

최근 소의 조기임신진단과 관련한 임신관련 당단백질(PAG)의 개요와 활용방법



류 일 선
 아시아동물의학연구소 소장
 아시아동물병원 원장 (수의학박사)
 aami58@hanmail.net

최근 소 사육규모의 대규모 및 전업화 추세에 발맞추어 번식우에 있어서 발정관찰 부정확 등으로 인한 번식장애우의 다발로 증식에 걸림돌이 되고 있는 실정에 있다.

번식은 젖소 및 한우 생산에 있어 경제적인 측면에서 가장 중요하게 고려해야 사항이며, 1년 1산의 건강한 송아지 생산은 일반적인 목표이다. 성공적인 번식은 정확한 발정발견, 적기 수정 및 적기 배란이 이뤄져야 한다.

임신진단의 목표는 100%정확, 임신진단 오류 전무, 가능한 조기에 실시, 태령 판정, 성판별 진단 등이 가능해야 한다. 따라서 필자는 조기임신진단은 한우나 젖소에 인공수정 후 신속한 공태우의 검색에 따른 효율적으로 조기에 적극적인 재수정전략을 수립하는 것이 가능하고, 수정간격의 단축과 공태일수의 감소에 따른 번식효율의 향상이 기대된다.

1. 조기임신진단의 필요성

최근 국내 소 사육농가에서 대동물 임상수의사 등이 임신진단을 위해 널리 적용하는 방법으로 발정비재귀법(NR : Non-Return, 소 사육 농가가 가능한 방법으로 수정 후 2~4개월이 경과하여도 발정이 오지 않을 때 임신으로 판정), 이외에 직장검사(양막낭의 축진, 태막 Slip, 임신 자궁각의 팽대, 태막의 축진, 중자궁동맥의 비대와 진동 등), 경관점액의 검사 (임신 35일 이후 가능) 및 초음파(30일경 실시하나, 40일 전후에 정확도 90%) 등에 의한 검사방법은 적용되고 있다 (기술, 경험 및 기구 등에 의존하고 있음).

가. 시기 : 산전 건강관리의 개시

나. 건강한 임신/조기임신진단을 위한 관리, 사양 및 건강관리의 변화

다. 수정회수의 감소와 수정율 증가를 위한 번식효율 및 임신율 증진

라. 농장주 측면에서의 경제적인 측면 고려 : 임신진단의 정확성과 즉시성에 대한 욕구 증가, 대동물임상수의사의 부족과 신진 대동물 임상수의사의 진출이 감소 요인이 증대

바. 수정 후 조기임신진단에 따른 비임신우에 대한 차회 수정을 위한 재발정동기화 처리 필요

2. 암소의 발정주기 및 난소의 변화

가. 발정주기

(1) 제 20~1일

- 황체퇴행, 난포의 최종 성숙

(2) 제 1~2일(발정기, Oestrus, 총 30시간)

- 발정기, 성적 수용단계, 승가 시 허용시기로 발정 평균 지속은 4~24시간

(3) 제 2~4일(발정후기, Metoestrus)

- 발정종료 후 10~14시간 개시, 배란 및 황체 형성 시기
- 발정후기 출혈(처녀우 90%, 경산우 45%)

(4) 제 5~17일(발정휴지기, Dioestrus)

- 발정기와 발정기 사이
- 황체가 최대로 커지고 기능적으로 완성
- 발정휴지기 종료시에 황체의 용해(luteolysis)가 일어남

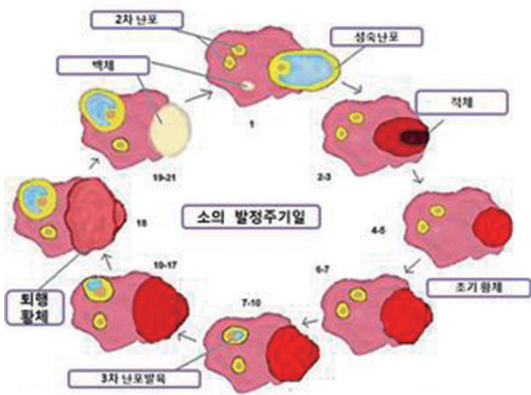
※ 발정주기중 황체의 용해(luteolysis)의 기전 : 암소의 발정

후 16~17일에 개시되며, 황체조직은 대체적으로 발정 후 4일까지는 PGF_{2α}에 반응이 없다.

