

자연發情犬 및 人工發情誘導犬에서 受精卵移植

金 容 浚

全北大學校 獸醫科大學
(1994년 3월 28일 접수)

Embryo transfer in the dog in natural or induced estrus

Yong-jun Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received March 28, 1994)

Abstract: To study the conditions to enhance success of embryo transfer in the dog, 20 mixed-breed bitches were used for the experiment along with 4 male dogs for mating. The bitches were paired according to synchronism of natural estrus, or the counterpart as donor or recipient was treated with gonadotropin as FSH (follicular stimulating hormone) or PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) for induction of estrus to be synchronized with estrus of the other bitch in natural estrus.

Embryo recovery was performed in two ways for comparison, either by flushing each uterine horn after ovariectomy or by flushing each horn in the state of non-ovariectomy. In addition, the result of pregnancy according to the embryo stage and the repeatability of the experimental animals as donor or recipient were also investigated.

FSH or PMSG was administered to the bitches which had passed over 4 months from last estrus, resulting in estrus-positive in 3 dogs of 6 FSH-treated dogs (50.0%), and in 5 dogs of 9 PMSG-treated dogs (55.6%), determined by proestrus signs and vaginal smear test. Estrus-positive bitches induced with gonadotropin were used as donor or recipient resulting in one embryo-recovered bitch as donor and one offspring-delivered bitch as recipient in 5 PMSG-treated dogs, whereas no result was obtained from 3 FSH-treated dogs. The rate of embryo recovery to be compared with number of corpus luteum was 68.2% in ovariectomized dogs and 55.2% in non-ovariectomized dogs, respectively. The number of dogs from which embryo was collected were 4 dogs of 6 ovariectomized dogs (66.7%) and 6 dogs of 7 non-ovariectomized dogs (85.7%), respectively.

The result of parturition was obtained from one dog of 5 estrus-induced recipients, whereas no result was obtained from 3 natural-estrus recipients. The only dog which delivered a male puppy had been transferred 3 morulae and 2 blastocysts. Of 6 repeat-used bitches in canine embryo transfer, 3 dogs showed repeatability either as donor or recipient.

These results indicated that inducing estrus of a dog with gonadotropin is feasible in canine embryo transfer to be synchronized with that of a natural-estrus dog, that embryo recovery is also possible in non-hysterectomized dogs, that the estrus-induced dog is also usable as recipient to result in parturition, and that repeat-use of a bitch as donor or (and) recipient is possible in canine embryo transfer.

Key words: embryo transfer, donor, recipient, induced estrus, gonadotropin, synchronization, ovariectomy

*이 논문은 1992년도 교육부 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었음.

서 론

家畜繁殖의 效率을 지대하게 향상시킬 수 있는 受精卵移植이 소의 경우 우수가축의 생산성을 높이는데 그 목적이 있다면, 개의 경우는 Tsutsui et al¹의 보고에서와 같이 過排卵처리시 그 효과가 만족스럽지 못하기 때문에 우수가축의 생산성을 높이는 것 보다는 受精卵은 생산되나 번식질환으로 인해 수태가 어려운 개체에서 受卵犬을 통해 번식을 가능하게 할 수 있다는 점에 그 목적이 있다고 하겠다.

따라서 난소는 정상적으로 기능하여 난자는 생산되나 해부적 또는 기타 병리적 원인에 의해 수태가 성립이 되지 않거나 유산이 반복되는 등의 번식장애를 갖고 있는 우수견 또는 순수혈통견에서 受精卵을 회수하여 受卵犬에 移植하여 산자를 생산하게 함으로써 이러한 개들의 번식력을 유지시킬 수 있고, 나아가 동결 受精卵을 이용할 수 있을 때 우수견 또는 순수 혈통견의 가치를 반영구적으로 보존할 수 있는 가능성이 주어진다.

개에서 受精卵移植은 1979년 Kinney et al²에 의해 최초로 성공한 이래, Takeishi et al³과 Tsutsui et al¹의 성공사례 정도만이 보고되어 있을 정도로 현재까지 체계적으로 매우 적은 성공사례들이 알려져 있다.

개에서 受精卵移植術이 발달되지 않은 원인으로서 Tsutsui et al¹은 과배란 유도가 어려운 점을 주요원인으로 보고 있다. 또한, 개에서 受精卵移植術의 성공이 쉽지 않은 요인으로서 Tsutsui et al¹은 受精卵회수시 자궁내막의 비후에 의해 자궁의 관류가 어려운 점을 보고하고 있고, 그 밖에 개는 발정기간이 길어 供卵犬과 受卵犬의 發情同期化가 어려운 점⁴, 생식기의 크기 및 해부학적 구조상 受精卵회수 및 移植시 외과적인 방법의 의존해야 한다는 점⁵, 등이 어려운 요인이 지적되고 있다.

아울러 受精卵移植이 성공적으로 이루어진 경우에도 분만된 産仔數가 매우 적어 受精卵의 사멸이 적지않게 일어나고 있음을 알 수 있다.

이와같이 개에서 受精卵移植術은 성공하기가 쉽지 않은 많은 요소를 가지고 있으므로 저자는 개 受精卵移植의 성공을 높이기 위한 조건들을 알아보려고 하며, 受精卵移植의 성공사례를 보고한 Takeishi et al³ 및 Tsutsui et al¹이 자연발정견만을 이용하여 성공사례를 보고하였는 바 저자는 이 실험에서 자연발정견에 대한 인공발정동기화방법을 시도하여 개 受精卵移植에서 그 사용가능성을 알아 보고자 했으며, 이와 함께 자연 발정견과 인공발정유도견에서 供卵犬으로서의 受精卵회수성 및 受卵犬으로서의 수태성적을 비교하고, 아울

러 受精卵회수시 卵巢子宮摘出術후 자궁관류법과 비직출상태에서 자궁관류법의 두가지 受精卵회수방법을 비교하고자 하며, 受精卵의 발달단계에 따른 수태성적, 受精卵移植에서 供卵犬 또는 受卵犬으로서 반복 사용가능성, 등을 알아보려고 이 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

供試動物 : 이 실험에 사용된 牝犬은 총 20두로서 연령은 1.5-4세의 미경산 4산의 잡종견이었다. 供卵犬에 대한 자연교배 또는 인공수정에 사용된 牝犬은 과거 번식력을 보인 바 있는 2-5세의 잡종모견 4두를 이용하였다.

自然發情犬의 준비 : 실험동물중 발정이 자연적으로 거의 같은 시기에 발생한 두개체를 이용하여 受精卵移植에 사용하였다.

