

## 한우 체외수정란의 생산과 이식후 쌍자 생산에 관한 연구

김 용 권\* · 김 진 성\*\*

동아대학교 축산학과

### Study on Production of *In Vitro* Embryos and Twin Calves by Embryo Transfer in Korean Native Cattle

Kim, Y. G.\* and J. S. Kim\*\*

Department of Animal Science, Dong-A University

#### ABSTRACT

The objectives of this study were performed to increase the efficiency of the culture conditions of embryos produced *in vitro*, and to assess the developmental potential after transfer of those embryos into recipients.

The mean number of follicular oocytes recovered from an ovary was 10.7. The rates of maturation and fertilization in Grade I oocytes were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than Grade II and III. Developmental rate into blastocyst in the culture group of TCM-199 with BOEC were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the groups of TCM-199 and conditioned medium (24.7% vs. 12.4% and 18.2%). The survivability of post-thawed blastocysts equilibrated for 3 min in EFS solution was significantly ( $P < 0.05$ ) lower than 10for 1 and 2 min (32.1% vs. 82.9% and 73.3%). Significantly higher ( $P < 0.05$ ) survival rate in blastocysts was seen after freezing than in morulae stage embryos.

Out of all 105 recipients, 49 (46.7%) were confirmed in pregnant. On pregnancy of cattle, 48 calves were born from 40 recipients. The ratio of twin and single calves was 30.5% (32/40) and 7.6% (8/40), respectively. However, the others composed of abnormal, as judging as 6 (12.2%) for abortion and 3 (6.1%) for stillbirth during the pregnant period.

(Key words : IVM, IVF, IVC, Embryo transfer, Twin production, Korean native calves)

#### I. 서 론

Austin(1951)과 Chang(1951)이 정자의 수정능획득 현상을 보고한 이래, Thibault 등(1954)에 의해 토끼에서 최초로 체외수정을 성공시킨 바 있다. 소의 경우는 Edwards(1965)가 체외성숙의 가능성을 시사하였고, Brackett 등(1982)이 체내성숙된 난자를 난

관으로부터 회수하여 체외수정한 다음 수란우에 이식한 결과 최초로 송아지를 생산한 이래 Crister 등(1986), Hanada 등(1986), Goto 등(1988)에 의해서도 축되어지는 난포란을 이용한 체외배양기법에 의해 생산된 수정란을 이식하여 송아지를 생산하기에 이르렀다.

따라서 본 연구에서는 체외수정란 이식에 따른 안정적인 한우 송아지의 생산을 목적으로 폐기되는 한우의

\* 동아대학교 대학원 축산학과 {(051)200-7317 FAX(051)200-7535}

\*\* 동아대학교 생활과학대학 식품과학부{(051)200-7317 FAX(051)200-7535}

난소를 이용해서 난포란을 채란하여 체외성숙 및 체외수정에 미치는 요인을 조사하고, 체외수정란의 배양조건을 확립함과 동시에 생산된 체외수정란을 수란우에 이식하여 수태율 및 분만율을 조사하여 효율적인 수정란이식기술을 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채취

본 실험에 공시된 난소는 도살된 한우 암소에서 적출하여 penicillin G (100 IU ml<sup>-1</sup>)와 streptomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>)이 함유된 생리 식염수(28℃~30℃)가 들어 있는 보온병에 담아 실험실로 운반한 후 penicillin G와 streptomycin이 함유된 생리식염수(28℃~30℃)로 3회 세척하여 난포란을 채취하였으며, 난포의 크기에 따라 소난포(<2 mm), 중난포(2~6 mm) 및 대난포(>6 mm)로 구분, 난포액과 난포란을 동시에 흡입하여 채란하였다. 흡입된 난포액은 40 배 배율의 도립현미경(Olympus, Japan)에서 난포란을 수집한 후 기본배양액(TCM-199 + 10% FCS)으로 3회 세척하면서 선발하였다.

난포란의 선별은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 4~5 층의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 충실한 것을 Grade I, 2~3 층의 난구세포층을 가진 것을 Grade II, 부분적으로 나화된 것을 Grade III, 완전히 나화된 것으로 구분하였으며, Grade I, II 및 III의 난포란을 실험에 공시하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙

체외성숙 배양액은 TCM-199 배양액에 sodium pyruvate(56 µg ml<sup>-1</sup>), streptomycin(100 µg ml<sup>-1</sup>), penicillin G(100 IU ml<sup>-1</sup>)와 hormones은 LH(10 µg ml<sup>-1</sup>), FSH(10µg ml<sup>-1</sup>), estradiol-17β (1 µg ml<sup>-1</sup>)를 첨가하였으며, 10% 수준의 FCS가 첨가된 배양액을 4-well dish에 1 ml씩 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 39℃)에서 4시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도하였다.

체외성숙은 Wiemer 등 (1991)의 방법에 준하여 18시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 다음, 체외성숙용 배양액에 등급별로 15~20개의 난포란을 넣고 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 체외성숙을 유

도하였으며, 체외성숙에 이용한 체세포는 과립막세포나 난관상피 세포를 사용했으며, 농도는 각각 1~2×10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>의 농도로 난포란과 같이 24시간 동안 공배양을 실시하여 난구세포의 팽창 정도와 세포질의 충실도 등으로 체외성숙도를 판정하였다.