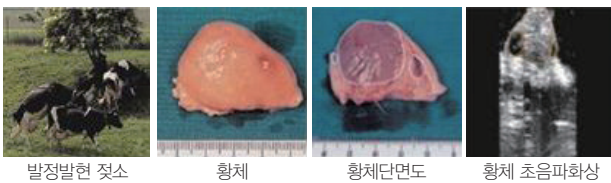
- ① 황체로 혈류의 급격한 감소
 - LH와 cAMP(사이클릭아데노신일인산 : Cyclic adenosine monophosphate)의 스테로이드합성작용의 방해에 따른 PGF_{2α}의 황체용해작용에 의해 황체로 혈류의 급격한 감소
 - PGF_{2α}투여후 황체용해 개시와 황체용적의 감소에 따라 8시간에 황체내 혈액공급량이 감소하는 것으로 보고하고 있음

② 황체세포에 직접 작용 : PGF_{2α}, cAMP, LH

(5) 제 17~20일(발정전기, Proestrus)



• 황체퇴행 개시와 자궁은 수정란 인지하며, 임신 시 황체는 난포 발육을 방해하는 호르몬 생산 지속, 비임신 시 자궁은 황체에 신호를 보내 새로운 발정주기준비개시를 위한 퇴행을 유도함



3. 임신기간

소의 평균임신기간은 281일(279~290일)이며, 배아기와 태아기로 나뉘지며, 적절한 황체기능은 progesterone의 충분한 농도로 분비함에 따라 임신유지에 필수불가결하다.

가. 배아기(Embryonic phase : 임신 1~42일)

나. 태아기(Foetal phase : 임신 42일~분만)

4. 임신유지

가. 자궁내막상피세포에 옥시토신 수용체의 저해

나. prostaglandin합성억제의 발현

5. 임신진단

가. 발정비재귀(Non-return to oestrus) : 임신우중 약 7%가 발정발현됨

나. 직장검사법 : 수정 후 35~65일

• 직장검사에 의한 자궁을 촉진해서 임신진단법은 1800년대부터 보고된 이후, 현재도 널리 사용되는 주요한 기술이다.

• 조기 임신진단(1~3개월)

- 자궁각 비대칭
- 임신 자궁각의 긴장도 감소
- 임신 자궁각의 파동(후기 양측 자궁각)
- 임신자궁각측의 난소에 황체 촉진
- 태막 slip
- 양막낭 촉진

• 후기 임신진단(3개월 이상)

- 자궁경관이 골반연의 앞에 위치하고 자궁은 수축되지 않음
- 자궁 이완
- 태반엽, 태아 촉진
- 중자궁동맥의 직경 증가와 진동 촉진

표 1. 직장검사법으로 임신진단이 가능한 증상

임신단계	태막 slip	양막낭	태아	태반엽	중자궁동맥 진동 촉진	
					같은 측	반대측
30일	±	+				
45	+	+				
60	+	+				
75	+	+		+		
90	+		+	+		
105			+	+	+	
4개월			+	+	+	
5개월			+	+	+	+
6개월				+	+	+

