graff 등, 1995; Graff 등, 1999).

현재 우리나라에서는 염소 도축장과 염소를 대량으로 도축하는 곳이 드물어, 소나 돼지에서와는 달리 도축된 개체의 난소를 지속적으로 공급받을 수가 없다. 또한 한국흑염소에서 초음파 또는 복강경을 이용한 난포란 채취에 관해서는 아직 보고된 바가 없다. 이에 살아있는 개체에서 난자를 회수하는 방법 중 가장 이점이 많은 복강경을 이용한 난포란 채취 방법(LOPU)을 한국흑염소에 적용하여, 난포란의 채취 가능성을 타진해 보고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 호르몬 처치

총 25마리의 암컷 한국흑염소(생후 24~36개월)를 실험동물로 사용하였으며, 이들은 본 실험을 수행하기 전 최근 1년 이내에 이미 2회 이상의 과배란 처치와 개복 수술을 받은 경험이 있는 개체들로써, 각 회 당 과배란 처치를 위해 160 mg의 follicle stimulating hormone(FSH, 20 mg × 8회)과 200 IU의 equine chorionic gonadotropin(eCG)이 투여되었다. 실험은 겨울철(12~2월)에 실시하였으며, 실험동물군은 호르몬 투여 방법에 따라 각각 6마리씩 무작위로 배정하였다.

실험동물은 대화장 내에 비가림막과 보온 막사가 있고, 철조망 울타리가 쳐진 야외에서 사육되었으며, 실험 전후 처치 및 회복은 격리가 가능한 컨테이너 사육실에서 실시하였다. 사료[퍼펙트100®, (주)금강TMR]는 1일 2회 충분한 양을 급여하였고, 깨끗한 수돗물 및 무기염류[미네랄부록®, (주)대한뉴팜]를 자유 급식을 시켰다.

발정 동기화를 위하여 질 내 10~12일 동안 CIDR(controlled internal drug releaser, progesterone, 0.3 g; Pfizer, Auckland, New Zealand)를 삽입하고, LOPU 36 h 전에 제거하였다. 난포 자극을 위하여 eCG(대성 P.M.S.G.®, 대성미생물연구소)와 FSH(Folltropin-V®, Bioniche, Belleville, Ontario, Canada)를 Table 1과 같이 투여하였다. 일회 투여 방법(one shot)은 LOPU 72 h 전에 근육으로 투여하였으며, FSH 다회 투여(multiple-shot)는 LOPU 72 h 전 eCG와 함께 1회 투여하고, 이후 12 h 간격으로 총 6회 근육 주사를 하였다.

개체의 난포 자극 반응 여부(직경 2 mm 이상의 난포 존재

여부)를 복강경을 통해 확인하였다.

2. 복강경을 이용한 난포란 채취(LOPU)

실험동물은 LOPU 36 h 전부터 절식시켰으며, 24 h 전부터 절수시켰다. 실험동물은 마취 전 복부(abdomen)와 살굴 부위(inguinal region)의 털을 제거하였다. 마취의 유도를 위해 tiletamine-zolazepam(Zoletil 50®, Virbac, Carros, France)을 2.0 mg/kg 정맥 주사하였고, isoflurane(아이프란액®, 하나제약주식회사)의 흡입을 통해 마취를 유지시켰다. 마취 유도 후 머리 쪽을 아래로 30도 기울인 Trendelenburg 자세로 고정하였다. 수술부위는 surgical iodine[베타딘®, (주)한국파마]과 소독용 alcohol로 각각 3회씩 반복하여 소독하였다.

복강경은 FENCER®(MGB, Germany)를 사용하였다. LOPU를 위해 먼저 하복부 부위에 verres needle을 이용하여 이산화탄소를 복강 내로 주입해 공기배증을 만들었으며, cannula(5.5 mm)의 삽입 위치에 5 mm의 피부를 절개하였다. 두 개의 cannula를 복부 정중선에서 좌·우 약 3 cm, 유방에서 머리 쪽으로 약 5 cm 떨어진 지점에 위치하여 삽입하였다. 두 개의 trocar sleeve를 통해 endoscope(rigid endoscope 30°, Schölly® FIBEROPTICGMBH, Germany)와 복강경 검자를 삽입하여 좌·우 난소의 전체 표면을 관찰함으로써 난포 자극 효과를 확인하였다.

