

## 일본 북해도의 수정란이식 현황과 수태율 향상

Matsuzaki Shigenori

제네틱스 홋카이도

### 1. 북해도의 수정란이식 현황

#### 북해도의 축산 및 인공수정

일본에는 젖소 180만두, 육우 284만두가 사육되고 있다. 북해도에는 젖소가 93만두(44.8%) 육우가 40만두 (13.4%)가 사육되고 있다. 인공수정에 있어서 젖소는 100%, 육우는 96%가 실시되고 있다. 또 북해도 내에서는 인공수정의 82%가 농협과 NOSAI 등의 조합에 소속된 수의사(47%)와 인공수정사(53%)에 의해 실시되고 있으며 현장에서 실시하고 있는 수정란 이식도 주로 이들 인공수정기술자에 의해서 실시되고 있다.

#### 북해도에 있어서 수정란 이식의 연혁

북해도 내에서 최초의 수정란 이식에 의해 출산된 것은 1976년에 日高·新冠 종합목장에서였다. 그 후, 캐나다의 수정란 이식회사에서 연구한 金川 박사(현 북해도 수의사회 회장, 북해도 대학 명예교수)에 의해 북미의 기술을 소개받고 귀국 후, 각 기관에 지도함으로써 급속하게 전파되었다. 일본 국내의 실시 두수에 있어서 1993년에는 433두에서 채란하여 681두가 이식되었으며, 2002년 현재는 14,698두에서 채란하여 55,198두에 이식되었다.

#### 북해도 내의 ET 실시 기관의 개요

홀스타인 미경산우로부터 장외 또는 장내에서 회수된 수정란을 이식하는 북해도 농업개발공사, 다수의 공란우와 수란우를 집중 관리하는 全農 ET센터 등이 있으며, 지역간 조합을 연결해주는 농가의 의뢰를 받고 지역에서 공란우를 집합시켜 채란하고, 이식은 지역의 기술자들에 의해 하고 있으며, 제네틱스 북해도가 조직적으로 채란하고 있다. 또 지역의 NOSAI 조합이 채란을 실시하고 있다. 그 이외에 4~5명의 개업 수의사가 채란 서비스를 하고 있다. 이식은 위에 설명한 바와 같이 인공수정을 하고 있는 기술자들에 의해 실시하고 있다.

## 제네텍스 북해도 (GH)

GH는 1983년에 대학 등과 협력하여 26일간의 인공수정 자격 강습회를 19회 개최(합계 530명), 17일간의 수정란이식 자격 강습회를 25회 개최(합계 580명)하여 자격을 취득하도록 하였다. 또 ET의 실무를 담당하고 있는 기술자와 의사 등을 대상으로 실기 강습회를 53회(합계 795명)를 실시하여 기술을 보급하는데 노력하고 있다.

## 2. 수정란 이식에 있어서 수태율 향상

### 현장 수란우 선발 현황

수정란 이식 기술은 인공수정과 비교하여 수정란 생산가격이 높고 체외수정, 성판별 및 핵이식 수정란 등 인위적 조작을 한 수정란이식 성적이 낮으므로 보급의 장애가 되고 있다. 일반적으로 수란우의 선발은 직장검사에 의해 항체를 확인하고, 수태율 향상을 하는 방법의 하나로서 항체기능의 평가를 호르몬 수준의 측정과 초음파 진단 장치를 이용하여 양호한 수란우를 선발하고 있다.

### 수정란 이식 시 CIDR 삽입에 의한 수태율 향상

경산우는 미경산우와 비교하여 10~15% 수태성적이 떨어진다. 경산우에서 수정란 이식 시 CIDR를 삽입하고 18일간 방치한 후 수태율에 미치는 영향을 조사하였다. 3단계법과 Direct법을 각각 비교하였다. 그 결과 3단계법에서는 CIDR 삽입군이 44.2%(23/52)에 대하여 대조군에서는 48.8%(42/86)로 차가 없었으나 Direct법에서는 CIDR 삽입군이 61.8%(21/34)인데 반하여 대조군에서는 50%(42/84)로 높아지는 경향을 나타냈다. 경산우에서 수태성적을 개선할 수 있는 가능성을 보였다.

