

개 인공수정

공 일 근

순천대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

I. 서론

경제성장과 더불어 핵가족화의 가속화 및 개인주의 팽배로 인한 반려동물로서 애완견사육이 증가하고 있다. 그러나 애완견의 올바른 사육환경과 번식기술의 부족으로 고급품종 애완견의 수요·공급 불균형을 초래하면서 애완견의 교미번식을 위하여 외국에서 종견수입이 날로 증가하고 있다. 우수한 종견의 이용효율을 향상시키고 국내의 애완견수준을 한 단계 높일 수 있는 방법은 인공수정의 보급과 이를 이용한 애완견의 생산체계의 구축이라고 단정하고 싶다. 인공수정을 이용한 번식기술은 이미 가축에서 그 효율이 증명되어 있지만 애완견에서는 아직까지 실용화되지 못하고 있다. 왜냐하면 애완견의 인공수정에는 해결되어야 할 몇 가지 중요한 문제점, 즉, 1) 자궁내 인공수정기구 및 인공수정기술의 개발, 2) 완벽한 동결정액의 제조기술 정립, 3) 정확한 인공수정적기의 판단기술 정립, 4) 동결정액의 체계적인 수급문제, 및 5) 채취 총 정자수의 불충분 등으로 판단하고 있다.

또한 동결정액의 제조기술의 정립은 우리고유의 유전자원의 보존과 더불어 새로운 육종방법의 개발 및 동결정액을 이용한 인공수정기술의 개발로 고가의 애완견수입 대신 동결정액의 수입과 이를 이용한 인공수정으로 효과적으로 종견을 생산할 수 있을 것이다.

따라서 본 강좌에서는 개 인공수정의 실용화를 위한 관련된 분야의 기술적인 문제에 대하여 논하고자 한다.

II. 자궁내 인공수정기술

1. 암캐의 생식기관구조의 특징

암캐의 생식기구조의 가장 특징적인 것은 질과 자궁의 모양일 것이다(Fig. 1-1, Fig. 1-2). 질은 외음부에서 자궁경관에 이르는 모양이 활과 같이 굽어있어 쉽게 자궁경관을 관찰하거나 조작할 수 없는 구조로 되어있다. 질내주입에 의한 인공수정 시에는 정액의 역류방지를 위해서 후구를 약 20-30 Cm 정도 높여주는 자세를 약 10분 정도 취해주는 것이 정액의 자궁내 진입을 도울 수 있을 것이다. 자궁경관과 질원개의 특이한 구조로 자궁내에 정액을 직접 주입하기가 쉽지 않다. 자궁경관이 질에서 자궁쪽으로 대각선방향으로 향하고 있기 때문에 주입기구의 조작 시 이러한 자궁경관의 구조적 특성을 충분히 파악할 필요가 있다. 자궁경관의 길이가 보통 약 0.5-1.0 Cm 정도이고 추벽이 없다. 그러나 애완견의 경우 자궁을 비롯한 생식기관의 크기가 적고 조직이 약하기 때문에 조작에 특별한 주의가 요구된다.

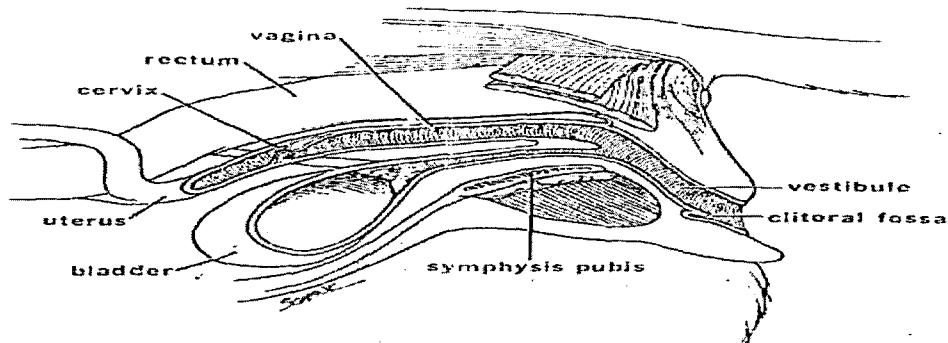


Fig. 1-1. Morphology of reproductive system in female dog.