이후 두 개의 trocar sleeve 위치에서 머리 쪽으로 5~8 cm 지점에 좌·우 두 개의 cannula를 삽입하였다. 좌측 꼬리 쪽의 trocar sleeve에는 rigid endoscope를, 우측 꼬리 쪽과 좌측 머리 쪽에는 복강경 검자를, 우측 머리 쪽에는 19G OPU needle(덕우메디칼)을 삽입하였다.

난포란의 흡입은 2 mm 이상의 난포에서 실시하였다. 난포 난포란의 흡입에는 진공펌프(GAST®, USA)를 사용하였으며,



Fig. 1. Laparoscopic ovum pick-up (LOPU) from hyperstimulated ovarian follicles.

OPU 바늘을 찌르기 전부터 한 쪽 난소의 난포를 모두 흡입할 때까지 지속적으로 난포액을 흡입하였다. 난포를 흡입하기 전에 난자 채취 배지를 OPU 바늘로 소량 흡입하고, 난포를 모두 흡입한 후 다시 배지를 흡입하여 OPU 바늘 세트 안에 남아 있는 난자가 없도록 하였다. 난자 채취 배지는 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS 1×; Gibco 14190)에 10% FBS (Gibco 26140-079)을 첨가하여 사용하였다. 흡입한 액체에서 바로 입체 현미경(WILD M5A[®]; WILD HEERBRUGG, Switzerland)을 통해 난자를 회수하였다.

실험 결과의 통계학적 유의성 검정은 PASW Statistics 18 프로그램을 이용하여 일표본 *t*-검정(one sample *t*-test)을 실시하였다.

3. 난자의 체외 배양

실험을 위해 난자 세정 배지는 tissue culture medium-washing (TCM-W; Gibco, Rochville, MD, USA), 체외 성숙 배지는 tissue culture medium(TCM; Gibco, Rochville, MD, USA), 단성 생식 배지는 modified synthetic oviduct fluid(mSOF; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 모든 배지는 pH를 7.2, 그리고 삼투압 농도를 280 mOsm/kg으로 조정하였다.

회수한 난자는 TCM powder(9.9 mg/ml; Gibco 31100)에 sodium bicarbonate(0.168 mg/ml; Sigma S-5761), hepes(2.38 mg/ml; Sigma H-6147), bovine serum albumin(BSA, 5 mg/ml; Sigma A-6003) 및 penicillin-streptomycin(10 ml/L; Sigma P-3539)으로 구성된 TCM-W 용액으로 2회 세정하고, 체외 성숙 배지로 1회 세정하였다.

체외 성숙 배지는 pyruvic acid(0.099 mg/ml; Sigma P-4562), penicillin-streptomycin 10 ml/l를 첨가한 TCM 199(Gibco 11150) 용액을 기본으로 antrin(FSH, 10 µg/ml; Denka, Japan), 17β-estradiol (1 µg/ml; Sigma E-8875) 및 10% FBS를 넣어 사용하였다. 난자를 체외 성숙 배지에 위치시켜 39℃, 습도 100%, 5% CO₂의 배양기에서 24h 동안 성숙시켰다.

체외 성숙시킨 난자-난구세포 복합체를 hyaluronidase(1 mg/ml; Sigma H-3506)를 첨가한 TCM-W 용액 내에서 내경 약 200 µm의 glass pipette을 사용하여, 난구 세포를 벗겨내었다. 난구 세포가 완전히 제거된 난자는 TCM-W 용액으로 2회 세정하였다. 체외 성숙의 평가는 난구 세포가 완전히 제거된 난자에서 제 1극체를 관찰하는 것으로 하였다.

난자의 활성화를 위하여 0.5 µM ionomycin(Sigma 10634)를 첨가한 TCM-W 용액에 4분간 정치시켰다. 이후 39℃, 습도 100%, 5% CO₂의 배양기에 넣어왔던 1.9 mM 6-diethylaminopurine(6-DMAP; Sigma D-2629)으로 2회 세정 후 25 µl 6-DMAP microdrop에 4시간동안 정치시켰다.

