

개에서 동결정액의 경관내 주입을 통한 인공수정

정동희 · 최윤주 · 임상현 · 김용준^{1*}

삼성에버랜드

*전북대학교 수의과대학

Intra-uterine Insemination with Frozen Canine Semen Using Vaginal Endoscope

Dong-Hee Chung, Youn-Ju Choi, Sang-Hyun Lim and Yong-Jun Kim*

Samsung Everland

*College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University

Abstract : Semen were collected from 9 male dogs and frozen by liquid nitrogen. Frozen semen were thawed at 70°C for 8 seconds. About 2×10^8 sperm per insemination were inseminated to 10 bitches (3 Retrievers, 4 Chihuahuas, 1 Yorkshire Terriers, 1 Maltese, and 1 Poodle) at three and six days after the estimated peak of luteinizing hormone. For small breed dogs, uretero-rensoscope (Kahl Storz, Germany, 12.5 Fr) was used for trans-cervical insemination, whereas cystoscope(Kahl Storz, Germany, 22Fr) was used for large breeds (Retrievers). Pregnancy was diagnosed by ultrasonography at 30 days after insemination. All of 3 Retrievers (100.0%) and 3 bitches of 7 small breed dogs (42.9%) were conceived (60.0% in total). This result indicated that trans-cervical insemination using endoscope is an effective method for AI with frozen semen not only for large breed dogs such as Retriever but also for small breeds.

Key words : frozen semen, trans-cervical insemination, endoscope, small breed dog

서 론

동결정액을 이용한 인공수정은 정액주입 방법 및 주입부위에 따라 많은 수태율의 차이를 나타낸다. 질내 주입하는 경우 기술은 용이하나 동결융해된 정자의 생존률 저하 및 생존기간이 단축됨에 따라 수태율이 자연교배에 비해 현저히 떨어지고 있는 것으로 보고되고 있다^{4,8}. 이와 같은 수태율 저하를 개선하기 위해 개복술을 통한 자궁내 주입법이 이용되었으나, 수술비용과 마취 및 수술에 대한 부담으로 일반적으로 권장되지는 않으며, 단 한번 수술로 수정적기를 맞추어야 하기 때문에 수정적기에 대한 정확한 판단이 요구된다.

Wilson⁹은 사람에서 사용하는 요도내시경을 이용하여 카테타를 자궁경관으로 삽입한 후 정액을 주입하는 방법을 고안하여 개의 동결정액을 이용한 인공수정에서 80% 이상의 수태율을 달성한 바 있다. 본 연구에서는 이와 유사한 방법으로 내시경을 이용하여 2000년도 기간 중 삼성에버랜드에서 10 case의 인공수정을 실시한 바, 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

삼성에버랜드에서 사육 중인 치와와 4두, 요크셔 테리어 1두, 말티즈 1두, 푸들 1두 등 5kg 미만의 소형견 7두

(Group 1) 및 라브라도 레트리버 2두, 골든 레트리버 1두 등 25kg 이상의 대형견 3두 (Group 2) 등 10두가 이용되었다. 동결융해된 정액이 인공수정된 암개는 Table 1과 같다.

정액의 채취

정액은 암컷이 있는 상태에서 맛사지법에 의해 채취하였

Table 1. The bitches which were inseminated with frozen canine semen

Date of Estrus	I.D.	Breed	Age (Yrs.)	Previous pregnancy	Weight (kg)
1999.12.17	SB-1	Chihuahua	3	Yes	2.8
2000. 1. 4	SB-2	Poodle	5	Yes	3.2
2000. 1. 4	SB-3	Chihuahua	3	Yes	3.0
2000. 1. 26	SB-4	Maltese	2	Yes	2.7
2000. 2. 8	SB-5	Chihuahua	4	Yes	2.7
2000. 3. 6	SB-6	Chihuahua	2	Yes	3.1
2000. 5. 11	SB-7	Yorkshire Terrier	4	Yes	3.0
2000. 8. 23	LB-1	Labrador Retriever	2	Yes	32.0
2000. 9. 21	LB-2	Labrador Retriever	5	Yes	39.7
2000. 10. 31	LB-3	Golden Retriever	1	No	31.0

SB : small breed dog LB : large breed dog

¹Corresponding author.

E-mail : yjk@moak.chonbul.ac.kr

Table 2. Composition of semen extender

Component	Tris base	Citric acid	Fructose	Penicillin	Streptomycin	Eggyork	Glycerol	D.W
Content	3 g	1.7 g	1.25 g	0.06 g	0.1 g	20 g	8%	100 ml

으며, 정자 농도가 높은 2분획을 채취하여 총정자수, 정자의 생존률, 기형률, 활력도를 측정하였다.