두개체는 각각 Feldman과 Nelson⁶의 방법에 의한 질점액도말검사를 통해 발정시기를 판정하였고, 발정개시일을 기준으로 하여 供卵犬과 受卵犬의 발정 간격은 ±3일 이내의 경우에만 실험에 공하였다.

발정이 개시된 것으로 판정된 供卵犬은 발정개시후 2일부터 매일 1회 연속 2일 자연교배 또는 인공수정을 시킨후 受精卵회수시까지 계속 격리시켰고, 受卵犬은 발정증상이 발현된 이후 移植시까지 계속 격리시켰다.

人工發情誘導犬의 준비 : 인공발정유도는 자연발정견이 있을 때 자연발정견에 대하여 供卵犬 또는 受卵犬으로 사용될 개의 發情同期化를 위하여 실시되었다.

인공발정유도에 이용된 牝犬은 전회 발정후 4개월 이상 경과된 동물을 대상으로 하였고 질점액검사를 실시하여 Feldman과 Nelson⁶의 성주기 판단기준에 따라 무발정기후기 또는 발정전기로 이행되는 동물만을 대상으로 하였다.

이 실험에서 사용한 gonadotropin은 FSH 및 PMSG로서 이중 PMSG 투여는 Evans⁷의 방법을 다소 변형시켰고 두가지 호르몬의 사용기간 및 용량은 Table 1과 같다.

즉, FSH-P(Shering)는 10kg미만의 소형견에서는 투여 1일 3mg, 투여 2일부터 종료일까지는 오전 오후 각각 1mg씩 2mg을 투여하였고, 투여기간은 5 - 10일간 투여하여 자연발정견이 질점액검사 결과 발정개시 소견을 보일때 HCG 500IU를 투여하였다.

또한 11kg 이상의 중·대형견은 투여 1일 4mg, 투여 2일부터 오전·오후 각각 1.5mg 씩 3 mg을 투여하였고 자연 발정견이 질점액검사 결과 발정개시 소견

Table 1. Administration of follicle stimulating hormone (FSH) or pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) followed by human chorionic gonadotropin (HCG)

Gonadotropin	Consecutive injection days	Time of injection	Body weight of bitch (kg)					
			5 - 10			11 - 26		
			Initial dose	Maintenance dose(Am+PM)	Total	Initial dose	Maintenance dose(Am+PM)	Total
FSH*(mg)	5-10		3	2 (1+1)	11-21	4	3(1.5+1.5)	16-31
PMSG(IU)		once(twice)			300(×2)			500-600(×2)
HCG** (IU)		once			500			1,000

*FSH was injected once in the afternoon on the 1st day, and was injected twice a day from 2nd to the last day.
 **HCG was injected on the same day when the dog in natural estrus was determined as in the beginning of estrus by vaginal smear test.

을 보일때 HCG 1000IU를 투여하였다.

PMSG(Intervet)투여는 10kg 이하의 소형견은 300IU를 투여한후 발정 외부증상이 관찰되지 않을때 투여후 4일에 같은 용량을 재투여 하고 나서 자연발정견이 발정개시 소견을 보일 때 HCG 500IU를 투여하였다. 11kg이상의 중·대형견은 500-600IU를 투여 한후 발정의부증상이 관찰되지 않을 때 투여개시후 4일에 같은 용량을 재투여하였다. HCG는 1,000IU를 사용하였으며 사용시기는 전기한 요령과 동일하였다.

人工發情誘導犬의 처리 : 성선자극 호르몬 투여후 외부발정증상 및 질점액검사소견결과 발정양성을 보이는 동물만 供卵犬 또는 수란견으로 이용하였으며, 인공발정유도후 供卵犬 및 受卵犬의 격리는 자연발정견의 경우와 같다.

人工發情誘導犬의 發情의 外部 증상 판정 : 성선자극 호르몬을 투여한 牝犬은 발정의 외부증상을 확인하고 자 투여후 매일 1일 2회 발정전기 출혈 및 외음부의 종대를 조사하였고, 동시에 약 10-20분동안 牝犬과 함께 있게 함으로써 모견이 승가행위를 시도하는 등, 모견의 courtship 행동에 따른 male attraction 여부를 확인하였다. 이때 비견은 사람에게 의해 쉽게 제어될 수 있도록 하였다.

질점액검사 : 자연발정견 및 인공발정유도견 모두에 대하여 질점액검사를 통해 발정주기를 확인하였다. 이때 슬라이드의 염색은 Roberts⁸의 방법에 의한 Diff Quick 염색을 하였다. 발정기의 판정은 Feldman과 Nelson⁹의 발정기 판정기준에 준하여 질점막상피세포의 각화 및 핵의 존재여부를 광학현미경하에서 200배로 검사하여 확인하였고, 상피세포의 핵이 별로 존재하지 않으면서 각화상을 보이는 상피세포가 시야의 대부분에서 관찰될 때를 발정기의 시작으로 판정하였다.

受精卵回收 및 移植培地 : 이 실험에서 수정란회수 및 이식에 사용된 배지는 Dulbecco's phosphate-buffered saline(PBS, Gibco)이었고 이 배지에 fetal calf

serum(FCS, Gibco)은 20%가 되도록, 그리고 bovine serum albumin(BSA,Sigma)은 3.5%가 되도록 첨가하였다. 또한 penicillin과 streptomycin을 100ml당 각각 10,000IU, 10mg이 되도록 혼합하여 조성을 마친 배지는 사용시까지 37℃, 5% CO₂ incubator내 보관하였다.

受精卵의 回收時期 : 供卵犬으로부터 受精卵의 회수는 상실배, 배반포, 부화배반포를 얻기 위하여 2회째 자연교배 또는 인공수정으로 부터 각각 8일, 9-10일, 12-13일에 실시하였다.

受精卵回收方法 : 수정란회수방법은 供卵犬의 복벽을 외과적으로 절개한 후 두가지 방법, 즉 난소자궁적출술후 자궁관류법 또는 자궁비적출 상태에서 자궁관류법을 사용하여 비교하였다.

供卵犬에 대한 복벽절개를 위한 마취로서는 Lumb와 Jones⁹의 방법에 준하여 atropin sulphate (0.05mg/kg, S.C)로 전마취후 ketamineHCl(10-21mg/kg,IM)으로 마취를 유지하였다.