활성화 시킨 난자는 mSOF 배지로 2회 세정한 후 25 µl mSOF microdrop을 만들고, 미네랄 오일을 도포하여 준비한 35 mm dish(Falcon 1008)에 위치시켜 39℃, 습도 100%, 5% CO₂의 배양기에 넣고, 매일 분할을 관찰하였다. 체외 배양 평가는 각 실험동물군에서 회수된 난자의 체외 성숙율과 분할율로 하였다.

결 과

1. 호르몬 투여량에 따른 난포 자극 효과

Table 1. Responses of ovarian stimulation according to differential treatment of eCG/FSH and oocyte retrieval rates to LOPU in Korean black goats (mean ± SEM)

Treatment	No. of goats treated	No. of goats hyper-stimulated*	Total no. of follicles		Oocyte retrieval rates (%)
			developed and aspirated (mean ± SEM)	Total no. of oocytes retrieved	
eCG 1,000 IU	5 ^a	1(20.0%)	8(1.6 ± 2.5)	2	25.0
eCG 1,000 IU + FSH 50 mg	3 ^b	2(66.7%)	13(4.3 ± 3.1)	6	46.0
eCG 500 IU + FSH 70 mg	6	3(50.0%)	33(5.5 ± 4.2)	11	33.3
eCG 1,000 IU + FSH 70 mg	5 ^c	3(60.0%)	33(6.6 ± 2.1)	12	36.4
eCG 300 IU + FSH multipleshot (20 mg × 6)	6	5(83.3%)	53(8.8 ± 7.8)	27	50.9
Total	25	14(56.0%)	140(5.6 ± 5.0)	58	41.4

* Follicles were developed to >2mm in diameter.

^{a-c} Due to severe bilateral ovarian adhesions caused by previous laparotomies, 1, 2 and 1 goat(s) of each treatment group were ruled out respectively.

실험동물은 호르몬 투여 방법에 따라 각 군당 6마리씩 배정하였다. 그러나 이전에 시행된 2회 이상의 개복 수술에 따른 심한 유착으로 인해 복강경을 통한 난소 확인이 불가능한 개체는 실험에서 제외하였다(Table 1).

호르몬의 투여량 및 방법에 따른 난포 자극 효과의 차이와 회수율은 Table 1과 같았다.

eCG 단독 투여 방법은 다섯 마리에 마리 당 1,000 IU의 eCG를 투여하였다. 이들 다섯 마리 중 한 마리에서만 난포 자극 반응이 나타났고, 나머지 4 마리에는 반응이 없었으며, 난포의 숫자는 6개에 불과하였다.

FSH와 eCG 병행 투여에서는 호르몬 투여 용량에 따라 난포 자극 반응(직경 2 mm 이상의 난포)이 증가되어 나타났다. eCG 1,000 IU + FSH 50 mg, eCG 500 IU + FSH 70 mg 및 eCG 1,000 IU + FSH 70 mg의 투여에서는 각각 4.3 ± 3.1 개, 5.5 ± 4.2 개 및 6.6 ± 2.1 개의 난포가 관찰되었다.

eCG 300 IU + FSH 20 mg \times 6에서는 8.8 ± 7.8 개의 난포가 관찰되었으며, 이들 여섯 마리 중 한 마리의 흑염소에서 23개의 난포가 관찰되었다.

호르몬 투여 방법에 따른 난포 자극 효과는 개체별 발육 난포수의 변화가 워낙 심하여 통계적 유의성이 없었다.

2. 복강경을 이용한 난포란 채취 및 회수율

복강경을 이용한 난포란 채취는 난포를 찌르기 직전부터 진공펌프를 사용하여, 지속적인 음압을 주는 방법으로 실시하였으며, 이 방법으로 140개의 난포에서 58개의 난자가 회수되어 평균 41.4%의 회수율을 얻었다.

3. 체외 배양 발육률

회수한 난자의 체외 배양 성숙율과 단성 생식 활성을 통한 분할율은 Table 2와 같다.

회수한 난자 49개 중 33개에서 제 1극체가 확인되었으므로

성숙율은 67.3%였으며, 이중 26개의 난자가 단성 생식 활성을 통해 분할되어 분할율은 78.8%였다. 난자의 분할은 4 cell까지 관찰되었다.

FSH 50 mg + eCG 1,000 IU 투여에서 회수한 6개의 난자는 체외 배양 중 오염에 의해 결과를 얻지 못하였다.