동결정액 희석액의 제조

정액동결을 위한 희석액은 New Zealand 희석액의 조성에 따라 제조하였으며 glycerol은 8%가 되도록 첨가하였다. 그 조성은 Table 2와 같다.

정액의 희석

정자수는 2차 희석 후 최종농도가 따라 ml당 1×10^8 이 되도록 원정액에 glycerol이 포함되지 않은 1차 희석액을 혼합하였으며, 37°C의 물 30ml가 들어 있는 용기에 시험관을 넣고 1시간 30분에 걸쳐 4°C까지 서서히 냉각하였다. 그 후 4°C에서 보존되었던 glycerol이 포함된 2차 희석액을 1차 희석액과 동량으로 서서히 혼합한 후, 1시간에 걸쳐 glycerol 평형이 이루어지도록 하였다.

정액스트로 충전

glycerol 평형 후 정액은 0.5 ml straw내 충전하였고, 정자수는 50×10^6 /straw가 되도록 하였으며 충전 후 polyvinyl alcohol을 이용하여 straw를 봉하였다.

동결방법

polystyrene 상자 안에 액체질소를 채운 후 액체질소 수면 위 4 cm가 되도록 철제 rack을 설치하여 스트로를 rack위에 정렬하고 뚜껑을 덮은 후 10분에 걸쳐 동결하였다.

동결정액의 보존

동결된 정액스트로는 액체질소탱크에 넣어 보존하였다. 보존 기간은 1개월에서 1년이였다.

동결정액의 용해

동결정액은 저자 김¹²의 방법에 준하여 70°C의 물에서 8초간 용해하였다.

수정적기검사

외음부 종창과 출혈 보이기 시작하는 발정 초기에서부터 2일 간격으로 질도말검사를 실시하였다. 이후 질상피세포가 완전히 각화된 이후에는 매일 검사를 실시하여 백혈구가 출현하며 intermediate cell이 나타나는 시기까지 검사를 실시하였다. 혈중 progesterone 검사는 Fig 1에서 같이 OVUCHECKTM Premate10(Vetoquinol, France)을 이용하는 방법과 서울의과학연구소에 혈청을 의뢰하여 RIA(RadioImmunoAssay) 방법을 병용하여 혈중 progesterone가 2 ng 이상으로 상승하는

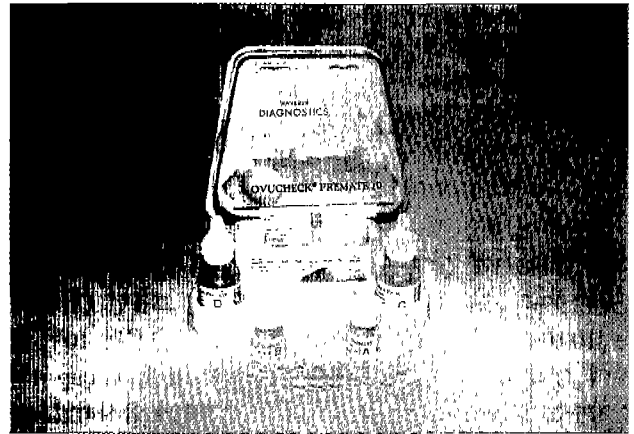


Fig 1. Blood progesterone test kit (OVUCHECKTM Premate10, France).

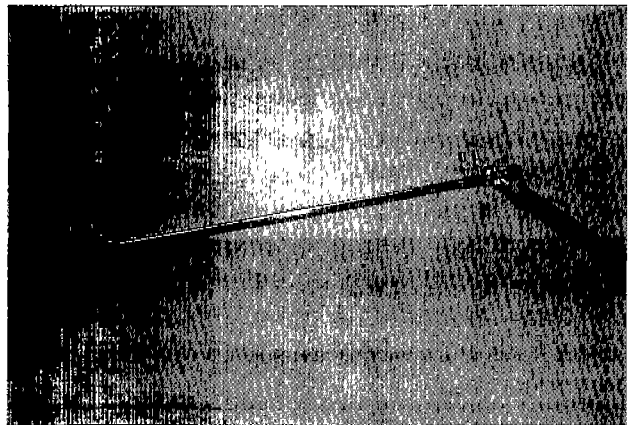


Fig 2. Uretero-renoscope (Kahl Storz, Germany).

