워크숍 초록

초음파 진단기를 활용한 소 난자의 직접 채취법

이병천 · 조종기 · 박종임 · 이강남* · 황우석

서울대학교 수의과대학 · 아산동물병원*

1. 서 론

소 수정란이식 program 에 필요한 수정란의 대량생산법인 과배란 처치법을 대체할 수 있는 방법으로 최근에 초음파 진단기를 활용한 소 난자의 직접 채취법(ultrasound-guided, transvaginal ovum pick-up method; OPU)이 실용화되고 있다. 소에서의 과배란 처치법에 의한 수정란의 생산은 성선자극호르몬인 난포자극호르몬 (FSH) 또는 임마혈청성 성선자극호르몬 (PMSG) 을 사용하여 일시에 다수의 난포발육 및 배란을 유도한 후, 인공수정에 의하여 발생된 수정란을 수술적 또는 비수술적 방법에 의하여 회수함으로 이루어져 왔다(Nicholas와 Smith, 1983). 이러한 과배란 처리법은 20 여년간 지속적으로 연구 발전되어 왔으나 기존의 결과를 획기적으로 개선시킬 수 있는 처리법이 개발되지 않아 한정된 수의 이식가능한 수정란를 생산할 수 밖에 없는 한계성을 가지고 있다(John, 1992).

소에서 OPU기법이 개발되어(Pieterse 등, 1988) 실용화를 위한 연구들이 수행되고 있다(Scott 등, 1994; Meintjes 등, 1995). OPU에 관한 연구로 송아지(Fry, 1995; 이 등, 1996) 성우(Pieterse 등, 1992; Scott 등, 1994), 임신우(Meintjes 등, 1995; Guyader 등, 1997) 및 저수태우(Looney 등, 1994)에서 난자 채취 및 채취효율을 증진시키려는 노력이 있었으며, 말(Brück과 Greve, 1994)에서도 시도된바 있다. 공란우로서 고능력의 임신우를 상정하여 볼 때 생식생리학적으로 임신 중에는 수정란의 채취가 불가능하나 OPU 기법의 경우에는 임신시에도 일정기간 난자를 채취할 수 있다는 장점이 있다. 특히 OPU는 동일한 개체에서 반복적으로, 안전하게 미성숙 난자를 채취하여 체외성숙 및 체외수정을 통한 수정란을 생산할 수 있는 가능성을 제시한다. 이러한 OPU 가 실용화 수준에 도달되면 동물의 생식주기의 인위적 이용 및 새로운 개념의 번식 program 의 확립에 기여할 것이다. 즉, 실험실에서의 수정란

의 생산은 복강경이나 직접 수술에 의해 회수 또는 도축장 유래 난소에서 채취된 미성숙 난자를 사용하고 있으나 각각의 방법은 수술 후 발생할 수 있는 공란우의 경제성 감소 및 동일한 개체에서 반복적인 미성숙 난자의 채취가 불가능하다는 단점을 지니고 있다. 따라서, OPU 가 이용되어진다면 공란우에서 발생할 수 있는 경제성 감소의 방지 및, 우량형질을 가진 동일개체에서 연속적으로 난자의 채취가 가능하여지는 이점등이 상정될 수 있다.

이러한 OPU기법을 체외배양 체계와 연결시키면 기존의 과배란 처리법의 개선이 기대되어진다. 즉, 수술적방법에 의한 수정란 회수법과 도축장유래 난소에서 미성숙난자의 채취후 체외배양을 실시하는 방법의 장점들은 유지한채 단점을 보완한 우수한 방법으로 OPU 가 발전되어질 수 있다. 소에서 처음으로 OPU 기법이 개발된 이래로(Pieterse 등, 1988), 실용화를 위한 연구들이 현재 활발하게 수행되어지고 있다(Meintjes 등, 1995). 국내에서도 OPU에 의한 수정란의 생산 기법이 소개 되었으며(이 등, 1996), 효율성을 증진시키기 위한 연구로 채취 시기 및 bST 처치 영향에 관하여(이병천 등, 1997), 과배란 처리 후 미성숙 난자의 채취(이효종 등, 1997) 및 OPU 기본 기술의 개발(최 등, 1997a, 1997b) 에 관한 연구가 있었다.

