

## 過排卵處理 家兔에서 受精卵의 非外科的 回收와 外科的 回收의 比較

沈金鑾 · 卞泰鎬 · 李在根

高麗大學校 農科大學

### Comparison of Non-surgical and Surgical Recovery of Fertilized Eggs in Superovulated Rabbits

K. S. Shim, T. H. Byun and J. K. Lee

College of Agriculture, Korea University

#### Summary

This experiment was carried out to compare with the nonsurgical and surgical recovery of fertilized eggs in super-ovulated rabbits. Sixty-four eggs recovered were transferred to twelve synchronized, pseudopregnant rabbits to test the viability of the eggs by surgical transfer.

Each group (I, II, III) received a single subcutaneous injection of 5mg PGF<sub>2</sub>α/kg B.W. at 24(Group I), 48 (Group II) and 72 hours (Group III) after mating, respectively.

After the administration of PGF<sub>2</sub>α, vaginal washings were conducted at 3,6,9,12 and 24 hrs, and frequency of vaginal washing was 5 times for each group (I, II, III).

In Group (IV, V, VI), the rabbits were killed to recover the fertilized eggs from the genital tract at 24 (Group IV), 48 (Group V) and 72 hours (Group VI) after mating, respectively.

The results obtained were as follows:

1. Of the total eggs, 69.3%, 73.4% and 66.9% were recovered for Group I, II and III, respectively from the vagina within 6 hrs after PGF<sub>2</sub>α injection and particularly for Group III.
2. The rates of egg recovery versus the number of corpora lutea were 55 (51.6-60)%, 35.8 (24-52.6)%, 33.4 (25-47)% and 72 (70.7-73.0)%, 60.3 (50-71.4)%, 44.9(44.4-45.5)% in Group I, II, III and Group IV, V, VI, respectively.
3. Most of eggs recovered were one-cell and two-cell stage in Group I and Group IV. More than one half of the eggs recovered in Group II and V were over eight-cell stage, and most of the eggs were so in Group III and VI.
4. When sixty-four eggs recovered between 24 to 72 hours after mating were transferred to pseudopregnant rabbits. Three recipients were pregnant, and the rate of pregnancy was 25%.

#### I. 緒 論

Heape (1890)이 家兔를 使用하며 포유동물에 있어 최초로 受精卵移植에 성공한 이래 Nicholas (1933), Warwick (1934), Willet (1951) 등은 各各 쥐, 양, 소 등을 대상으로 한 研究 結果를 報告하였다.

한편 國內에서도 이에 대한 研究가 매우 활발히

進行되고 있는 실정이다. 受精卵移植 過程 中 가장 중요한 문제는 受精卵의 回收라 하겠다. 回收方法은 크게 나뉘어 外科的 方法과 非外科的 方法으로 양분할 수 있다.

家兔에 있어 Takeuchi (1960) 등은 外科的 回收에 의해 交尾後 48時間에 卵管 및 子宮에서 75%의 卵子를 回收하였고, Ishijima (1967) 등은 妊馬血清性

腺刺戟ホルモン(PMSG)과 胎盤性性腺刺戟ホルモン(HCG)를 통하여 過排卵시킨 家兎에서 交尾後 24, 48, 72 時間에 各各 85.6%, 96.1%, 95.5%의 높은 回收 성적을 報告하였다.

外科的方法의 경우 實驗動物이 小動物인 경우는 屠殺해서 채란하여도 무방하겠으나, 大家畜의 경우는 그 經濟的 손실이 막대하며, 또한 마취상태로 하여 回收하고 난 後에도 供卵畜을 계속 繁殖에 使用한다면 生殖導管 주위에 수술의 후유증으로 인한 장애가 남게되며 시술상의 마취, 절개, 회복등의 복잡한 過程을 거쳐야 한다는 단점이 있다.

한편 Elsdon (1976) 등이 최초로 非外科的 回收方法으로 自然排卵시킨 소의 膾에서 92% 卵자를 回收하는데 성공함으로써 外科的 回收에 따른 단점을 보완하였다.