복벽 절개후 모든 供卵犬에서 양쪽 난소의 난소낭을 가위로 절개하고 나서 황체수를 확인하였다. 자궁각 관류에 사용된 배지는 상기 수정란회수배지를 각 자궁각마다 약 30ml를 사용하여 受精卵을 회수하였다.

受精卵의 판정 : 자궁각을 관류한 배지는 페트리 디쉬 내 옮겨 실체현미경하에서 경검하여 受精卵을 회수하였고, 회수된 受精卵은 페트리 디쉬 내 배지 droplet을 연속 통과하는 방법으로 5회 세척하였다. 세척후 실체현미경하에서 受精卵의 발달단계 및 상태를 경검하였고, 일령에 따른 정상 발육 단계 및 양호한 상태를 보이는 受精卵만을 선별하였다. 受精卵을 다시 35x 10mm 페트리 디쉬 내 배지 droplet에 옮긴후 이식까지 37℃, 5% CO₂ incubator내 보존하였다.

受卵犬의 준비 : 受卵犬은 자연발정 또는 성선자극 호르몬처리 방법에 의한 인공 발정유도로 發情同期化하였고, 질점액 도말 검사를 실시하여 발정기를 확인하였다. 수란견에 대한 수정란 이식은 供卵犬으로 부터

결 과

신선 受精卵을 즉시 移植할 수 있기 위하여 供卵犬으로부터 移植 가능한 受精卵이 확인된 즉시 供卵犬과 동일한 외과적 방법으로 마취 및 복벽절개를 실시하여 이식하였다.

受精卵移植: 受卵犬은 복벽 절개후 자궁각을 노출시켰고, 회수된 受精卵은 양쪽 자궁각에 가능한 균등한 숫자로 移植하였다. 移植 부위는 상실배의 경우 자궁각 선단 부위를 택했고, 배반포의 경우 자궁각 선단부에서 중앙부쪽으로 약간 아래부분을 선택하였다.

移植방법은 유지침(indwelling needle)을 이용하여 자궁강을 확보하였고, steelet을 제거한후 가늘게 뽑은 pasteur pipette내 受精卵을 넣어 유지침내로 삽입하여 자궁강내 移植하였다. 移植을 끝낸 受卵犬은 복벽을 봉합한후 별도 격리하여 관리하였다.

妊娠의 진단: 受卵犬의 임신 진단은 임신 30일이후 복부 촉진 및 임신 50일 이후 X선 촬영법을 이용하였다.

분만의 확인: 受卵犬의 분만시 생산된 仔犬의 수, 仔犬의 생사여부, 성별, 태아의 이상상태, 등을 확인하였다.

개 受精卵移植시 供卵犬 또는 受卵犬으로 이용하기 위하여 FSH 또는 PMSG를 사용하여 외부증상 및 질점액도말검사를 통해 발정을 확인한 결과는 Table 2와 같다.

PSH 및 PMSG투여 군에서 호르몬 투여 개시후 발정전기 증상을 보인 간격은 각각 5.2, 4.9일 이었다.

발정전기증상 중 male attraction은 양군 모두에서 나타났으며, 발정전기 출혈은 FSH투여 6두중 2두, PMSG 투여 9두중 3두로서 각각 33.3%의 발생율을 보였고, 외음부 종대는 FSH 투여군에서 3두, PMSG 투여군에서 6두로서 각각 50.0%, 66.7%를 나타내었다. 질점액 도말검사에서 발정기 양상으로 판정된 개는 FSH 투여군에서 3두, PMSG 투여군에서 5두로서 각각 50.0%, 55.6%를 나타내었다.

성신자극 호르몬으로 인공적으로 발정을 유도한 후 발정양상으로 판정된 동물을 受精卵移植에서 供卵犬 또는 受卵犬으로 이용한 결과는 Table 3과 같다.

Table 2. Effect of gonadotropin on estrus induction in anestrus bitches*

Gonado-tropin	Bitch No	Total dose (FSH:mg PMSG:IUxtime)	Consecutive injection days	Sign appearance from 1st treatment (day)	Proestrus sign			Estrus detection by vaginal smear	
					MA	VB	VS	+	-
FSH-P (6 bitches)	F-1	17	8	6	0	-	-	0	-
	F-2	13	6	5	0	-	-	-	0
	F-3	11	5	4	0	-	-	-	0
	F-4	15	7	4	0	0	0	0	-
	F-5	19	6	5	0	0	0	0	-
	F-6	19	9	7	7	0	0	0	-
Mean ± SD		15.67 ± 3.27	6.83 ± 1.47	5.17 ± 1.67					
				Ratio	6/6	2/6	3/6	3/6	5/6
PMSG (9 bitches)	P-1	500x2		4	0	0	0	0	-
	P-2	600x2		6	0	-	-	-	0
	P-3	300x1		3	0	-	0	0	-
	P-4	600x2		8	0	-	-	-	0
	P-5	300x1		4	0	-	-	-	0
	P-6	600x2		5	0	0	0	0	-
	P-7	300x1		4	0	-	0	0	-
	P-8	600x2		6	0	-	0	-	0
	P-9	500x1		4	0	0	0	0	-
Mean ± SD				4.89 ± 1.54					
				Ratio	9/9	3/9	6/9	5/9	4/9
Total	15bitches			Ratio	5/15	5/15	9/15	8/15	7/15

MA: male attraction, VB:vaginal bleeding, VS:vulvar swelling

*: only the bitches that had passed over 4 months from last estrus were used in this experiment.

Table 3. Result of estrus induction by gonadotropin injection in canine embryo transfer

Bitch No	Gonadotropin		Role in ET		
	FSH-P	PMSG	Donor		Recipient Parturition
			No of embryos collected		
F-1	0				No
F-4	0			-	
F-5	0			-	
P-1		0		1	
P-3		0			No
P-6		0			No
P-7		0			No
P-9		0			Yes
Total	3	5		3	5

ET: embryo transfer

Table 4. Comparison of canine embryo recovery between ovariectomized and non-ovariectomized donors