정상 생식주기 중의 소에서는 한 발정주기 중 지속적인 난포의 성장과 폐쇄가 보인다(Pieterse 등, 1991a). 또한 임신 전반 ⅓ 기에는 주기적인 비 배란성 난포의 성장이 출현됨이 이미 알려져 있다(이병천 등, 1997). 또한 임신우에 외인성 성선자극호르몬을 투여시 ovarian response 의 반응이 있으며, 임신된 도축우의 난소로부터 정상 생식주기의 소보다 많은 수의 질 좋은 미성숙 난자를 얻을 수 있었으며, 체외성숙 및 체외수정을 실시한 결과 수정란의 생산에는 차이가 없었다고 하였다(Moreno 등, 1993). OPU 기법을 활용한 미성숙 난자의 채취는 정상 생식주기의 소뿐만 아니라 임신 중의 소에서도 가능한 것으로 알려져 있다(Meintjes 등, 1995).

따라서, 본 workshop에서는 초음파 진단기를 이용한 소 난자를 직접 채취하고자 한다. 초음파 진단기를 이용한 소 미성숙난자의 채취법은 축산선진국에서도 1988년부터 착안되어 이용 효율 및 채취효율을 높이기 위한 연구가 진행되어 왔다. 이러한 과정에 적합한 방법의 국내 개발은 축산 선진국의 실정과 또다른 여건의 지역성(Location Specific Biological Characteristics)을 감안할 때 국내 실정에 맞는 개발된 기술을 소개하고자 한다.

2. OPU 기법

가. 선발기준 및 공란우의 처리

임상적 검사 및 혈액·혈청학적 검사에 의해 건강하다고 인정되고 직장검사를 통하여 난소와 생식기도에 이상이 없으며 2회 이상 정상 발정주기를 보이는 경산우 및 미경산우를 선발한다. 발정주기동안 2일에서 3일 간격으로 직장을 통해 초음파로써 난소의 활력 및 생식기도의 이상유무를 검사하여 정상인 개체만을 공란우로 최종 선발한다. 또한 필요시에는 난포의 발육을 촉진시켜 공란우의 효율을 증진시키기 위해 FSH 및 eCG를 처치 할 수도 있다. 일주일에 1회 채취시 선발된 공란우는 발정주기 4, 10, 16일에 미성숙 난자의 직접 채취를 실시하기 위해 미리 FSH 및 eCG를 처치한다. FSH(Super-OV® 25 IU)은 12시간 간격으로 3일간 6회 근육주사하며, 처치 종료 12시간 후에 미성숙 난자를 흡입한다. 또한 eCG(1000IU)는 근육주사하고 72시간 후 미성숙 난자를 흡입한다.

배란전의 소 난포의 발육을 촉진시키는 것으로 알려진 bST를 병용처치 할 수도 있다. 국내에서 개발된 bST(BOOSTIN-S, LG Chem, Korea) 500mg을 10일 간격으로 주사하여 소 난포의 발육을 촉진한다.

나. 초음파유도에 의한 미성숙난자의 흡인

초음파유도에 의한 미성숙난자의 흡인은 Pieterse 등(1991b), Bols 등(1995), Bols 등(1997) 및 이 등(1997)의 방법을 응용하여 실시하였다. 공란우를 보정틀에 고정시킨다. 공란우와 보정틀 사이에는 cushion을 설치하여 움직임을 최소화한다. 목장에 보정틀이 없을 경우에는 stanchion에 공란우를 보정하고 다음과 같이 진정을 시켜 OPU를 수행 할 수 있다. 공란우는 2% Lidocaine 5 ㎖로 경막외마취를 실시하고 진정을 위해 2% xylazine 0.25 ㎖/100 ㎏의 용량으로 미정맥을 통해 주사한다. xylazine의 투여 후 외음부의 세척 및 소독을 실시 하는 동안 공란우는 진정되어 OPU를 종료하는 약 20분간은 충분히 진정된 상태를 유지한다.