家兎에 있어 Tsutsumi (1976) 등이 최초로 非外科的 回收를 시도한 이래 Takeda 등(1977, 78, 79)은 Prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α)의 生理的 기능을 이용하여 受精卵의 非外科的 回收를 용이케 하였다.

따라서 本 實驗은 PMSG 및 MCG 處理에 의한 過排卵을 誘起한 家兎에 다시 PGF<sub>2</sub>α를 투여, 非外科的方法으로 受精卵를 回收하고, 時間別로 回收率을 비교하였으며, 위 두가지 回收方法에 의해 얻은 卵자를 各各 外科的方法으로 受卵兎에 移植하며 生存性を 비교함으로써, 受精卵移植 과정中 受精卵 回收에 관한 基礎資料를 마련하고자 實施하였다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 供試兎

雌兎는 體重 2.0~3.3kg의 Flemish Giant 種 30 首, 雄兎는 體重 2.5~4.0kg의 同種 3 首를 使用하였다.

### 2. 過排卵 誘起

交尾前 80時間에 150I. U의 PMSG (Intervet 社, Folligen)를 1回 筋肉注射하고, 雄兎와 2回 交尾와 동시에 75I. U.의 HCG (Intervet 社, Chorlon)를 1回 靜脈注射하여 過排卵을 誘起하였다.

### 3. PG F<sub>2</sub>α 處理

卵管 및 子宮의 筋肉運動을 促進시켜 過排卵된 受精卵를 조기에 回收할 目的으로 Group I, II 및 III을 交尾後 各各 1, 2 및 3일에 PGF<sub>2</sub>α (Upjohn 社, Lutalyse) 5mg/kg을 1回 皮下注射하였다.

## 4. 受精卵回收

### (A) 非外科的 回收

Takeda (1977) 등이 고안한 two-way Catheter를 使用하여 Group I, II 및 III 모두 PGF<sub>2</sub>α 處理後 3, 6, 9, 12, 24, 時間에 5回 膾·回收를 실시하였으며, 관류액은 9.75g의 Tissue Culture Medium 19g (Difco Laboratories, Detroit Michigan USA)와 3mg/ml의 Bovine Serum Albumin, 700I. U./ml의 Penicillin G Potassium 및 500mg/ml의 Streptomycin Sulfate를 증류수에 첨가하여 1ℓ 가 되게 한 後 이中 50ml를 Catheter를 통하여 子宮內에 流入하고 역류한 세척액을 Catheter 개구부를 통하여 100ml의 시험관으로 目收하였다.

### (B) 外科的 回收

HCG의 투여와 동시에 자연교미 실시後 24, 48 및 72 時間에 各各 開腹手術하여 受精卵를 채취하였다. HCG 주사 後 48時間 이전의 것은 上向式卵管灌流法 (Chang, 1949에 의해 回收하였고, 72시간 것은 屠殺하여 子宮角을 분리절단하고 子宮角의 한쪽에 주사침을 삽입, 5cc 내외의 관류액을 주입하여 卵자를 시험관내로 回收하였다.

## 5. 受卵兎의 發情同期化

受精卵의 移植를 目的으로 12首의 雌兎를 供卵兎와 同一한 方法으로 PMSG 및 HCG를 투여하였다.

## 6. 回收된 受精卵의 移植

外科的 및 非外科的으로 回收한 受精卵의 生存性 檢査를 위해 回收受精卵를 신속히 受卵兎에 外科的方法을 통하여 초기난자는 미세유리관을 난관체에 삽입하여 卵管內에 移植하였으며, 後期卵자는 子宮角에 주사침을 使用하여 구멍을 낸 後 移植하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. PGF<sub>2</sub>α 투여에 따른 時期別 卵자 回收

交尾後 24, 48 및 72時間에 首當 1回 5mg/kg의

PGF<sub>2</sub>α를 處理한 다음 3, 6, 9, 12, 24時間에 實施한 卵子回收狀況을 살펴보면 Table 1에서 보는바와 같다.

Group I, II의 回收卵子는 대부분이 6時間内に 回收되었다.

