

최 중
연구보고서

진돗개와 삼살개 난자의 체외배양체계 개발
Development of In Vitro Culture System in
Jindo and Sapsaree-Dog Oocytes

순천대학교

농림자료실



0012266

농림부

요 약 문

I. 제 목

진돗개와 삼살개 난자의 체외배양체계 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

진돗개는 국가에서 1962년 천연기념물 제53호로 지정하였고, 진도개의 혈통보존과 보호·육성을 위하여 진도군을 진도개 보호지구로 지정하여 보호하고 있다. 또한 1995년 국제공인(FCI) 334호로 지정받아 세계적으로도 보호받고 있으며, 마찬가지로 삼살개도 국가적으로 천연기념물 제 368호로 지정하여 보호 육성하고 있는 국내 고유의 유전자원이다. 진돗개와 삼살개의 유전자원을 보호하기 위해서는 체계적으로 번식 및 육성을 하여야 한다. 소 등과 같은 가축은 세계적으로 많은 연구를 진행하여 현재 가축의 번식과 육성에 상업화 하는데 성공 하였다. 하지만, 개과 동물은 동결정액, 인공 수정기술, 과 배란 처리기술 및 난자의 체외성숙 기술 등이 완벽하게 정립되지 못하고 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하지 않는 한, 진돗개와 삼살개의 대량번식 및 육성에 어려움이 따르며, 이는 국가와 사회 경제적 측면에도 이익을 기대하기 어렵다. 따라서 본 연구의 목적은 진돗개와 삼살개의 대량 번식에 필요한 난자의 체외성숙 system 개발에 목적이 있다.

2. 연구개발의 필요성

가) 기술적 측면

본 연구과제에서는 진돗개와 삽살개의 난자를 체외성숙을 정립하기 위한 일련의 기술로서 발정유기 및 과 배란 방법 그리고 난자의 체외성숙배양체계의 확립 등에 관련된 기법을 정립하고자 한다. 개과 동물은 소, 돼지, 염소 등과 같이 일정한 발정 주기를 가지는 동물과 다르게, 한번 발정이온 후 발정휴지기가 대략 6-8개월 동안 지속되는 동물이다. 소, 돼지, 염소 등은 배란 시 완전히 성숙단계 (metaphase II; MII)에 배란이 되어 난관에서 바로 수정이 될 수 있는 단계에 배란이 되는 반면, 개는 배란 시 미성숙 단계(germinal vesicle; GV)에 배란이 되어 난관에서 완전히 성숙 될 때까지 대략 72-96시간이 필요하다. 이러한 독특한 배란생리로 인해 현재까지 체외성숙 배양에서 난자의 체외성숙 비율이 매우 낮다. 이렇게 타 가축과 상이한 번식 및 배란 생리현상에서 알 수 있듯이 개 난자의 체외성숙 배양에 있어, 완전히 새로운 체외성숙 배양체계를 구축해야 할 것이다.

나) 경제·산업적 측면

1997년 Texas A&M University의 Dr. Westusin 교수팀이 Missyplicity project를 수주하여 대중에 알려진 후 세계의 관심사고 되어왔다. 인간생활의 풍요와 함께 산업 발달로 인한 인간성의 상실 등으로 반려동물로서 애완건의 사육두수는 폭발적으로 늘고 있으며 애완건은 이미 동물의 개념을 초월한 가족의 개념으로 받아들이고 있다. 애완건의 수명은 사람과 비교가 안 될 정도로 짧아 애완건을 잃은 인간은 애완건에 대한 복제를 원하고 있다. 현재 미국의 경우 애완건복제를 원하는 사람들은 상당수 존재하며 이미 사망한 애완건의 조직을 냉동 보관하여 주는 회사도 성업 중에 있다. 이러한 첨단 기술뿐만 아니라, 진돗개 및 삽살개는 한국을 대표하는 개이다. 또한, 현재까지도 진돗개와 삽살개는 분리 사육되고 있어 이들의 보존 및 번식기술 개발 등의 차원에서 개에 관한 번식생리 연구는 중요한 전환점에 있다 할 수 있다. 따라서 개의 번식 생리 현상의 구명 및 체외에서 생식세포의 및 초기 배세포의 조절 및 이들의 동

결보존 등은 진돗개와 삼살개의 유전자원의 보존에 응용될 수 있다고 본다. 그리고 현재까지 개의 복제에 사용되는 발정견의 체내성숙 난자는 대량으로 사용할 수 없는 한계를 가지고 있음으로 인해 이를 체외에서 대량생산 할 수 있는 기초기술이 확립이 된다면 체내난자를 대체할 수 있는 효과를 가지고 있다. 또한, 체내성숙 난자를 이용한 복제 개 생산의 연구는 사용할 수 있는 난자의 한계가 있으며, 윤리적으로도 많은 문제점을 야기 시킬 수 있는 맹점이 있다. 하지만, 체외성숙난자의 경우 대부분이 애완견 사육가중 불임을 원하는 개체의 난소를 동물병원에서 불임수술을 통해 획득하기 때문에 윤리적 문제를 최소화 할 수 있을 뿐만 아니라, 개의 미성숙 난자의 체외성숙 시스템의 개발은 많은 난자를 사용할 수 없는 체내성숙 난자를 대체 할 수 있어 경제적으로 이득을 가지고 올수 있을 것으로 판단된다.

