

한우에 있어서 초음파기기를 이용한 생체내 난자 채취시 채란조건 및 수태율에 관한 연구

박성재 · 양보석 · 임기순 · 성환후 · 장원경 · 정일정 · 박충생¹
축산기술연구소

The Study of Factor Concerning Ovum Pick-up and Conception Rate by Ultrasound-Guided Follicular Aspiration in Hanwoo Heifers

Park, S.J., B.S. Yang, K.S. Im, H.H. Sang, W.K. Chang, I.C. Cheong and C.S. Park¹
National Livestock Research Institute, R.D.A

ABSTRACT

This study was carried out to investigate of factors concerning to ultrasound-guided follicular aspiration; level of vacuum pressure, diameter of use needle, effect of FSH hormone and conception rate after embryos transfer.

1. Oocytes collection number were 4.2 ± 2.9 e.a to luteuml phase and follcular phase were 4.4 ± 3.5 e.a to ovaries of Hanwoo.
2. We taked proper level of aspiration vacuum pressure was 40~120 mmHg to oocytes collection. Oocytes collected number were 4.2 ± 3.2 , 4.3 ± 3.4 , 4.5 ± 3.4 e.a. to 40, 80, 120mmHg, respectively, follicles aspiration rate were 49, 47, 45%.
3. Effect of collection needle diameter was not difference significantly($P < 0.05$), oocytes collected number were 4.4 ± 3.5 e.a to 17G and 3.0 ± 1.8 e.a to 18G needle, collected oocytes quality were no difference significantly ($P < 0.05$).
4. Follicles increase number to FSH hormone injection were 6.2 ± 2.3 e.a to intramuscle and 1.1 ± 2.7 e.a. to epithelial injection method.
5. Conception rate derived from E.T. was 11.1% to freezing embryos and 46.2% to fresh E.T., difference significantly($P < 0.05$).

(Key words : Ultrasound-guided follicular aspiration, Conception rate, E.T.)

I. 서 론

초음파기기를 이용하여 체내의 난포란을 채란하고 이를 체외에서 수정란을 생산하는 기술은 많

은 연구자들에 의해 보고되고 있으며, 초음파기기를 이용하여 수정란을 생산하는 기술이 상업적으로 가능 (Hasler 등 1995)하다는 보고를 한 이후 각 연구자들 마다 공란우를 반복적으로 이용하는 기초기술의 개발에 많은 보고를 하고 있는 실정이라,

¹ 경상대학교(Gyeongsang National University)

본 연구에서는 한우의 발정주기중 난소의 상태에 따른 난포란의 회수율과 난포란 채란시 적당한 음압의 정도에 따른 채란수 및 등급을 조사하고 채란바늘의 직경의 차에 대한 영향, 반복채란우에 대한 난포자극호르몬을 투여했을 때 난포란의 발달수를 조사하고 체내난포란을 반복적으로 이용하여 체외에서 수정란을 생산한 다음 수란우에 이식하는 방법을 연구하여 우수한 소에서 반복적이고 주기적으로 수정란을 생산하는 기초기술의 확립을 위하여 실험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

미성숙난포 채란용 한우는 축산기술연구소에서 사육하고 있는 번식기관이 정상이고 발정주기가 정상적으로 나타나는 3세의 미경산 우 22두를 선발하여 실험에 공시하여 총 224회의 채란을 실시하였고, 수란우는 정상적인 발정주기를 보이는 개체를 22두 선발한 다음 발정동기화를 유도하여 신선란 및 동결란으로 구분하여 수정란 이식을 실시하였다.

2. 초음파 난포란 채취기구 및 채란 방법

미성숙난자 채란에 이용된 초음파기기는 가축용으로 6.5MHz (convex type) 탐촉자가 부착된 휴대용 SA 600 (Medison Co., Korea)기를 이용하였다.

난포란의 흡인은 음압조절이 가능한 음압발생기 (WISAP[®], Germany)를 이용하였으며 채란용 바늘은 17 G (gauge) 또는 18 G (gauge)의 바늘끝에 초음파 반향부가 있는 Echo-Tip[®] (Cook Co., Australia)를 사용하였다.

공란우는 보정틀에 보정시킨 후 진정을 유도하기 위해 0.3ml의 xylazine hydrochloride (Rumpun[®], Bayer, Korea)을 근육주사하고, 부가적으로 5ml의 lidocaine HCl (광명, 한국)을 이용 경막의 마취를 하였다. 또한 천자시 통증을 완화하기 위해 자궁경부 주변에 lidocaine HCl을 3ml를 도포하여 마취를 실시하였다.