외음부 세척 및 소독을 위해 2% chlorhexidine으로 깨끗이 닦은 후 물기를 제거하며, 꼬리를 묶어 고정한다. 미성숙 난자 흡인은 일회용 주사침(TERUMO®, Japan)또는 55 cm 주사침(Cook®, Australia)을 사용, 주사침과 튜브의 여분의 공간을 줄이고 채취되는 난자에 적합한 환경을 조성하기 위해 흡인용 배지(PBS, 2% fetal calf serum, 0.2% heparin)를 주사침 및 흡입관 내에 충진한다. 채취를 용이하게 하기 위해서 needle guide가 장착된 transducer holder를 준비한다. 초음파진단기는 convex scanner(6.5 ㎒, Medison, Korea)

또는 sector scanner(5.0 or 7.5 ㎒, Pie-Medical, Netherlands)를 사용할 수 있다(그림 1). 직장을 통해 자궁을 끌어당기며 난소를 견인하여 transducer와 최대로 직면할 수 있도록 위치시킨다. 초음파상에서 난포를 확인한 후 needle을 삽입하여 monitor상의 puncture line이 난포를 횡절단할 수 있도록 난포를 위치시킨다. Aspiration Needle로 질벽을 관통하여 복강내에 들어가 난소의 난포를 천자한후 난포내에 주사침이 들어간 것이 확인되면 regulated vacuum pump를 foot switch로 작동시켜 미성숙난자가 포함된 난포액을 흡인한다. 난포 내에 주사침의 끝이 위치된 것을 확인 후 펌프를 작동하여 채취하였으며, 초음파상에서 확인되는 직경 2-3 ㎜ 이상의 모든 난포를 흡입한다. 난포가 collapse될 때까지 계속적으로 흡입하며 puncture needle의 끝이 난포벽에 닿아 음압이 차단될 때까지 실시한다. 이때 주사침을 난포강내에서 한바퀴 회전시켜 주사침의 입구와 반대각도에 있을지도 모르는 미성숙 난자를 흡인한다. 흡입후 needle 내에 잔류된 난포액 회수를 위해 aspiration medium으로 세척한다. 흡인용 주사침과 vacuum pump 사이에는 수정란 필터를 장착하여 난자가 포함된 난포액이 모아지게 위치시켰다. OPU시에 발생할 수 있는 혈액은 필터를 장착함으로써 효과적으로 제거할 수 있다. 목장에서 실험실까지 난자의 운반은 충전지가 장착된 portable incubator를 이용하였다(그림 2).