다) 사회·문화적 측면

개 난자의 체외성숙 기법을 정립하는 최종적인 목적은 한국전통견인 진도견과 삼살견의 보존번식에 관한 과학적 근거를 제시하고 더욱 나아가서는 애완견복제를 실현하기 위해서다. 애완견 사육인구의 급증은 경제성장과 더불어 현대사회의 발전이 오히려 삭막한 생활과 인간성 상실의 현실로 나타나 이러한 현상을 극복하고 대체사랑의 대상이 애완동물, 특히 애완견의 사육인구 증가로 이어지는 것 같다. 이러한 애완견을 사육하는 인간은 애완견의 죽음대신 똑 같은 복제애완견을 얻고자 하는 욕구가 매우 클 것이다. 가족으로 취급되는 애완견의 복제는 인간의 생활에 큰 만족을 줄 수 있을 것이며, 사회 안정에도 기여하리라고 본다. 또한 특수견 (맹인견, 경찰견, 마약수사견 등) 사회의 복지와 안정에 기여하리라고 믿는다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 “진돗개와 삼살개 난자의 체외배양체계 개발” 로써 1년차 연구로 “개의 발정유기방법의 정립” 2년차 연구로 “과배란 치료에 의한 체내난자의 체외성숙체계 정립” 3년차 연구로 “체외난자의 체외성숙조건 정립” 으로 나누어 실시되었고, 각 년차별 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 개의 발정유기방법의 정립

- 1) 질상피 세포의 변화에 의한 배란적기 진단
- 2) 초음파진단에 배란적기 관찰
- 3) Hormone 투여에 의한 발정유기
- 4) 유기발정견의 난소의 배란점 및 배란율 조사

2. 과배란 치료에 의한 체내난자의 체외성숙체계 정립

- 1) 발정유기 또는 자연발정 개의 과 배란 유기방법 개발
- 2) 외과적 수술방법에 의한 채란방법의 정립
- 3) 배란된 난자의 회수율
- 4) 체내생산 된 난자의 핵 발달율

3. 체외난자의 체외성숙조건 정립

- 1) 개 뇌하수체 추출물을 이용한 체외성숙 조사
- 2) 개 태아혈청의 첨가에 따른 체외성숙 조사
- 3) 체외성숙 시 hormone 및 각종 첨가제의 첨가농도 및 종류의 결정

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

배란적기 판단을 위하여 첫째, 질 상피세포의 변화에 의한 배란적기의 진단과 둘째, 초음파진단에 의한 배란적기의 진단하였다. 가장 일반적으로 이용되는 질 상피세포의 변화에 의한 진단은 상피세포의 각질화의 정도에 따른 배란적기의 정확성을 담보하기가 어려웠다. 그러나 초음파진단방법은 개(진도개)의 난포가 6.7 mm 이상까지 조사되지 않아 graffian follicle의 최대 size로 판단된다. 즉, 약 6-7 mm 정도의 난포크기는 배란직전이라는 것으로 판단할 수 있다.

체내 난자의 효율적인 이용을 위하여 hormone 처리에 의한 발정유기는 약 60%의 발정유기율을 보였으나 실제 배란율은 저조하였다. 또한 발정유기와 과배란유기를 위하여 자연발정과 발정유기된 개에게 GnRH (1000 IU) + CPE + GnRH (1000 IU)와 PGF_{2a} (0.5 mg/kg) + eCG (50 IU/kg) + hCG (20 IU/kg) 방법으로 실시한 결과 10 두 중 9두에서 발정유기는 가능하였으나, 과배란 유기는 성과가 없었다. 이렇게 발정유기 및 과배란 처리된 개체로부터 난자를 회수하기 위하여 외과적 수술방법에 의한 체란방법을 정립하였다. 배란적기로 판단된 공시견은 배란된 난자의 회수를 위해 전신마취 후 복부 정중선을 절개하여 난소와 난관을 확인한 후, 50 ml 주사기에 난자 회수액인 TL-Hepes를 loading하여 1 ml 주사기를 부착하여 난관 끝과 자궁이 만나는 자리에 주입하여, 수술용 실을 이용하여 난관과 주사기를 견고하게 부착하여 난관체에는 Tom cat 카테터를 주입하여 배란된 난자를 회수하였다. 자연발정견과호르몬처리에 의한 발정유기 및 과배란 처리구에서 난자의 회수율을 살펴본 결과 발정유기는 가능하지만 과배란유기는 성공하지 못하였다고 판단된다. 즉, 발정유기와 과배란처리구에서 난자회수율이 차이점이 없었다. 이렇게 생산된 체내난자의 핵 발달율은 처리구간에 유의적인 차이가 없었을 뿐만 아니라 MII 단계 난자의 회수율이 37.5% 정도로 낮았다. 즉, 난자의 MII 단계의 난자를 회수하는데 정확한 배란시기와 회수시기의 판단이 요구된다.

미성숙난자의 체외성숙을 위하여 다양한 체외성숙조건으로 체외배양을 실시한 결과 개의 종 특이성으로 MII 단계까지 개선되지 못하였다. 그러나 반복된 결과를 얻지는 못하였으나 난소낭액의 첨가와 배양온도의 시기별 변화를 줌으로써 50% 이상의 발달율도 얻을 수 있었다. 그러나 이러한 조건들도 반복적인 실험에서 안정적인 결과를

얻지 못하여 궁극적으로 완벽한 배양조건을 건립하지는 못하였다. 다양한 배양액과 단백질원의 첨가와 개 난포액의 첨가에 따른 MII까지의 발달율은 처리구간 유의차가 없었다. 개 난소의 수송 시 온도가 난자의 생존율에 미치는 영향을 살펴본 결과 5°C 저온으로 수송한 처리구의 난자는 13.2% 생존율을 보였으나, 35°C 처리구에서는 77.8% 생존율로서 즉 저온에서 개 난자의 생존율은 치명적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 체외배양 시간에 따른 체외성숙율은 유의차가 없었다. 체외성숙의 한계점을 극복하기 위하여 회수된 미성숙난자를 난관 이식 후 성숙율을 조사한 결과 체외성숙과 마찬가지로 전혀 개선되지 않았다. 이는 난자 자체의 활성화와 연관이 있다는 증거로 판단된다.