마취가 완료된 공란우는 직장내 분을 완전히 제

거하고 외음부 주변을 깨끗이 닦고 소독을 한 후, 탐촉자의 선단에 Sonogel (삼립의료 (주), 한국)로 도포를 한 다음 직장검사용 비닐장갑을 탐촉자의 끝에 씌우고 질내로 삽입한 다음 다른 손은 직장벽을 눌러 난소를 잡은 다음, 난소를 탐촉자의 앞에 일치되게 위치시켜 난소의 표면에 있는 난포가 초음파기기의 화면상에 정확히 나타나도록 하였다. 이때 초음파기기는 화면상에 난포란 채취바늘 유도선이 화면에 나타나도록 조작용 한 후 난소를 천천히 조작하여 난포가 초음파기기의 바늘유도선에 위치하도록 한 다음 채취바늘을 화면상의 난포내 (혹점)로 삽입하였다. 난포내로 주사바늘이 안으로 들어가면 화면에 채취바늘의 선단에 있는 반향부에 의하여 흰점으로 나타나며 이를 기준으로 음압발생기를 발스위치로 작동시켜 난포액을 흡인하였다. 난포액이 모두 흡인된 경우는 화면상에 난포혹점이 없어질 때 흡인완료로 보고, 다른 난포를 채란하기 위해 난소를 조작하였다. 난자회수시 음압은 40, 80, 120mmHg를 각각 조절하여 채란성적을 조사하였다.

난포자극호르몬을 채란전 처리하여 난포란을 채란한 경우는 호르몬의 전처리가 난포수와 회수난자수의 증수효과를 구명하기 위하여 200 혹은 400mg의 FSH (Folltropin-V[®]; Vetrepharm, Canada)을 30%의 polyvinylpyrrolidone (PVP, M.W.; 40,000; Sigma, USA)에 용해하여 1회 근육 또는 피하주사하고 72시간 후에 채란을 실시하였다.

미성숙난자의 회수액은 1% (V/V)의 소태아 혈청 (fetal bovine serum; FBS; Gibco, USA)과 0.2% (V/V) heparin sodium (녹십자, 한국)이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; Gibco, USA)액을 이용하였다.

3. 난포란의 체외성숙 유도 및 체외수정

미성숙난자의 채란이 끝나면 회수액을 30분 이내에 실험실 내로 옮긴 후, Emcon Embryo filter (Agtec, USA)를 이용하여 Lacto-Ringers solution (대한약품, 한국)으로 희석여과하여 실체현미경 (Olympus, Japan) 하에서 난자를 수집하여 등급분류 후 체외성숙을 유도하였다.

회수된 미성숙난자는 난구세포층의 부착정도 및 충실도에 따라 등급을 정하였다.

채란된 미성숙난포란의 등급분류의 기준은 다음과 같다. 1등급은 난자를 에워싸고 있는 난구세포층이 4층 이상으로 충실한 것을, 2등급은 난구세포층이 1~3층으로 둘러싸여 있는 것을, 3등급은 난구세포가 채란시 상해를 입었거나, 자연적으로 벗겨져서 나화된 경우, 4등급은 대난포에서 채란된 경우이거나 난구세포층이 팽창되어 있는 것으로 구분하였다.

등급분류된 1~3등급의 미성숙 난자는 3% FCS가 포함된 D-PBS에서 2회 세척한 다음 10% FCS and 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)가 첨가된 HEPES buffered tissue culture medium 199 (TCM 199; Earl's salt, Gibco, USA)으로 3회 세척을 실시하고 100 μ l 소적에 옮겼다. 미성숙란의 체외성숙 유도에는 5% CO₂와 95% 공기상태의 38.5°C의 배양기 (Forma Co. USA)에서 20~22시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

성숙유도된 난포란의 체외수정을 위한 동결정액은 축협에서 생산한 농가공급용인데 38°C 온수에서 10초간 용해 후 5 mM caffeine-sodium benzoate와 10 μ g/ml heparin이 첨가된 BO액 (Brackett and Oliphant)을 7배를 희석한 다음 400g에서 5분간 2회 원심세척을 한 후 정자 pellet은 정자농도가 5~6 \times 10⁶/ml가 되도록 조정준비하였고, 체외배양기에서 21 \pm 1시간 정도 성숙을 유도한 난자는 5mg/ml of bovine serum albumin (BSA, fraction V, Sigma, USA), 5mM caffeine-sodium benzoate 그리고 10 μ g/ml heparin (Sigma, USA)이 첨가된 BO액으로 3회 세척 후 준비된 정자와 6 \pm 1시간 공배양하여 체외수정을 유도하였다.

체외수정 6 \pm 1시간 후 체외성숙시와 동일한 신선 배양액으로 5회 세척을 실시한 다음 난구세포와 같이 100 μ l 소적내에서 배양을 실시하였다. 배양액 교환은 매 2일마다 75 \pm 5 μ l씩 교환을 실시하였으며, 난할율은 수정후 2일째에, 배반포 발달율은 수정후 7~9일에 실시하였다.