### 영양막 세포의 동반이식에 의한 수태율 향상

소에서는 15일째부터 착상하는 시기까지의 수정란에 영양막으로부터  $INF-\tau$ 를 분비하고, 자궁상피에서는  $PGF2-\alpha$  분비를 저해하고 항체퇴행을 억제하여 임신상태를 유지한다고 알려져 있다. 여기에서 체내에 14~16일간 발육된 체내 유래 영양막 세포를 체외에서 배양하였다.

체내 TBV의 제작 : 발정주기 7~8일 째에 체내 또는 체외 수정란을 다수 이식하고 7~8일 후에 발룬카테타 끝부분의 구멍을 넓게 하여 신장기(伸張期) 수정란을 회수하였다. 회수된 수정란은 실체현미경 하에서 매스틀 이용하여 0.5~0.6mm로 절단하고 약 12시간 TCM199에서 배양하여 포상으로 확장된 것을 ethylen glycol을 이용하여 Direct법으로 동결하였다.

수정란과의 동반이식 : 신선 및 동결수정란과 동결융해한 TBV를 동반이식하였다. 동결수정란은 3단계법으로 항동해제를 제거하였다. 신선수정란 이식은 홀스타인, 동결수정란이식은 흑모화우로 이식하였다. 또 같은 시기에 동반이식을 하지 않은 것을 대조군으로 비교하였다. 그 결과 신선수정란 이식에 있어서 수태율은 83.3%(30/36)인데 반하여 대조군은 68.5%(113/65)를 나타내었다. 한편, 동결수정란 이식에서는 동반이식한 군이 56.5%(13/23)인데 반하여, 대조군은 47.8%(32/67)로서 전부 동반이식한 군이 높은 성적을 보였으나 유의차는 인정되지 않았다. 또 동반이식한 군 전부가 정상적으로 분만하여 송아지의 발육에 이상이 없었다.

#### TBV이식이 발정회귀에 미치는 영향

흑모화우 경산 및 미경산 6두를 이용하여 그 중 3두에 발정주기 7일째에 각각 5개의 TBV를 이식하였다. 또 다른 3두에서는 대조군으로 이식기를 이용하여 자궁경관을 통과시키기만 하였다. 발정회귀를 조사하기 위해 아침저녁 2회 약 30분간의 발정관찰을 하였다. 최초의 발정으로부터 매일 40일간 체혈을 하였다. 혈중항체 호르몬 수준은 측정하였다. 혈중 P4수준은 宮本 등의 방법에 준하여 하였다. 그 결과, 발정주기 7일째에 TBV를 이식한 군에서 3두 중 1두가 예정일에 발정회귀 하였다. 그 밖에 2두는 40일간의 행동관찰 중에 발정을 확인할 수 없었다. 혈중 P4에 있어서 거의 발정주기에 맞게 발정회귀를 나타내었다. 한편, 이식기만을 통과시킨 대조군에서 행동 관찰한 1두에서 예정과 같이 발정이 회귀되었으며 그 밖에 1두는 17일간 늦은 발정이 확인되었다. 나머지 1두는 발정이 그 기간 중 확인되지 않았다. 혈중 P4를 검사하였을 때 대조군 2두의 발정회귀가 있음을 확인하였다.

#### 株化영양막 세포의 동반이식

TBV의 제작은 과배란과 자궁세정 등 회수효율도 별로 좋지 않으며 번잡스럽다. 최근에서는 체외에서 배양 주화 하는 방법, IFN- $\tau$  분비 기능을 가진 대장균 등을 제작하는 일이 시도되고 있다.

#### 주화영양막세포의 제작

기능성 펩티드연구소에 의뢰하여 체외수정란유래 TBV를 배양주화하여 제작하였다. 주화 TB sheet를 절단하여 3-4개를 0.25 스트로우에 넣어 Direct법으로 동결하였다.