난자의 과립막세포는 난자의 성숙과 밀접한 관계를 맺고 있어 gonadal hormone 처리에 따른 과립막세포의 확장과 체외성숙율을 조사한 결과 FSH 처리구에서는 과립막세포의 확장이 유의적으로 높았고, LH 처리구에서는 대조구와 차이가 없었다. 그러나 핵발발율에서는 처리구간 유의차가 없었다. 난자의 크기는 체내 배란된 난자가 체외 회수된 난자보다 유의적으로 컸으며, 체외난자 중에서는 발정기의 난자가 유의적으로 컸다. 발정주기에 따른 난자의 GV단계를 조사한 결과 체내 배란된 난자는 100%가 GV-V 단계이며, 체외 채란된 follicular 단계의 난자는 57.4%로서 비발정기 및 황체기보다 유의적으로 GV-V단계의 난자가 많았다. 이들을 체외성숙한 결과 체내 채란된 난자의 50%가 MII로 발달하였으나, 체외채란된 난자는 발정주기에 관계없이 발달율에 차이가 없었다. 개 뇌하수체호르몬의 첨가에 의한 체외성숙율을 조사한 결과 40, 400 $\mu\text{g/ml}$ 처리구에서 17.4, 15.4% MI-II 발달율을 보였다. 또한 insulin의 처리가 체외성숙에 미치는 영향을 조사한 결과 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과를 분석하면 개의 발정유기는 인위적인 hormone 처리에 의하여 가능하나, 이들을 과배란처리에 의한 난자의 회수에는 한계가 있다고 판단된다. 즉 많은 배란점을 보이고 있으나, 회수된 난자의 발달율이 일정하지 않았으며 이는 배란이 동시에 일어나는 것이 아니라 시간차이를 두고 배란이 일어나 동시에 MII단계의 난자를 회수하는데 어려움이 있다고 판단된다. 또한 체외성숙을 유도하기 위하여 다양한 배양조건으로 시도하였으나 만족할 만한 체외 성숙율을 얻지 못하였다. 그러나 본 연구에서 난소낭액을 첨가하였을때 50% 이상의 MII 단계의 발달율을 확인한 결과가 있었으나, 반복실험에서 성공하지 못하였다. 이는 발정시 생체내액이 개 난자의 체외성숙 조건에 필요하다고 판단된다.

2. 연구개발 결과의 활용에 대한 건의

본 연구에서 확인된 발정유기방법과 과배란 유기방법을 기초로 배란된 체내난자의 외과적 채란방법으로 체내난자를 이용한 다양한 연구를 수행할 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 호르몬처리에 의한 체내난자의 배란은 동시에 배란되는 것이 아니라 시차를 두고 배란되는 관계로 MII 단계를 효율적으로 회수할 수 없었다. 자연발정견의 경우도 마찬가지로 보면 궁극적으로 체외성숙배양체계를 구축해야할 필요성이 있다. 그러나 본 연구에서 다양한 배양체계를 검토해 보았으나 타 축종의 체외배양체계와 같은 성적은 얻을 수 없었다. 그러나 난소낭액의 첨가와 배양온도의 조절로 약 50% 이상의 MII 단계의 발달율을 얻었으나, 반복적인 결과를 얻는 데는 실패하였다. 장기적이고 체계적인 연구의 필요성이 있다고 판단되는 점이다.

개 난자의 체외성숙체계의 구축은 개과동물을 대상으로 다양한 기초연구 즉, 생물학, 의학 등의 기초 및 응용 분야에 널리 이용될 수 있다. 개를 비롯한 특수한 가축의 경우 현재 전 세계적으로 많은 연구를 진행하고 있으나 기초자료 부족과 접근방법에 있어서 어려움으로 아직까지 체외배양 시스템이 구축되지 못하고 있다. 따라서 국외 선도그룹과의 경쟁에서 앞서가기 위해서는 개 난자의 체외성숙배양 수준을 세계적 수준으로 끌어올릴 수 있는 몇 안 되는 분야중 하나일 것이다. 따라서 본 연구의 결과를 바탕으로 앞으로 더욱더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

SUMMARY

This study was carried out to establish of estrus induction, superovulation and in vitro maturation of canine oocytes for applying of preservation of genetic materials and development of worldwide superior dog, such as Jindo dog and Sapsaree dog. Jindo dog was designated already 53th of natural mounment in Korea and 334th in FCI at 1995. Also Sapsaree dog was designated already 368th of natural mounment in Korea. To preservation of the genetic in jindo and sapsaree-dog, reproduction and breeding was systematically needed. Recently, although the bovine and other domestic animals has been approved and commercial application, frozen semen, aritfical insemination, induction of estrus and super-ovulation and in vitro maturation technology was not established in canine species. Therefore, this research objective was establishment of in vitro culture systems in Jindo and Sapsaree dog oocyte.

To confirm an ovulation time point, staining of vaginal epithelial cell and diagnosis of follicle size by ultrasonography was applied in estrus or induced estrus dog. Although the staining of vaginal epithelial cells can be applied, confirmation rate was not exact rather than ultrasonography, which can apply to measure of follicle size in estrus dog. In general, Maximan size of follicle in Jindo dog was measured to 6.7 mm and so it's size is graafian follicle, that mean, could be ovulate as soon.

To use of in vivo eggs, we tried to induced estrus and superovulation from anestrus dog. Anestrus dog was injected various hormones to induce estrus such as two combination methods, which was GnRH + CPE + GnRH and PGF_{2a} + eCG + hCG. Both methods can be induced an estrus 9 out of 10 dogs, but superovulation was not improved in both treatments. To collect in vivo ovulated oocytes, the surgical collection method was developed in induced or superovulated dogs by surgery. However, the recovery rate was not improved in induced or superovulated groups. the developmental rate to MII in collected oocytes was not

different in both treatment groups and also still low to 37.5%. The induced ovulated eggs were not ovulated same time and so did not found same developmental stage eggs derived from in vivo ovulated eggs.