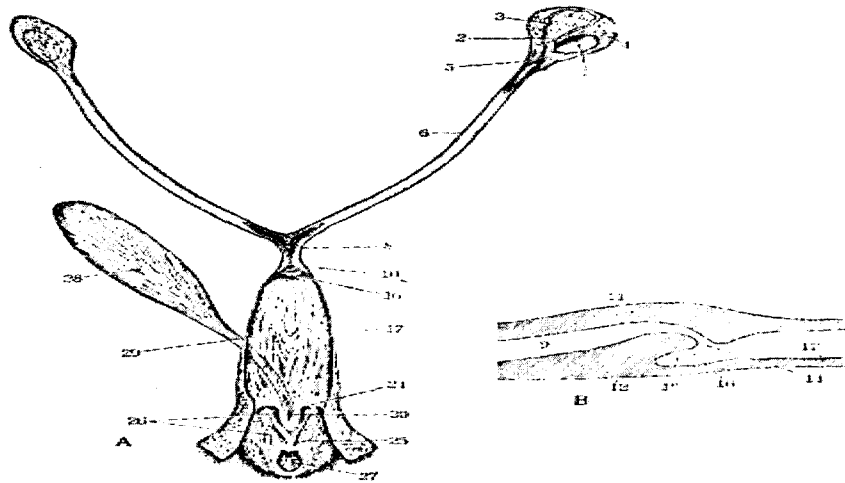


Fig. 1-2. Morphology of reproductive system in female dog.

2. 다양한 자궁내 인공수정기구

자궁내 인공수정기구는 세계적으로 현재까지 개발 이용되고 있는 기구는 많지 않다. Fougner's 인공수정기구(Fougner 등, 1973), 내시경을 이용한 인공수정기구 (Concannon과 Battiata, 1989) 및 Kong's 인공수정기구 (공 등, 2000) 이 개발되었다. Fougner's 기구는 자궁경관의 확인이 불가능하고 실제 이용하는 데는 많은 노력과 훈련이 요구된다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 내시경을 이용한 인공수정기구가 개발되었는데 이것은 장비의 구입비가 약 천만원 정도 소요될 뿐만 아니라 자궁경관을 확인하고 자궁경관통과를 위한 플라스틱 catheter의 조작이 용이하지 않다는 불리한 점이 있어 실용화되지 못하고 있는 실정이다.

본 연구실에서는 이러한 점을 해결하고 사용하기에 편리 할 뿐만 아니라 저렴하게 이용할 수 있는 자궁내 인공수정기구를 개발하게 되었다(Fig. 2). 질경이용으로 자궁경관입구 및 질내부를 관찰 할 수 있을 뿐만 아니라 질경 끝부분을 자궁경관의 모양과 유사하게 제작하여 자궁경관의 촉진과 확인이 용이하게 제작하였다.

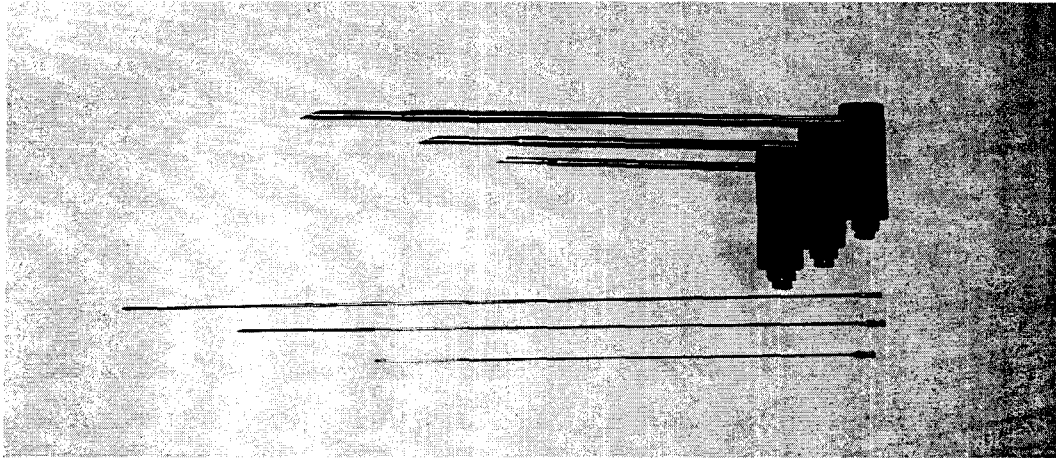


Fig. 2. Kong's intrauterine inseminator (Kong et al., 2002).