Collection method	Bitch No	Estrus		Breeding		No of corpus luteum	No of embryos collected	Ratio of recovery	
		N	I	NC	AI			No of embryos / No of CL	%
Ovario-hysterectomy (6 bitches)	OH-1	0		0		3	1	1/3	33.3
	OH-2		0		0	-	-	-	-
	OH-3	0		0		6	6	6/6	100.0
	OH-4	0			0	5	4	4/5	80.0
	OH-5	0		0		3	-	0/3	-
	OH-6	0			0	5	4	4/5	80.0
Ratio(bitches/Total)		5/6	1/6	3/6	3/6	5/6	4/6	Total 15/22	68.2
Non-ovario-hysterectomy (7 bitches)	NH-1	0			0	4	2	2/4	50.0
	NH-2		0		0	3	-	0/3	-
	NH-3		0	0		6	1	1/6	16.7
	NH-4	0		0		4	3	3/4	75.0
	NH-5	0		0		4	4	4/4	100.0
	NH-6	0		0		3	1	1/3	33.3
	NH-7	0		0		5	5	5/5	100.0
Ratio(bitches/Total)		5/7	2/7	5/7	2/7	7/7	6/7	Total 16/29	55.2
Total		10/13	3/13	8/13	5/13	12/13	10/13	31/51	60.8

N: natural, I: induced, NC: natural coitus, AI: artificial insemination, CL: corpus luteum

FSH로 발정이 유도된 3두중 2두는 供卵犬으로 그리고 1두는 受卵犬으로 이용하였으며, 供卵犬 2두에서는 受精卵이 전혀 회수되지 않았다. 또한 受卵犬 1두는 임신이 성립되지 않았다.

PMSG로 발정이 유도된 5두중 1두는 供卵犬으로 이용하였고 4두는 受卵犬으로 이용하였다. 供卵犬 1두로부터는 한개의 상실배가 회수되었다. 受卵犬은 4두중 3두는 임신이 성립되지 않았고 1두만이 임신되어 분만하였다.

卵巢子宮摘出術후 자궁을 관류하는 방법과 자궁비적출상태에서 자궁을 관류하는 방법을 이용하여 受精卵을 회수한 결과는 Table 4와 같다.

난소자궁적출술시 受精卵회수는 6두중 4두에서 회수됨으로써 66.7%를 나타내었고 비적출시는 7두중 6두에서 회수되어 85.7%를 나타내었다.

총 황체수에 비례한 受精卵회수율은 난소자궁적출시 총 황체수 22에 대하여 회수 受精卵수는 15로서 68.2%의 회수율을 나타내었고, 비적출시는 총황체수 29에 대하여 회수 受精卵수 16으로서 55.2%의 회수율을 나타내었다. 자연발정견에 대한 受精卵회수 두수는 난소자궁적출시 5두중 4두(OH-1, 3, 4, 6), 비적출시는 5두중 5두(NH-1, 4~7)로서 각각 80.0%, 100.0%를 나타내었고, 인공발정 유도견은 비적출시 1두(NH-3)에서만 회수됨으로써 총 3두중 1두가 회수되어 33.3%를 나타

Table 5. Result of canine embryo transfer in recipient bitches

Bitch No	Estrus		Embryos transferred				Offspring delivered			
	Natural	Induced	Morula	Blastocyst	HB	Total	LB	SB	Male	Female
R-1	0		1			1				
R-2	0		5			5				
R-3	0				3	3				
P-1		0			2	2				
P-3		0		3		3				
P-6		0		4		4				
P-7		0		3		3				
P-9		0	3	2		5	1		1	
Total	3	5	9	12	5	26	1		1	

HB: hatched blastocyst, LB: live birth, SB: still birth

Table 6. Repeatability of bitches as donor or recipient in canine embryo transfer

Bitch No	Donor			Recipient			Total No of use	
	Estrus		No of embryos collected (embryo stage)	Estrus		No of embryos transferred (embryo stage)		No of offspring delivered
	N	I(F/P)		N	I(F/P)			
Rep-1	0	-	1(M)	0	-	3(HB)	-	2
Rep-2	-	0(F)	-	-	-	-	-	2
Rep-3	0	0(F)	5(B)	-	0(P)	3(B)	-	3
Rep-4				0	-	5(M)	-	2
				-	0(P)	4(B)	-	
Rep-5				-	0(F)	2(HB)	-	2
				-	0(P)	4(B)	-	
Rep-6	0	-	4(B)	-	0(P)	5(M/B)	1	2

N: natural, I: induced, F: FSH, P: PMSG, M: morula, B: blastocyst, HB: hatched blastocyst

내었다.

교배방법에서 자연교배시킨 견에 대한 受精卵회수수는 난소자궁적출시 3두중 2두(OH-1, 3), 비적출시 5두중 5두(NH-3~7)로서 각각 75.0%, 100.0%를 나타내었고 총 8두중 7두에서 회수되어 평균 87.5%를 나타내었다.

인공수정시는 난소자궁적출시 3두중 2두(OH-4, 6), 비적출시 2두중 1두(NH-1)에서 회수되었고, 총 5두중 3두에서 회수됨으로써 평균 60.0%의 회수율을 나타내었다.

受精卵를 供卵犬으로 부터 회수한후 자연발정견 또는 인공발정 유도견에 이식한 결과는 Table 5 와 같다.

受卵犬은 총 8두로서 이중 3두는 자연발정을 나타내었고 5두는 성선자극호르몬을 이용하여 인공적으로 발정이 유도되었다.

受卵犬에 移植된 受精卵는 발달단계로 분류하여 상실배, 배반포, 부화배반포 이었고, 상실배, 배반포, 부화배반포만을 이식받은 受卵犬은 각각 2두, 3두, 2두 이

었고 1두는 상실배와 배반포가 동시에 移植되었다.

受精卵이 移植된 8두중 1두만이 분만을 하였고, 분만한 1두는 인공발정유도된 수란견으로서 상실배 3과 배반포 2를 이식받아 1두의 産仔를 분만하였다.

개 受精卵移植에서 실험동물을 供卵犬 또는 受卵犬으로서 2회 이상 실험에 사용한 결과는 Table 6과 같다.

供卵犬 또는 受卵犬으로서 2회이상 실험에 사용된 개는 총 6두 이었다. 이중 2회 이상 사용하여 2회째 이상의 횟수에서 供卵犬으로서 受精卵이 회수되거나 受卵犬으로서 분만한 개는 3두이었다(Rep-1, 3, 6).

供卵犬으로서 2회 연속 사용된 개는 2두(Rep-2, 3)이었으며, 이중 1두에서 受精卵이 회수되었다.

受卵犬으로서 2회 연속 사용된 개는 2두(Rep-4, 5)이었으며, 2두 모두 임신이 이루어지지 않았다.

분만을 이룬 1두(Rep-6)는 1회째 供卵犬으로서 受精卵를 생산하고나서, 또한 2회째 受卵犬으로서도 산자를 분만하였다.