Aref (1973) 등은 交尾後 24時間에 平均 4 mg/kg의 PGF<sub>2</sub>α를 투여하여 이에 따른 卵管内 運動性を 검사하였는데, PGF<sub>2</sub>α 투여 15~20分後에 運動性이 서서히 증가하였고, 2~6時間後 가장 격렬한 움직임이 보였다고 報告하였다. 또한 Spilman과 Harp-

er (1976)는 家兎에 PGF<sub>2</sub>α 투여後 卵管收縮에 影響을 미치는 時間은 3,4時間 以内라고 보고하고 있어 이는 PGF<sub>2</sub>α의 生理的 기작이 원인으로 사료된다. 時間에 따른 Group I, II의 回收率은 대체로 비슷한 경향을 다소 나타내고 있으나, Group III은 다소 차이가 난다. 이에 대해 Takeda (1979) 등은 24,28時間後 PGF<sub>2</sub>α를 투여하였을 때 대부분의 卵子가 단시간에 回收되는 반면, 交尾後 72時間 이후에 P-GF<sub>2</sub>α를 處理할 경우는 PGF<sub>2</sub>α 투여後 12時間 이후에 다수의 卵子가 回收되었다고 報告하였다.

Table 1. Number of eggs recovered from vagina of superovulated does in each hours after administration of PGF<sub>2</sub>α at 24, 48, 72 hrs post coitum.

Group*	Hours after treatment					Total
	3	6	9	12	24	
I	17	35	6	13	4	75
II	16	17	7	4	1	45
III	-	24	8	3	-	35

\*Each group including three does.

## 2. 回收方法에 따른 回收率의 比較

非外科的 回收를 實施한 Group I, II, III의 回收率을 Table 2에서 살펴보면 各 Group에서 55.0%, 35.8%, 33.4%를 나타냄으로써 Group I이 가장 높은 回收率을 기록하였고, Group II, III은 이보다 훨씬 낮은 回收率을 나타내고 있어, PGF<sub>2</sub>α 투여時間과 回收率間에 密接한 關係가 있는 것으로 여겨진

다.

Porter 및 Behrman (1971)은 Progesterone은 PGF<sub>2</sub>α의 作用을 抑制한다고 보고하였다. 한편 Tsutsumi (1980) 등은 過排卵 家兎에 있어 交尾後 24時間頃에 Progesterone의 급격한 감소가 일어나고, 交尾後 48~120時間에는 다시 Progesterone이 크게 증가한다는 사실을 보고하였는데, 이 사실등을 종합하여 볼 때 交尾後 48, 72時間에 PGF<sub>2</sub>α 투여時 回

Table 2. Comparison of recovery rate in superovulated rabbits at 24, 48, 72 hrs after post coitum

Group*	Non-surgical recovery v			Surgical recovery		
	I	II	III	IV	V	VI
Average number of recovered eggs	25.0 (21-31)	15.0 (12-20)	11.7 (9-16)	31.0 (29-34)	22.3 (20-25)	16.3 (15-18)
Average number of corpora lutea	46.0 (35-60)	43.3 (38-50)	35.3 (32-40)	43.0 (41-46)	37.3 (35-40)	36.3 (33-40)
Average rate of egg recovery (%)	55.0 (51.6-60.0)	35.8 (24.0-52.6)	33.4 (25.0-47.0)	72.0 (70.7-73.9)	60.3 (50.0-71.4)	44.9 (44.4-45.5)

\* Each group including three does.

回收率이 떨어지는 것은 交尾後 시간경과에 따라 증가된 Progesterone 이 PGF<sub>2</sub>α의 작용을 抑制하여 그에 따른 卵管運動性を 저하시킨 결과로 여겨진다.

外科的 卵子回收를 實施한 Group IV, V, VI의回收率을 Table 2에서 살펴 Group IV, V, VI은 각각 72.0%, 60.3%, 44.9%로써 非外科的 回收를 실시한 Group I, II, III과 비슷한 경향을 나타냈다. 또한 本 實驗에 있어 Group VI이 가장 저조한 回收率을 기록하였는데, 이에 대해 Takeuchi (1960), Kennelly (1965), Ishijima (1967, 1973), Tsunoda (1978) 등은 過排卵 家兔에 있어 卵管内 運動性이 매우 민감하게 되어 自然排卵 家兔에 비해 約18時間 以上 卵管移行 時間이 촉진되어 이미 腔内로 방출된 卵子가 상당수에 이른다고 보고하였다.