4. 체외수정란의 동결, 이식 및 임신감정

수정란의 동결은 배양 7일째의 내세포괴의 발달이 양호한 배반포란을 선별한 후 준비된 유리화(초자화)액으로 수정란의 동결을 유도하였다.

동결을 위해 준비한 유리화액의 제조는 3단계(액)로 준비하였는데, 1단계는 10% Glycerol에다 1/8mole Sucrose, 1/8mole Glucose, 20% Calf Serum 수준으로 혼합이 되고, 2단계 초자화액은 10% Glycerol에다 10% Ethylene glycol, 1/4mole Sucrose, 1/4mole Glucose, 20% Calf Serum 수준으로 혼합하고, 3단계 초자화액은 20% Glycerol에다 20% Ethylene glycol, 3/8mole Sucrose, 3/8mole Glucose, 20% Calf Serum 수준으로 혼합구성되는 유리화액을 준비하는 데, 모두 0.4 μ m 필터를 이용하여 제균을 한 다음 최대 1달간 냉장보관하면서 사용하였다.

먼저 수정란의 유리화 동결을 위해서는 동결용 0.25ml straw를 준비 및 수정란 내역 표기를 하고 straw내에 동결보호제를 1단계 충전 (20mm 정도) 하고 준비한 다음, 1단계액에서 5분, 2단계액에서 5분, 3단계액에서는 1분을 침지하여 수정란의 완전한 유리화가 일어나면 straw에 수정란을 주입하고, straw액을 충전하여 준비된 액체질소에 침지를 한다. 이때 밀봉용 분말이 먼저 액체질소에 들어가도록 하고, 서서히 straw를 액체질소에 담근 다음, 영구보존용 액체질소통에 넣는다. Sugar solution은 Sucrose 16.0453g에다 Glucose 8.445g을 PBS 50ml과 잘 혼합하여 0.4 μ m filter로 제균을 하고, Straw액 (1/2M Sucrose sol.)은 Sucrose 3.423g에 PBS 20ml과 FCS 2ml을 섞어서 0.4 μ m filter로 제균을 하고 냉장보관하면서 최대 1주일간 사용하였다.

유리화로 동결된 수정란을 이식할 때는 액체질소통에서 수정란이 보관된 straw를 실온에서 4~5초간을 정지한 다음 straw의 끝을 절단하여 동결란을 1/4M sucrose에서 5분간 침지한 다음, 1/2M sucrose에서도 5분간 침지하고, 1/4M sucrose액으로 옮긴 후 정상적으로 수정란의 형태가 복원된 수정란을 straw에 주입한 다음, 수정란 이식기로 수관우에 비외과적으로 이식을 하였다. 이 때 straw내에 공기가 최소한으로 들어가도록 1/4M sucrose액으로 수정란이 straw중간 정도에 위치되도록 하

여야 한다. 1/4M sucrose액은 sucrose 1.7115g을 PBS 20ml, FCS액을 2ml 혼합하고 0.4 μ m filter로 제공하여 사용하였다.

신선란을 이식할 경우는 발달 7일째 되는 양호한 배반포에서 내세포피의 발달이 충실한 것을 위의 설명과 같이 straw에 장착하여 준비된 수란우에 이식을 실시하였다.

수란우는 발정동기화용 CIDR[®] (controlled internal durg release device; InterAg, New Zealand)를 이용하여 인위적으로 동기화를 유도한 후 수정란을 비외과적으로 이식하였다.

수란우의 수태 여부는 이식후 42일째 되는 시기에 임신진단 kit ('99, 축산연 개발)를 이용하여 판정하였다.

5. 통계학적 분석

모든 자료는 χ^2 -분석법으로 분석하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 발정주기중 난소의 초음파 채란 성적의 비교

한우난소를 황체기와 난포기 구분에 따른 채란수와 등급을 조사한 결과는 Table 1와 같다.

초음파기기를 이용하여 난포란을 채란한 결과 황체기는 4.2 \pm 2.9개, 난포기는 4.4 \pm 3.5개를 채란할 수 있었는데 난소의 황체기 또는 난포기 구분에 따른 미성숙난자의 채란수는 회수된 난자의 질과 마찬가지로 유의적 차이는 인정이 되지 않았다 ($P < 0.05$). 본 결과처럼 한우의 난소에서 황체가 있는 시기와 황체가 없는 난포 존재시기로 구분하여 채란한 성적에 대한 결과는 비교할 문헌이 없었는데 본 결과로 볼 것 같으면 난포만 있는 시기나 황체가 존재하는 시기에서나 유의적인 차이 없

이 생체내로부터 난포란을 채취할 수 있으며, 채란된 난자의 등급에서도 주로 1~3등급이 채란된다는 것을 알 수 있었다.