3. 인공수정 시 개의 보정

개의 생식기 구조상 인공수정기구의 주입이 용이하지 않기 때문에 암개의 후구를 약 20-30 Cm 높여서 활과 같은 구조의 질을 최대한으로 일직선상의 모양으로 맞추어 준 후에 인공수정기구를 질내에 주입하는 것이 최선의 방법일 것이다. 인공수정을 위해서는 후구를 높여줄 수 있는 보정대를 고안하여 이용하는 것이 편리한 방법일 것이다. 또한 발정개의 갑작스런 공격에 대비하여 입마개 또는 입을 묶어서 물리는 사고가 발생하지 않도록 주의를 요한다.

Ⅲ. 인공수정적기의 판단

1. 개의 발정주기 및 배란시기

개의 발정주기는 다른 가축과 달리 매우 특이한 생리구조와 발정주기를 나타낸다. 그림 3에서 보는 바와 같이 정확한 배란시기를 판단하기 위해서는 여러 가지의 조사에 의하여 판단할 수 있다. 그러나 그 어느 것도 100% 정확한 방법은 없으며 임상적으로 이용하기 위해서는 가장 편리하고 근사치의 배란시기를 판단할 수 있는 방법을 찾아야 할 것이다. 일반적으로 progesterone 농도 (5 ng)에 의한 판단이 가장 정확한 방법으로 알려져 있으나 이 방법을 이용하

기 위해서는 progesterone kit (Status-pro, International Canine Genetics, USA)를 구입해야 함으로써 경제적인 문제가 있다. 그리고 질 상피세포의 각 질화 정도에 의한 판단은 정확도가 떨어지는 방법적인 문제점을 안고 있다. 그 외에 이용할 수 있는 방법은 초음파에 의한 난포 및 배란점의 관찰방법이 있는데 이는 초음파검사를 위하여 애완견의 복부의 털을 깎아야 하는 문제점이 있어 축주가 애완견(미견)의 털제거를 원하지 않을 경우에는 이용이 불가능한 단점이 있다. 마지막으로 정관결체수술을 받은 수캐를 이용하여 수캐를 받아들이는 자세를 취하는 경우 수정적기로 판단하는 방법과 외음부의 색깔과 모양 등으로 판단하는 경험적인 방법을 들 수 있을 것이다.

일반적으로 외음부 출혈 후 약 10-13일에 걸쳐 배란이 일어나며 배란 후 약 2일정도 난관 내에서 성숙과정을 거쳐 정자와 수정이 일어난다. 개는 다태 동물로서 배란되는 난자의 숫자가 많은 관계로 1회 수정으로 바라는 만큼의 충분한 수정이 일어날 수 없으므로 2-3회 정도 수정을 실시한다. 이때 자연교미가 아닌 동결정액을 이용한 인공수정 시에는 동결·용해된 정자의 생존율과 생존기간이 짧음으로서 정확한 인공수정시기를 판단하는 것이 무엇보다도 중요하다 할 수 있을 것이다. 또한 질내주입 시에는 정자의 생존조건이 자궁내 보다 불리한 조건이기 때문에 자궁내 인공수정방법의 이용이 효과적이라고 판단된다.