고 찰

개 受精卵 移植시 供卵犬 또는 受卵犬으로 사용하기 위하여 FSH 또는 PMSG를 사용한 결과, FSH군은 발정전기 외부증상을 보인 6두중 3두에서, PMSG 투여군은 9두중 5두에서 질 점액 검사 결과 발정기 양성 소견을 보임으로써 각각 50.0%, 55.6%를 나타내었다.

비 발정기에 있는 개의 발정을 인공적으로 유도시키기 위하여 Archbald et al¹⁰, Cain¹¹, Kraemer와 Bowen¹² 그리고 Thun et al¹³이 PMSG를 9-10일간 계속 사용하여 인공적으로 발정을 일으켰다고 하였고 이와 관련된 연구도 적지않다.^{14,15,16,17,18}

이 실험에서 FSH는 5-10일간의 범위로 투여되었고 PMSG는 1회 또는 2회로서 투여되어 발정증상을 일으킬 수 있었는데 male attraction은 대부분에서 관찰되었으나 외음부 종대는 약 50-60%만이 표시하였고 발정전기 출혈이 33%에서 나타난 것은 상기 연구자들의 보고와 비교해 볼때 성선자극 호르몬의 자극이 다소 부족했던 것으로 사료된다.

그러나 Evans⁷는 PMSG를 성선자극호르몬이 자극할 수 있는 적절한 시기에 1회 또는 2회 투여하여 투여된 동물의 85%가 standing estrus를 나타냈다고 하였는데 이 실험에서 발정기로 판정된 동물이 FSH, PMSG 투여군에서 모두 50%를 상회한 사실은 실험에 사용되었던 빈견들이 전회 발정후 4개월 이상 경과된 개들이었기 때문인 것으로 판단된다.

또한 이 실험에서 HCG투여는 자연발정견의 발정개시 시기와 동일한 시기에 인공 발정유도전에 대하여 사용되었는데 그럼에도 불구하고 50-55%가 발정양성반응을 나타낸것은 자연 발정견에 대한 發情同期化를 위해 인공적인 발정유도가 사용 가능하다는 사실을 시사하는 것으로 보인다. 또한 인공적인 발정유도는 동일한 시기에 자연적으로 발정이 나타나는 동물을 2두이상 한번에 확보하기가 어려운 상황이므로 보다 성공율을 높일 수 있는 방법이 더욱 연구되어야 할 것이다.

이 실험에서 성선자극호르몬 투여시 질점액 검사 소견상 발정 양성을 보인 개만을 供卵犬 및 受卵犬으로 사용한 결과 FSH 투여군중 供卵犬으로 사용된 2두에서 受精卵이 전혀 회수되지 않았고 受卵犬 1두는 임신이 성립되지 않은 반면, PMSG로 처리된 供卵犬 1두에서 受精卵이 회수되었고, 受卵犬 4두중 1두가 임신이 성립되어 분만이 일어난 결과는 개에서 성선자극호르몬 사용시 PMSG 사용이 FSH사용보다 더 좋은 효과를 나타내는 경향을 보인 것으로 생각된다.

이러한 사실은 Chakraborty et al¹⁹이 Labrador 개에

서 인공적인 발정유도시 PMSG가 FSH 보다 더 효과적이라고 한 보고와 Shillie et al²⁰이 개에서 FSH 사용시 그 효과를 절대적으로 신뢰하기 어렵다고 한 보고와 일치되는 것으로 보인다.

이 실험에서 난소 자궁적출술후 자궁을 관류한 개 6두중 4두에서 受精卵이 회수됨으로써 66.7%, 비적출시 개 7두중 6두에서 受精卵이 회수되어 85.7%의 회수율을 나타냄으로서 비적출시 더 높은 수정란 회수두수율을 나타낸 것은 受精卵 회수를 자궁비적출상태에서도 사용 가능함을 시사하는 것으로 보인다.

특히 비적출시의 이와 같은 회수 성공율은 자궁적출시에는 1회에서만 受精卵의 회수가 가능하나, 비적출상태에서는 매 발정기 때마다 受精卵을 회수할 수 있는 가능성을 높여줌으로써 우수견 또는 순수 혈통견의 번식성을 계속 유지시킬 수 있다는 점에서 더 가치를 나타낼 수 있으며, 개 동결 受精卵의 移植 성공시 그 가치는 더욱 높아질 것으로 보여진다.

한편, 이 실험에서 난소자궁적출시의 受精卵회수 두수율이 66.7% 인것은 Tsutsui et al¹의 3마리 Beagle을 이용한 실험에서 난소자궁적출술을 이용한 방법에 의해 3마리 모두 受精卵이 회수됨으로써 100.0%인 것에 비해서 낮는데, Tsutsui et al¹의 경우 3두 모두 자연 발정견이었으며 실험견의 수가 이 실험의 6두보다 반이 적었고 동일한 Beagle 품종만을 사용하였던 것이 성공율을 더 높일 수 있었던 것으로 보이나, 수정란 회수 두수율은 앞으로 더 향상시켜야 될 점인 것으로 판단된다.

또한 이 실험에서 총 황체수에 비례한 受精卵의 회수율은 자궁적출시 68.2%, 비적출시 55.2%로서 자궁적출시 수정란 회수의 가능성이 더 높은 것으로 인정된다.

한편 자궁적출시의 受精卵회수율 68.2%는 Tsutsui et al¹이 세마리 Beagle견의 자궁적출후 受精卵회수에서 총 황체수에 대한 受精卵회수율을 89.6%로 보고한 것에 비해 낮은 율이었는데 이는 앞으로 개선해야 될 것으로 사료된다.

또한 이 실험에서 자연교배를 실시한 供卵犬 8두중 7두에서 受精卵이 회수된 반면, 인공수정을 실시한 5두중 3두에서 受精卵이 회수된 결과는 受精卵移植시 확실한 受精卵의 생산을위하여 자연교배가 인공수정보다 더 선택될 수 있는 방법인 것으로 판단되나, 인공수정의 경우 受精卵이 회수되지 않은 2두가 모두 인공발정 유도된 供卵犬이었음을 감안한다면 필요한 경우에 인공수정을 사용해도 정상적인 성적을 올릴 수 있을 것으로 기대된다.

이 실험에서 인공 발정 유도된 개 3두중 2두에서 황

체가 인정되었고 황체가 인정된 2두중 1두에서만 受精卵이 회수되었으며, 수정란회수도 황체에 비해 매우 저조한 결과는 이 실험에서 인공발정유도를 위해 투여된 성선 자극호르몬이 자연발정견의 발정개시 시기에 맞추어 투여되었기 때문에 난포의 발달 및 성숙에 불충분했던 것을 시사하는 것으로 보인다.