- 직장검사법에 의한 부정확한 진단의 흔한 오류
 - 자궁전인 실패
 - 비정상적인 자궁내용물(자궁축농증 또는 자궁점액종)
 - 부정확한 수정일

다. 호르몬측정

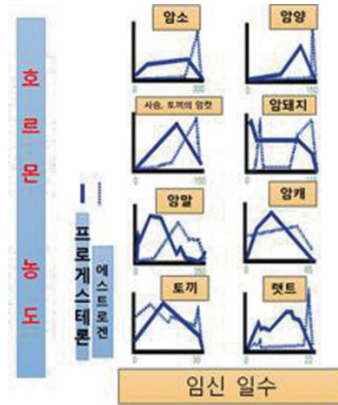
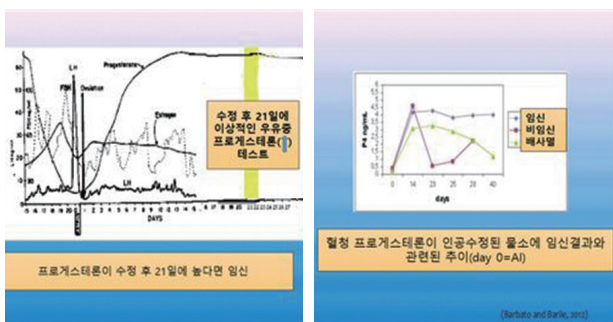
- 프로게스테론 측정법(Progesterone assay)
 - 교배 또는 수정 후 18~24일 사이에 기능성 황체로부터 분비되는 progesterone은 조기 임신진단의 지표이다.
 - 혈장이나 우유로 분석되며, 최적의 분석시기는 교배 또는 수정 후 24일이나 가양성으로 되는 긴 발정간격의 가능성을 제거한다.
 - 정확성 : 우유 progesterone(ELA) test의 민감도(즉 임신진단의 정확성)는 93.1%이나, 특이성(즉 비임신우 진단의 정확성)은 39.3%이며, 비임신우의 대다수는 임신으로 진단되기도 한다.
 - 프로게스테론 측정법은 인공수정 후 다음 발정이 올 경우는 전후 4~5일간은 혈중 및 탈지유(전유)중 프로게스테론은 1ng/mL(5ng/mL)이하의 낮은 수치를 나타내나, 임신시 1ng/mL(5ng/mL)이상의 수치를 나타내나, 영구황체 등의 경우에 오진의 가능성이 있다(정확도 80~85%).

※ 호르몬 측정시 흔한 오류

- 자궁축농증/영구황체
- 단발정 간격
- 난포낭종/황체낭종
- 시료와 진단 키트의 부정확한 조작

라. 초기 임신관련 단백질

- 근 혈액시료내 초기 수태인자(early conception factor)나 임신관련 당단백질이 검출이 가능한 검사가 있다.
- 배사멸이 많이 발생할 수가 있기 때문에 수태의 지표로 적용할 수 있으며, 이후에 임신진단은 직잠검사법이나 초음파화상 진단에 의해 확진한다.



마. 초음파진단

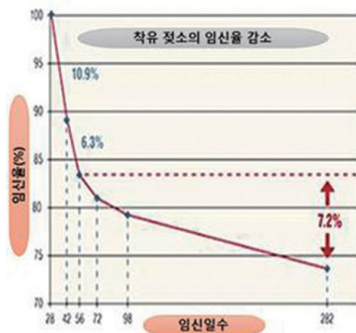
- 소에서 초음파기술 적용은 1982년에 처음으로 도입된 이후, 장점으로는 난소나 자궁에 관한 정보를 다수 수집 가능, 임신진단 정확도의 향상, 수정란이나 태아 생존이 평가 가능, 쌍태진단의 정확도 향상, 성판별의 가능, 태령추정 정확도의 향상, 축주에 대한 태아 확인 가능 등으로 신뢰관계 구축이 쉽다는 것이다.
- 소에서 수정 후 비임신소의 초기에 확인하는 것은 수정간격을 줄여주고 AI회수의 증가를 감소시켜 번식율과 임신율을 증진한다.
- 실시간초음파<Real time(B-mode) ultrasound>는 수정 후 20~53일에 가능하나 대부분 26일이후에 임신진단이 가능하나 조기배사멸이 종료되는 시점인 42~56일에 재실시하는 것이 좋다.
 - 정확성 : 99%
- 초음파진단의 오류는 발정전 또는 발정중의 자궁내액의 저류, 방광과의 감별, 배사멸 등이다.

바. 초기 임신진단과 배사멸

- 초기 배사멸은 초기배사멸(수정후 1발정주기(19~24

일)과 후기배사멸(수정후 24일부터 기관형성이 완전히 종료하는 42일까지)이며, 육우(한우)는 젖소보다 낮으며, 젖소는 성우에 비해 육성우가 낮은 배사멸율을 나타내고, 고능력우나 폭염스트레스에서는 배사멸율이 높아진다.