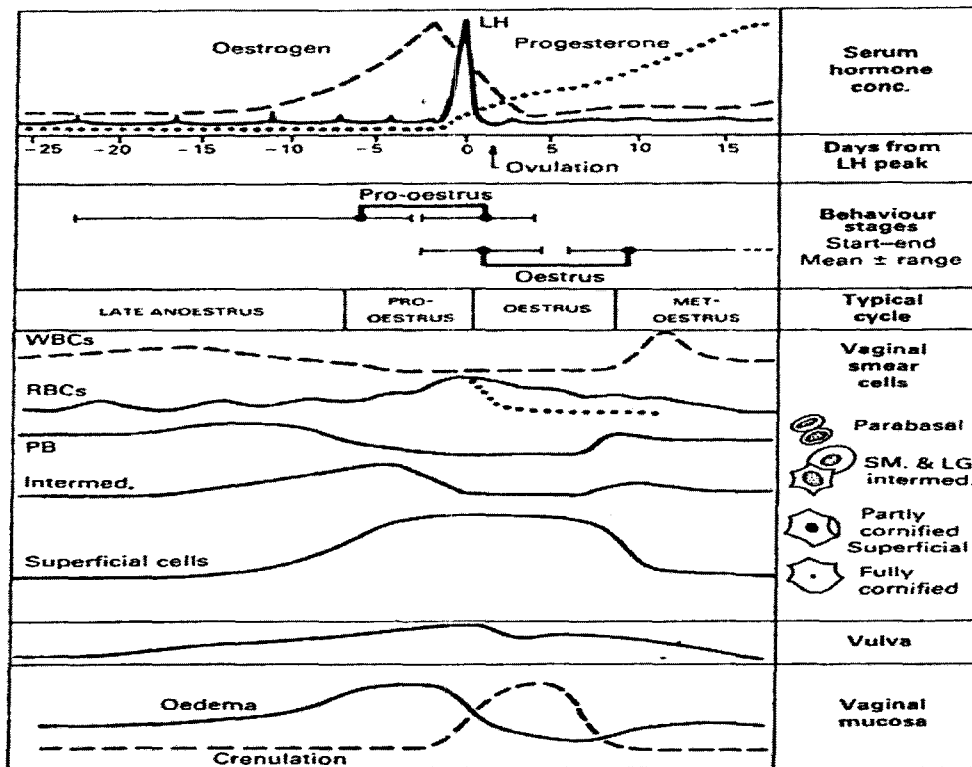


Fig. 3. A schematic summary of the temporal relationships among the periovulatory endocrine events, behavioural and vulval changes, and changes in vaginal smears during prooestrous, oestrus and early metoestrus in the bitch (Concannon and Lein, 1989).

2. 질상피세포의 각질화에 의한 판단

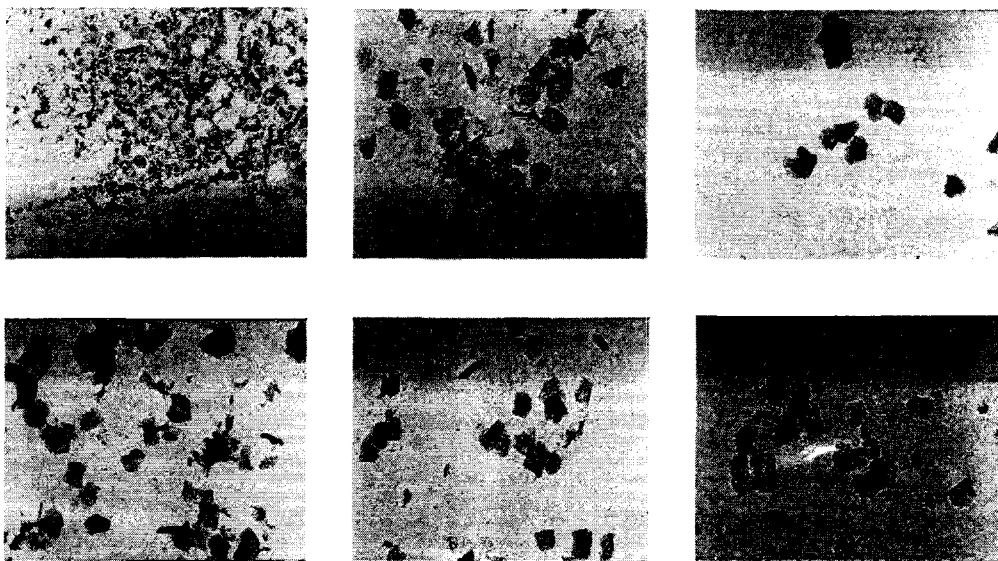
Fig. 3에서 보는 바와 같이 estrogen의 농도가 낮아짐과 동시에 질상피세포들의 각질화가 진행이 가속화되어 배란시기 및 estrus 시기 등을 판단할 수 있는 근거를 제공하고 있다. 임상적으로 가장 널리 이용되고 있는 방법은 정확성은 다소 떨어지나 편리하게 이용할 수 있는 방법으로서 그 가치를 인정받고 있다 하겠다. 일반적으로 각질화의 정도가 약 50-60% 진행되고 핵의 크기가 줄어드는 시기라면 수정적기로 판단할 수 있을 것이다 (Fig. 4).

○ Cornified cells:

- Anuclear squames : superficial cells과 닮은 큰 세포로서 핵이 염색되지 않아 핵이 없는 것같이 보인다.
- Superficial cells: 무정형의 경계선을 가진 큰 세포, 작고 짙게 농축 염색 됨.