### 3. 정자의 준비 및 체외수정

체외수정을 위한 정자의 준비는 도살된 한우로부터 정소를 적출하여 4℃ 전후의 항생제가 첨가된 생리식염수에 담아 실험실로 운반 penicillin G(100 IU ml<sup>-1</sup>)와 streptomycin(100 µg ml<sup>-1</sup>)이 첨가된 생리식염수로 2~3 회 세척하여 B.O. 배양액이 들어있는 dish에서 세척한 농후정자를 채취하였다. 채취된 정자는 caffeine(10 mM)이 첨가된 세척용 B.O. 배양액으로 활력이 높은 정자를 채취코자 CO<sub>2</sub> incubator에서 swim-up을 실시하였다.

Swim-up을 유도하여 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500×g에서 1회 5분간 원심분리한 후, 수정능 획득을 위하여 BSA(5 mg ml<sup>-1</sup>), caffeine(5 mM) 및 heparin(10 µg ml<sup>-1</sup>)이 첨가된 수정용 B.O 배양액을 5 ml 첨가하여 다시 500 ×g에서 5분 동안 원심 분리한 후 약 1 ml의 수정용 B.O. 배양액을 첨가한 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 10~15 분간 처리하여 수정능 획득을 유도하였다.

체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 B.O 배양액에 100 µl 소적 당 10~15개의 난자를 옮긴 후 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 1~2×10<sup>6</sup> sperms ml<sup>-1</sup>이 되도록 한 후 24시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 수정을 유도하였다.

### 4. 공배양을 위한 난관상피세포의 준비

#### 1) 난관상피세포의 준비

도축장에서 채취한 난관을 실험실로 운반한 후 TCM-199 배양액 1 ml을 10 ml syringe를 이용해서 난관협부에서 누두부쪽으로 관류시킨 다음 난관상피 세포를 채취하였으며, 채취한 난관상피세포는 500×g에서 5분간 원심 분리시켜 1~2×10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>의 최종농도로 조절하여 48시간 동안 배양시킴으로써 monolayer cells의 형성을 유도하였다.

## 2) Conditioned medium의 준비

난관 상피세포는 48시간 CO<sub>2</sub> incubator 에서 배양을 하였다. 배양액은 500×g에서 10분간 원심분리를 2회 실시하였고, 원심 분리된 배양액은 0.2 μm의 milipore filter로 필터를 한 후, 사용할 때까지 4℃의 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

## 5. 체외수정란의 체외배양

체외수정된 수정란은 10% FCS가 첨가되어 있는 TCM-199 배양액으로 4~5회 세척한 후 monolayer cells을 형성한 난관 상피세포에서 공배양을 시키면서 48시간마다 신선한 배양액으로 교환했고, monolayer cells은 5일 간격으로 교환하였다. 난관 상피세포에서 공배양을 하면서 수정후 2- 세포기 이상의 분할을과 배 발달에 미치는 영향 등을 7~9일 동안 배양하여 후기배로의 수정란 발달을 유도하였다.

## 6. 체외수정란의 동결보존

### 1) 동결보존액제조, 독성검사, 체외수정란 동결과 융해 및 생존성 조사

10%의 FCS가 첨가된 D-PBS를 기본배양액으로 하여 Kasai 등(1992)의 방법에 따라 동결보존액(EFS)을 제조하였으며, 동결보존액의 독성은 동결보존액에 1분, 2분 및 3분 동안 배반포 수정란을 평형을 시킨 후 0.5M sucrose 용액에 회석한 다음 10%의 FCS가 첨가된 D-PBS로 3~4회 세척한 후 10%의 FCS가 첨가된 TCM-199 배양액에서 배양하였다. 체외수정란의 동결보존은 체외수정란을 EFS 동결보존액에서 1분 동안 평형한 다음 -196℃의 액체질소에 침적·보관하였고, 체외수정란의 융해는 straw를 꺼낸 후 20℃의 물에 침지하여 융해하고 straw의 양끝을 절단하여 0.5M sucrose에 5분 동안 정지한 다음, 10%의 FCS가 첨가된 D-PBS로 3~4회 세척하여 수정란내의 동결보호제를 제거하였다. 동결융해된 체외수정란은 난관 상피세포의 momolayers가 형성된 TCM-199 배양액에서 24~48시간 동안 배양하여 확장배반포 수정란으로 발달하는 것을 생존한 것으로 판단하였다.

## 2) 수정란의 세포수 조사

체외수정란은 수정 후 8일째의 배반포 수정란을 Pursel등(1985)의 방법에 준하여 염색한 다음 10μl Hoechst(1mg ml<sup>-1</sup>), 750μl의 2.3% sodium citrate 및 250μl의 99% ethanol을 첨가하여 working solution을 제조하여 사용하였으며, 제 8일째 배반포 수정란을 slide 위의 trypan blue 소적내에 30초~1분간 침지시킨 후 trypan blue를 micropipette을 이용해서 완전히 제거한 다음 working solution을 떨어뜨리고 수정란이 있는 slide glass를 2~3분 동안 37℃ incubator에 두고 micropipette을 이용해서 working solution을 완전히 제거하였다. 수정란의 세포수는 형광현미경하에서 계산하였다.

## 7. 수정란의 이식 및 임신감정

수정란은 37~39℃가 유지될 수 있는 보온병에 담아 운반한 후 1~2시간 내에 이식할 수 있는 지역에서 비외과적 방법으로 황체 존재의 유무에 관계없이 발정주기 7~8일째의 crown 형의 황체를 가지고 있는 소를 수란우로 선별하여 각 2개의 수정란을 자궁체에 이식하였다.

이식 후 21일경에 발정이 재귀되지 않는 수란우는 1차적으로 임신 가능성이 있음을 시사하였고, 60~90일 사이에 직장검사법으로 임신 여부를 최종 확인하였다.