고 찰

염소에서 다수의 난자를 회수하기 위한 eCG와 FSH의 다양한 투여 용량 및 방법에 관한 연구가 있다(Graff 등, 1995; Baldassarre 등, 1996; Graff 등, 1999; Ledda 등, 1999; Stangl 등, 1999; González-Bulnes 등, 2000; Baldassarre 등, 2002; Cognin 등, 2003; Koeman 등, 2003; Abdullah 등, 2008). 호르몬 투여 시기는 사람(Mansour 등, 1994), 원숭이(Chen 등, 2006), 돼지(Ratky 등, 2003)에서는 ovum pick-up(OPU) 36시간 전이지만, Abdullah 등(2008)은 염소에서의 경우, 이 시기에 투여하면 미성숙 난자가 많이 존재하므로 LOPU 72시간 전에 투여하여야 가장 높은 회수율과 발육율을 얻을 수 있다고 하였다.

난포 자극을 위한 호르몬 처치에서 eCG 단독 투여는 난포 자극 효과 반응이 나타나지 않거나 미약하였다. 그러므로 eCG 단독 투여 방법은 이미 2회 이상의 반복적인 eCG 투여 경험이 있는 본 실험에서의 한국흑염소에서는 부적절한 난포 자극법으로 보인다.

FSH와 eCG 병행 투여에서는 그룹별로 eCG 1,000 IU + FSH 50 mg, eCG 500 IU + FSH 70 mg 및 eCG 1,000 IU + FSH 70 mg을 투여하였으나, 부족한 난포자극 반응 결과를 얻었다. Abdullah 등(2008)은 교잡종 염소에 FSH 70 mg + eCG 500 IU의 투여로 평균 약 20개 난포의 난포 자극 반응을 얻었다고 하였다. Baldassarre 등(2002)도 Alpine과 Saanen 종에서 FSH 80 mg + eCG 300 IU의 투여로 평균 약 25개 난포의 난포 자극 반응을 얻었다고 보고하였다. 그러나 이미 2회 이상

Table 2. Maturation and cleavage rates of laparoscopic picked-up oocytes

Treatment*	No. of oocytes	No. of matured oocytes	No. of cleaved oocytes (2 cell)	No. of oocytes developed to 4 cell
eCG 1,000 IU	2	2(100%)	0	-
eCG 500 IU + FSH 70 mg	11	7(63.6%)	5(71.4%)	0
eCG 1,000 IU + FSH 70 mg	12	10(83.3%)	9(90%)	6(66.7%)
eCG 300 IU + FSH multipleshot (20 mg \times 6)	24	14(58.3%)	12(85.7%)	4(33.3%)
Total	49	33(67.3%)	26(78.8%)	10(38.5%)

* The 2nd treatment group (eCG 1,000 IU. + FSH 50 mg) were excluded from this table due to contamination during culture.

의 과배란 처리 경험이 있는 한국흑염소에서 이와 비슷한 호르몬 투여량으로 충분한 난포 자극 반응을 얻기에는 그 투여량이 부족한 것으로 여겨진다. eCG 1회 투여 및 FSH 병행 다회 투여 방법에서의 난포 자극 반응 또한 다소 부족한 결과를 보였다. 그러나 이중 한 마리에서 23개의 난포가 관찰되기도 하여 호르몬 투여량 부족보다는 반복적인 사용 개체에서의 난포 자극 반응 감소로 보인다. 호르몬 투여 방법에 따른 이러한 결과는 염소에서 난포 자극을 위한 호르몬 처치 방법으로써, FSH 다회 투여 방법이 가장 적합한 것으로 여겨진다는 선행 연구 결과들(Brebion 등, 1992; González-Bulnes 등, 2000; Baldassarre 등, 2002; Cox 등, 2007)과 일치되었다.