- 임신율 저하는 임신 42~56일 이후에 감소하여 56~98일에 3.4%, 98일부터 분만까지 5.5%로 보고하고 있다.
- 조기에 임신진단시 배사멸이 높으며, 28일에 임신진단된 소의 10~16%가 수정 후 56일경에 재진단 시 조기 배사멸이 나타난다.
- 저수태우(repeat-breeder syndrome : RBS)는 소 경제적인 손실의 주요 요인(Bartlett 등, 1986)이며, 정액 손모와 인공수정비용 과다지출, 수태간격증가, 수의진료비, 도태 및 세대간격증가로 인한 수익성 저하를 초래하였다.
- RBS의 비율은 미경산우 10.0~40.0%, 경산우 6.8~45.6%로 나타났으며, 우군 평균 22.8%로 나타난 것으로 보고하고 있다(Moss 등, 2002).



Major Landmarks:

Bovine/ Buffalo Early Pregnancy

Ovulation :	20-36 h of r ^o detection of estrus
Fertilization :	within hours of ovulation
Transport to Uterine horn :	3½ to 4 days
Hatching:	Day 7
Maternal recognition of pregnancy:	Day 14-19
Implantation :	Starts on Day 22 - completed by Day 40
Pregnancy losses	
Fertilization losses :	5-10%
Early embryonic mortality :	10-20%
Late embryonic losses :	very few (<5%)
Post implantation losses :	rare
Most reliable indication of successful pregnancy: Implantation i.e. Day 40+	

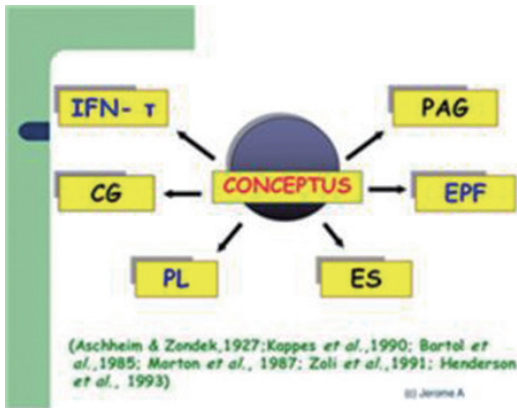
바. 태반성 프로락틴계 및 임신관련 당단백질

• 태반의 기본적인 분류

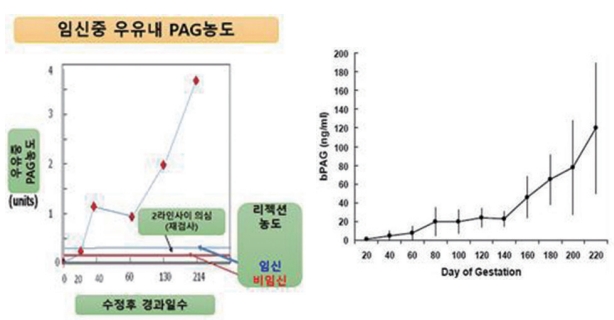
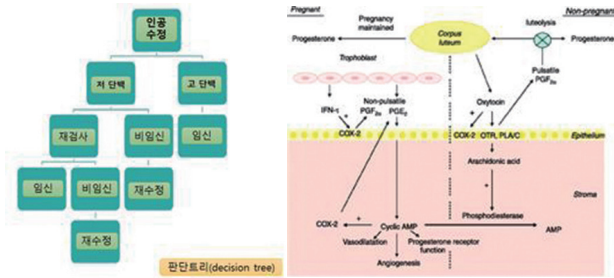
분포	침윤도	용모상 상피세포	대표적인 종
총모성	상피용모성	단핵(일부2핵)	말, 돼지, 고래, 돌고래
산재성	결합직용모성	단핵/2핵/다기	소, 양(반추류)
대상	내피용모성	다기	개, 고양이(육식동물)
반상	혈용모성	다기	마우스, 토끼(설치류), 사람

