

간이 난자채취기를 이용한 젖소로부터 난포란의 채취와 체외수정란의 생산

김일화 · 손동수 · 이호준 · 양병철 · 최선호 · 이동원 · 서국현 · 이광원
축산기술연구소

***In Vitro* Embryo Production Following Transvaginal Follicular Oocyte Aspiration from Holstein Cows Using a Simple Aspiration Apparatus**

**I. H. Kim, D. S. Son, H. J. Lee, B. C. Yang, S. H. Choi, D. W. Lee,
K. H. Seo and K. W. Lee**

National Livestock Research Institute

SUMMARY

The present study was carried out to produce *in vitro* fertilized embryos with immature follicular oocytes collected by transvaginal aspiration from Holstein cows. A simple aspiration apparatus consists of two stainless steel tubes, an inner tube (needle holder; 1.2cm diameter, 55cm long) and an outer tube (1.5cm diameter, 45cm long), and a hand-operated vacuum pump was used. Under epidural anesthesia, the needle guide was passed into the vagina of the cow to a point next to the cervix. An ovary was placed against the wall of the vagina over the end of the aspiration needle by rectal manipulation. As the needle passed into the ovary, an assistant was asked to apply vacuum (100mmHg) and the ovary was manipulated back and forth in all directions over the needle. When all sites of the ovary was aspirated, the needle was withdrawn and the needle guide was moved to the other side of ovary and the procedure was repeated. When the oocyte aspiration procedure was finished, collected fluid was transported to laboratory. Oocytes surrounded with at least 1 layer of cumulus cells were matured, fertilized and cultured *in vitro*. The results were as follows;

Ninety seven oocytes were collected by transvaginal aspiration from seventeen Holstein cows (5.7/head). The number of oocytes surrounded with at least 1 layer of cumulus cells were 60 (61.9%). Following *in vitro* maturation, fertilization and culture, the cleavage and development rate to morula+blastocyst were 83.3% and 30.0%, respectively.

From this study, transferable *in vitro* fertilized embryos could be produced with immature follicular oocytes collected by transvaginal aspiration from Holstein cows using a simple aspiration apparatus.

(Key words : follicular oocyte, simple aspiration apparatus, Holstein cows, *in vitro* fertilization)

서 론

과배란치리에 의한 수정란의 비외과적 채란방법은 소의 개량을 위하여 널리 이용되는 방법이나 공란우 개체에 따른 회수란 수의 변이가 심하며(Monniaux 등, 1983), 채란 후 번식 간격의 지연(Cowen과 Sosnik, 1987) 등의 원인에 의해 수정란의 다량 생산면에서 효율성이 떨어진다. 근래에는 체외수정 기술을 수정란 생산에 활용하므로써 실험실내에서 이식가능 수정란의 다량 생산이 가능하게 되었으나(Stubbings와 Walton, 1995) 도축된 암소의 난소에서 난포란을 채취할 경우에는 난자의 반복채취가 불가능하며(Pieterse 등, 1991), 수정란이식 후 태어난 산자의 모계통에 대한 혈통 및 능력을 알 수 없기 때문에 가축개량을 위해서 사용은 곤란하다. 따라서 고능력 가축으로부터 미성숙 난포란을 주기적으로 채취, 체외수정 및 배양으로 수정란을 생산 시에는 우량 수정란의 다량 생산체계를 구축할 수 있으며(Pieterse 등, 1988) MOET program(Reinders와 Leeuw, 1996)에도 유용한 수단이 될 수 있다.