반복적인 사용 개체에서의 난포 자극 반응 감소 극복을 위하여 호르몬의 병행 투여(McNeilly 등, 1987; Cognié, 1999)와 생식샘 자극 호르몬 방출 호르몬 작용제(GnRH agonist) 또는 길항제(GnRH antagonist)의 전처치 방법(Brebion 등, 1992; Cognié, 1999; Bari 등, 2001; Cognié 등, 2003)이 시도되어 왔다. 난포 자극을 위한 호르몬의 반복 처치는 호르몬에 대한 항체의 형성으로 인해 3회 이상의 투여에서 난포 자극 반응이 감소된다고 한다(Ryan 등, 1991). 호르몬의 반복 처치에 따른 난포 자극 반응이 감소되는 부작용은 서로 다른 호르몬의 병행 투여로써 극복할 수 있다고 한다(Cognié, 1999).

난포 자극을 위한 호르몬 투여 시 큰 난포(> 6 mm)가 있게 되면 난포 자극 반응이 감소되어 나타난다(Graff 등, 1999). 생식샘 자극 호르몬 방출 호르몬 작용제 또는 길항제의 전처치는 큰 난포를 제거하기 위한 방법으로 사용된다(Martion 등, 1995). 반복 사용된 개체에서 생식샘 자극 호르몬 방출 호르몬 작용제 또는 길항제를 전투여하였을 경우에 투여하지 않았을 때보다, 높은 난포 자극 반응을 보였다고 한다(Brebion 등, 1992; Cognié, 1999; Cognié 등, 2003).

소형 반추 동물에서의 복강경을 이용한 난포란 채취 과정은 Snyder와 Duckelow(1974)에 의해 처음 소개되었으며, 이러한 과정은 동물의 보정과 마취, 공기배증, cannula 삽입, ovum pick-up순서로 행해진다. 동물은 머리쪽을 기울여 보정하고, 복강 내 CO₂를 주입하여 공기배증 상태를 만들어 줌으로써, 복강 내 다른 장기의 손상 위험을 줄이며, 난소의 접근을 용이하게 한다고 하였다(Snyder와 Duckelow, 1974; Graff 등, 1999; Baldassarre 등, 2002; Cognié 등, 2004; Cox 등, 2007). 난소 고정을 위한 복강경 걸자를 Baldassarre 등(1996), Abdullah 등(2008)은 한 개, Snyder와 Duckelow(1974), Graff 등(1999)은 두 개를 사용한 것으로 보고되어 cannula의 삽입 개수에 차이를 보였다. Cannula의 삽입 부위는 하복부에서 유정맥을 피해 유방으로부터 머리쪽 복부 정중선을 기준으로 좌우에 삽입한다고 하였다(Baldassarre 등, 1996; Cox 등, 2007; Abdullah 등, 2008). OPU 바늘의 굵기에서는 Snyder와 Duckelow(1974)는

23G, Baldassarre 등(2002)과 Cox 등(2007)은 20G로, Cognié 등(2004)과 Graff 등(1999)은 18G를 사용하였다. 난포란을 흡입하는 방법으로 Snyder와 Duckelow(1974)는 2.5 cc 주사기를 사용하였고, 이후 Tervit(1996), Baldassarre 등(1996) 및 Cognié 등(2004)은 진공펌프를 사용하였다. 진공펌프의 흡입 압력은 Baldassarre 등(1996)은 50 mmHg로, Cognié 등(2004)은 25 mmHg로, Cox 등(2007)은 70 mmHg로 달리 사용하였다.

난포란의 회수율은 최근에 개선된 LOPU 방법에서의 보고된 회수율에 크게 못 미치는 것이다(Baldassarre 등, 2002; Cognié 등, 2003; González-Bulnes 등, 2004; Cox 등, 2007; Abdullah 등, 2008). 낮은 회수율의 원인으로는 난포란을 흡입하는 전문적인 장비의 부재가 가장 크다고 여겨지며, 실험자의 숙련도 또한 영향이 있었다. 실험에 사용한 진공펌프는 LOPU를 위한 전문적인 장비가 아닌 배지의 filtering를 위한 펌프를 사용한 것으로 OPU 바늘에 걸리는 정확한 압력의 수치를 알 수 없었다. 하지만 도축장 유래의 소 난소에서 예비 실험을 실시하여 적절한 흡입 압력을 도출함으로써 회수율을 높일 수 있었으며, 이때의 회수율이 50~60%였다.