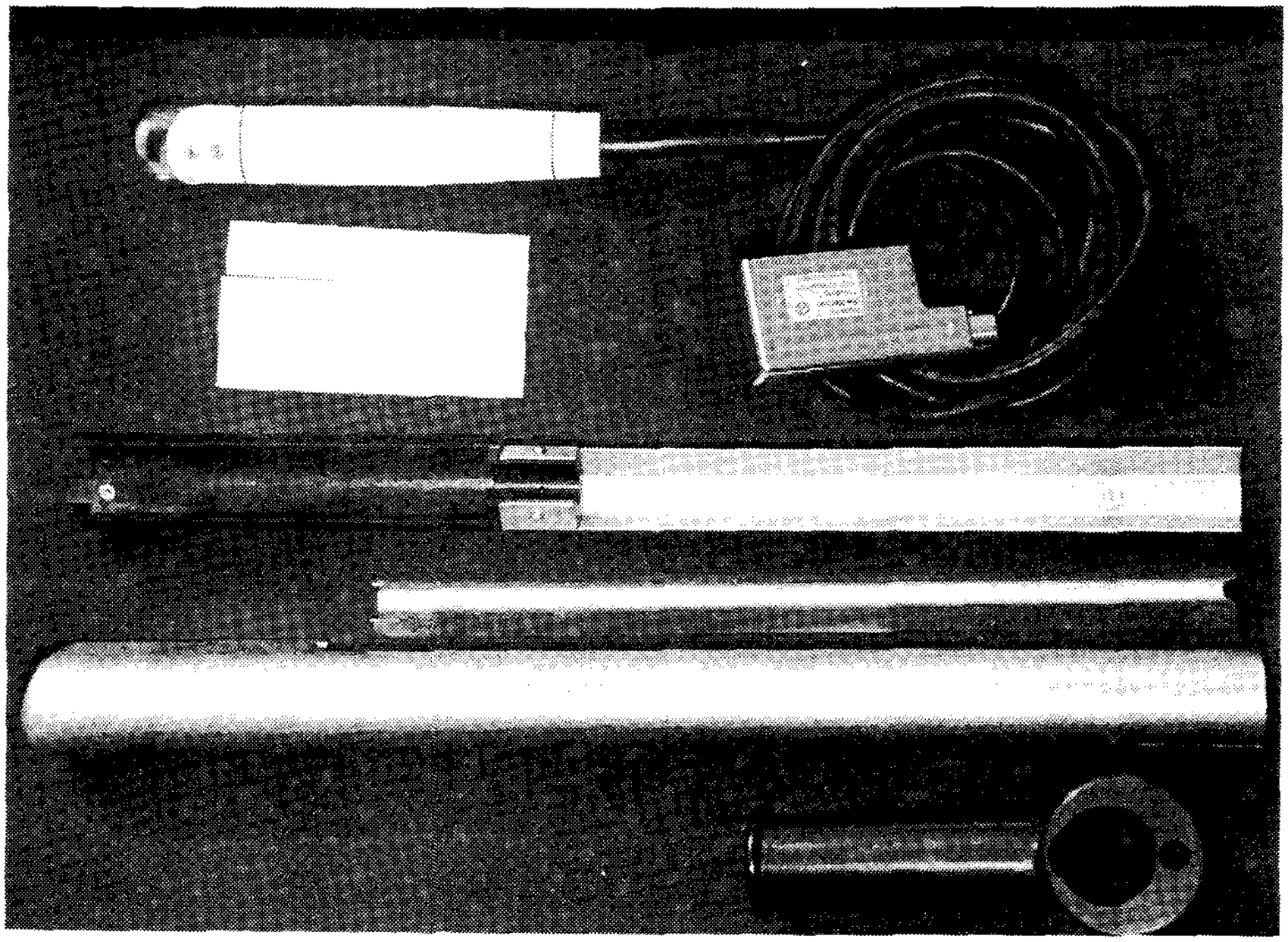

Figure 1. OPU equipment.