## 8. 통계학적 분석

실험결과의 통계적 분석은 SAS package(version 6.12)를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) Procedure를 적용하여 각 요인의 Least square means를 구하여 요인간의 유의성을 검정하였으며 P<0.05일 때 유의성을 인정하였다.

## Ⅲ. 결과 및 고찰

### 1. 난포란의 채란율

난포의 크기별로 소난포(<2 mm), 중난포(2~6 mm) 및 대난포(>6 mm)로 구분하여 채취한 결과는 Table 1과 같다.

소·중·대난포에서 442개의 난포란을 채취하였고, 난포의 크기별로 볼 때 Grade I 등급인 난포란의 회수

**Table 1. Recovery rates of bovine follicular oocytes by different follicular size**

Follicle size (mm)	No. of ovaries used	No. of oocytes recovered (%)			
		Total	Grade I	Grade II	Grade III
Small (<2)	41	184	64 (34.8)	74 (40.2)	46 (25.0)
Medium (2~6)	41	157	31 (19.7)	81 (51.6)	45 (28.7)
Large (>6)	41	101	5 ( 5.0)	15 (14.8)	81 (80.2)
Mean no. of oocytes recovered per ovary (%)	41	442 (10.7)	100 (2.4)	170 (4.1)	172 (4.2)

는 소난포에서 64개(34.8%), 중난포에서 31개(19.7%) 및 대난포에서 5개(5.0%)가 회수되었고, 등급별 총 회수율은 각각 Grade I, II 및 III에서 100개, 170개 및 172개를 채란하였다. Grade I, II 및 III의 난소당 채란율은 각각 2.4개, 4.1개 및 4.2개로 평균 난소당 10.7개의 난포란을 회수하였다.

난포란을 채란한 결과를 종합해 볼 때, 소난포와 중난포에서 대부분 회수되었으며 대난포에서는 거의 회수되지 않았다. 이는 난소의 발정주기 중 배란직전에 있는 Graffian follicle의 수는 한 개 혹은 두 개의 수준임을 알 수 있었다.

체외수정에 적합한 Grade I과 II의 난포란 회수율은 소난포와 중난포에서 높았으며, 난소 한 개당 Grade I과 II의 회수된 난포란수는 6.5개였다. 이러한 결과는 Katska와 Smorag(1984) 및 Leibfried-Rutledge, First등(1979)이 난포란을 흡입방법으로 회수한 결과 50% 이상이 Grade I과 II등급의 난포란을 회수되었다는 결과와 유사한 성적이었다. Hamano와 Kuwayama (1993)의 보고에 있어서 흡입방법으로 난포란을 회수한 바 Leibfried-Rutledge등(1985)의 흡입방법에 의해 회수된 6.6개보다 상회하는 난소 한 개당 약 11개를 회수하였으며, cutting 방법에 의해서는 31개의 난포란이 회수됨으로써 난포란의 채란시 많

은 수의 난포란을 회수하기 위해서 흡입방법보다 cutting 방법이 유용하다고 보고하였지만, 난자의 성숙과 체외발달에 대해서는 깊이 연구해 보아야 할 것으로 사료된다.

본 실험의 결과로 흡입 방법으로 난포란을 회수할 경우, 소·중난포에서 난포란을 회수하는 것이 높은 채란율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 2. 난포란의 질이 체외성숙에 미치는 효과

회수한 난포란을 Grade I, II 및 III으로 구분하여 체외성숙을 유도하여 난구세포의 팽창 여부로 성숙을 판단한 결과는 Table 2와 같다.

Grade I, II 및 III의 미성숙 난포란을 FCS(10%), LH(10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), FSH(10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), estradiol-17 $\beta$  (1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), 과립막세포가 첨가된 TCM-199 배양액에서 각각 200개, 196개 및 203개의 난포란을 22~24 시간 동안 Incubator에서 배양한 결과, 188(94.0%)개, 155(79.1%)개 및 147(72.4%)개의 난포란에서 난구세포의 팽창을 확인할 수 있었다. Yang과 Lu (1990)는 난포란을 난구세포의 부착 정도에 따라 체외성숙, 수정, 배양한 결과, 4~5층의 난구세포를 가진 난포란의 체외성숙율, 체외수정율 및 체외수정란의 발달율이 나화 난포란과 2~3층의 난구세포를 가진 난포

**Table 2. Effect of grade of bovine follicular oocytes on *in vitro* maturation by expansion of cumulus cells**

Grade of oocytes	Replicates	No. of oocytes used	No. of oocytes expanded (%)
Grade I	5	200	188 (94.0) <sup>a</sup>
Grade II	5	196	155 (79.1) <sup>b</sup>
Grade III	5	203	147 (72.4) <sup>b</sup>

\*Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

란보다 유의적으로 높은 성적을 보였다 하였고, Wiemer 등(1991)은 난포란의 선발기준은 수정란의 발달능력을 결정하는 중요한 요인이라고 하였고, Grade I 및 II에 있는 난포란의 체외성숙율은 각각 91.3과 73.3%라고 보고하였으며, 이는 본 연구의 결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서, 난포란을 채란한 후 난구세포가 많이 부착되었거나 세포질의 치밀도가 높은 난포란을 선발하여 체외성숙을 유도한다면, 체외 수정율뿐만 아니라, 높은 수정란의 발달율도 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

### 3. 난포란의 질이 수정율에 미치는 효과

미성숙 난포란을 과립막 세포가 첨가된 TCM-199 배양액에서 22~24시간 동안 체외성숙된 난포란을 수정용 BO 배양액에 24시간 동안 체외수정을 유도한 후의 수정율은 Table 3과 같다.