생체 소로부터 난포란의 회수를 위하여 처음에는 복강경검사법 및 개복술이 이용되었으며(Holland 등, 1981; Lambert 등, 1983), Pieterse 등(1988)이 초음파유도 난자채취기를 이용한 소의 난포란의 채취기술을 소개한 후 이러한 기술을 이용한 체외수정란의 생산에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다(Bols 등, 1995; Bungartz 등, 1995; Brogliatti와 Adams, 1996). 또한 Hill(1996)은 초음파유도장치 부착되지 않은 간단한 난자채취기를 이용하여 농가에서도 쉽게 공란우로부터 난포란의 반복채취가 가능하였다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 초음파유도 난자채취기를 이용한 난포란 채취를 위한 예비 시험으로 젖소로부터 매우 간편한 난자채취기를 이용하여 절을 경유한 미성숙 난포란을 채취, 체외수정 및 배양으로 이식가능한 체외수정란을 생산하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

난포란 채취를 위한 공란우는 축산기술연구소 종축개량부에서 사육중인 젖소 종빈우 14두로서 직장검사를 통하여 정상적인 생식기관을 가진 개체를 선발하여 그 중 3두는 1차 채취 10일후에 반복채취하였다.

2. 공란우의 준비

공란우의 움직임을 최소화하기 위하여 공란우 전용 보정틀에서 보정시킨 후 2% xylazine hydrochloride(Rompun, 바이엘코리아) 0.4ml의 정맥주사로 진정시킨 다음, lidocaine hydrochloride(2% 리도카인, 제일제약) 6ml로 경막외마취를 실시하였다. 직장내의 분을 제거한 후 외음부 주위를 중성세제로 씻고 종이타올로 닦은 후 70% 알코올면으로 소독하였다.

3. 간이 난자채취기의 준비(Fig. 1)

Needle adapter 앞부분에 19G aspiration needle(Becton Dicknson, USA)로 접속하고, 뒷부분에는 inner tube를 통과한 silicone tubing(Dow Corning #508-009)으로 연결하였으며, silicone tubing 반대쪽은 17G needle을 접속하여 실리콘 마개를 한 50ml centrifuge tube(Elkay, USA)에 연결하였다. Hand-vacuum pump(Nalgene, USA)에 plastic

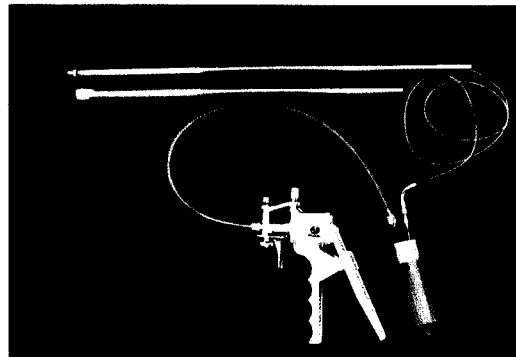


Fig. 1. A simple aspiration apparatus consists of two stainless steel tubes and an hand-operated vacuum pump.

N : aspiration needle; I : inner tube; O : outer tube
V : hand-operated vacuum pump.

tubing (I 1/4", Nalgene, USA)을 끼우고 16G needle로서 50ml centrifuge tube에 연결한 후 25mg/ml heparin(Sigma)이 첨가된 TCM 199 배양액을 소량 흡입했다. Outer tube의 선단부를 sealing film(Whatman, USA)으로 감은 후 inner tube를 outer tube에 장착하였다.

4. 난포란의 채취

난포란의 채취는 간이 난자 채취기를 공란우의 질을 통하여 자궁경관에 근접시키고 직장을 통하여 난소를 견인하여 outer tube의 끝에 오게 하였다. Inner tube를 밀어 outer tube의 끝이 sealing film을 통과하게 하고 needle을 난소내에 삽입한 후 vacuum pump의 압력이 100mmHg가 유지되도록 하면서 난소의 모든 방향으로 표면 및 내부를 천자하여 난포액을 흡입하였으며, 양측 난소의 채란이 종료되면 needle을 철회한 후 배양액의 흡입으로 tubing내의 난포액을 tube에 회수하여 실험실로 옮겼다.

5. 난포란의 체외 성숙 및 수정

회수된 채란액을 수정란회수기(Embryo collector, Fujihira Inc., Japan)의 필터를 통하여 여과시킨 후 하부에 남아 있는 채란액을 실체현미경(Olympus, Japan)하에서 난포란을 회수하여 최소 1층 이상의 난구세포층을 가진 난자를 선별하여 5 μ g/ml FSH (Sigma), 10IU/ml hCG(Chorulon, Intervet, Holland), 1 μ g/ml estradiol-17 β (Sigma), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco) 및 50 μ g/ml gentamicin(동신제약)이 첨가된 TCM 199 성숙배양액에서 3~4회 세척 후 TCM 199 성숙배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하고 선별된 난자를 넣었으며 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂배양기에서 24시간 동안 배양을 실시하여 체외성숙을 유도하였다.