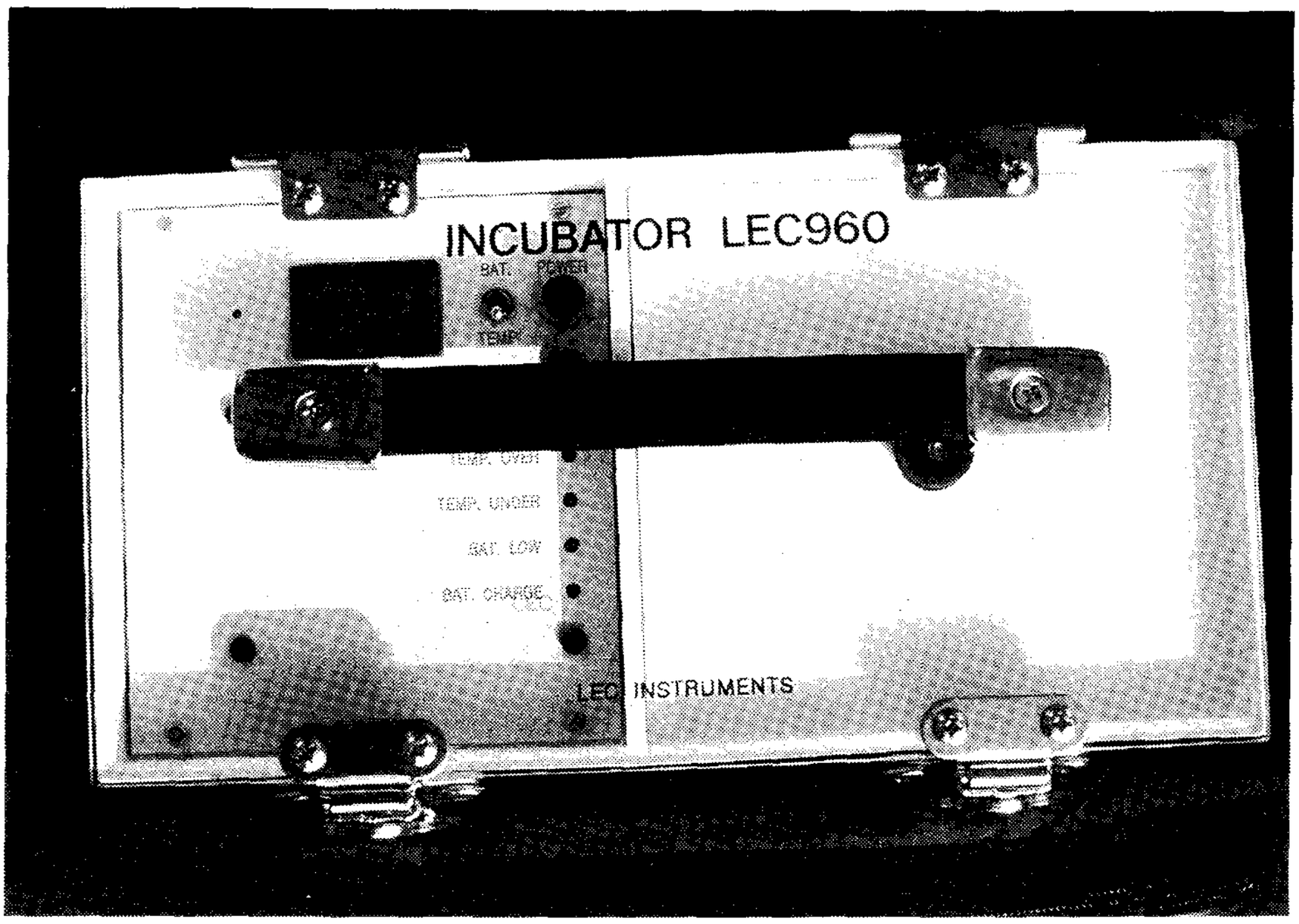

Figure 2. Portable incubator.

3. 참고문헌

1. Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A. and de Kruip A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow : A new disposable needle guidance system. Theriogenology, 43:677-687.
2. Bols PEJ, Ysebaert MT, Lein A, Coryn M, Van Soom and de Kruif A. 1997. Effects of long term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield during an OPU-IVF program : In Transvaginal ovum pick-up in th cow : Technical and biological modifications(Thesis). Universiteit Gent., 155-173.
3. Brück I and Greve T. 1994. Transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicular fluid in the mare. Theriogenology, 41:170 abstr..
4. Fry RC. 1995. Transvaginal Oocyte Recovery in cows and Calves Proceedings of the Twenty-seventy annual conference. Australian society for Reproductive biology, 3.

5. Guyader Joly C, Ponchon S, Thuard JM, Durand M, Nibart M, Marquant-Le Guienne B and Hombolt P. 1997. Effects of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and in vitro embryo production in pregnant heifers. Theriogenology, 47:157 (Abst.).
6. John FH. 1992. Reproductive technology and genetic improvement. Dairy Sci, 75:2857-2879.
7. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. Theriogenology, 41:67-72.
8. Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB and Godke RA. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in vitro fertilization. J. Anim. Sci., 73:967-974.
9. Moreno JF, Flores-Foxworth G, Westhusin M and Kraemer D. 1993. Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated post-mortem. Theriogenology 39:271(Abstr.).
10. Nicholas FW and Smith C. 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. Animal Production, 36:341.
11. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM and Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during trasvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology, 30:751-762.
12. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Willemse AH and Taverne MAM. 1991a. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. Theriogenology, 35:401-413.
13. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willemse AH and Taverne MAM. 1991b. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. Theriogenology, 35:19-24.
14. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willemse AH and Taverne MAM. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows. Theriogenology, 37:273.
15. Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Paterson C and Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. Vet. Rec., 134:440-443.
16. 이병천, 윤기영, 김현일, 노상호, 이강남, 황우석. 1997. 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 II. 발정주기, 계절 및 bST 처치 영향에 관하여. 대한수의학회지, 37(4):917-924.

17. 이병천, 이강남, 김남렬, 황우석. 1996. 송아지 난소에서 초음파 유도에 의한 한우의 미성숙난자 채취시에 bST-FSH 처리효과에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 11(2):103-109.
18. 이효종, 강태영, 조성근, 박준규, 손우진, 최민철, 최상용, 박충생. 1997. 과배란처리 한우에서 초음파 유도에 의한 난자채란에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 12(2):195-202.
19. 최민철, 강태영, 조성근, 최상용, 손우진, 이효종. 1997. 초음파유도 난포란 채취를 위한 기본 기술의 개발 Ⅰ. 초음파상에 나타난 한우 난소, 난포 및 황체의 크기 측정. 한국수정란이식학회지, 12(2):203-210.
20. 최민철, 강태영, 조성근, 최상용, 손우진, 이효종. 1997. 초음파유도 난포란 채취를 위한 기본 기술의 개발 Ⅱ. 소의 마취방법과 채란기구의 개발