To improve the in vitro maturation condition of oocytes in canine, the collected oocytes were matured in various culture conditions such as various culture media, supplement of protein sources and follicle fluid, transport temperature, culture periods and in vivo transfer and culture temporally. However, there was not improved in vitro development derived from in vitro collected oocytes. This is related on oocytes sources not in vitro culture system, because in vivo transfer oocytes was not improved developmental rates. The oocytes was so sensitive to low temperature for transportation, even it was several hours. However, an addition of ovarian bursa fluid (OBF) in IVM media may be improved of IVM rate to MII, even the result was not replicated continually.

Cumulus cells were connected with maturation and development of oocytes and so investigated expansion of cumulus cells and in vitro development depend on gonadal hormones. Expansion of COCs in FSH group were expanded more than in LH and control group. However, the developmental rate to MII was not improved in any hormone treatment groups. The size of in vivo ovulated oocytes were significantly bigger than that from in vitro collected oocytes, but there was not significantly different between estrus stage of in vitro collected oocytes. GV-V stage of in vivo ovulated oocytes was significantly more advanced than that in in vitro collected oocytes, but the oocytes of follicular stage were advanced rather than other in vitro oocytes. Also the development to MII from in vivo collected oocytes were significantly higher than those from in vitro collected oocytes, but in vitro collected oocytes was not different among estrus stages. Development rate in 40 and 400 $\mu\text{g/ml}$ CPE groups were higher than those in other treatments.

Although estrus can be induced, efficiency of superovulation was still low and could not collected all of MII same time, because of ovulation at different time and specific reproductive physiology in dog. Even the oocytes were matured in vitro in various culture condition, the developmental efficiency was not improved. We need to examine the culture condition of in vitro maturation to apply the basic research

and application of IVM oocytes in canine.

CONTENTS (영 문 목 차)--> 영문목차 작성 바랍니다.

목 차

Chapter 1. Outline of the research project
Section 1. Objects of the research project
Section 2. Necessity of research project
1. Necessity of technical side
2. Necessity of economic · social side
3. Necessity of industrial side
Chapter 2. Current status of technical developments at home and abroad
Section 1. Current status and trouble of related technicla at home and abroad
1. Current status of related technical at abroad
가. Estrus induction and superovulation of dog
나. In vitro maturation of dog's oocytes
2. Current status of related technical at home
가. Estrus induction and superovulation of dog
나. In vitro maturation of dog's oocytes
Section 2. Weakness of technical status at present
Chapter 3. Research project topics and results
Section 1. Materials and methods
1. Diagnosis of ovulation time by vaginal epithelial cell change
2. Diagnosis of ovulation time by ultrasonography

3. Estrus induction by Hormone treatment
4. Ovulation spot and rate of induced estrus dog
5. Estrus induction and superovulation of dog
6. Establishment of oocyte collection method by surgical
7. Recovery rate of ovulated oocytes
8. Nuclear development of in vivo ovulated oocytes
9. In vitro maturation of immature oocytes
가. Effect of various culture media and proteins on in vitro development of oocytes
나. Effect of transport temperature of ovaries on in vitro maturation of oocytes
다. Effect of in vivo transfer into oviduct on nuclear maturation of oocytes
라. Effect of FSH and LH addition in maturation media on in vitro maturation of oocytes
마. In vitro maturation according to estrus and GV stage
바. Effect of CPE addition on in vitro maturation of oocytes
사. Effect of insuline addition on in vitro maturation of oocytes
아. Effect of estrus serum and various protein sources on in vitro maturation of oocytes
자. Effect of ovarian bursa fluid addition on in vitro maturation of oocytes

Section 2.	Research project results
1.	Diagnosis of ovulation time by vaginal epithelial cell change
2.	Diagnosis of ovulation time by ultrasonography
3.	Estrus induction by hormone treatment
4.	Ovulation spot and rate of induced estrus dog
5.	Estrus induction and superovulation of dog
6.	Establishment of oocyte collection method by surgical
7.	Recovery rate of ovulated oocytes
8.	Nuclear development of in vivo ovulated oocytes
9.	In vitro maturation of immature oocytes
가.	Effect of various culture media and proteins on in vitro development of oocytes
나.	Effect of transport temperature of ovaries on in vitro maturation of oocytes
다.	Effect of in vivo transfer into oviduct on nuclear maturation of oocytes
라.	Effect of FSH and LH addition in maturation media on in vitro maturation of oocytes
마.	In vitro maturation according to estrus and GV stage
바.	Effect of CPE addition on in vitro maturation of oocytes
사.	Effect of insuline addition on in vitro maturation of oocytes
아.	Effect of estrus serum and various protein sources on in vitro maturation of oocytes
	- 13 -
자.	Effect of ovarian bursa fluid addition on in vitro maturation of oocytes

Chapter 4.	Goal achievement and impacts on related fields
Section 1.	Objects of research project by year
Section 2.	연도별 evaluation viewpoint and achievement by year
Section 3.	Contribution of related fields
Section 4.	Research results
Section 5.	Application scheme of research results
Section 6.	References

아래 부분부터는 국문 목차입니다.