시점을 LH peak 일로 간주하였다. OVUCHECKTM Premate10을 사용하여 혈중 progesterone 농도가 10 ng 이상이 되는 시점부터 내시경 검사를 실시하여 질점막의 변화를 관찰하였으며 상기 3가지 검사법을 조합하여 배란일을 추정 한 후 Jeffcoate와 Lindsay⁴방법에 따라 수정 적기일을 판단 하였다.

동결정액의 주입

Group 1의 7두는 Fig 2에서와 같은 utero-renoscope(Kahl Storz, Germany, 12.5Fr.)와 polypropylene catheter(Buster, Sweden, 8Fr.)를 이용하여 동결용해된 정액을 2회에서 4회까지 경관내에 주입하였으며, 동결용해후 정액의 생존률은 50-70%, 활동성은 +3-+4였다.

Group 2의 3두는 cystoscope (Kahl Storz, Germany,

22Fr.)와 polypropylene catheter(Buster, Sweden, 8Fr.)를 이용하여 Group 1의 방법과 마찬가지로 동결융해된 정액을 경관내에 주입하였다.

임신 진단

임신진단은 인공수정 후 30일에 5.0 MHz convex형 탐촉자가 장착된 초음파진단장치(SONOACE 4800HD, Medison co, Korea)를 이용하여 진단하였다.

결 과

경관내 정액을 주입하여 인공수정 후 암컷에 대한 수태결과는 Table 3과 같다. 5 kg 이하의 소형견 그룹인 Group 1은 42.9%의 수태율을 나타내었으며 대형견 그룹인 Group 2는 100.0%의 수태율을 보였다. 따라서 인공수정된 10두 전체에 대하여는 60.0%의 수태율을 나타내었다. Group 1의 산자수는 평균 3.3두로 자연교배시의 산자수와 유사하였으나 Group 2의 산자수는 평균 3.3두로 자연교배시의 산자수에 비하여 상당히 감소하였음을 나타내었다.

고 찰

동결정액을 이용한 인공수정은 개 번식에 있어서 우수 품종의 보존 및 시간과 공간의 제한없이 번식을 가능하게 할 수 있다는 점 등에서 매우 중요하다고 할 수 있다. 개에서 동결정액을 이용한 인공수정이 성공적으로 이루어지기 위해서는 우수한 종견의 선발, 신속하고 정확한 정액의 채취 및 검사, 융해 후 높은 생존율을 낼 수 있는 동결방법, 정확한 발정주기검사를 통한 배란일 및 수정적기의 판단, 그리고 주

Table 3. Result of intrauterine insemination with frozen-thawed canine seme

I.D.	Breed	Previous pregnancy	Number of insemination	No. of offspring
SB-1	Chihuahua	RIA, Kit	3	None
SB-2	Poodle	RIA, Kit	5	4
SB-3	Chihuahua	RIA	5	None
SB-4	Maltese	RIA, Kit	2	None
SB-5	Chihuahua	RIA, Kit	3	3 (1 dead)
SB-6	Chihuahua	RIA, Kit	2	None
SB-7	Yorkshire Terrier	Kit	4	3 (1 dead)
LB-1	Labrador Retriever	RIA, Kit	1	1
LB-2	Labrador Retriever	RIA, Kit	3	6
LB-3	Golden Retriever	RIA, Kit	2	3 (1 dead)

*RIA : radioimmuno assay, Kit : OVUCHECK[□] Premate10

입기술까지 어느 한 부분이라도 적정 수준에 이르지 못한다면 성공할 수 없다. 본 실험에서 사용한 수컷의 경우 항상 동일한 방법으로 동결하였음에도 불구하고 융해 후 그 생존률과 활동성은 Nothling 등⁷의 보고에서와 같이 개체간 많은 차이를 보였다.

개에서 동결정액을 통한 인공수정방법이 오랜 기간동안 연구되었음에도 불구하고 저조한 성공률을 보인 이유는 여러 요인이 작용한 것이라고 판단되며 이러한 요인 중 특이 중요한 것은 정확한 발정주기의 판단과 주입방법의 선택이 된다고 생각한다^{2,3,6}. 일반적인 신선정액의 인공수정의 경우는 여러 번에 걸친 질내 주입으로도 성공을 이룰 수 있을 것이다. 그러나 융해 후 최고 50~70%의 생존율을 갖게 되는 현재의 동결방법으로서는 반드시 수정적기판단과 적정 생식기 부위내 정액의 주입기술이 절대적으로 필요하다고 본다.