Tsutsumi (1980) 등은 過排卵시킨 家兔에 있어 정상적인 경우에 비해 훨씬 빠른 시간에 腔内로 卵子가 방출되는 원인에 대해 子宮内 卵子의 移動說로 설명하고 있는데, 卵子가 子宮을 통과하는 作用은 소수의 卵子가 신속히 子宮内로 통과하여 子宮頸에도달하는 것과 子宮内 進入後 發育段階를 걸쳐 서서히 이동하는 것 등의 양면적 方法이 있는데, 이 경우는 급진적 子宮통과의 기작이라고 報告하였다. 그러므로 이와같은 現象은 過排卵 誘起를 위한 PMSG 및 HCG 투여에 따른 Steroid 간의 불균형이 원인이 되는 것으로 사료된다.

결과에 나타난 바와 같이 非外科的 方法으로 卵子回收를 實施한 경우보다 外科的 回收時 다소 높은

回收率을 나타내고 있지만, 後期卵子의 回收를 目的으로 할 때는 非外科的 回收를 실시하는 것이 훨씬 좋을 것으로 생각되며, 回收方法 및 PGF<sub>2</sub>α가 雌兔의 卵管 및 生殖導管에 미치는 영향에 대해 研究가 진척되면 그에 따라 回收率의 向上을 기대할 수 있어 家兔를 屠殺하지 않고 卵子를 回收할 수 있는 非外科的 方法이 훨씬 바람직 할 것으로 생각된다.

### 3. 卵子의 發達狀態

Group I과 Group VI에 있어 回收된 卵子 분할 상태는 Table 3에 나타난 바와 같다.

Group I과 Group IV의 回收된 卵子는 대부분 1, 2 細胞期였으며, Group II와 Group V는 절반 이상이 8 細胞期였다. 그리고 Group III과 Group VI에서 回收된 卵子의 전부가 8 細胞期 이상이였다.

以上 Group I ~ VI까지 回收된 卵子의 發達狀態를 종합고찰하여 보면 PGF<sub>2</sub>α 處理 Group 인 Group I, II, III과 PGF<sub>2</sub>α를 處理치 않은 Group IV, V, VI間的 卵子 發達狀態 間에 큰 차이점은 발견되지 않았으나, 비정상 卵子의 比率에 있어 Group I, II, III은 13.3%, 15.6%, 22.9%를 차지하고 있어 Group IV, V, VI의 9.7%, 11.9%, 16.3%에 비해 다소 높은 理象을 나타내고 있다. 따라서 PGF<sub>2</sub>α 투여가 비정상 卵子發生에 影響을 미치지, 아니면 다른 내분비 기작 및 卵管수송時 發生하는 物理的 충격에 의한 것 인지는 좀더 研究가 필요한 것으로 생각된다.

Table 3. Stages of development of eggs in superovulated rabbits.

Cell stage	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI	Total
1 cell	18 (24%)	8 (17.8%)	2 (5.8%)	28 (30.1%)	5 (7.5%)	-	
2 cell	36 (48%)	4 (8.9%)	-	54 (58%)	3 (4.5%)	-	
4 cell	9 (12%)	8 (17.8%)	1 (2.8%)	2 (2.2%)	12 (17.9%)	-	
8 cell	2 (2.7%)	6 (13.3%)	4 (11.4%)	-	13 (19.4%)	7 (14.3%)	
Beyond 16 cell	-	12 (26.6%)	20 (57.1%)	-	26 (38.8%)	34 (69.4%)	
Abnormality	10 (13.3%)	7 (15.6%)	8 (22.9%)	9 (9.7%)	8 (11.9%)	8 (16.3%)	
Total	75	45	35	93	67	49	364

#### 4. 回收卵자의 移植後の 관찰

Table 4 에 나타난 바와 같이 回收된 364個의 卵자中 64個의 卵자를 選別하여 12首의 受卵兎에 移植한 結果, 이중 3首가 수태를 하여 25%의 수태율을 기록하였다.