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요
제 1 절 연구개발의 목적
제 2 절 연구개발의 필요성
1 기술적 측면에서의 필요성
2 경제·사회적 측면에서의 필요성
3 산업적 측면에서의 필요성
제 2 장 국내외 기술개발 현황
제 1 절 국내·외 관련기술의 현황 및 문제점
1 국외의 관련기술 현황
가 . 개의 발정유기 및 과배란 처리기술
나 개 난자의 체외배양에 관한 연구
2 국내의 경우
가 개의 발정유기 및 과 배란 처리기술
나 개 난자의 체외배양에 관한 연구
제 2 절 현기술상태의 취약성
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과
제 1 절 연구수행 방법
1 질 상피 세포의 변화에 의한 배란적기 진단
2 초음파진단에 배란적기 관찰

3	Hormone 투여에 의한 발정유기
4	유기 발정건의 난소의 배란점 및 배란율 조사
5	발정유기 또는 자연발정 개의 과배란 유기방법 개발
6	외과적 수술방법에 의한 채란방법의 정립
7	배란된 난자의 회수율
8	체내생산 된 난자의 핵 발달율
9	미성숙 난자의 체외성숙
가	다양한 배양액과 단백질원이 난자의 체외성숙에 미치는 영향
나	개 난소의 수송온도가 개의 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향
다	개의 생식기내에 난자의 이식인 난자의 성숙에 미치는 영향
라	FSH 및 LH를 첨가하여 난자의 체외성숙에 미치는 영향
마	발정기와 GV 모양에 따라 난자의 체외성숙
바	개의 뇌하수체 호르몬을 이용하여 난자의 체외성숙
사	Insuline 이 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향
아	개 태아혈청 및 각종 단백질원이 개 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향
자	Ovarian bursa fluid 가 개 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

제 2 절	연구수행 결과
1	질 상피세포의 변화에 의한 배란적기 진단
2	초음파진단에 배란적기 관찰
3	Hormone 투여에 의한 발정유기
4	유기 발정견의 난소의 배란점 및 배란율 조사
5	발정유기 또는 자연발정 개의 과배란 유기방법 개발
6	외과적 수술방법에 의한 채란방법의 정립
7	배란된 난자의 회수율
8	체내생산 된 난자의 핵 발달율
9	미성숙 난자의 체외성숙
가	다양한 배양액과 단백질원이 난자의 체외성숙에 미치는 영향
나	개 난소의 수송온도가 개의 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향
다.	개의 생식기내에 난자의 이식인 난자의 성숙에 미치는 영향
라	FSH 및 LH를 첨가하여 난자의 체외성숙에 미치는 영향
마	발정기와 GV 모양에 따라 난자의 체외성숙
바	개의 뇌하수체 호르몬을 이용하여 난자의 체외성숙
사	Insuline 이 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향
아	개 태아혈청 및 각종 단백질원이 개 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향
자	Ovarian bursa fluid 가 개 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
제 1 절 연도별 연구개발의 목표
제 2 절 연도별 평가의 착안점 및 달성도
제 3 절 관련분야에의 기여도
제 4 절 연구실적
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획
제 6 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

진돗개는 국가에서 1962년 천연기념물 제 53호로 지정하였고, 진도개의 혈통보존과 보호·육성을 위하여 진도군을 진도개 보호지구로 지정하여 보호하고 있다. 또한 1995년 국제공인(FCI) 334호로 지정받아 세계적으로도 보호받고 있으며, 마찬가지로 삼살개도 국가적으로 천연기념물 제 368호로 지정하여 보호 육성하고 있는 국내 고유의 유전자원이다. 진돗개와 삼살개의 유전자원을 보호하기 위해서는 체계적으로 번식 및 육성을 하여야 한다. 소 등과 같은 가축은 세계적으로 많은 연구를 진행하여 현재 가축의 번식과 육성에 상업화 하는데 성공하였다. 하지만, 개과 동물은 동결정액, 인공수정기술, 과 배란 처리기술 및 난자의 체외성숙 기술 등이 완벽하게 정립되지 못하고 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하지 않는 한, 진돗개와 삼살개의 대량번식 및 육성에 어려움이 따르며, 이는 국가와 사회 경제적 측면에도 이익을 기대하기 어렵다. 따라서 본 연구의 목적은 진돗개와 삼살개의 대량 번식에 필요한 난자의 체외 성숙 system 개발에 목적이 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

본 연구과제에서는 진돗개와 삼살개의 난자를 체외성숙을 정립하기 위한 위한 일련의 기술로서 발정유기 및 과 배란 방법 그리고 난자의 체외성숙배양체계의 확립 등에 관련된 기법을 정립하고자 한다. 개과 동물은 소, 돼지, 염소 등과 같이 일정한 발정주기를 가지는 동물과 다르게, 한번 발정이온 후 발정휴지기가 대략 6-8개월 동안 지속되는 동물이다. 소, 돼지, 염소 등은 배란 시 완전히 성숙단계 (metaphase II; MII)에 배란이 되어 난관에서 바로 수정이 될 수 있는 단계에 배란이 되는 반면, 개는 배란 시 매우 미성숙 단계 (germinal vesicle; GV)에 배란이 되어 난관에서 완전히

성숙 될 때까지 대략 72-96시간이 필요하다. 이러한 독특한 배란 생리로 인해 현재까지 체외성숙 배양에서 난자의 체외성숙 비율이 매우 낮다. 이렇게 타 가축과 상이한 번식 및 배란 생리현상에서 알 수 있듯이 개 난자의 체외성숙 배양에 있어, 완전히 새로운 체외성숙 배양체계를 구축해야 할 것이다.