난자의 체외 배양에서는 난자 활성화 방법으로 ionomycin과 6-diethylaminopurine(6-DMAP)의 처리 방법을 사용하였다. Guo 등(2010)은 염소의 난자에서 ionomycin과 6-DMAP의 처리가 temperature shock, electrical pulses, ethanol, strontium chloride(SrCl₂)와 cytochalasin B(CB)의 처리보다 높은 분할율을 보였다고 하였다.

난자의 체외 배양 결과는 다른 실험에서의 보고(Martino 등, 1995; Izquierdo 등, 1999; Izquierdo 등, 2002)보다 낮은 성숙율과 분할율을 나타내었다. 이는 소 난자 체외 배양용 배지 사용, 적은 난자 수, 대형 난포에서 채취한 난자의 질이 낮았던 점 등이 그 원인이었던 것으로 여겨진다.

체의 배양에서 보다 높은 발육률을 얻기 위한 방안으로 수정란을 난관 상피 세포(oviductal epithelial cells)와 같이 배양(co-culture)하는 방법이 있다(Tyagi 등, 1997; Teotia 등, 2001). Izquierdo 등(1999)의 체외 배양 실험에서도 염소의 수정란을 염소의 난관 상피 세포와 같이 배양하였을 때, 수정란의 분할율이 보다 높게 나타났다. 그러므로 이러한 방법을 추가하여 체외 배양한다면 보다 좋은 발육율을 얻을 수 있을 것이다.

소의 반복적인 난포란 채취에 있어 dominant follicle과 co-dominant follicle의 존재 시 난자의 성숙 또는 분할율이 낮은 것으로 보고되었다(Viana 등, 2010). 그러므로 이러한 대형 난포의 제거 방법 또한 고려 대상이다.

결론

실험 전 최근 1년 이내에 2회 이상의 과배란 처치 경험이

있는 총 25마리의 한국흑염소에 eCG의 단독 1회 투여, eCG와 FSH의 병행 1회 투여, 또는 eCG 1회 투여 및 FSH의 병행 다회 투여를 통하여 LOPU 가능성을 타진하기 위해 난포 자극 반응을 관찰하고, 복강경을 이용한 난포란 채취를 실시하였다.

난포 자극을 위한 eCG 단독 1회 투여 방법에서 평균 1.6 ± 2.5 개의 난포가 관찰되어, 이미 반복적인 eCG 투여 경험이 있는 한국흑염소에서 LOPU를 하기 위한 충분한 난포 자극 반응 결과를 얻을 수가 없었다. eCG와 FSH의 병행 1회 투여 방법들 중 eCG 1,000 IU + FSH 50 mg, eCG 500 IU + FSH 70 mg 및 eCG 1,000 IU + FSH 70 mg의 투여에서는 각각 평균 4.3 ± 3.1 , 5.5 ± 4.2 및 6.6 ± 2.1 개의 난포가 관찰되어 eCG 단독 1회 투여 방법에서 보다 다소 나은 결과를 얻을 수가 있었다. eCG(300 IU) 1회 투여 + FSH 병행 다회 투여 방법에서는 평균 8.8 ± 7.8 개의 난포가 관찰되었다. 난포 자극을 위한 호르몬 투여 방법에서는 eCG(300 IU) 1회 투여 + FSH 병행 다회 투여 방법이 난포 자극 반응을 이끌어내는데 가장 좋은 결과를 보였다.

복강경을 이용한 난포란 채취는 다음과 같은 과정으로 실시하였다. 즉, 실험동물을 Trendelenburg 자세로 고정하고, 복강 내 CO₂를 주입하여 공기배증 상태를 만든 다음, cannula를 삽입하였다. 이후 복강경 겹자를 이용하여 난소를 고정된 상태에서 OPU 바늘로 직접 난포를 찢어 난포란을 흡입하였다.