○ Noncornified cells:

- Intermediate cells: 풍부한 세포질과 크고 잘 발달된 소낭같은 핵을 가진 둥근 모양의 세포로서, 작고 큰 중간세포들로 분할된다.
- Parabasal cells: 불규칙중간세포로서 가장 작은 정상적인 상피세포같이 보인다. 이들 세포는 중간세포들보다 둥글며 길고 더욱더 짙게 염색되며 크고 잘 염색되어 명확한 핵을 포함하고 있다.
- Metestrus cells: parabasal cells의 변형으로서 그들의 세포질에는 호중구 포함



Day 1	Day 9	Day 10
Day 11	Day 13	Day 15

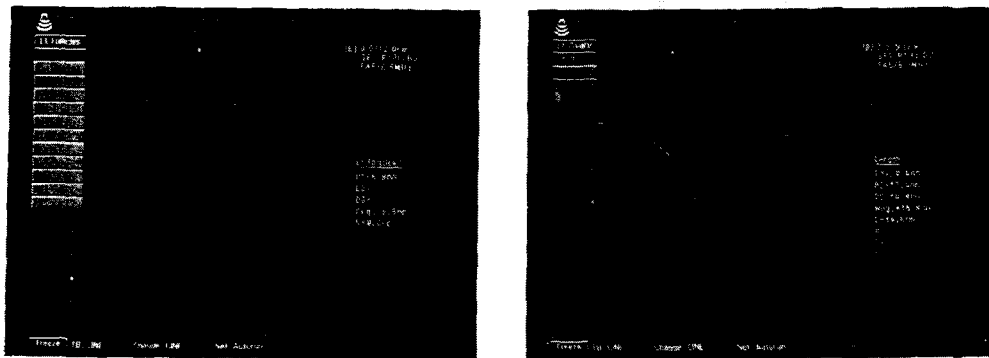
Fig. 4. Changes of vaginal cytology.

3. 호르몬농도

발정개의 혈중호르몬 농도변화에 따른 배란시기 및 수정적기의 판단은 정확한 방법중의 하나이다. 일반적으로 progesterone의 혈중농도가 5 ng 이상일 때 수정적기로 판단하여 1차수정을 실시하고 이후 48시간 후에 2차수정을 실시한다. LH surge 후 약 48시간 후에 배란이 일어나기 시작하며, 배란 후 약 48시간 동안 체외성숙기간을 거친 후 수정을 하게 된다. 혈중 progesterone을 측정하기 위해서는 Status-Pro kit(Synbiotics, USA)를 사용하여 측정할 수 있다. 이는 호르몬의 농도에 따른 색깔의 변화를 관찰함으로써 판단할 수 있는 간단한 kit이다. 그러나 이를 이용하기 위해서는 kit를 구입해야하는 비용문제와 개체차이에 의한 정확도의 문제는 해결해야할 것이다.

4. 초음파를 이용한 수정적기의 판단

초음파를 이용한 배란 및 수정적기의 판단방법은 가장 정확한 방법일 수 있다(Fig. 5). 즉, 발정주기에 따라 난소를 관찰함으로써 난포형성과 배란에 의한 난포변화를 알 수 있다. 해부학적으로 난소는 kidney의 바로 뒤쪽에 위치해 있어 kidney를 먼저 관찰하고 바로 뒷부분을 조사하면 난소의 위치를 정확하게 발견할 수 있다. 개의 난소는 비발정기에는 난소피질에 전혀 난포의 생성이 이루어지지 않고 있다가 발정기에 난포를 형성함으로써 발정개의 난포를 초음파의 화상에서 쉽게 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 난포발육과 대난포 및 출혈체항체 등을 확인할 수 있어 배란일자와 수정적기를 판단할 수 있다.



(A) graafia follicle

(B) Ovary

Fig. 5. Detection of graafian follicle in estrus dog for AI with ultra-sonograph.

IV. 동결정액 제조

1. 정액채취

개의 정액채취는 수압법에 의한 채취가 가능하다. 즉 구선(bulbus glandis)에 압력을 가함으로써 정액을 채취하는 방법으로서 약 5-10분동안 5-10 ml 정도의 정액을 채취할 수 있다. 개의 사정은 1, 2, 3차 fraction으로 사정을 하는데 1차 및 3차에는 정자농도가 거의 없으며, 2차 fraction에서 농후한 정자를 얻을 수 있다. 정자농도는 약 1-5억 정도의 총 정자수로서 개체차이가 있지만 경제적으로 이용하는데 많은 문제점이 있다. 정액채취 시 고려해야 할 사항들을 정리하면 다음과 같다.