난포란의 등급(Grade I, II, III)에 따른 수정율은 각각 88.3%, 76.6% 및 72.5% 였다. 이는 Grade II, III에 비하여 Grade I의 난포란에 있어서 수정율이 유의적( $P < 0.05$ )으로 높게 나타났다.

체외수정란의 수정율 및 발달율을 상승시키는 인자를 Younis 등(1989)은 난구세포의 부착 정도와 세포질의 치밀도가 수정란 발달을 결정짓는 요인이라고 하

였으며, Wiemer 등(1991)은 난포란의 선발기준이 수정란의 발달능력을 결정하는 중요한 요인이라 하였고 Grade I 및 Grade II에 있는 난포란의 체외수정율은 각각 86.6%와 64.8%라고 하였으며, 이는 본 연구의 결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서, 난포란의 질에 따라 수정율에 차이를 보이는 것은 난포란의 형태학적인 차이가 수정율에 중요한 영향을 미치므로 난포란의 채란시 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 우수한 난포란을 선발하여 체외수정에 이용한다면 높은 수정율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

### 4. 배양조건에 따른 체외수정란의 발달율

체외성숙/수정된 체외수정란을 10%의 FCS가 첨가된 TCM-199 기본배양액, 기본배양액에 난관 상피세포가 공배양된 배양액(BOEC) 또는 난관 상피세포를 배양하여 추출하여 제조한 conditioned medium에서 배양하여 수정율 및 상실배기 수정란과 배반포기 수정란의 발달율은 Table 4에서 보는 바와 같다.

10% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액, 난관 상피세포가 첨가된 배양액 또는 난관 상피세포의 conditioned medium에서 상실배기 수정란으로의 발달율은 각각 24.1%, 31.2% 및 21.9%로서 난관 상피세포와 공배양된 배양액에서 발달율이 다소 높았으며, 이

**Table 3. Cleavage rates by different grade of *in vitro* matured bovine oocytes**

Grade of oocytes	Replicates	No. of oocytes used	No. of oocytes fertilized (%)
Grade I	5	197	174(88.3) <sup>a</sup>
Grade II	5	201	154(76.6) <sup>b</sup>
Grade III	5	233	169(72.5) <sup>b</sup>

\*Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 4. Effect of different culture system on *in vitro* development of IVM-IVF bovine embryos**

Culture system	Replicates	No. of oocytes used	No. of oocytes cleaved	No. of embryos developed to (%)	
				Morula	Blastocyst
TCM-199	5	170	145(85.3) <sup>ab</sup>	35(24.1) <sup>ab</sup>	18(12.4) <sup>b</sup>
BOEC <sup>1)</sup>	5	190	170(89.5) <sup>a</sup>	53(31.2) <sup>a</sup>	42(24.7) <sup>a</sup>
CM <sup>2)</sup>	5	167	137(82.0) <sup>b</sup>	30(21.9) <sup>b</sup>	25(18.2) <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>BOEC : TCM-199 with bovine oviductal epithelial cells.

<sup>2)</sup>CM : Conditioned medium with TCM-199.

\*Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

와 유사하게 배반포기 수정란으로 발달을 조사에서도 각각 12.4%, 24.7% 및 18.2%로서 난관 상피세포와 공배양된 배양액에서 배양한 것이 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액, 난관 상피세포의 conditioned medium보다 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높은 발달율을 보였다.

Goto 등(1988)은 난포란을 난구세포와 공배양했을 때 15.5%가 배반포기 수정란으로 발달하였다고 하였으며, Eyestone 등(1989)은 수정란의 발달에 난관 상피세포의 공배양 효과를 조사한 바, 난관 상피세포와 공배양했을 때 배반포기 수정란으로 발달율은 39.0%였고, 반면 난관 상피세포와 공배양을 하지 않은 단순 배양에서는 1.9%를 보여, 이 두 구간에는 유의적인 ( $P < 0.05$ ) 차이가 있다고 하였다.

Rexroad(1989)는 수정란을 난관 상피세포와 공배양할 경우 난관 상피세포에서 수정란의 발달에 필요한 glucose 같은 대사물질, epidermal growth factor 혹은 insulin growth factor 같은 성장촉진인자가 분비되어 수정란의 발달에 유익하게 작용한다고 하였으며, 또한 난관 상피세포는 수정란의 대사에 의해서 생성되는 대사성 물질 및 배양액내의 해로운 물질을 제거하는 역할을 한다고 보고하였고, Kane 등(1992)은 공배양이 수정란의 발달에 유리한 점은 난관 상피세포 같은 helper cell이 수정란의 유사분열 촉진물질을 분비하고, 세포 외 물질들은 수정란의 분화를 촉진하는데 도움을 준다는 가설을 제시하였다. 그의 Wiemer 등(1991)은 수정란의 발달에 대한 각종 다른 체세포와 공배양 실험에서 난관 상피세포와의 공배양이 과립막세포와의 공배양보다 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높은 상실배기 수정란과 배반포기 수정란으로의 발달율을 보고한 결과와 본 실험결과를 비교 검토해 본 결과 안정적인 체외수정란을 생산하기 위해서는 난관 상피세포와 공배양하는 방법이 높은 발달율을 얻는데 효과적

일 것으로 사료된다.

### 5. 동결보존시 평형시간이 체외수정란의 생존율에 미치는 효과

체외생산된 배반포기 수정란을 EFS 동결보존액으로 동결을 할 때, 동결보존액에 대한 최적의 평형시간을 조사하기 위하여 1분, 2분 및 3분 동안 평형을 유도하여 배반포 수정란의 생존율을 조사한 결과는 Table 5와 같다.