체내로부터 난포란을 채란하는 데는 난포기의 난소보다 황체기의 난소상태에서는 채란할 때 황체로 인한 출혈을 조심해야 하는 점이 있다. 만약 채란시 출혈이 생기면 난소의 체내유착이 우려되므로 주의를 해야 하며 가능하면 채란시 바늘끝과 황체가 멀리 위치하도록 하는 것이 필요하다. 또한 난소실질 내부로 지나치게 바늘을 전진하는 것은 난소조직의 파괴가 우려되며 이 때 출혈로 인하여 난소가 자궁 주변의 근육과 유착이 발생할 수도 있으므로 난포란 채란시 난포만 정확한 흡인이 되도록 하여야 한다. 발정 후 1~4일째의 난포기의 난소로부터 채란을 하는 것이 황체로 인한 출혈을 최소로 줄일 수 있는 한 방법이라고 사료된다.

2. 채란음압에 대한 난포란의 회수율과 난포란의 채란등급

난포란의 채란시 적용한 음압의 차이에 의한 난포란의 회수율, 채란 난포란의 수는 Table 2과 같다.

초음파기기를 이용한 난포란 채란의 기술수준의 평가는 주로 난포란의 회수율이 기준이 된다고 할 수 있겠다. 난포란의 회수율을 높이기 위해서는 바늘의 크기 선택 및 채란압력이 중요하다고 보는데, 본 실험에서는 채란음압이 40mmHg에서 4.2 \pm 3.2개, 80mm Hg에서 4.3 \pm 3.4개, 120mmHg에서 4.5 \pm 3.4개를 채란하여 채란시 적용한 음압의 차이에 의한 채란수는 유의적인 차를 나타내지 않았고 ($P < 0.05$), 난포란의 회수율에서도 음압이 40mmHg에서는 49%, 80mmHg에서는 47%, 120mmHg에서는 45%의 난포란 회수율을 나타내어 채란압력에 따른 회수율의 차이도 유의적인 차가 인정되

Table 1. Number and grade of collected oocytes to ovaries of Hanwoo heifer

Phase of ovaries	No. of heifers	No. & Grade of collected oocytes per session				
		Total	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Luteal	125	4.2 \pm 2.9	1.1 \pm 0.7	1.2 \pm 0.8	1.3 \pm 0.8	0.6 \pm 0.5
Follicular	99	4.4 \pm 3.5	1.3 \pm 0.9	1.2 \pm 1.1	1.3 \pm 1.0	0.6 \pm 0.5

Table 2. Effect of difference vacuum pressure to follicular oocytes aspirated by ultrasound

	Aspiration vacuum(mmHg)		
	40	80	120
No. of session	72	101	51
No. of total follicle	541	856	512
No. of total oocyte collected	264	404	229
Recovery rate(%)	49	47	45
No. of oocyte collected /session/ head(Mean±SD)	4.2±3.2	4.3±3.4	4.5±3.4
No. of collected oocyte grade / session			
Grade I	1.0±1.1	1.2±1.7	1.1±1.2
Grade II	1.5±1.6	1.1±1.2	1.2±1.2
Grade III	1.2±0.4	1.3±1.6	1.8±2.2
Grade IV	0.5±0.9	0.7±1.3	0.4±0.8

지 않았는데 ($P < 0.05$), 이는 Bols 등 (1995)의 결과와 일치하였으며, 음압이 셀수록 나화되어 채란되는 수가 다소 증가하는 경향이 있었으나, 난포란이 흡인되면서 난구세포층에 상처를 주는 경우가 있었다.

초음파 채란에서 적용되고 있는 음압의 정도를 보면 대부분이 75~100mmHg 범위의 압력으로 채란을 실시하고 있다 (Gibbons 등, 1994; Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995; Meintjes 등, 1995).

다양한 음압에 대한 난포란의 회수율에 대해 Scott 등 (1994)은 7%, Loony 등 (1994)은 69.6%, Pieterse 등 (1988)은 27.4%, Pieterse 등 (1991)은 52%, Callesen 등 (1987)은 42%를 각각 보고하였으며, Klossok 등 (1997)은 191회의 난포란 채취를 시도함으로써 1,815개의 난포에서 955개의 난포란을 회수하여 52.3%의 회수율을 보고하였다. 위와 같은 것을 참고로 채란을 실시해 본 결과 음압의 차이에 의한 유의적인 차 ($P < 0.05$)가 인정이 되지는 않았지만, 음압의 차이에 의한 바늘 내부로 흡입되는 난포액의 채란시간이나 유입되는 혈액의 흡입량에는 다소 차이가 있었다.