- 임신기의 포유류의 태반에서는 다수의 단백질호르몬이 분비되어지고 있으며, 그중에서도 영장류, 설치류, 반추류의 태반에는 하수체호르몬인 프로락틴(PRL)이나 파랄로그(Paralog : 일반적으로 같은 생물 종 내에서 유전자가 중복되어 만들어진 서열)가 발현하는 것이 알려져 있다(Josimovich and MacLaren, 1962 ; Kohmoto and Bern, 1970 ; Buttle and 랙노스, 1976).
- 태반성락토겐(placental lactogen : PL)은 태반용모를 구성하는 영양막세포에서 생산되는 당단백질의 하나로써 PRL의 활성을 나타낸다. 설치류, 반추류의 태반에서는 PL이외에도 다수의 PRL 파랄로그(Paralog)가 발현하는 데, 이러한 한군의 단백질은 태반성 PRL 유전자군(Family)으로 불리운다.
- 태반성 PRL 유전자군 단백질은 PRL의 활성을 가진 전형적인 구성원(Classical member)인 PL과, 구조적으로는 PRL에 가까우나 PRL양 생물활성을 가지지 않는 PRL양단백질(Prolactin like protein : PLP)나 PRL관련단백질(Prolactin-related protein : PRP)등의 비전형적인 구성원(Non-classical member)로 대별된다.
- 임신관련당단백질은 임신특이성 단백질로서 aspartic proteinase gene에 속하는 단백질(소, 양, 염소, 물소, 아메리카 및 유럽 들소, 말코 손바닥 시슴, 엘크 등 많은 반추동물의 태반엽에서 분리)로서 태반의 용모막과 자궁소구에서 생산되어 모체의 말초혈액중에 출현하며, 자궁내막상피와 점막하조직에서는 인정되지 않았다.
- 소의 임신관련 당단백질(PAG : pregnancy-associated α 2 glycoprotein)의 유전자는 임신 26일령의 태막에서 발현되어 임신초기부터 말기까지의 기간에 태반에서 발현되고 있는 것이 PCR법으로 확인되었으며, 임신 1개월 이후의 조기임신진단에 응용이 가능하다.
- 말초혈액중의 PAG는 임신 20일전후부터 약 1ng/mL의 농도로 검출되어 임신이 진행함에 따라 농도가 현저하게 증가하고 분만의 약 20일전부터 급증하여 분만시에 1~2 μ g/mL의 농도로 최고치에 도달한다는 것이 밝혀졌다. 단태와 쌍태임신우를 비교하면, 쌍태임신우가 혈중 PAG농도가 높고 분만직전의 상승이 보다 급격하다(1997, Takahashi Teshio).

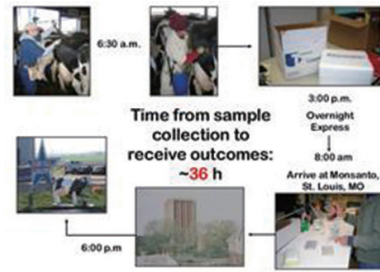
•조기임신진단관련 방법 내역



- ※ 주 1. IFN-T : Interferon Tau(수태산물(임신 14~24일/ 17일 Peak), PGF2α 분비억제에 의한 황체화억제, 발정재발 억제, 수태적절 환경 제공 등)
- 2. CG : Chorionic Gonadotropins(Women 8~11일 ○, Ruminant ×)
- 3. PL : Placental Lactogen : Cattle 3~4월에 가능
- 4. ES : Estrone Sulfate(Cattle 31, 2~4월에 가능, 너무 늦음)
- 5. PAG : Pregnancy Associated Glycoprotein(22일)
- 6. EPF : Early Pregnancy Factor(48시간 가능하나 가양성, 가음성 반응이 너무 많음)



•임신관련당단백질 즉 태반단백질(PAG, Pregnancy-Associated Glycoprotein)키트를 이용한 조기 임신진단을 위한 절차



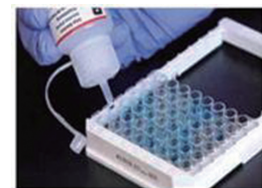
SUNDAY	MONDAY	TUESDAY	WEDNESDAY	THURSDAY	FRIDAY	SATURDAY
	Blood Test for PAG	27 hrs Bleed for Test Results Done	Low AM	Low AM	Low AM	Low AM
					Call AM	Call AM
						Low AM
	Call PM (On line)	Bleed AM (14 hrs)				