- ① 표피부분의 털을 깎고 생리식염수로 깨끗하게 닦아주어 오염을 줄인다.
- ② 정액채취장소는 일정한 온도를 유지하는 청결한 장소에서 행한다.
- ③ 정액채취 용기는 50 ml tube에 온도변화를 방지하기 위해 온수가 담겨있는 병을 이용하고 입구에는 깔대기를 설치하여 정액누출을 방지한다.
- ④ 채취장소는 직사광선을 피할 수 있는 곳에서 한다.
- ⑤ 정액채취는 약 5-10분 정도 사정시간 소요된다.
- ⑥ 정액채취를 위해서 끼는 일반적인 polyglove는 뒤집어서 착용한다.
- ⑦ 채취한 정액은 가능한 빠른 시간내에 1차희석액에 희석을 시켜야 한다.
- ⑧ 정액의 급격한 온도변화를 최소한으로 유지한다.

2. 동결정액 희석액

동결정액 희석액은 정자의 생존기간연장과 양적증대 및 적정 삼투압 등을 유지시키기 위한 물질들을 첨가하여 제조하게 된다. 난황 등에는 lecithin과 같은 냉각감작에 의한 손상을 방지하는 물질이 함유되어 있어 온도변화에 대한 내성을 갖도록 한다. 여기에서 동결정액을 제조하기 위해서는 동결보호제로서 glycerol 등을 적정농도로 첨가하여 동결·융해과정에서 세포내외에 결빙형성을 방지함으로써 세포의 파괴 및 손상을 막는다.

동결정액 희석액으로는 Tris-buffer가 가장 일반적으로 이용되고 있어 이의 성분과 함유량 등을 소개하고자 한다(Table 1). 여기에서 이용된 각 성분들은 영양물질 (glucose, egg yolk 등), pH 조절 (citric acid), 항생물질 (Na-benezylpenicillin, Streptomycin sulphate), 항동해제 (glycerol) 및 운동성 증가

(Equex STM paste)로서 구성되어 있다. 정자의 생존성에 절대적인 영향을 미칠 수 있는 요인들 중에서 pH, 삼투압, 온도, 농도 및 빛 등으로서 희석액에서 해결할 수 있는 부분들인 pH, 삼투압 등을 철저하게 준수해야 한다. 이렇게 제조된 희석액은 1회사용 시 필요한 용량으로 분주하여 냉동시켜 이용할 수 있다.

Table 1. Composition of Tris-buffer extenders for canine semen freezing

Compounds	Extender I	Extender II
Tris	3.028 g	3.028 g
Citric acid, monohydrate	1.678 g	1.678 g
Glucose or Fructose	1.0 g	1.0 g
Na-benzylpenicillin	0.06 g	0.06 g
Streptomycin sulphate	0.1 g	0.1 g
Egg yolk	20 ml	20 ml
Glycerol	-	8 ml
Equex STM paste	-	1 ml
D.W.	to 100 ml	to 100 ml
pH	6.53	6.48
Osmolarity	280 mOsm/kg	1370 mOsm/kg

(Rota et al., 1997)

3. 동결 · 용해방법

채취한 정액의 동결 및 용해과정에서 가장 주의해야 할 점은 정액의 갑작스런 온도변화를 가하지 않는 것이다. 채취한 정액성상을 관찰 후 생존성 및 농도 등을 조사하고 동결보존을 수행할 것인가를 먼저 판단한 후에 가능하다면 희석액 I에 적정농도로 희석하여 희석된 정액이 함유된 tube를 500 ml beaker에 증탕으로 담아서 5℃ cold room에서 5℃까지 약 2시간에 걸쳐 냉각을 실시한다. 5℃까지 냉각 후 같은 온도와 용량의 희석액 II를 10, 20, 30 및 40%의 용량으로 10분간의 간격으로 약 1시간에 걸쳐 희석액 I에 첨가희석을 유도한다. 희석액 I, II의 완전한 희석 후 스티로폼에 그물망을 설치하여 액체 질소의 증기에 의하여 예비동결 및 동결을 실시한다(Fig. 6).