또한 이 실험에서 자궁의 비적출시 受精卵회수의 경우에도 자궁체를 절개하여 catheter를 삽입하여 자궁을 관류한 방법은 자궁체 절개시 출혈이 있게되는 점, 절개 부위에 대한 봉합후 반흔이 존재 할 수 있는 점, catheter조작이 용이하지 못한 점, 등에서 Kraemer et al⁵이 제시한 바와 같이 소에서와 같은 balloon catheter를 이용한 受精卵회수방법이 더욱 연구된다면 供卵犬의 이용가능성을 더욱 높일 수 있을 것으로 생각된다.

회수된 受精卵을 자연 발정견 또는 인공발정유도견에 移植하여 분만이 일어난 受卵犬은 8두중 1두이었다. 이중 3두는 자연 발정견이었고 5두는 인공 발정 유도견이었는데, 이 결과는 개 受精卵移植에서 자연발정견과의 發情同期化를 위해 인공발정유도의 가능성을 확인하는 결과로 보여진다.

이 실험에서 자연 발정견에서 수태가 성공되지 못한 점은 供卵犬과 거의 동시에 발정이 일어나 자연적인 發情同期化가 이루어졌다하여도 자궁환경의 불일치 또는 부적합 때문인 것으로 보이며 이밖에도 3두중 1두는 주입 受精卵수가 한개로 너무 적었던 점, 다른 1두는 투명대가 제거된 부화배반포가 移植되었던 점이 원인으로 작용한것 같으며, 나머지 1두는 5개의 受精卵이 주입되었으나 受精卵의 조기 사멸을 일으킬 수 있는 환경요인이 존재했던 것으로 보여진다.

또한 인공 발정 유도된 개 5두중 1두만이 임신이 되어 대부분이 임신에 실패한 것은 성선자극호르몬의 외부주입에 의해 형성된 受卵犬의 자궁환경이 외부에서 移植된 受精卵이 착상하기에 적당하지 못하였음을 뜻하는 것으로 보인다.

이 실험에서 移植된 受精卵의 발달단계는 상실배, 배반포, 부화배반포의 세단계로 구별되어 移植되었으나 임신과 분만이 이루어진 것은 상실배와 배반포가 동시에 移植된 受卵犬 1두에서만 이루어진 결과로 보아 상실배 또는 배반포의 移植시 임신의 성공율을 더 높일 수 있는 것으로 생각된다. 이 결과는 Tsutsui et al¹이 3두의 受卵犬에 대하여 각각 상실배, 배반포, 팽대 배반포(expanded blastocyst)를 移植한 결과 상실배가 주입된 개 1두에서만 임신이 이루어진 사실과 비교해볼 때 개 受精卵移植에서는 상실배의 移植이 성공율을 더 높일 수 있는 것으로 사료된다.

이 실험에서 産仔를 분만한 受卵犬 1두에게는 5개의 受精卵이 移植되어 1두가 생산되어 낮은 분만율을 나타내었다. Tsutsui et al¹의 受精卵移植결과는 3두의 수란견에 18개의 수정란을 이식하여 상실배 8개가 이식된 1두에서 2마리가 생산되었으며, Kinney et al²이 7두의 受卵犬에 37개의 受精卵을 移植하여 총 4두만이 분만하여 평균 産仔數가 1.3이었다고 나타난 결과는 이 실험의 성적과 유사한 것으로 사료된다. 또한, 이 실험 및 상기 연구자들의 실험결과에서 볼수 있는 바와 같이 受精卵의 사멸이 높게 일어나고 있음을 알 수 있는데, 이것은 Kraemer와 Bowen¹¹의 보고에서와 같이 개에서 발정전기 및 발정기가 길기 때문에 供卵犬과 受卵犬간에 완전한 내분비적 發情同期化가 어려우므로 따라서 供卵犬으로 부터 생산되어 受卵犬에 移植된 受精卵이 생존하거나 착상이 이루어질만한 적합한 자궁환경이 受卵犬에서 제대로 성립되지 않았음을 나타내는 것으로 보여진다.

이 실험에서 受精卵 移植을 통해 移植된 1두는 移植 후 60일만에 출생함으로써 受精卵의 일령을 고려한 임신기간은 68일정도에 해당되는데, 이것은 개의 임신기간의 정상 범위로서 Feldman과 Nelson⁶이 보고한 58-68일, 그리고 Roberts⁸가 보고한 57-70일의 개의 정상 임신 기간의 범위에 속하기는 하나, 평균 임신기간인 60-63일 보다는 다소 늦은 결과로서 受卵犬에 移植된 受精卵이 受卵犬의 자궁 환경에 적응되기까지 受精卵의 발달이 다소 지연 되었을 가능성도 추측된다.

개 受精卵移植에서 供卵犬 또는 受卵犬으로서 2회이상 실험에 사용한 결과 2회째 이상의 회수에서 供卵犬으로서 受精卵이 회수되거나 또는 受卵犬으로서 분만 성적을 나타낸 개는 2회이상 사용견 6두중 3두이었다.

이중 2두는 2회 또는 3회째 供卵犬으로서 受精卵이 회수되었고, 분만을 이룬 1두는 1회째 供卵犬으로서 受精卵을 생산하고 나서 2회째 受卵犬으로서 분만을 하였다.

이 결과는 전회에서 개복수술 및 자궁을 조작하는 기술을 실시함에도 차회에서 번식성을 유지 할 수 있음을 나타내는 것으로 보이며, 특히 供卵犬으로서 受精卵회수 방법은 난소 자궁 비적출 상태에서 이루어진 결과로서 자궁비적출 상태에서 受精卵을 계속 회수할 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 생각된다.

이 실험에서 供卵犬에 대한 수술개시부터 受卵犬에 대한 移植시간은 평균 1시간 30분(60분-1시간 50분)이 소요되었다. 이 소요시간은 Tsutsui et al¹의 방법에서의 40-70분보다는 다소 긴 시간으로서 소요시간을 좀더 줄일 필요가 있다고 사료되나, Tsutsui et al¹의 경우 자

중난소적출술만을 실시한 방법에서의 소요시간이 이 실험에서 자궁적출술과 비적출상태에서의 평균소요시간과 차이가 있는 것으로 보인다.