*Ovarynch Program: * Sun day: Friday
Bleed day: Monday

- 임신관련당단백질 즉 태반단백질(PAG, Pregnancy-Associated Glycoprotein)키트로 임신진단시 이용된 우유로 검사한 결과 수정 후 33~52일에 99%, 60~74일에 98%의 정확도를 나타냈다.
- 시료를 혈청이나 혈장을 이용시 정확도는 비임신우(100%), 임신우(98.5%), 민감도(특이성)은 비임신우(97.8%), 임신우(100%)로 나타났다.
- 조기임신진단시 이용되는 임신관련당단백질 즉 태반단백질(PAG, Pregnancy-Associated Glycoprotein)농도는 23~25일에 매우 낮으나, 32~37일에 증가되므로 이 시기에 진단하는 것이 정확도를 높일 수가 있다.

6. 국내 조기임신진단검사를 위한 키트 적용 방법 예시

- IDEXX 임신 진단 검사 키트
- ▶태반단백질(PAG) 검출
- ▶혈청 또는 혈장(EDTA) 사용
- ▶수정 28일 후 초기 임신 진단
- ▶2시간 이내 검사 완료
- ▶눈으로 결과 판독



IDEXX Visual Pregnancy Test
Test With Confidence™

- ▶ 동물병원 등에서 사용 가능
- ▶ 임신 초기 진단으로 공태기간 단축 등 경제적 이득
- ▶ ELISA reader, 세척기 등 실험기구 필요 없음

▶ Mini 파이펫 & 1회용 파이펫 팁 포함



* PAG: Pregnancy-associated glycoprotein

IDEXX Visual Pregnancy Test
Test With Confidence™

시약준비	<ul style="list-style-type: none"> • 시약 : 모든 시약은 실온(18~20°C)에 도달하도록 한다. • 세척액 : 10배 희석하여 사용 	
시료 및 대조시약 분주	<ul style="list-style-type: none"> • 시료 : 피펫액 1방울을 잘게 잘라주심 • 시료(혈청 또는 혈장) 및 대조시약 피펫으로 분주(실온에서 30분간 반응 (with cover)) • 3~5회 세척 	
검출액 분주	<ul style="list-style-type: none"> • 검출액 2방울을 잘게 잘라주심(실온에서 30분간 반응) • 3~5회 세척 	
컨쥬게이트 분주	<ul style="list-style-type: none"> • 컨쥬게이트 2방울을 잘게 잘라주심(실온에서 30분간 반응) • 3~5회 세척 	
TMB & 정지액 분주	<ul style="list-style-type: none"> • TMB 2방울을 잘게 잘라주심(실온에서 15분간 반응) • 정지액 2방울을 잘게 잘라주심 	
판독	<ul style="list-style-type: none"> • 무른색 : 임신 • 무색 : 공태 	

이상과 같이 상기 열거한 임신진단법중에 최근 미국이나 유럽 등에서 적극적으로 활용되고 있는 PAG관련 조기 임신진단법을 소개하였는 바, 국내 대동물 임상수의사의 고령화와 젊은 수의사들의 4D(더러운 일(dirty), 위험한 일(dangerous), 힘든 일(difficulty), 꿈과 희망이 없는 일(Dreamless)이나 필자는 대동물 왕진은 원양어업과 동일한 업종으로 사료되어 먼거리(Long-distance)로 대체 언급하였음을 밝혀둡)업종으로 분류되어 기피가 심각한 상황에서 도입 및 활용에 다소 희망적임을 밝혀둔다.

이웃나라인 일본에서는 일부 도입되어 활용되고 있으나, 우리나라도 점차적으로 추후 도입 및 활용이 기대되며, 한우나 젖소에 인공수정 후 신속한 공태우의 검색에 따른 효율적으로 조기에 적극적인 재수정전략을 수립하는 것이 가능하고, 수정간격의 단축과 공태일수의 감소에 따른 번식효율의 향상이 기대된다. ♡