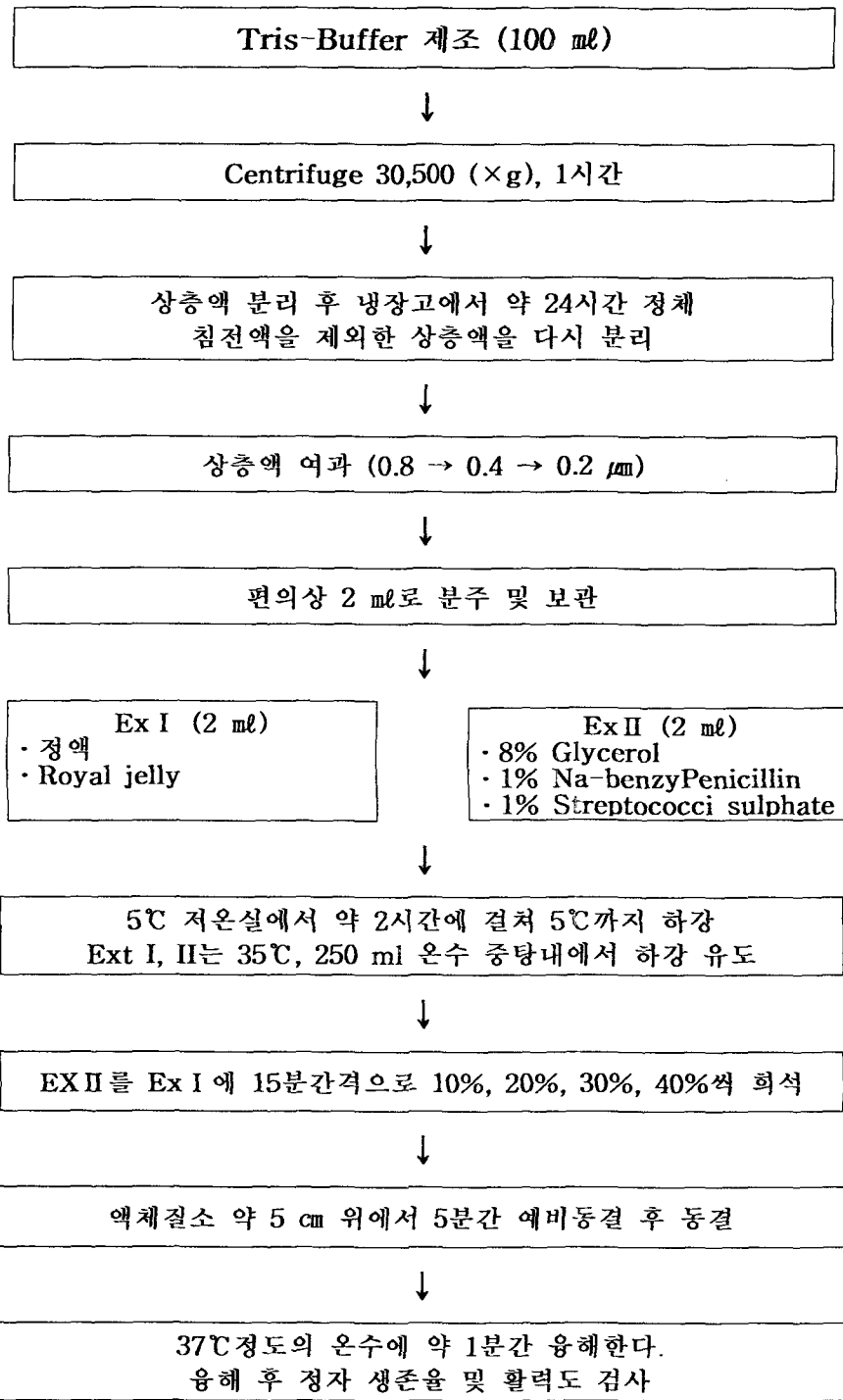


Fig. 6. Procedure of frozen semen.

4. 정자농도의 조절

채취한 정액농도는 개체와 채취빈도 등에 따라 다르기 때문에 채취 시 농도검사를 해야한다. 인공수정 시 정자농도는 수정술에 직접적인 영향을 미치는 것이기 때문에 정확한 농도계산은 대단히 중요한 부분으로서 5,000만 /straw의 농도로 제조 이용하고 있다.

V. 수태율에 미칠 수 있는 요인들

인공수정에 직접적인 영향을 미칠 수 있는 요인들(동결정액의 생존율, 정자농도, 수정방법, 수정적기판단, 번식기질병) 중에서 가장 중요한 몇 가지의 예를 들고 이들에 관련된 현재까지 보고된 외국의 자료들을 살펴봄으로서 우리들의 예상결과를 유추해볼 수 있을 것으로 판단된다.