난포란의 채란시 채란음압에 따른 난구세포층의 충실도 차이는 120mmHg 채란압에서는 3등급의 난포란의 숫자가 많았지만 유의적인 차 ($P < 0.05$)는 인정이 되지 않았다. Bols 등 (1996)은 채란음압이 70~130 mmHg 범위에 있을 때에는

난포란의 구조에 이상을 나타내지 않다고 하였으며, Lenz 등 (1987)은 높은 채란압력은 채란수는 증가시키나 난포란의 형태가 비정상적이거나 나화 난포란의 채취가 많다는 보고하였다. 본 연구에서도 유의적인 차이는 인정이 되지는 않았지만 높은 음압을 이용할 때 나화된 등급의 난포란 채란수가 다소 높아지는 경향이 있었다.

3. 채란바늘의 크기에 따른 효과

채란용 바늘의 크기에 차이가 날 때 난포란의 회수율과 난포란의 채란등급의 비율을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

위의 결과에서는 난포란채취 바늘의 굵기에서 17G와 18G를 이용한 난포란의 채란수는 4.4 ± 3.5 개와 3.0 ± 1.8 개, 회수율은 54%와 45%였으며, 회수 난포란의 등급은 I~III등급이 대부분이고 IV등급 상대적으로 적은 수를 채란하였으나 바늘의 직경이 채란 난포수, 회수율 및 회수 난포란의 등급에서 유의적인 차 ($P < 0.05$)는 인정되지 않았다. 이는 Bols 등 (1995)의 보고결과와 일치하지만, 바늘이 너무 굵으면 채란시 공란우의 난소실질에 상처를 많이 줄 수 있다는 것에 유의를 해야 하고 채란의 숙달도를 높이도록 노력을 해야 한다.

난포란의 채란시 채란바늘의 크기에 대한 차이를 보면, Baltussen 등 (1992)은 채란 바늘의 직경이 클 경우 난소실질에 대한 손상이 크며, 바늘이

Table 3. Number and Grade of collected oocytes according to needle diameter

Needle diameter	No. of session	No. of follicle observed	No. of oocytes collected /RR*(%)	No. of oocytes collected per session			
				Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
17G	32	8.1±3.5	4.4±3.5(54)	1.0±1.0	1.6±1.2	1.4±1.0	0.4±0.3
18G	23	6.7±2.2	3.0±1.8(45)	0.9±0.5	0.8±0.6	0.8±0.5	0.5±0.2

* RR : recovery rate

난포내로 진입할 때 난포액이 복강내로 누출되는 현상이 있으며, 바늘의 직경이 작은 경우는 보다 정확하게 흡인은 할 수 있지만 난포란의 이송경로가 협소하여 난구세포층의 탈락 및 손상을 많이 받는다고 하였다. 또한 바늘의 끝부분이 긴 각도를 가지면 난포내에 대한 침투는 용이하나 채취난포액의 누출이 많다고 하였다.

Wikland 등 (1983)은 채란바늘의 크기, 끝의 예리함, 채란압의 정도는 난포란의 채란효율에 영향을 준다고 하였으며, Bols 등 (1996)은 채란바늘을 19gauge와 21 gauge를 사용하는 것보다 18gauge를 사용하는 것이 난포란의 회수율이 가장 높았다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 바늘의 직경차는 유의적으로 인정이 되지 않는 것으로 (p < 0.05), 다만 높은 흡압을 이용시 흡인되는 혈액의 양이 다소 많다는 것을 알 수 있었다.

4. 난포자극호르몬 주사방법에 따른 난포발육 및 채란 성적

한우에 있어서 난포란 채취시 채란난포의 수를 증가시키고 난포의 확인 및 난소 조작에 도움을 얻고자 채란 72시간 전에 400mg의 FSH를 30%의 PVP와 희석하여 1회 근육 및 피하주사하여 효과를 조사한 결과는 Table 4와 같다.

위의 결과에서 보면 FSH 400mg을 30%의 PVP를 이용하여 근육 또는 피하주사한 결과 72시간 후의 난포수는 각각 9.0±1.1 및 10.6±1.3개에서 15.2±2.3 및 11.6±2.7개로 각각 증가하여 근육주사한 경우 6.2±2.3개 (69.2%)가 피하주사한 경우는 1.1±2.7개 (10.5%)가 증가하였는데 두 그룹간에 유의적인 차는 없었다 (P < 0.05).

호르몬을 주사하여 난포의 발육을 조사한 보고는 D.T. Armstrong 등 (1994)이 어린 송아지 (3, 6, 9주령)에 주사하여 난포의 발육이 좋았다는 보고가 있으며, 1994년에는 M. Meintjes 등이 20, 40mg의 FSH를 주사하여 43% 정도의 난자를 채란하였다는 보고가 있었는데 이와 같은 연구결과들을 보면 호르몬 처리 후 미성숙난자의 채란에는 효과가 있는 것으로 사료된다. 본 실험에서도 부가적으로 다수의 난포발육으로 인해 난소의 축지가 용이하여 조작이 쉬웠으며 초음파 화면을 통한 난포의 확인 및 채란에 도움이 되었다.