이상의 결과, 개 受精卵移植에서 자연 발정견이 있을 때 그 개에 대한 상대견을 供卵犬 또는 受卵犬으로 하기 위한 發情同期化를 위해 성선 자극호르몬에 의한 인공 발정유도가 가능하며, 受精卵 회수는 자궁을 비적출한상태에서도 가능하며 그 개의 번식성을 유지하기 위해서는 비적출상태에서의 회수법이 더 선택될 수 있다는 것과, 인공 발정유도된 受卵犬도 분만이 성공적으로 이루어질 수 있으며, 아울러 受精卵移植시 한 동물을 供卵犬 또는 受卵犬으로서 반복이용, 또는 역할을 교환함으로써 계속 사용 가능하다는 사실을 확인할 수 있었다.

결 론

개에서 受精卵移植의 성공을 높일 수 있는 조건들을 알아보고자 20두의 잠종 빈견 및 4두의 잠종모견을 이용하여 受精卵移植을 시도하였으며, 發情同期化를 위해 자연 발정견 끼리 짝을 맞추거나 또는 자연 발정견에 대하여 다른 개를 供卵犬 또는 受卵犬으로 사용하기 위하여 FSH 또는 PMSG로 처리하여 인공적으로 발정을 유도시켰다.

受精卵회수는 卵巢子宮摘出術후 자궁관류법 또는 자궁비적출상태에서 자궁관류법의 두가지 방법을 비교하였으며, 受精卵移植시 受精卵의 발달 단계에 따른 수태 성적, 그리고 受精卵移植에서 供卵犬 또는 受卵犬으로서 반복사용 가능성을 알아 본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 전회 발정후 4개월이상 경과된 개에 FSH 또는 PMSG를 사용하여 외부증상 및 질점액검사에 의해 발

정을 확인한 결과 FSH투여군은 6두중 3두 (50.0%), PMSG 투여군은 9두중 5두 (55.6%)가 양성을 나타내었다.

2. 성선자극호르몬 투여후 발정 양성인 개를 供卵犬 또는 受卵犬으로 사용한 결과 FSH투여군은 전혀 성적이 나타나지 않은 반면, PMSG 투여군 5두중 1두는 供卵犬으로서 受精卵이 회수되었고, 1두는 受卵犬으로서 분만 성적을 나타내었다.

3. 卵巢子宮摘出術과 비적출시의 受精卵채취성적에서, 자궁적출시는 총 황체수에 비례한 受精卵회수율이 68.2%로서 비적출시의 55.2%보다 受精卵회수율에서 더 높은 수치를 나타내었다.

4. 卵巢子宮摘出術시 受精卵이 회수된 두수는 6두중 4두로서 66.7%, 비적출시 受精卵이 회수된 두수는 7두중 6두로서 85.7%를 나타내어 受精卵회수 두 수는 비적출시 더 높은 수치를 나타내었다.

5. 受精卵이 移植된 受卵犬에서 자연발정견 3두에서는 임신이 성립되지 못 했고, 성선자극호르몬으로 인공 발정 유도된 5두중 1두가 분만하였다.

6. 분만을 한 1두는 상실배와 배반포가 동시에 移植된 受卵犬이었다.

7. 供卵犬 또는 受卵犬으로서 2회이상 계속 사용하여 供卵犬으로서 受精卵이 회수되거나 受卵犬으로서 분만 한 개는 2회이상 반복사용 견 6두중 3두이었다.

이상의 결과, 개 受精卵移植에서 자연발정견이 있을 때 자연 발정견에 대한 상대견을 供卵犬 또는 受卵犬으로 하기위한 發情同期化를 위해 성선 자극 호르몬에 의한 인공 발정유도가 가능하다는 사실, 受精卵회수는 자궁 비적출상태에서도 가능하다는 사실, 인공발정유도된 受卵犬도 분만이 성공적으로 이루어 질 수 있다는 사실, 그리고 受精卵移植시 供卵犬 또는 受卵犬으로서 계속 사용 가능하다는 사실을 확인할 수 있었다

Legends for figures

Fig 1. A canine compact morula which is about 9 days old. phase contrast microscope. ×100.

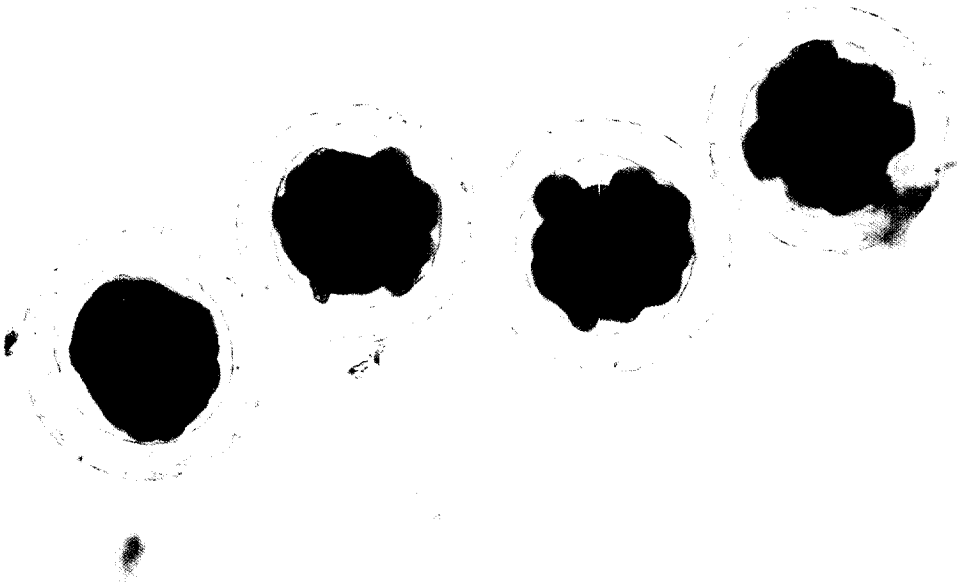
Fig 2. Four canine compact morulae which are about 8 days old. phase contrast microscope. ×100.

Fig 3. A hatched blastocyst which is about 12-13 days old. light microscope. ×100.

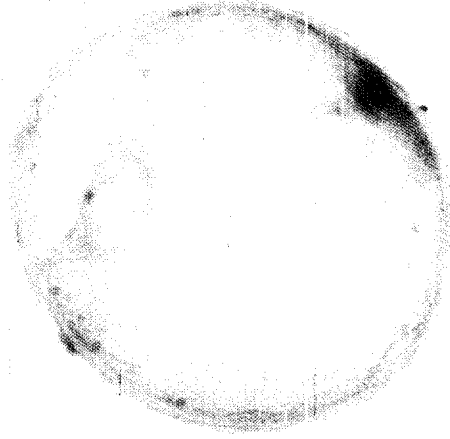
Fig 4. The greater part of the same blastocyst as No. 3 which is magnified. phase contrast microscope. ×200.