젖소 동결정액을 38 $^{\circ}$ C의 온수에서 30초간 용해시킨 후 10mM caffeine(Sigma)이 첨가된 정자 세척용 BO배양액(Brackett과 Oliphant, 1975)과 혼합하여 회석한 다음 200 \times g으로 5분간 2회 원심세척 후 5mM caffeine, 10 μ g/ml heparin(Sigma) 및 0.5% bovine serum albumin(BSA, Sigma)이 첨

가된 수정능획득용 BO배양액으로 재부유하였으며 최종적으로 정자농도가 1 \times 10⁶ 정자/ml가 되게 조정하여 200 μ l의 소적을 60 \times 15mm 조직배양접시(Nunc, Denmark)에 적하한 후 멸균 mineral oil(Sigma, USA)로 피복하고 성숙 난자를 체외수정용 BO배양액으로 3~4회 세척한 후 정자 소적에 옮겨 6시간 동안 CO₂배양기에서 체외수정하였다.

6. 수정란의 체외배양

1) 난관 상피세포의 준비

도축장에서 채취한 소의 난관을 5 $^{\circ}$ C로 유지하면서 실험실로 옮겨 멸균된 수술기구로 난관 주위 결합조직과 지방조직을 제거하고 70% 알코올로 소독하였다. TCM 199 기본배양액 2ml로 난관채에서 난관-자궁연결부쪽으로 관류시켜 난관 상피세포를 회수한 후 200 \times g으로 5분간 2회 원심분리하여 세척하고 TCM 199 성숙배양액으로 재부유하여 난관 상피세포의 최종농도가 1 \times 10⁶ cells/ml가 되도록 조정한 후 4-well dish에 0.5ml씩 분주하여 CO₂배양기에서 72시간 배양시켜 단층세포의 형성을 유도하였다.

2) 체외배양

체외수정된 난자를 voltex(Scientific Industries, USA)로써 진탕시켜 난자에 부착된 난구세포와 정자를 제거하고 난관상피 단층세포에서 9일간 공배양시켰으며, 배양중 48시간마다 배양액을 신선한 배양액으로 교환하고 24시간마다 수정란의 분할, 상실배 및 배반포의 발육을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 간이 난자채취기를 이용한 젖소로부터의 난포란 채취 성적

젖소 종빈우 14두에 대해서 11두는 1회, 3두는 1차 채취 10일 후 반복하여 난포란을 채취한 결과는 Table 1과 같다.

젖소 종빈우 17두에서 두당 평균 5.7개의 난포란이 회수되었으며(Fig. 2) 그 중 최소 1층 이상의 난구세포층으로 둘러싸인 난자는 평균 3.5개(61.9%)

Table 1. Recovery of follicular oocytes by transvaginal aspiration from Holstein cows using a simple aspiration apparatus

Collection sequence	No. of cows	Total ova /cow	Viable ova*/cow (%)
1	14	5.9±4.3	3.6±3.3 (61.0)
2	3	5.0±3.6	3.3±3.1 (66.7)
Total(mean)	17	5.7±4.2	3.5±3.2 (61.9)

* Viable ova : ova surrounded with at least 1 layer of cumulus cells.

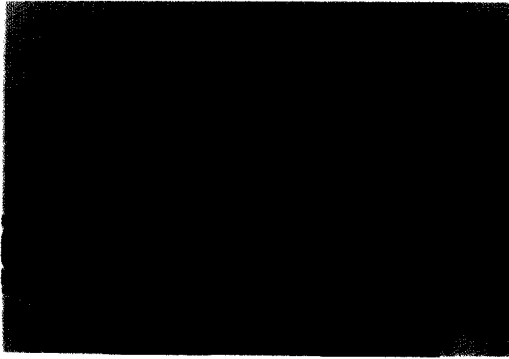


Fig. 2. Immature follicular oocytes collected by transvaginal aspiration from a Holstein cow.