EFS 동결보존액에 대한 평형시간이 1분, 2분 및 3분 일 때, 체외수정란의 생존율은 각각 82.9%, 73.3% 및 32.1%로서 평형시간이 1분과 2분일 때의 생존율은 3분 동안 평형한 수정란보다 유의적으로 높았으며 ( $P < 0.05$ ), 3분 동안 평형은 수정란의 생존율에 치명적인 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 Tachikawa 등(1993)이 2분 동안 체외수정란을 평형하여 90%의 생존율을 보고한 것과 유사한 경향을 보였으며, Fahy 등(1984)의 보고에 의하면 EFS 동결보존액내에 함유된 분자량이 큰 ficoll은 수정란의 동결보호시 수정란내에 존재하는 수분을 안정적으로 유리화를 유도하며, sucrose는 비침투성 동결보호제로서 수정란내의 수분탈수를 촉진함으로써 ethylene glycol과 ficoll 같은 침투성 동결보호제의 독성을 줄여주는 역할을 한다고 Kapur와 Johnson(1986)이 보고하였다. 따라서, 소 배반포 수정란을 vitrification법으로 동결할 경우에는 1~2분 동안 EFS 동결보존액에 평형시키는 것이 배반포기 수정란의 생존율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

### 6. 체외수정란의 발달단계에 따른 동결보존 후 생존율

상실배 수정란 또는 배반포 수정란을 1분 동안 EFS 동결보존액에 평형을 시킨 후, vitrification 방법으로 동결보존 및 융해하여 생존율을 조사한 결과는 Table 6

**Table 5. Effect of equilibration times of EFS solution on survival of *in vitro* produced bovine embryos**

Equilibration time (min)	No. of embryos used	No. of blastocysts survived (%)
1	35	29(82.9) <sup>a</sup>
2	30	22(73.3) <sup>a</sup>
3	28	9(32.1) <sup>b</sup>

\*Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 6. Effect of embryonic stage on post-thaw survival of *in vitro* produced bovine blastocysts cryopreserved by vitrification**

Embryonic stage	No. of embryos used	No. of blastocysts survived (%)
Morula	45	15(33.3) <sup>a</sup>
Blastocyst	55	40(72.7) <sup>b</sup>

\*Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

과 같다. 배반포기 수정란을 동결보존한 후의 생존율은 72.7%였으며, 상실배기 수정란은 33.3%가 생존하여 상실배 수정란보다는 배반포 수정란의 생존율이 유의적으로 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

소에 있어서 상실배기 수정란의 생존율이 낮은 것은 종 자체의 특이적인 경향이 있다고 사료된다. Pollard와 Leibo(1993)는 1.5 M의 ethylene glycol을 이용해서 완만동결법으로 동결한 후 생존율을 조사한 바 생존성을 가진 수정란은 전혀 없었고, 반면 체내 상실배기 수정란은 64%, 체외배반포기 수정란은 63.5%가 생존하였다고 보고하였다. 이러한 결과로 상실배기 수정란은 배반포기 수정란에 비하여 동결 저온에 대한 민감도가 높은 것으로 사료되며, Vajta 등 (1996)도 체외에서 생산된 상실배 수정란의 동결보존 후 생존율이 낮다고 하였고, 이는 compaction의 부실에 의한 것이라고 하였다.

Tachikawa 등(1993)은 상실배기 수정란과 배반포기 수정란의 동결보존시 생존성에 영향을 미치는 중요한 차이점은 세포의 크기가 상실배기 수정란이 배반포기 수정란보다 상당히 크기 때문에 동결보존 후 수정란 내에 침투된 동결보호제의 제거시 발생하는 삼투압의 감수성이 배반포기 수정란 보다 상실배기 수정란에서 월등히 크다고 하였고, 또한 상실배기 수정란은 수분이 세포 사이에 있지만, 배반포기 또는 확장배반포기 수정란의 경우는 배반포강 내에 존재하기 때문에 동결보

호제에 노출되었을 경우 배반포기 또는 확장배반포기 수정란은 수분의 유출을 막을 수 있는 세포막이 약하므로 탈수가 쉽게 되지만, 상실배기 수정란은 충분한 탈수가 되기 위해서 동결보호제에 노출되는 시간이 길어야 하므로 수정란은 독성의 영향을 받아서 배반포기 수정란에 비하여 생존율이 떨어진다고 하였다. Pollard와 Leibo(1994)의 보고에 의하면 상실배기 수정란을 동결보존할 경우 냉각속도를 빨리 하므로서 동결 용해 후 생존율이 증가하였다고 보고하였다. 이러한 결과로 보아 수정란을 동결보호 함에 있어 수정란의 발달단계 뿐만 아니라 동결보호제의 조성, 동결보호제에 대한 평형시간 및 동결속도가 용해후 생존성에 많은 영향을 미치는 것으로 사료된다.

### 7. 신선 수정란과 동결 수정란의 세포수

동결용해 과정에서 수정란의 세포의 손상여부를 확인하기 위하여 배반포기 수정란을 Hochest 33342로 염색하여 형광현미경 하에서 세포수를 조사한 결과는 Table 7과 같다. 제8일의 신선 수정란의 평균 세포수는  $169 \pm 10$ 개였으며, 동결 용해 후 24시간 배양된 수정란의 평균세포수는  $140 \pm 8$ 개로서, 동결된 수정란의 세포수가 유의적( $P < 0.05$ )으로 적었다. Tekeli 등 (1987)의 결과에 따르면 동결수정란의 세포수가 감소하는 것은 동결 용해 과정에서 동결보호제의 독성, 삼투압의 영향 및 결빙형성으로 세포의 손상과 체외배양

**Table 7. Effect of cryopreservation on the number of blastomeres in *in vitro* produced bovine embryos**

Source of embryo*	No. of embryos used	No. of blastomeres(Mean $\pm$ S.E)
Fresh	35	$169 \pm 10^a$
Frozen	37	$140 \pm 8^b$

\*Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*Fresh : day-8 blastocysts produced in vitro.