2) 경제·산업적 측면

1997년 Texas A&M University의 Dr. Westusin 교수팀이 Missyplicity project를 수주하여 대중에 알려진 후 세계의 관심사로 되어왔다. 인간생활의 풍요와 함께 산업 발달로 인한 인간성의 상실 등으로 반려동물로서 애완견의 사육두수는 폭발적으로 늘고 있으며 애완견은 이미 동물의 개념을 초월한 가족의 개념으로 받아들이고 있다. 애완견의 수명은 사람과 비교가 안 될 정도로 짧아 애완견을 잃은 인간은 애완견에 대한 복제를 원하고 있다. 현재 미국의 경우 애완견복제를 원하는 사람들은 상당수 존재하며 이미 사망한 애완견의 조직을 냉동 보관하여 주는 회사도 성업 중에 있다. 이러한 첨단 기술뿐만 아니라, 진돗개 및 삽살개는 한국을 대표하는 개이다. 또한, 현재까지도 진돗개와 삽살개는 분리 사육되고 있어 이들의 보존 및 번식기술 개발 등의 차원에서 개에 관한 번식생리 연구는 중요한 전환점에 있다 할 수 있다. 따라서 개의 번식 생리 현상의 구멍 및 체외에서 생식세포의 및 초기 배세포의 조절 및 이들의 동결보존 등은 진돗개와 삽살개의 유전자원의 보존에 응용될 수 있다고 본다. 그리고 현재까지 개의 복제에 사용되는 발정견의 체내성숙 난자는 대량으로 사용할 수 없는 한계를 가지고 있음으로 인해 이를 체외에서 대량생산할 수 있는 기초기술이 확립이 된다면 체내난자를 대체할 수 있는 효과를 가지고 있다. 또한, 체내성숙 난자를 이용한 복제 개 생산의 연구는 사용할 수 있는 난자의 한계가 있으며, 윤리적으로도 많은 문제점을 야기 시킬 수 있는 맹점이 있다. 하지만, 체외성숙 난자의 경우 대부분이 애완견 사육가중 불임을 원하는 개체의 난소를 동물병원에서 불임수술을 통해 획득하기 때문에 윤리적 문제를 최소화할 수 있을 뿐만 아니라, 개의 미성숙 난자의 체외성숙 시스템의 개발은 많은 난자를 사용할 수 없는 체내성숙 난자를 대체할 수 있어 경제적으로 이득을 가지고 올수 있을 것으로 판단된다.

3) 사회·문화적 측면

개 난자의 체외성숙 기법을 정립하는 최종적인 목적은 한국전통견인 진도견과 삽살견의 보존번식에 관한 과학적 근거를 제시하고 더욱 나아가서는 애완견복제를 실현

하기 위해서다. 애완견 사육인구의 급증은 경제성장과 더불어 현대사회의 발전이 오히려 삭막한 생활과 인간성 상실의 현실로 나타나 이러한 현상을 극복하고 대체사랑의 대상이 애완동물, 특히 애완견의 사육인구 증가로 이어지는 것 같다. 이러한 애완견을 사육하는 인간은 애완견의 죽음대신 똑 같은 복제애완견을 얻고자 하는 욕구가 매우 클 것이다. 가족으로 취급되는 애완견의 복제는 인간의 생활에 큰 만족을 줄 수 있을 것이며, 사회 안정에도 기여하리라고 본다. 또한 특수견 (맹인견, 경찰견, 마약수사견 등) 사회의 복지와 안정에 기여하리라고 믿는다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황 및 문제점

1. 국외의 관련기술 현황

가. 개의 발정유기 및 과배란 처리기술

1) Gonadotropin

- FSH 0.77 ~ 1.1 mg/kg을 근육 주사하여 60%의 발정전기를 확인하였고, 그중 20%가 발정기에 도달하였다. 또한, 40%의 배란율과 20%의 임신율을 확인 하였다 (Shille et al. 1984. J Am Vet Med Assoc 184, 1469-147).
- FSH 0.077 ~ 0.11 그리고 1.23 ~ 1.78 mg/kg을 근육 주사하여 50%의 발정전기를 확인하였고, 그중 25%의 발정을 확인하였다. 또한 50%의 배란율을 보였으나 임신은 확인하지 못했다 (Shille et al. 1984. J Am Vet Med Assoc 184, 1469-147).
- Human menopausal gonadotropin (HMG)을 1~7 IU/kg을 9일 동안 근육주사하여 발정전기까지 90%까지 진행되었음을 확인하였고, 그중 60%가 발정기로 이행됨을 확인하였다. 또한 40%가 임신되었음을 보고 하였다 (Wanke et al. 1997. Theriogenology 1997, 47: 935-942).
- Luteinizing hormone (LH)를 0.1 IU/Kg을 매일 3회씩 7일간 주사하여 100%의 발정전기를 확인하였고, 44%의 발정기를 확인하였다. 또한, 44%의 배란율을 확인하였으며 37.5%의 임신율을 보고하였다 (Verstegen et al. 1997. J Reprod Fertil 111, 35-40).

2) Estrogens

- Diethylstilbesterol (DES)를 0.19 ~0.21 mg/Kg을 skin capsules (SID PO)를 14일간 처리하고 FSH 0.38~0.42 mg/Kg 근육주사 한 후 9일에서 11일 후에 다시 hCG를 37.9 ~42.4 IU/Kg을 근육 주사한 후 5일 후에 확인한 결과 80%의 발정전기를 확인하였으며, 20%의 발정견이 배란함을 보고 하였다 (Shille et

al. 1989. J Reprod Fertil Suppl 39, 103-113).

- Diethylstilbesterol (DES)를 발정전기가 되기 전 6~9일 동안 5 mg/dog PO SID를 처리하여 100%의 발정전기를 확인하였고, 100%의 배란율을 확인하였다 (Bouchard et al. 1993. J Reprod Fertil Suppl 47, 515-51).
- Diethylstilbesterol (DES)를 0.1~0.2 mg/Kg을 SID PO를 14일간 처리 후 FSH 0.2~0.4 mg/Kg을 5일, 9일 및 11일 후 근육 주사하여 69%의 발정전기를 확인하였고 46%의 배란율을 확인하였다 (Concannon et al. 1997, J Reprod Fertil Suppl 51, 41-54).

3) Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)

- PMSG 500 IU/dog 매일 피하주사 8~9일 동안 처리한 후 배란 유도제로 10일째 hCG를 500 IU/dog 피하 주사하여 100%의 발정전기 징후를 보았고, 10~14일째 100%가 발정징후를 보였다. 또한 100%의 배란율을 보고 하였다 (Jones et al. 1973, Acta Endocrinol (Copenh) 72, 573-581).
- PMSG를 31.2~71.4 IU/kg 매일 피하주사를 10일 동안 처리 후 배란 유도제 hCG를 10일째 31.2~71.4 IU/Kg을 피하 주사하여 50%의 발정기 징후를 관찰하였고, 50%의 배란율을 보고하였다 (Thun et al. 1977, Am J Vet Med 38, 483-486).
- PMSG를 15.6~35.7 IU/kg 매일 피하주사를 10일 동안 처리 후 배란 유도제 hCG를 10일째 31.2~71.4 IU/Kg을 피하 주사하여 57%의 발정기 징후를 관찰하였고, 57%의 배란율을 보고하였다 (Thun et al. 1977, Am J Vet Med 38, 483-486).
- PMSG를 20 IU/kg 매일 피하주사를 10일 동안 처리 후 배란 유도제 hCG를 10일째 31.2~71.4 IU/Kg을 피하 주사하여 58%의 발정기 징후를 관찰하였고, 58%의 배란율을 보고하였다 (Thun et al. 1977, Am J Vet Med 38, 483-486).
- PMSG를 44 IU/kg 매일 근육주사를 9일 동안 처리 후 배란 유도제 hCG를 10일째 25~50 IU/Kg을 피하 주사하여 100%의 발정전기의 징후를 보였으며, 5~19일 후 100%의 발정기 징후를 관찰하였고, 80%의 배란율을 보고하였다 (Archbald et al. 1980, Vet Med Small Anim Clin 75, 228-23).
- PMSG를 44 IU/kg 매일 피하주사를 9일 동안 처리 후 배란 유도제 hCG를 10일째 25~50 IU/Kg을 피하 주사하여 80%의 2번째 발정전기의 징후를 보였으

며, 9~11일 후 발정기 징후를 관찰하였고, 80%의 배란율을 보고하였다 (Archbald et al. 1980, Vet Med Small Anim Clin 75, 228-23).

- PMSG를 110 IU/kg 매일 근육주사를 7일간 3회 처리 후 100%의 발정기 징후를 관찰하였고, 87.5%의 배란율을 보고하였다 (Wright, 1980, Aust Vet J 56, 137-140).
- PMSG를 110 IU/kg 매일 근육주사를 7일간 3회 처리 후 배란 유도제 hCG를 1번째 발정이 올 때 37~62.5 IU/Kg을 근육 주사하여 100%의 발정징후와 100%의 배란율을 보였다 (Wright, 1980, Aust Vet J 56, 137-140).
- PMSG를 18.9~31.2 IU/Kg을 매일 14~21일간 피하 주사하여 배란 유도제 hCG를 37~62.5 IU/Kg 피하 주사하여 첫 번째 발정일 또는 21일 째에 주사하여 87.5%의 발정전기 징후와 62.5%의 발정징후를 관찰 하였고, 75%의 배란율을 보고하였다 (Wright .1982, Aust Vet J 59, 123-124).
- PMSG를 20~50 IU/Kg을 6일 간격으로 2번 근육 주사하여 배란 유도제 hCG를 500~1000 IU/Kg 첫 번째 발정일과 2번째 발정일 때 근육 주사하여 100%의 발정전기 징후와 60%의 발정징후를 관찰하였다 (Chakraborty et al. 1982, Vet Clin North Am Small Anim Pract 12, 85-92).
- PMSG를 27.8~41.7 IU/Kg을 매일 피하주사를 10일 동안 처리 후 10일째 배란 유도제 h CG를 10일째 27.8~41.7 IU/Kg을 근육 주사하여 100%의 발정전기의 징후를 보였으며, 87% 발정기 징후를 관찰하였고, 100% 배란율을 보고하였다 Chaffaux et al. 1984, Br Vet J 140, 191-195).
- PMSG를 27.8~41.7 IU/Kg을 매일 피하주사를 10일 동안 처리 후 10일째 배란 유도제 Gonadoliberin을 0.003~0.004 mg/Kg을 근육 주사하여 100%의 발정전기의 징후를 보였으며, 60% 발정기 징후를 관찰하였고, 100%의 배란율을 보고 하였다 (Chaffaux et al. 1984, Br Vet J 140, 191-195).
- PMSG를 44 IU/Kg을 매일 근육주사를 9일 동안 처리 후 10일째 배란유도제인 hCG를 25~100 IU/Kg을 근육 주사하여 100%의 발정전기의 징후를 보였으며, 64발정기 징후를 관찰하였고, 64% 배란율을 보고하였다 (Nakao et al. 1985, Nippon Juigaku Zasshi 47, 17-24).

4) Dopamine agonist

- Bromocryptine 0.02 mg/kg 발정전까지 하루 2회 경구 투여하여 100% 발정전기

- 징후를 관찰하였다 (van Haafden et al 1989, J Reprod Fertil 39, 330-1).
- Bromocryptine 0.05 mg/kg 발정 전까지 하루 2회 경구 투여하여 80% 발정전기 징후를 관찰하였다 (Concannon et al 1993, J Reprod Fertil 47, 3-27).
 - Bromocryptine 3일 동안 한 마리당 0.3 mg을 하루 1회 경구 투여하여 발정이 올 때까지 3~6일 동안 지속적으로 마리당 0.6-2.5 mg 하루 1회 경구 투여하여 100% 발정기 징후를 관찰하였다 (Zoldag et al 2001, Theriogenology 55, 1657-1666).
 - Bromocryptine을 발정 전까지 0.1 mg/kg 경구 투여하여 80% 발정전기 징후를 관찰하였다 (Concannon et al 1997, Proc Ann Meet Soc Theriogenology Montreal, pp. 245-247).
 - Cabergoline 0.005 mg/kg 발정 전까지 LH peak가 지나가는 30일로 부터 하루 한번 경구 투여하여 80% 발정전기 징후를 관찰하였다 (Jeukenne et al 1997, J Reprod Fertil 51(Suppl.): 59-66).
 - Cabergoline 0.005 mg/kg 40일 또는 발정전후 3~8일까지 하루 한번 경구 투여하여 100% 발정 전기 징후를 관찰하였다 (Verstegen et al 1999, Theriogenology 51:597-611).
 - Carbergoline 0.005 mg/kg 발정전에서 발정시기까지 하루 한번 경구 투여하여 83% 발정전기 징후를 관찰하였다 (Kutzler et al 2002, Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod Liege [abstract]).