Table 1. Fertility data from 141 vaginal AIs using frozen-thawed dog semen presented in relation to the number of AIs performed per estrous cycle (Mean±SD)

No. of AIs/cycle	No. of AIs	Interval to whelping		Whelping rate(%)	Litter size	Male pups (%)
		from 1st AI	from last AI (days)			
1	23	61.6±1.9	-	34.8	2.5±1.3	57.5±41.7
2	60	61.9±2.2	60.5±1.9	60.0	3.4±2.4	50.9±33.8
3	36	63.7±2.8	60.6±2.0	63.9	5.1±3.1	49.7±29.5
4	17	62.8±2.2	58.1±1.3	70.6	5.0±2.9	46.1±15.4
5	5	66.8±4.1	61.5±4.2	80.0	3.3±2.2	25.0±28.9

(Linde-Forsberg et al., 1999)

Table 2. Fertility data for 327 AIs using frozen-thawed dog semen in relation to semen deposition site (Mean \pm SD)

Site of semen deposition	No. of AIs	Whelping rate (%)	Interval to whelping from 1st AI from last AI (days)		Litter size	Male pups (%)
Intrauterine using Norwegian catheter	167	84.4	61.2 \pm 2.1	60.0 \pm 1.6	5.4 \pm 3.0	53.9 \pm 25.3
Vaginal	141	58.9	62.7 \pm 2.7	60.2 \pm 2.2	4.0 \pm 2.7	49.3 \pm 31.1
Intrauterine using fiberoptic endoscopy	19	57.9	61.7 \pm 2.3	60.5 \pm 1.2	6.0 \pm 2.1	66.7 \pm 20.7

(Linde-Forsberg et al., 1999)

Table 3. Whelping rate and litter size after vaginal AI and intrauterine AI using the Norwegian catheter (NIU) in relation to total number of spermatozoa (up to 400x10⁶) inseminated (Mean \pm SD)

Total number of spermatozoa (x10 ⁶)	Vaginal AIs			NIU AIs		
	Number of AIs	Whelping rate (%)	Litter size	Number of AIs	Whelping rate (%)	Litter size
≤ 100	7	28.6	3.5 \pm 2.1	8	100.0	3.0 \pm 2.0
101-200	24	45.8	2.8 \pm 2.1	31	90.3	4.8 \pm 3.0
201-300	24	50.0	4.5 \pm 2.0	30	77.4	5.3 \pm 2.5
301-400	19	63.2	4.5 \pm 3.2	21	76.2	6.4 \pm 3.9

(Linde-Forsberg et al., 1999)

Table 4. Birth fertility after natural service or artificial insemination with fresh or frozen semen (n=92 bitches)

	n	Number of conception	Conception rate (%)	Total number of pups	Average # of pups per litter
Group I Natural service	25	23	92	120	5.2
Group II AI w/fresh semen- Vaginal dep.	12	3	23	15	5.0
Group III AI w/fresh semen- Intrauterine dep.	25	21	84	118	5.6
Group IV AI w/frozen semen- Intrauterine dep.	30	20	67	112	5.6
Total	92	67	72	365	5.5

(Rota et al., 1999)

VI. 참고문헌

- Concannon PW. 1986. Canine physiology of reproduction. In *Small Animal Reproduction and Fertility*, pp. 23-77. Ed. T. Burke Lee and Febiger. Philadelphia.
- Concannon PW and Lein DH. 1989. Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy and pregnancy in dogs. In *Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice*, Vol. X, pp. 1269-1282. Ed. R. Kirk, W.B. Saunders, Philadelphia.
- Concannon PW and Battiata M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. *Current veterinary Therapy*, X.W.B. Saunders, Philadelphia. pp. 1253.

- Fourgner JA, Aamdal J and Anderson K. 1973. Intrauterine insemination with frozen semen in the blue fox. *Nord. Vet.-Med.* 25:144-149.
- Linde-Forsberg C, Strom B and Govette G. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* 52:11-23.
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C and Rodriguez-Martinez H. 1997. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 47:1093-1101.
- Rota A, Iguer-Ouada M, Verstegen J, Linde-Forsberg C. 1999. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without equex STM paste. *Theriogenology* 51:1045-1058.
- 공 등, 2002. 개의 자궁내 인공수정기구. 특허등록번호(특허 제0322995호).
- 공 등, 2002. 개의 질모양에 따른 자궁내 인공수정기구. 특허출원. 출원번호 (10-2002-0009052).
- 공일근, 조성균, 임용택, 이상인, 위성하. 1999. 개 자궁내 인공수정기에 의한 인공수정 후 산자생산. *한국임상수의학회지*. 16(2): 375-380.