Frozen : frozen on day-7, followed by cultured for 24 hours.

조건의 부적합 등의 영향에 의한 것으로 추정하였다.

이러한 결과로서 비록 생존성에는 영향을 미치지 않는다고 할지라도, 동결 융해된 수정란은 동결 융해 과정에서 각각의 할구들은 microtubule과 microfilament 같은 세포소기관이 치명적인 손상을 받는 것으로 사료되며, 따라서 이식 후에도 수태율의 저하를 야기하는 원인이 될 것으로 사료된다.

### 8. 임신율 및 유·사산율

체외발달된 배반포기 수정란 두 개를 발정주기 제 7~8일째의 수란우 105두에 이식한 결과는 Table 8과 같다.

수란우 105두 중 49두(46.7%)가 이식 60일~90일째 직장점사 소견으로 임신이 확인되었고, 그 중 6두(5.7%)가 유산, 3두(2.9%)가 사산하였으며, 최종 분만은 40두(38.1%)였다. 이는 임신된 49두를 기준으로 보면, 12.2%가 유산되었고, 6.1%에서 사산, 그리고 81.7%가 분만된 결과를 보였다. 이는 단태를 생산하기 위해서 한 개의 수정란을 이식한 경우 6%의 사산율을 나타낸 반면, 쌍태를 생산하기 위해서 두 개의 수정란을 이식했을 경우 19%의 사산율을 보였다고 한 Penny 등(1985)의 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 특히, Agca 등(1998)은 임신 40일령에 유산율은 신선란 이식에 의해서는 9%인 반면에, 동결수정란을 이식했을 때는 유산율이 28%로서 신선란에 비해 동결 수정란의 유산율이 아주 높았다고 하여 수정란 동결에 따른 유산을 상승을 보고하였다. 또한 2개의 수정란을 이식할 때 이식장소가 중요한 유산원인을 제공한다고 Massip 등(1996)과 Tachikawa 등(1993)이 보고하였으며, 그들의 보고에 따르면 한쪽 자궁각에 두 개의 수정란을 이식할 경우 유산율이 높다고 하였는데 이는 동일한 자궁에서 쌍태가 발달할 경우 태아끼리 서로

경쟁하면서 발육하기 때문에 약한 태이는 유산이 된다고 하였다. Sreenan과 Diskin(1989)은 임신 50일 이후 미경산우와 경산우의 유산율은 각각 15%와 8%라고 하여 유산율에는 산차에 따른 차이도 있다고 하였다. Schmidt 등(1996)은 수정란이식에 의한 사산율이 14%로써 인공수정시 7~8%, 다배란 수정란이식(MOET)에 의한 사산율 2%보다 높다고 하였는데, 수정란이식에 의한 사산율이 높은 원인은 태반분열의 수가 감소한 것과 관련이 있다고 Farin 등(1995)이 보고하였다. 이러한 결과와 유사하게 Reichenbach 등(1992)도 양쪽 자궁각에 각각 1개씩의 수정란을 이식했을 때 6%의 유산율을 보였으나, 한쪽 자궁각에 2개의 수정란을 동시에 이식했을 때 유산율은 20%로 유의적으로 높았다고 보고하였다.

Hasler 등(1995)은 TCM-199 배양액에서 배양한 수정란을 이식한 결과 11%가 유산되었으며, King 등(1985)은 체내 수정란을 이식한 연구에서는 이식 후 2~7개월 사이에 5.3%가 유산되었고, Hasler 등(1987)은 체내 수정란이식 후 임신 2~6개월 사이에 4.7%가 유산되었다고 하였다. 이런 결과를 종합하면, 계절적인 변화, 수란우의 조건, 수정란이 이식되는 자궁각의 선택, 수정란의 동결보존 방법 및 수정란의 질 등이 수정란 이식 후 유산 및 사산에 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다.

### 9. 체외수정란 이식에 의한 쌍태율

한우 체외수정란 2개를 한우 수란우에 이식했을 때 단태율과 쌍태율은 Table 9에서 보는 바와 같다.

105두의 수란우 중 40두에서 분만이 완료되었고, 32두가 단태 그리고 8두에서 쌍태를 보여 단태율은 30.5% 그리고 쌍태율은 7.6%를 나타내었다.

이러한 결과는 인공수정 후 발달주기 제 7일째의 체내 배반포기 수정란을 이식하여 이식 후 40일령에 단

**Table 8. Calving and abortion rates in pregnant cows following transfer of *in vitro* produced bovine embryos**

Pregnant cows	No. of cows	Percentage
Aborted	6	12.2
Stillbirth	3	6.1
Calved	40	81.7
Total	49	100

**Table 9. Twining rates of Korean cows transferred with two *in vitro* produced bovine embryos**

No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant (%)	No. of calves (%)	
		Single	Twin
105	40(38.1)	32(30.5)	8(7.6)



태울 및 쌍태율이 각각 42%와 6%라고 보고한 Agca 등(1998)의 결과와 유사하였으나, 체내수정란을 2개를 이식해서 42%의 쌍태율을 보고한 Massip 등(1996)의 결과와는 많은 차이를 보였다.