소에서 다배란을 위하여 적정 처리량은 400mg이며 (Gonzale 등, 1990). 이 FSH는 주사 후 반감기가 301±23분으로서 아주 짧아 (Demarstier 등, 1988) 하루 2회씩 4일간 주사를 하여야 소에서 다배란을 야기할 수 있다. 그러나 물과 유기 용매에 용해성이 있으며 체내에 무해한 혈장증량액인 분

Table 4. Follicular responses to FSH injection method

Injection method	Replicates	No. of follicles per session		No. of follicles development/FDR*(%)
		Before injection	After injection	
I.M*	13	9.0±1.1	15.2±2.3	6.2±2.3/(69.2)
S.C°	9	10.6±1.3	11.6±2.7	1.1±2.7/(10.5)

* : intramuscle, ° : subcutaneous, * : follicle development rate.

자량이 40,000인 polyvinylpyrrolidone (PVP)을 이용하여 FSH를 용해하면 체내 흡수를 서서히 할 수 있어 1회의 주사로서 다배란을 야기할 수 있다는 Yamamoto 등 (1993, 1994) 및 Takedomi 등 (1995)의 보고와 같이 본 연구에서도 한우에 적용한 결과 효과에 있어서 유사한 결과를 얻었다.

5. 다난포발달 촉진을 위한 호르몬 투여량 조절

반복적으로 난포란 채란시 호르몬의 전처리시 투여량에 따른 난포수의 증가와 채란수 (울)를 조사한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다.

채란우에 대하여 PVP에 용해한 FSH의 투여량을 400mg 또는 200mg으로 하였을 때 400mg 주사시 난포의 증가수 (울)는 6.3 ± 2.4 개 (64.6%)이고 200mg 투여시는 4.1 ± 3.2 개 (50.9%)의 증가를 보였는데 유의적인 차는 인정이 되지 않았다 ($P < 0.05$). 그리고 증가된 난포란에 대한 채란수 (울)는 400mg 투여시는 3.5 ± 0.9 개 (21.9%)이고 200mg 투여시는 4.7 ± 1.1 개 (38.3%)를 회수하여 채란수 (울)에서도 유의차는 없었다 ($P < 0.05$).

본 결과에서 얻어진 난포자극호르몬의 전처리에 의한 성적은 Pieterse 등 (1988)과 Loony 등 (1994)의 결과와 같이 난포의 발달자극에는 호르몬 투여가 효과적이라는 결론을 얻을 수 있다. 그러나 호르몬의 주사량 차이에 의한 난포란의 증가에서는 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

($P < 0.05$).

본 연구에서 얻어진 근육내 주사가 피하주사에 비하여 난포발육율이 높았던 결과는 근육주사법이 단기간에 난포란을 채란시 체내 흡수반응시간이 피하주사법 보다는 짧았기 때문이라고 사료된다.

Bungartz 등 (1995)은 100mg의 FSH를 근육주사하고 96시간 후 난포수의 증가를 조사한 결과 FSH 투여구에서는 난포수가 10.6개로 FSH를 투여하지 않은 대조구의 난포수 8.9개보다 많았으며, 처리구 간에 유의적인 차이를 ($P < 0.05$) 나타내었다고 하였다. 호르몬의 비처리와 처리간에는 난포수의 증가를 많은 연구자들이 효과가 있다는 보고를 하고 있는데 (Bo 등, 1994; Armstrong 등, 1994; 박 등, 1997), 본 결과에서도 호르몬을 처리한 공란우에서 난포의 발달수가 증가하였고, 이로 인해 난소의 축지가 유리했고 난포수의 증가는 채란시 화면의 해독과 채란에 유리하였다.

6. 초음파유도 채란 난포란 유래 체외수정란의 이식 수태율

초음파 유도로 생산된 수정란을 이식한 후 수태율을 조사한 결과는 Table 6에 나타내었다.

본 결과에서는 동결 수정란 20개를 9두의 수란우에 이식하여 1두 (11.1%)에서 수태되었으며, 신선 수정란 29개를 13두에 이식하여 6두 (46.2%)가 수태되어 신선 수정란이 동결 수정란보다 높은 수

Table 5. Effect of dosages to FSH single injection

Dose of FSH	No. of Head	No. of follicles before injection	No. of follicles after injection	No. of follicles increased/DR*(%)	No. of oocyte collected/RR*(%)
400mg	12	9.7 ± 1.2	15.9 ± 2.4	$6.3 \pm 2.4 / (64.6)$	$3.5 \pm 0.9 / (21.9)$
200mg	7	8.1 ± 1.6	12.3 ± 3.2	$4.1 \pm 3.2 / (50.9)$	$4.7 \pm 1.1 / (38.3)$

* DR : follicles development rate, * RR : oocytes recovery rate

Table 6. Conception rate after embryos transfer derived from Ovum pick-up

Embryos control	No. of recipient	No. of embryos transferred	No. of pregnancy detection(%)
Frozen	9	20	1(11.1) ^a
Fresh	13	29	6(46.2) ^b

* Different superscripts denote significant differences($P < 0.05$)

태율을 보였다 ($P < 0.05$).