가 회수되었다. 채취회수에 따른 회수란 수 및 최소 1층 이상의 난구세포층으로 둘러싸인 난자수는 각각 1회 채취시 5.9개, 3.6개로 2회 채취시 5.0개, 3.3개에 비하여 다소 많았다. 이러한 성적은 본 연구에서 사용한 것과 유사한 간이 난자채취기를 이용하여 난포란을 채취한 Hill(1996)의 평균 회수란 수 6.2개, 양질의 난자수 3.7개에 비해 다소 낮은 성적을 나타내었다. 한편 Gibbons 등(1995)은 초음파유도 난자채취기를 이용하여 난포란을 채취 결과 회수란 수 9.7개, 양질의 난자수 5.1개로서 본 연구의 결과

에 비해 양호한 난포란 채취 성적을 보고하였으며 또한 Schans 등(1991)은 회수난자중 난구세포가 부착된 난자의 비율이 74~75%라고 하여 본 연구 결과의 61.6%에 비하여 보다 높은 양질의 난자 회수율을 보고하였다. 그러나 Goto 등(1995)은 평균 회수란 수 5.6개, 생존 난자수 3.7개, Bungartz 등(1995)은 회수란 수 5.8개, 생존 난자수 3.6개로서 본 연구와 유사한 성적을 나타내었다. 본 연구에서 다른 연구자와 달리 초음파 유도장치가 부착되지 않은 간이 난자채취기로써 난포란을 채취하였기 때문에 채란시 부정확한 채취과정에 기인되어 낮은 난자 회수율을 나타낸 것으로 생각되며 또한 시술자의 숙련도(Scott 등, 1994)와 공란우의 발정주기, 비유단계, 연령, 품종 및 채란시의 스트레스 등(Hazeleger 등, 1995)에 의한 난소의 활성 상태도 영향을 미치므로 이와 관련된 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

2. 미성숙 난포란의 체외 수정 및 배양 성적

채취된 미성숙 난포란을 체외 성숙, 수정 및 배양시킨 후의 분할률 및 상실배 이상의 발달률은 Table 2에서와 같다.

최소한 1층 이상의 난구세포층으로 둘러싸인 미성숙 난포란 60개를 체외 성숙, 수정 후 난관상피

Table 2. Development of embryos derived from oocytes recovered by transvaginal aspiration from Holstein cows

No. of immature oocytes	No. of oocytes inseminated	No. of embryos cleaved (%)	No. of embryos developed to (%)		
			Morula	Blastocyst	Morula + blastocyst
60	60	50 (83.3)	9 (15.0)	9 (15.0)	18 (30.0)

단층세포에서 9일간 체외배양시킨 결과 50개가 2세포기 이상으로 분할(83.3%) 되었으며 그 중 9개(15.0%)는 상실배로, 9개(15.0%)는 배반포로 발육되었다. 이러한 성적은 Broussard 등(1996)이 보고한 2세포기 이상 분할률 82.4%와는 비슷하였으며 상실배 이상 발달률 55.2%에 비해서는 낮았으나, Goto 등(1995)이 보고한 분할률 및 상실배 이상 발달률 44~53%, 12~23%와 Gibbons 등(1994)의 상실배 이상 발달률 18.0%~26.1%보다 높은 발달률을 보였다. 그러나 본 연구의 상실배 이상 발달률 30.0%는 동일 실험실에서 도축 난소를 이용 난포란을 회수하여 체외수정 및 배양 결과 상실배 이상 발달률(김 등, 1996) 40.7~54.4%에 비해 낮은 발달률을 나타내었는데 이것은 본 연구에서 채취된 난자의 질이 불량하였던 점과 최소 1층 이상의 난구세포가 부착된 난자를 사용한 것이 주원인으로 추정된다.