Lu와 Polge(1991)는 비외과적으로 2개의 체내수정란을 이식하여 77%의 수태율을 얻었으며, 이중 65%가 쌍태였다고 하였고, Penny 등(1985)은 2개의 체내수정란을 비외과적으로 이식하여 분만율이 51.1%였으며, 이중 39.1%가 쌍태라고 보고하였다. 이렇게 높은 쌍태율의 원인은 질이 좋은 체내수정란을 이용했으며, 또한 체격이 큰 젖소를 수란우로 이용했기 때문이라고 사료된다.

Sakakibara 등(1996)은 Holstein과 Japanese black cow에 체내 동결수정란을 이식하여 각각 42%와 16%의 쌍태율을 보고했으며, 이는 체구가 다소 큰 Holstein에 있어서 쌍태율이 높았다고 하였다. 본 실험의 연구결과보다는 다소 상회하는 쌍태율이지만, 본 연구에서도 약 8%의 쌍태율을 보였다. 따라서 향후 쌍태 유기를 위해서는 체구가 큰 Holstein을 수란우로 이용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

그러나 쌍자 생산에 있어서 문제점으로 대두될 수 있는 것은 Holstein을 수란우로 이용하는 방안뿐만 아니라 이식되는 두 개의 수정란이 각각 이성일 경우에 야기될 수 있는 암컷의 freemartin 발생일 것이다. Long 등(1990)의 보고에 의하면 이성 쌍자 생산 중 freemartin 발생율은 적게는 82.5%로부터 많게는 95% 정도까지 보고되고 있는 바 이는 생산된 이성 쌍자들 중 5~18%는 정상 암컷 개체로서 이용할 수 있음을 시사한다. 따라서 이성 쌍자의 생산을 막을 수 있는 새로운 기술의 확립이 중요하다고 사료된다. 이에 이식 전의 수정란 일부를 biopsy하여 PCR 방법 혹은 염색체 분석에 의한 sexing을 하여 동일한 성의 수정란 두 개를 이식하는 방안도 향후 개발하여야 할 과제일 것이다.

#### IV. 요약

본 실험을 통하여 얻어진 결과를 요약하여 보면,

1. 소난포(<2 mm), 중난포(2~6 mm) 및 대난포(>6 mm)에서 각각 184개, 157개 및 101개의 난포란을 회수하여 442개의 난포란을 채취하였으

며, 난포의 크기별로 볼 때 Grade I인 난포란의 회수는 소난포에서 64개(34.8%), 중난포에서 31개(19.7%) 및 대난포에서 5개(5.0%)를 회수하였으며, 등급별 총 회수율은 Grade I, II 및 III에서 각각 100개, 170개 및 172개를 회수하였다. Grade I, II, 및 III의 난소당 채란된 수는 각각 2.4개, 4.1개 및 4.2개로 평균 난소당 10.7개의 난포란을 회수하였다. Grade I, II 및 III의 미성숙 난포란, 각각 200개, 196개 및 203개를 체외성숙 배양액에서 22~24시간동안 배양한 결과, 188개(94.0%), 155개(79.1%) 및 147개(72.4%)의 난포란이 성숙되었으며, 수정율은 각각 88.3%, 76.6% 및 72.5% 였다. Grade I의 난포란의 성숙율 및 수정율이 Grade II와 III에 비하여 유의적( $P < 0.05$ )으로 높게 나타났다. TCM-199 배양액, 난관 상피세포가 첨가된 배양액 또는 난관 상피세포의 단순배양액(CM)에서 상실배의 발달율은 각각 24.1%, 31.2% 및 21.9%로서 CM 배양액보다 난관 상피세포에서 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 발달율을 얻었으며, 배반포 수정란의 경우, 발달율이 각각 12.4%, 24.7% 및 18.2%로서 TCM-199 배양액보다 난관 상피세포를 첨가한 배양액에서 배양한 것이 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 발달율을 보였다.

2. 동결보호제에 대한 평형시간이 1분, 2분 및 3분 일때, 체외수정란의 생존율은 각각 82.9%, 73.3% 및 32.1%로서, 평형시간이 1분과 2분일 때의 생존율이 3분 동안 평형한 수정란보다 생존율이 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았으며, 3분 동안 평형시에는 수정란의 생존율에는 치명적이었다. 배반포 수정란을 동결보존한 후의 생존율은 72.7%였으며, 상실배는 33.3%가 생존하여 상실배보다는 배반포 수정란의 생존율이 유의적( $P < 0.05$ )으로 높게 나타났다.
3. 배반포 수정란을 105두의 수란우에 이식한 결과, 임신우 49두(46.7%)가 임신 되었으며, 그 중에서 12.2% (6/49)의 유산율과 6.1%(3/49)의 사산율을 보였고, 최종 40두(81.7%)가 분만하였다. 이러한 결과로 보아 난포란의 체외배양 시 이식가능한 체외수정란의 생산율은 25%로서, 이는 난소 한개당 2.7개의 체외수정란 생산을 나타낸

다. 생산된 수정란을 수란우에 이식한 결과 46.7%의 임신율을 보여 향후 안정적인 쌍자 분만을 위해서 한 우 수정란을 쫓소의 대리모를 이용하는 방안에 대해 더욱 연구해 보아야 할 것으로 사료된다.