본 연구와 유사하게 Pieterse 등 (1991)은 초음파 기기를 이용하여 생산된 수정란을 이식하여 4두의 임신을 보고하였고, Hasler 등 (1995)은 공란우 155두를 주 1회로 연속적으로 초음파유도를 실시하여 2,268개의 체외수정란을 생산하였으며 1,220 (53.8%)개의 수정란이 수태되었다고 하였다.

이러한 연구결과를 볼 때 생체내로부터 많은 수의 난포란을 반복적으로 뽑아서 연속적으로 수정란을 생산한 다음 신선한 상태로 수란우에 이식하는 것이 효율적이라고 사료된다.

IV. 요약

본 연구에서는 한우의 난소의 변화 주기를 이용한 난포란 채란, 채란시 음압의 정도, 난포란의 채취용 바늘의 직경에 따른 효과, 난포자극호르몬을 이용하여 난소의 난포발달자극의 효과, 생체에서 생산된 미성숙 난포란을 이용하여 체외에서 수정란을 생산한 다음 동결란과 신선란을 이식하여 결과를 도출하였는데, 그 결과는 다음과 같이 요약될 수 있다.

1. 한우의 난소에서 난포기와 황체기로 구분하여 생체로부터 난포란을 채란할 경우 황체기는 4.2 ± 2.9 개를, 난포기에는 4.4 ± 3.5 개를 채란할 수 있었는데 유의적인 차는 인정되지 않았다 ($P < 0.05$).
2. 한우에서 난포란을 채란할 때 적당한 음압의 수준은 40~120mmHg의 범위가 적당하다는 것을 알 수 있었다. 40, 80, 120mmHg에서의 채란수는 각각 4.2 ± 3.2 , 4.3 ± 3.4 , 4.5 ± 3.4 개였고, 회수율은 각각 49, 47, 45%를 보였는데 유의적인 차는 없었다 ($P < 0.05$).
3. 난포란 채란에 이용되는 채란용 바늘의 직경의 차이에서 난포란의 채란수 (울)에는 17G에서는 4.4 ± 3.5 (54%)개를, 18G에서는 3.0 ± 1.8 (45%)개의 채란수를 얻었는데 유의적인 차 ($P < 0.05$)는 없었고, 채란난자의 채란등급에서도 채란바늘의 직경차이에도 표에 보는 바와 같이 유의적인 차가 없었다 ($P < 0.05$).

4. 난소에서 보다 많은 난포의 발달을 유도하여 난포란의 채란수 (울)를 증가시키기 위해 난포자극호르몬을 투여한 결과, 근육주사법에서는 증가난포수 (울)는 6.2 ± 2.3 (69.2)개를, 피하주사법에서는 1.1 ± 2.7 (10.5%)개가 증가하는 효율을 보였는데 주사법에 따른 유의차는 없었고 ($P < 0.05$), 호르몬주사량에 따른 난포발달수 (울)은 400mg을 주사한 그룹에서는 6.3 ± 2.4 (64.6 %)개를, 200mg을 주사한 그룹에서는 4.1 ± 3.2 (50.9%)개가 증가하는 효율을 보였는데 유의적인 차는 없었다 ($P < 0.05$).

5. 한우의 체내에서 뽑은 난포란을 이용하여 수정란을 생산한 후 공란우에 대해 이식을 실시한 결과, 동결란을 이식한 경우의 수태율은 11.1%를, 신선란을 이식한 결과 46.2%의 수태율을 얻었는데, 동결란보다는 신선란의 수태효율에서 유의적으로 높은 결과를 얻었다 ($P < 0.05$).

본 연구에서는 한우로부터 다수의 난포란을 안정적으로 채란하여 우수한 수정란의 연속적인 생산 및 이식의 가능성을 확인하였다.