수정적기의 판단은 질도말검사 이외에 혈중 프로제스테론 농도를 측정함으로써 LH peak 및 배란일을 추정할 수 있다. 현재 여러 종류의 ELISA기법을 이용한 프로제스테론 농도 측정키트가 상용화되어 있다. 또한 임상병리검사기관을 활용하여 RIA기법으로 혈중 프로제스테론 농도를 측정하는 방법도 있다.

정액의 주입방법으로서는 융해된 정자의 생존률과 활동성을 고려해볼 때 질내 주입으로 충분치 않은 경우가 많다. 그리하여 개복술을 통한 자궁내 직접 주입법이 이용되기도 하였으나 암컷에게 있어 수술을 통한 스트레스를 줄 수 있고, 1회로 끝내야 한다는 단점이 있었다. 비외과적 방법을 통한 자궁내 주입법으로는 Sweden의 Norwegian catheter을 통한 경관내 주입법이 소개되었으며⁵ 최근에는 요도내시경 등을 통하여 자궁경부에 접근, 카테타를 삽입하여 정액을 주입하는 방법이 시도되고 있다^{3,9}. 이 방법을 통해 Wilson⁹은 중·대형견종에서 80% 이상의 수태율을 나타내었으며 자연교배시 산자수와 버금가는 결과를 나타내었다. 본 연구에서는 레트리버 등 중대형견을 비롯하여 소형견종에서 국내 최초로 경관내 주입법을 시도하였으며 금번에 60%의 성공률을 나타내었는 바, 이 결과는 동결정액을 이용한 인공수정에서 실용화 할 수 있는 단계에 근접한 것으로 판단된다. 내시경을 이용한 주입법에서 소형견은 자궁경부 주위가 좁아 경산견이 아니면 경부를 발견하기가 매우 곤란하였고 내시경의 작동범위가 좁아 주입에 많은 어려움이 있었다. 그러나 본 연구를 통하여 대형견종에서 동결정액을 이용한 경관내 주입의 효용성과 소형견종에서의 가능성을 확인할 수 있었다.

결 론

2000년 기간 중 암컷 10두에 대하여 경관내 주입법을 이용하여, 동결정액을 융해 후 주입, 이 중 6두가 임신에 성공하여 산자를 생산하였다.

분만한 암컷 6두 중 3두는 5 kg미만의 소형견으로 42.9%의 성공률을 나타내었으며 3두는 25 kg 이상의 대형견으로 3두 모두 임신에 성공하여 100.0%의 성공률을 나타내었다.

동결정액은 압컷과 동일품종인 9두로부터 신선정액을 채취하여 동일한 방법으로 동결하였다. 대형견에서는 cystoscope (Kahl Storz, Germany, 22Fr) 를 그리고 소형견에 대해서는 uretero-roscope (Kahl Storz, Germany, 12.5Fr.)를 이용하여 경관내 주입을 시도하였으며 자궁경부까지 접근한 후, polypropylene catheter를 자궁안까지 삽입하고 나서 정액을 주입하였다. 이 결과 대형견종에서 동결정액을 이용한 경관내 주입의 효용성을 확인하였으며 향후 소형견종에서도 경관내 주입법을 이용한 인공수정이 가능하다는 점을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Andersen K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene* 1975;10:1
2. Farstad W, Berg KA. Factors influencing the success rate of artificial insemination frozen semen in the dog. *J Reprod Fertil Suppl* 1989;39:289-92
3. Fontbonne A, Badinand F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison intravaginal and intrauterine deposition of semen *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:325-7
4. Jeffcoate IA, Lindsay FE. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J Reprod Fertil Suppl* 1989;39:277-87
5. Linde-Forsberg C, et al. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen : retrospective study. *Theriogenology* 1999 Jul 1;52(1):11-23
6. Linde-Forsberg C, Forsberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl* 1989;39:299-310
7. Nothling JO, et al. Semen quality after thawing : Correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51:109-16
8. Smith FO. Update on freezing canine semen. In: Kirk RW ed. *Current Veterinary Therapy* 9th. W.B. Saunders Co, Philadelphia 1986;1240-48
9. Wilson MS. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:307-11
10. 김용준, 박영재, 김병진, 유일정. 개에서 동결정액을 이용한 인공수정 - Methanol을 이용한 간이동결방법. *대한수의학회지* 1993;34(4):851-5
11. 신남식, 문유식, 정동희, 김용준. 개에서 내시경을 이용한 동결정액의 인공수정. *한국임상수의학회지* 1997;14(2):297-300
12. 지동범, 김용준. 개 정액의 용해 후 정자의 생존을 향상을 위한 동결 방법. *한국임상수의학회지* 2000;17(2):420-430