## V. 인용문헌

1. Agca, Y., R. L. Monson, D. L. Northy, O. Abas Mazani, D. M. Schaefer and J. J. Rutledge. 1998. Transfer of fresh and cryopreserved bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation length. *Theriogenology*, 50:147-162.
2. Austin, C. R. 1951. Observation on the penetration of the sperm into mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. Ser. B.*, 4:581-586.
3. Brackett, B. G., D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick and K. A. Bennet. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27:147-158.
4. Chang, M. C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. *Nature(London)*, 168:697-698.
5. Crister, E., M. L. Leibfreid-Rutledge, W. H. Eyestone, D. L. Northey and N. L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 25:150.
6. Edwards, R. G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
7. Eyestone, W. H and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
8. Fahy, G. M., D. R. MacFarlane, C. A. Angell and J. M. Robl. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21:407-426.
9. Farin, P. W. and C. E. Farin. 1995. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*: Survival and fetal development. *Biol. Reprod.*, 52:676-682.
10. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after Co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83:753-758.
11. Hamano, S. and M. Kuwayama. 1993. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39:703-712.
12. Hanada, A., T. Suzuki and Y. Shioya. 1986. Birth of calves originated from non-surgical transfer of blastocysts originated from *in vitro* fertilized oocytes matured *in vitro*. *Proc. 78th Meet. Jpn. Soc. Zootech. Sci.*, 18.
13. Hasler, J. F., W. B. Henderson, P. J. Hurtgen, Z. Q. Jin, A. D. McCauley, S. A. Mower, B. Neely, L. S. Schuley, J. E. Stockes and S. A. Trimmer. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent results. *Theriogenology*, 43:141-152.
14. Hasler, J. F., A. D. McCauley, W. F. Lathrop and R. H. Foote. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryos transfer program. *Theriogenology*, 27:139-168.
15. Kane, M. T., E. W. Carney and J. E. Ellington. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 38:297-313.
16. Kapur, R. P. and L. V. Johnson. 1986. Selective sequestration of an oviductal fluid gly-

- coprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J. Exp. Zool.*, 238:249-260.
17. Kasai, M. 1992. High survival of rabbit embryos in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol Reprod.*, 46:1042-1046.
  18. Katska, L. and A. Smorag. 1984. number of quality of oocytes in relation to age of cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 7:451-460.
  19. King, K. K., Jr. G. E. Seidel, R. P. Elsdon. 1985. Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. *J. Anim. Sci.*, 61:747-762.
  20. Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Crister and N. L. First. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology*, 23:753-759.
  21. Leibfried-Rutledge, M. L. and N. L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
  22. Long, S. E. Practice tip : 1990. Development and diagnosis of freemartinism in cattle. *In Pract.*, 12:208-210.
  23. Lu, K. H. and C. Polge. 1991. Pregnancy and twinning rates after transfer of IVF embryos to the bred recipient. *Proc. 7th Con. European Embryo transfer Association (Cambridge)*: 164.
  24. Massip, A., P. Mermillod, A. Van Langendonck, H. D. Reichenbach, P. Lonergan, U. Berg, C. Carolan, R. De Roover and G. Brem. 1996. Calving outcome following transfer of embryos produced *in vitro* in different conditions. *Theriogenology*, 44:1-10.
  25. Penny, C. D., B. G. Lowman, N. A. Scott, S. Voelkel and D. A. Davies. 1985. Management aspects of induced twinning in beef suckler cows using *in vitro* fertilised embryos. *Vet. Rec.*, 136(20):506-510.
  26. Pollard, J. W. and S. W. Leibo. 1993. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:287.
  27. Pollard, J. W. and S. W. Leibo. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41:101-106.
  28. Pursel, V. G. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 24:687-691.
  29. Reichenbach, D. R., J. Leibrich, U. Breg and G. Brem. 1992. Pregnancy rates births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 95:363-370.
  30. Rexroad, C. E. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31:2066-2072.
  31. Sakakibara, H., H. Kudo, A. Boediono and T. Suzuki. 1996. Induction of twinning in holstein and Japanese black cows by ipsilateral frozen embryo transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 44:203-210.
  32. Schmidt, M., T. Greve, B. Avery, J. F. Beckers, J. Sulon and H. B. Hansen. 1996. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 46:527-539.
  33. Sreenan, J. M. and M. G. Diskin. 1989. Effect of unilateral or bilateral twin embryo distribution on twinning and embryo survival rate in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 87:657-664.
  34. Tachikawa, S., T. Otoi, S. Kondo, T. Machida and M. Kasai. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived from *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:266-271.
  35. Tekeli, T., O. K. Kweon and H. Kanagawa. 1987. The viability of deep-freezing aggregated mouse embryos. *Jpn. J. Vet. Res.*, 35:

283-286.

36. Thibault, C., M. L. Dauzier and S. Winterberger. 1954. Etude cytologique de la fécondation *in vitro* de l'oeuf de la Lapine. C. R. Soc. Biol., Paris, 148:789-190.
37. Vajta, G., P. Holm, T. Greve and H. Callesen. 1996. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. Animal Reprod. Sci., 45:191-200.
38. Wiemer, K. E., A. J. Watson, V. Polanski, A. I. McKenna, G. H. Fick and G. A. Schultz. 1991. Effects of maturation and culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev., 30:330-338.
39. Yang, Y. B. and K. H. Lu. 1990. The influence of bovine oocytes type on the *in vitro* fertilization and subsequent *in vitro* development. Theriogenology, 33: 355.
40. Younis, A. I., B. G. Brackett and R. A. Fayerer-Hoskon. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Gamete Res., 23:189-201.

(접수일자 : 2000. 2. 2. / 채택일자 : 2000. 3. 13.)