V. 인용문헌

1. Armstrong, D.T. and Opavsky, M.A. 1986. Biological characteristics of a pituitary FSH preparation with reduced LH activity. *Theriogenology*, 25:135.
2. Armstrong, D.T., Irvine, B., Earl, C.R., McLean, D. and Seamark, R.F. 1994. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, 42: 1227-1236.
3. Baltussen, R.M.W.J., Vos, P.L.A.M., Pieterse, M.C. F.A.M. de Loos, Bevers, M.M. and Dielerman, S.J. 1992. Transvaginal ultrasound-guided follicle puncture in PMSG/PG treated cows: a comparison between three puncture needles. *Proceedings of the 12th International Congress*

- on Animal Reproduction, vol 1:129-131.
4. Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Tribulo, H.E., Caccia, M. and Mapletoft, R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41:1555-1569.
 5. Bols, P.E.J., Van Soom, A., Vanroose, G. and de Kruif, A. 1996. Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgian Blue donor cows: preliminary results. *Theriogenology*, 45:359.
 6. Bols, P.E.J., Ysebaert, M.T., Van Som, A. and de Kruif, A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and development capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, 47: 1221-1236.
 7. Brogliatti, G.M., Salamone, D.F. and Adams, G.P. 1997. Ovarian follicular wave synchronization and superstimulation in prepubertal calves. *Theriogenology*, 47:1253-1264.
 8. 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.
 9. Callesen, H., Greve, T. and Christensen E. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 27:217.
 10. Demarstier, M.M., Beckers, J.Fr., Van Der zwalmen, P., Closset, J.L. and Ectors, Pr. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, 30:379-386.
 11. Fry, R.C., Simpson, T.L., Squires, T.J., Parr, R.A. and Damanik, R.M. 1994. Factors affecting transvaginal oocyte pick up in heifers. *Theriogenology*, 41:197.
 12. Gibbons, J.R., Beal, W.E., Krisher, R.L., Faber, E.G., Pearson, R.E. and Gwadauskas, F.C. 1994. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 41:206.
 13. Gonzalez, A., Lussier, J.G., Carruthers, T.D., Murphy, M.D. and Roche, R.J. 1990. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*, 33:519-529.
 14. Hanenberg, E.H.A.T. and van Wagten-dank-de Leeuw, A.M. 1997. Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocyte collection for *in vitro* embryo production results. *Theriogenology*, 47:158.
 15. Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCaully, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E. and Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-152.
 16. Klossok, G., Hadeler, K.G., Lemme, E., Rath, D., Schindler, L. and Niemann, H. 1997. Estrus cyclicity and pregnancy establishment during ultrasound-guided follicular aspiration in dairy cows. *Theriogenology*, 48:160.
 17. Lenz, S., Leeton, J. and Renou, P. 1987. Transvaginal recovery of oocytes for *in vitro* fertilization using vaginal ultrasound. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.*, 4:51-55.
 18. Loony, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L. and Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67- 72.
 19. Meintjens, M., Bellow, M.S., Broussard, J.R., Paul, J.B. and Godke, R.A. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.*, 73:967-974.
 20. Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, Th.A.M.,

- and Taverne, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 33:751-762.
21. Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruip, Th.A.M., Wurth, Y.A., Van Beneden, Th.M., Willemse, A.H. and Taverne, M.A.M. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24.
 22. Presicce, G.A., Jiang, S., Simkin, M., Zhang, L., Looney, C.R., Godke, R.A. and Yang, X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.*, 56:386-392.
 23. Riddle, M.G.Jr., Carlson, R., Riddell, K., Galik, P. and Stringfellow, D. 1997. Use of exogenous FSH to increase the yield of oocytes collected from aged beef cows; Case reports. *Theriogenology*, 47:162.
 24. Taneja, M., Bols, P.E.J., Ban Develde, A., Ju, J.C., Schreiber, D. Tripp, M. Levine, H. Riesen, J. and Yang, X. 1998. Pregnancies from *in vitro* produced embryos derived from calf oocytes collected at 10 to 15 weeks of age. *Biol. Reprod.*, 58:475.
 25. Scott, C.A., Robertson, L., de Moura, R.T.D., Paterson, C. and Boyd, J.S. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet. Rec.*, 134:440-443.
 26. Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G. and Sasamoto, S. 1995. Superovulation in Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 43:1259-1268.
 27. Wikland, M., Nilsson, L. Hansson, R. Hamberger, L. and Janson, P.O. 1983. Collection of human oocytes by the use of sonography. *Fert. and Steril.*, 39: 603-608.
 28. Yamamoto, M., Suzuki, T., Ooe, M. and Takagi, T. 1993. Superovulation in beef cows and heifers with a single injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *J. Reprod. Dev.*, 39:353-356.
 29. Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M. and Suzuki, T. 1994. Superovulation in the cow with a intramuscular injection of FSH in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 41:747-755.
 29. 박충생, 조성근, 강태영, 최창용, 손우진, 박성재, 공일근, 이정규, 최민철, 이효종, 최상용. 1997. 젖소의 초음파 유도 채란율에 대한 FSH 전처리 효과의 비교. *한국가축번식학회지*, 21: 147-156.
(접수일자 : 2000. 2. 1. / 채택일자 : 2000. 6. 15.)