#### 수정란과의 동반이식

홀스타인 혹은 흑모화우의 체내동결 수정란을 홀스타인 경산 또는 미경산우에 1개를 이식하였다. 수정란의 용해와 동해방지제의 제거는 3단계법으로 하였다(대조구). TBV는 체내수정란 유래의 TB 세포를 배양주화한 것을 ethylene glycol을 이용하여 Direct법으로 3-4개를 스트로우에 넣어 동결시킨 것을 용해하여 PBS로 세정하고 수정란과 동반이식하였다(시험구). 그 결과 대조구가 42.3%(22/52)인데 대하여 시험구에서는 36.0%(18/50)로 낮게 나타났다. 또 수정란의 등급별로 비교하였을 때 모든 등급에 있어서 거의 동일한 낮은 수태성적을 보였다. 그 원인은 sheet 형태의 TBV를 이식할 때 수정란을 포함한 이식기의 끝의 구멍이 막혔다고 생각되나 확실하지는 않다.

## 발정주기의 미치는 수정란 이식의 영향

### 시험 1(운동량의 변화)

운동량 측정장치에 의해 발정주기가 연속적으로 3회 명확하게 확인된 홀스타인 암소 모두에 3번째 발정 후 7일째에 주화 TBV를 이식하여 발정행동량의 변화로부터 발정주기에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 대조 5두, 시험구 4두 중 2두에서 주화 TBV 이식에 따른 영향은 없었다. 또, 대조군의 행동량의 변화는 동일개체에서도 발정주기가 안정되게 반복되지 않는 것을 알 수 있었다. 이번의 결과에서 총 주기 7일째에는 TBV의 이식에 의한 발정주기의 지연을 확인하는 것은 어려웠다. TBV로부터 분비된 IFN- $\tau$ 가 양적으로 부족하거나 이식 시기 등 앞으로 검토해야 할 필요가 있다. 또 발정행동량을 이용하는 방법으로 혈중 P4의 변화와 맞춰서 발정주기의 영향을 판정할 수 있다고 생각된다.

### 시험 2(혈중 P4의 추이)

홀스타인 미경산우 3두, 경산우 1두를 이용하여 발정주기 7일째에 주화 영양막 세포 3~4개를 비외과적으로 자궁각 심부에 이식하였다. 소의 발정관찰을 하면서 2~3일 간격으로 채혈을 하였다. 채혈 후 즉시 혈장을 분리하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 보존하였다. 황체호르몬 수준의 측정은 오비히로대학 생식과학 실험실에서 宮本 등의 방법에 의해 EIA법으로 실시하였다. 그 결과 4두 중 2두에서 연장되지 않았으며 1두에서는 3일간, 1두는 4일간의 발정주기연장이 확인되었다. 또 연장이 확인된 2두에 있어서 혈중 P4의 최대치가 높은 경향을 보였다.

이번의 시험으로 체내 회수 TBV의 동반 이식에 의해 수태성적을 개선하는 것이 가능하다고 시사되었다. 생체에서부터 회수시기와 방법, 동반이식의 시기와 방법 등의 과제가 많이 남아있다. 또 주화 TBV에 있어서는 INF- $\tau$  분비능, 계대 배양의 영향, 이식세포의 수량 등의 문제 등 불명확한 점이 많았으며 앞으로 이

기술을 이용하여 기초적인 조사연구가 필요하다고 생각된다. 즉 앞으로 수정란 이식을 낙농축산현장에서 이용할 경우 효율성이 높은 실용기술로서 가장 먼저 이용할 필요가 있는 과제라고 생각된다.

### **3. 그 밖의 첨단 기술의 이용**

북해도립 축산시험장과 공동으로 (1)수정란의 성판별 (2)핵이식 (3)OPU 등의 첨단기술을 현장에 응용하려는 연구를 하고 있다.

(1) ET차내에서 수정란의 성판별을 실시하여 축산농가에서 수정란을 회수하여 성판별 수정란을 이식하는 것이 가능해졌다.

(2) 현장에서 상실배를 회수하여, 도립 축산시험장에서 성판별 후 암컷인 수정란만을 이용하여 핵이식을 하고, 생산된 핵이식 수정란을 현장에서 이식하여 송아지를 얻을 수 있었다.

(3) 독자적으로 보완한 OPU 기구를 이용하여 효율적으로 난자를 채취하는 일이 가능해졌다. 또 이것을 이용하여 원격지 축산농가에서 난자를 채취하여 본 사업단에서 체외수정을 하여 수정란을 생산, 신선수정란을 축산농가에 이식하고 송아지를 얻는 것이 가능해졌다.