적 요

젖소로부터 질을 경유하여 미성숙 난포란을 채취하여 이식가능한 체외수정란을 생산하고자 two stainless steel tubes와 an hand-operated vacuum pump로 구성된 간이 난자채취기를 경막외 마취된 젖소의 질내에 삽입하여 경관 가까이에 도달 후 직장을 통한 조작으로 난소를 간이 난자채취기의 aspiration needle의 끝부위가 접촉되는 질벽으로 이동시킨 후 aspiration needle로 난소의 모든 방향으로 표면 및 내부를 천자하여 간이 진공펌프로 100mmHg의 진공상태를 유지하면서 난포액을 흡입하였으며 채취된 난포액에서 난포란을 회수하여 체외성숙, 수정 및 배양시킨 결과는 다음과 같다.

17두의 젖소로부터 회수된 난포란은 97개(5.7개/두)였으며 그 중 최소 1층 이상의 난구세포층으로 둘러싸인 난자는 60개(61.9%)였다. 이러한 난포란 60개를 체외 성숙, 수정 및 배양 후 분할률 및 상실배 이상 발달률은 각각 83.3% 및 30.0%였다.

본 연구의 결과 매우 간단한 난자채취기를 이용하여 젖소로부터 질을 경유한 미성숙 난포란의 채취가 가능하였으며 체외 성숙, 수정 및 배양 후 이식 가능한 체외수정란이 생산되었다.

참고문헌

- Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A and de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick-up(OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43:677-687.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12:260-274.
- Brogliatti GM and Adams GP. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, 45:1163-1176.
- Broussard JR, Rocha A, Lim JM, Blair RM, Roussel JD and Hansel W. 1996. The effect of environmental temperature and humidity on the quality and developmental competence of bovine oocytes obtained by transvaginal ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology*, 45:351.
- Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D and Niemann H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 43:667-675.
- Cowen P and Sosnik U. 1987. Effect of superovulation on lactating Holsteins. *Theriogenology*, 28:783-788.
- Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE and Gwazdauskas FC. 1994. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 42:405-419.
- Gibbons JR, Krisher RL, Carlin SK, Pearson RE and Gwazdauskas FC. 1995. *In vitro* embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular

- oocyte aspiration. *Theriogenology*, 43:1129-1139.
- Goto K, Tanimoto Y, Ookutsu S, Nakanishi Y, Yanagita K, Kubota C, Kajisa O, Kawabata K, Yokoyama K and Inohae S. 1995. Birth of calves derived from oocytes collected by transvaginal ultrasound guided follicular aspiration. *J. Reprod. Deve.*, 41:171-174.
- Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB and Walton JS. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, 43:509-522.
- Hill BR. 1996. A simple method of transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, 45:235.
- Holland EJ, Bindon BM, Piper LR, Thimonier J, Cornisch KA, Radford HM. 1981. Endoscopy in cattle: techniques for ovarian examination by the paralumbar and midventral routes. *Anim. Reprod. Sci.*, 4:127-135.
- Lambert RD, Bernard C, Rioux JE, Beland R, D'Amours D and Montreuil A. 1983. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*, 20:149-161.
- Monniaux D, Chupin D and Saumande J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19:55-81.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip Th. AM and Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip Th. AM, Wurth YA, van Beneden Th. H, Willemse AH and Taverne MAM. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24.
- Reinders JMC and van Wagtenonk-de Leeuw AM. 1996. Improvement of MOET program by addition of *in vitro* production of embryos after ovum pick up from pregnant donor heifers. *Theriogenology*, 45:354.
- van der Schans A, van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, Eyestone WH and de Boer HA. 1991. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, 35:288.
- Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Peterson C and Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vec. Rec.*, 134:440-443.
- Stubbings RB and Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrus cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 43:705-712.
- 김일화, 손동수, 이호준, 최선호, 양병철, 이광원, 김경남, 장인호. 1996. 한우 체외수정란의 체외배양, 동결보존 및 이식에 관한 연구 I. 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 공배양세포와 성장인자의 효과. *한국수정란이식학회지*, 11: 111-124.