본 실험에서 난자의 회수율은 평균 41.4%로서 비교적 낮았으나, 과배란 처치 방법의 개선 및 LOPU 기술의 숙련도 등을 향상시킨다면 보다 높은 회수율을 얻을 수 있을 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

- Abdullah RB, Liow SL, Rahman ANMA, Chan WK, Wan-Khadijah WE and Ng SC. 2008. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pickup improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. *Theriogenology* 70: 765-771.
- Baldassarre H, Furnus CC, de Matos DG and Pessi H. 1996. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology* 1996; 45: 707-717.
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer C, Lazaris A and Karatzas CN. 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pickup and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology* 57: 275-284.
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, et al. 2003. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 59: 831-839.
- Bari F, Khalid M, Wolf B, Haresign W, Murray A and Merrell B. 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology* 56: 147-155.
- Brebion P, Baril G, Cognie Y and Vallet JC. 1992. Embryo transfer in sheep and goat. *Ann. Zoot.* 41: 331-339.
- Chen NQ, Liow SL, Abdullah RB, Embong WK, Yip WY, Tan LG, et al. 2006. Developmental competence of transported *in-vitro* matured macaque oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 12: 50-59.
- Cognié Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51: 105-116.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N and Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59: 171-188.
- Cognié Y, Poulin N, Locatelli Y and Mermillod P. 2004. State-of-the-art production, conservation and transfer of *in-vitro*-produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 437-445.
- Cox JF and Alfaro V. 2007. *In vitro* fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 83-87.
- Earl CR, Irvine BJ and Armstrong DT. 1994. Development of techniques for the production of viable embryos from six to seven week old lambs. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 20: 428.
- González-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ and López-Sebastian A. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54: 1055-1064.
- González-Bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, Garcia-Garcia RM, Inskip EK, et al. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 421-435.
- Graff KJ, Meintjes M, Paul JB, Dyer VW, Denniston RS, Ziomek C and Godke RA. 1995. Ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery from FSH-treated goats for IVF. *Theriogenology* 43: 223.

- Graff KJ, Meintjes M, Dyer VW, Paul JB, Denniston RS, Ziomek C, et al. 1999. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology* 51: 1099-1119.
- Guo J, Liu F, Guo Z, Li Y, An Z, Li X, et al. 2010. *In vitro* development of goat parthenogenetic and somatic cell nuclear transfer embryos derived from different activation protocols. *Zygote* 18: 51-59.
- Izquierdo D, Villamediana P and Paramio MT. 1999. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 52: 847-861.
- Izquierdo D, Villamediana P, Lopez-Bejar M and Paramio MT. 2002. Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57: 1431-1441.
- Koeman J, Keefer CL, Baldassarre H and Downey BR. 2003. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* 60: 879-889.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G and Naitana S. 1999. Production and lambing rate of blastocysts derived from *in vitro* matured oocytes after gonadotropin treatment of prepubertal ewes. *J. Anim. Sci.* 77: 2234-2239.
- Mansour RT, Aboulghar MA and Serour GI. 1994. Study of the optimum time for human chorionic gonadotrophin ovum pick-up interval *in vitro* fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 11: 478-481.
- Martino A, Mogas T, Palomo MJ and Paramio MT. 1995. *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43: 473-485.
- McNeilly AS and Fraser HM. 1987. Effect of GnRH agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J. Endocrinol.* 115: 273-282.
- Ratky J, Rath D and Brussow KP. 2003. *In vitro* fertilization of *in vivo* matured porcine oocytes obtained from prepubertal gilts at different time intervals after hCG injection. *Acta Vet. Hung.* 51: 91-101.
- Ryan JP, Hunton JR and Maxwell WMC. 1991. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of PMSG and FSH-P. *Reprod. Fert. Dev.* 3: 551-560.
- Santl B, Wenigerkind H, Scherthaner W, Mödl J, Stojkovic M, Prella K, et al. 1998. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. *Theriogenology* 50: 89-100.
- Snyder DA and Dukelow WR. 1974. Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnosis, and follicle aspiration in sheep. *Theriogenology* 2: 143-148.
- Stangl M, Kühholzer B, Besenfelder U and Brem G. 1999. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology* 52: 709-716.
- Teotia A, Sharma GT and Majumdar AC. 2001. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulosa cell monolayers. *Small Rumin. Res.* 40: 165-177.
- Tervit HR. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.* 1996; 42: 227-238.
- Tyagi S, Sharma GT and Majumdar AC. 1997. Meiotic competence of goat oocytes matured on granulosa cell monolayer. *Theriogenology* 47: 203.
- Viana JHM, Palhao MP, Siqueira LGB, Fonseca JF and Carmargo LSA. 2010. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology* 73: 966-972.

(접수: 2014. 3. 12/ 심사: 2014. 3. 12/ 채택: 2014. 3. 26)