PGF<sub>2</sub>α 處理를 하여 非外科的方法으로 臍에서 回收한 卵자를 移植, 그 結果 1首가 임신을 하였다. 이 사실로 미루어 보아 PGF<sub>2</sub>α 가 卵자의 生存性에 영향을 미치지 않는것을 알 수 있었으며 Takeda (1977)도 PGF<sub>2</sub>α 처리로 回收한 卵자를 移植하여 50%의 수태율을 보임으로써 위의 사실과 일치함을 보여주

었다.

한편 受卵兎의 數가 매우 적어 결론을 맺기에는 不足하다 하겠으나 本 實驗의 結果로 유추해 보면, 後期卵자를 子宮으로 移植하는 것이 가장 效果的인 것으로 생각되며, 本 實驗에서 移植後 5~7日頃, 2首가 流産을 하였는데 이것은 移植過程 中 Ether를 使用한 흡입마취의 영향 및 手術상의 미숙 등에 의한 受卵兎에 지나친 외부적인 Stress가 가해짐으로써 胚發生 阻害要因을 더한 것으로 추정되며, 앞으로 移植時間의 단축 및 技術의 向上이 이루어지면 훨씬 좋은 結果를 얻을 것으로 여겨진다.

Table 4. Observation of embryos after transfer to the recipients.

Treatment	Eggs transferred				No. of fetuses
	Cleavage stage	No. of eggs	The sites transferred embryos	No. of recipient	
Group I	2 cell	12	oviduct	2	
Group II	4 cell	12	oviduct	2	
Group III	morula	8	uterus	2(1)**	2 *
Group IV	2 cell	12	oviduct	2	
Group V	4 cell	12	oviduct	2	2 *
Group VI	morula	8	uterus	2(1)**	2 *

\*: Seven normal fetuses were observed at autopsy 15 days after transfer.

\*\* : The number of parentheses are that of aborted rabbits.

#### IV. 摘要

本 試驗은 過排卵시킨 家兎에 있어, 受精卵의 非外科的 및 外科的 回收를 實施하여, 回收方法에 따른 차이점을 比較하였다. 아울러 回收된 受精卵 中 64個를 12首의 발정동기화 시킨 受卵兎에 移植, 回收된 受精卵의 生存性을 검사하였다.

Group I, II, III은 交尾後 24時間(Group I), 48時間(Group II), 72時間(Group III)에 5mg/kg의 PGF<sub>2</sub>α를 각각 皮下주사하였고, PGF<sub>2</sub>α 투여後 3, 6, 9, 12 및 24時間에 걸쳐 질세척을 實施하였다.

Group IV, V, VI은 交尾後 24時間(Group IV), 48時間(Group V), 72時間(Group VI)에 각각 家兎를 屠殺하여 受精卵를 回收하였던 바, 그 結果는 다음과 같다.

1. Group I, II, III과 Group IV, V, VI에서 黃

體數에 대한 卵자의 回收率은 각각 55.0 (51.6~60.0)%, 35.8 (24.0~52.6)%, 33.4 (25.0~47.0)% 및 72.0 (70.7~73.9)%, 60.3 (50.0~71.4)%, 44.9 (44.4~45.5)% 였다.

2. PGF<sub>2</sub>α 處理後 시간경과에 따른 卵자의 回收率은 PGF<sub>2</sub>α 처리後 6시간이내에 Group I, II, III에서 각각 69.3%, 73.4%, 66.9%가 回收되었으나, Group III의 경우는 PGF<sub>2</sub>α 처리後 6~12시간 이내에 全卵자가 回收되어 매우 특이하였다.

3. Group I과 Group IV에 있어서는 回收된 卵자의 대부분이 1細胞期, 2細胞期였으며, Group II와 Group V에 있어서는 回收된 卵자의 절반이상이 8細胞期였다. 그리고 Group III과 Group VI에서는 回收된 卵자의 전부가 8細胞期 이상이였다.

4. 交尾後 24~72時間에 걸쳐 回收한 卵자中 64個를 12首의 受卵兎에 移植하여 3首가 임신을 함

으로서 25%의 수태율을 얻었다.