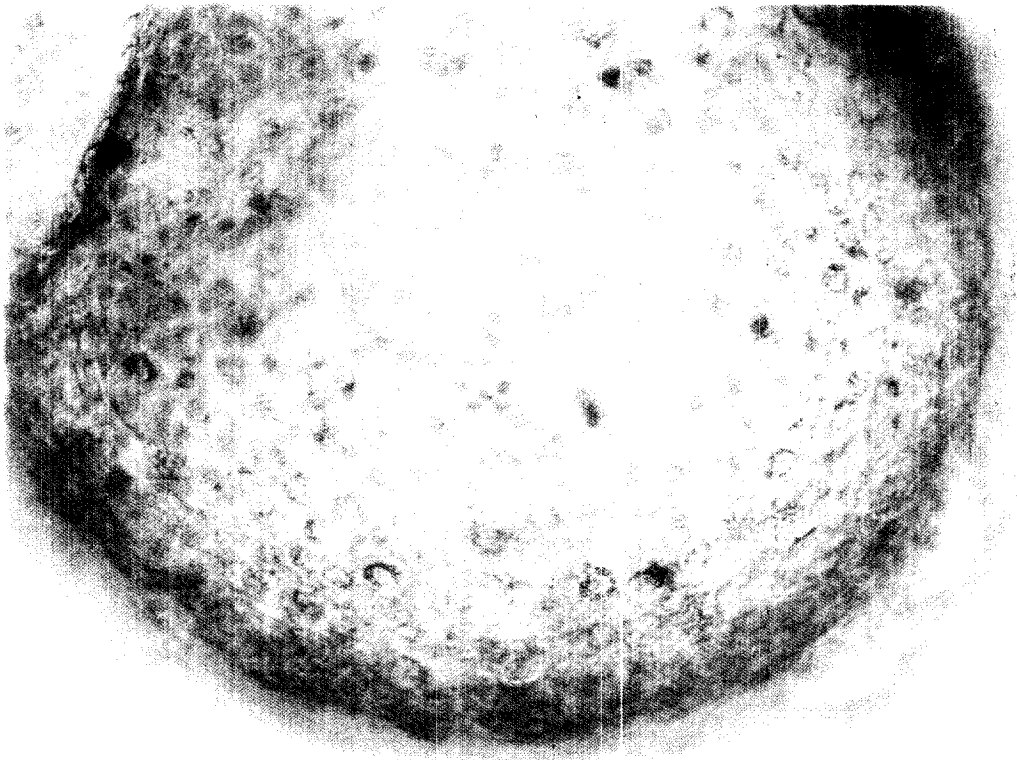
1



2



3



4

참 고 문 헌

1. Tsutsui T, Shimada K, Nishi M, et al. An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jpn J Vet Sci* 1989; 51:797-800.
2. Kinney GM, Pennycook JW, Schriver MD, et al. Surgical collection and transfer of canine embryos. *Biol Reprod Suppl* 1979; 1:20.96A.
3. Takeishi M, Akai R, Tsunekane T, et al. Studies on the reproduction in the dog. A trial of ova transplantation in dogs. *Jpn J Anim Reprod* 1980; 26:151-153.
4. Drost M. Embryo transfer in dogs and cats. In: Roberts SJ ed. *Veterinary obstetrics and genital diseases (theriogenology)*. Vermont: David and Charles Inc, 1986; 938-939.
5. Kraemer Dc, Flow BL, Schriver MD, et al. Embryo transfer in the non-human primate, feline and canine. *Theriogenology* 1979; 11:51.
6. Feldman EC and Nelson RW. Canine and feline endocrinology and reproduction. Philadelphia: WB Saunders Company. 1987; 399-413, 465-466.
7. Evans LE. Induction of estrus in the bitch. In: Morrow DA ed. *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders Company 1980; 618-620
8. Roberts. SJ. *Veterinary obstetrics genital disease*. Vermont: David and Charles Inc, 1986; 677-678.
9. Lumb WV and Jones EW. *Veterinary anesthesia*. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger 1984; 309.
10. Archbald LF, Baker BA, Clooney LL, et al: A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim Clin*. 1980; 75: 228-238.
11. Cain JL. Induction of estrus and ovulation in the bitch. In: Kirk RW and Bonagura JD ed. *Current Veterinary therapy XI Small animal practice*. Philadelphia: WB Saunders Company. 1992; 1288-1291.
12. Kraemer. DC and Bowen MJ. Embryo transfer in laboratory animals. In: Morrow DA ed. *Current therapy in theriogenology* 2. Philadelphia: WB Saunders Company. 1986; 73-78.
13. Thun R, Watson P and Jackson GL. Induction of estrus and ovulation in the bitch, using exogenous gonadotropins. *Am J Vet Res* 1977; 38:483-486.
14. Cain JL, Cain GR, Feldman EC, et al. Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. *Am J Vet Res* 1988; 49:1993-1996.
15. Nakao T, Aoto Y, Fukushima S, et al. Induction of estrus in bitches with exogenous gonadotropins, and pregnancy rate and blood progesterone profiles. *Jpn J Vet Sci* 1985; 47(1):17-24.
16. Tsutsui T, Kawakami E, Orima H, et al. Effects of prostaglandin F_{2α}-analogue administration on luteal function, implantation of embryos and maintenance of pregnancy in bitches. *Jpn J Vet Sci* 1989; 51:496-504.
17. Tsutsui T, Sato M, Kurosawa N, et al. Embryo transfer in the cat during the non-breeding Season. *Jpn J Vet Sci* 1989; 51:871-877
18. Tsutsui T, Takatani H, Hirose O, et al. Effects of prostaglandin F_{2α} on implantation and maintenance of pregnancy in the dog. *Jpn J Vet Sci* 1982; 44: 403-410.
19. Chakraborty PK, Panko Wb, Seager SWJ. Hormone levels during the estrous cycle, pregnancy and pseudopregnancy in the Labrador bitch(abstract). *Proceedings of the American Society of Animal Science*. 1978; 337:349.
20. Shillie VM, Thatcher MJ, Simmons KJ. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *JAVMA* 1984; 184:1469-1473.