## REFERENCES

1. Aref, I., E.S.E. Hafez & G.A.R. Kamar, 1973. Postcoital prostaglandins, in vivo oviductal motility, and egg transport in rabbits. *Fertil. Steril.* 24: 671.
2. Chang, M.C., 1949. Effects of heterologous sera on fertilized rabbit ova. *J. Gen. Physiol.* 32: 291-300.
3. Elsdon, R.P., J.F. Hasler & G.E. Seidel, 1976. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriol.* 6: 523.
4. Heape, W., 1980. *Reproduction in farm animals.* Edited by Hafez, E.S.E., Lea & Febiger, Philadelphia. p. 570.
5. Ishijima, Y. & Y. Sakuma, 1967. Effect of the estrogen pretreatment on the induced superovulation by PMS in rabbits. *Jap. J. Anim. Reprod.* 12: 133-136.
6. Ishijima, Y., 1973. Studies on pregnancy in rabbits after superovulation with gonadotrophins. *Jap. J. Anim. Reprod.* 19: 43-55.
7. Kennelly, J.J., R.H. Foote, 1965. Superovulatory response of pre-and post-pubertal rabbits to commercially available gonadotrophins. *J. Reprod. Fertil.* 9: 177-188.
8. Labhsetwar, A.P., 1971. Luteolysis and ovulation induced by prostaglandin  $F_2\alpha$  in the hamster. *Nature.* 203: april 23.
9. Nicholas, J.S., 1933. *Reproduction in farm animals,* Edited by Hafez, E.S.E., Lea & Febiger, Philadelphia. p. 570.
10. Porter, D.G., H.R. Behrman, 1971. Prostaglandin-induced myometrial activity inhibited by progesterone. *Nature.* Vol. 232: 627-628.
11. Spilman, C.H. & M.J.K. Harper, 1976. Effects of prostaglandins on oviductal motility and egg transport. *A.B.A. Vol. 44:* 89-90.
12. Takeda, T., Y. Tsutsumi, Y. Tanabe & K. Yamamoto, 1977. Administration of prostaglandin  $F_2\alpha$  for the recovery of fertilized eggs from the vaginas of rabbits. *Fertil. Steril.* 28: 759-762.
13. Takeda, T., Y. Tsutsumi, S. Hara & M. Ida, 1978. Effects of prostaglandin  $F_2\alpha$  on egg transport and in vivo egg recovery from the vaginas of rabbits. *Fertil. Steril.* 30: 79-85.
14. Takeda, T., H. Suzuki, Y. Terami & Y. Tsutsumi, 1979. Egg recovery from the vagina of the rabbit treated with prostaglandin  $F_2\alpha$ . *J. Anim. Reprod.* 25: 23-30.
15. Takeuchi, S., H. Shimizu, Y. Sakuma & M. Sato, 1960. Effects of progesterone pretreatment on the superovulation induced by pregnant mare serum preparation in rabbits. *Jap. J. Anim. Reprod.* 6: 4-6.
16. Tsunoda, Y., A. Iritani & Y. Nishikawa, 1978. Studies on superovulation in the rabbit with special reference to repeated superovulation. *Jap. J. Zootech. Sci.* 49: 89-95.
17. Tsutsumi, Y., T. Takeda, K. Yamamoto & T. Tanabe, 1976. Non surgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 48: 393-395.
18. Tsutsumi, Y., Y. Terami, T. Takeda, H. Suzuki & S. Matsui, 1980. In vivo egg recovery from the vaginae and the pattern of egg distribution in superovulated rabbits. *Jap. J. Anim. Reprod.* 26: 6-14.
19. Tsutsumi, Y., T. Takeda & H. Suzuke, 1980. Peripheral serum levels of progesterone and prostaglandin  $F_2\alpha$  during egg transport in superovulated rabbits. *Jap. J. Anim. Reprod.* 26: 15-23.
20. Warwick, B.L. & R.O. Berry, 1949. *Reproduction in farm animals,* Edited by Hafez, E.S.E., Lea & Febiger, Philadelphia, p. 570.
21. Willett, E.L., W.G. Black, L.E. Casida & W.H. Stone, 1951. *Reproduction in farm animals,* Edited by Hafez, E.S.E., Lea & Febiger, Philadelphia, p. 570.