5) Gonadotropin releasing hormone (Gn-RH)

- GnRH 0.000015~0.000500 mg/kg을 7~9일 동안 90분 간격으로 정맥 주사하여 72% 발정전기 징후와 56%의 발정기 징후를 관찰하였고 44%의 배란율을 보였으며 33%의 임신율을 관찰하였다 (Concannon et al 1997, J Reprod Fertil 51(Suppl.):1-54).
- GnRH 0.000096~0.000139 mg/kg을 11~13일 동안 90분 간격으로 정맥 주사하여 100% 발정기 징후를 관찰하였고 87.5%의 배란율을 보였으며 87.5%의 임신율을 관찰하였다 (Cain et al 1988, Am J Vet Res 49:1993-6.)
- GnRH 0.000040~0.000430 mg/kg을 9일 동안 87분 간격으로 정맥 주사 하여 75% 발정전기 징후와 62.5%의 발정기 징후를 관찰하였고 50%의 배란율을 보였으며 37.5%의 임신율을 보였다 (Vanderlip et al. 1987, Lab Anim Sci

27:459-68).

- Buserelin 0.0015 mg/kg 11일 동안 피하층에 하루 세 번 주사하고 0.00075 mg/kg을 3일 동안 피하층에 하루 세 번 주사하여 30%의 발정전기 징후를 관찰하였고 20%의 배란율을 보였으며 20%의 임신율을 보였다 (Inaba et al 1998 Theriogenology 49:975-82).
- Lutrelin 0.0017-0.0025 mg/kg을 14-28일 동안 SQ osmotic mini pump 하여 87.5% 발정전기 징후를 관찰하였다 (Concannon et al 1989 J Reprod Fertil 39(Suppl.): 149-160).
- Leuprolide 0.10 mg/kg을 피하층에 한번 주사하여 100% 발정기 징후를 관찰하였고 75%의 배란율을 보였으며 37.5%의 임신율을 보였다 (Inaba et al 1998 Theriogenology 49:975-82).
- Deslorelin 2.1 mg/kg을 피하층에 한번 주입하여 100% 발정전기 징후를 관찰하였고 83% 배란율을 보였으며 78%의 임신율을 관찰하였다 (Kutzler et al 2001, Proc Ann Meet Soc Theriogenology Vancouver 13 [abstract], Kutzler et al 2001 Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod Milan 147-8 [abstract]).
- Deslorelin 2.1 mg/kg을 외음부에 한번 주입하여 100% 발정전기 징후를 관찰하였고 100%의 배란율을 보였으며 43%의 임신율을 관찰하였다 (Kutzler et al 2002, Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod Liege [abstract]).
- Deslorelin 2.1 mg/kg을 외음부에 한번 주입하여 100% 발정전기 징후를 관찰하였고 100% 배란율을 보였으며 67% 임신율을 보였다 (Kutzler et al 2002, Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod Liege [abstract]).
- Deslorelin 1.5 mg/kg을 근육에 한번 주입 하여 100% 발정전기 징후를 관찰하였고 80%의 배란율을 관찰하였으며 40%의 임신율을 관찰하였다 (Kutzler MA- unpublished).

나. 개 난자의 체외배양에 관한 연구

- 배란 전 호르몬의 분비가 난자의 성숙률에 미치는 영향에 대해 연구하였다. Progesterone 이나 estradiol의 배지 내 추가는 양질 난자의 시험관내 성숙에 어떠한 영향도 미치지 못했으며 생체내의 호르몬 환경도 시험관내 성숙된 난자의 성숙을 일으키지 못하였다고 보고하였다 (Hewitt et al., J Reprod Fertil

suppl., 1997).

- 개 난자의 시험관내 성숙에 BSA, gonadotropin이 미치는 영향에 대해 연구하였다. BSA첨가 시 가장 meiotic resumption이 좋았고 hST 첨가 시 제 2중기의 이행에 좋은 영향을 끼쳤다. 하지만 어떠한 호르몬이나 단백질의 첨가로도 개 난자의 시험관내 완벽한 성숙은 이루지 못했음을 보고하였다 (Rodrigues et al., *Reprod Domest Anim.*, 2003).
- Epidermal growth factor(EGF)와 Gonadotrophin, steroids, growth factor 등 다양한 호르몬의 첨가가 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 이 연구를 통해 EGF와 FSH, LH를 함께 첨가하였을 경우에 배양한 개 난자의 granulosa/cumulus expansion은 향상시켰으나 제1중기, 제2중기에 도달한 무발정기, 초기 난포기 난자에는 아무런 영향을 주지 않았음을 보고하였다. (Bolamba D, *Theriogenology*, 2006).
- Human chorionic gonadotrophin (hCG)의 첨가가 난소자궁절제술을 통해 얻은 감수분열중인 개 난자의 시험관내 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 실험 결과 배양시간에 따라 감수분열이 향상되었는데 hCG에 96시간동안 배양 후 가장 높은 비율로 제2중기의 난자가 관찰되었다 (De los Reyes M, *Theriogenology*, 2005).
- 개 난자의 시험관내 수정 후 성숙을 위한 최적의 배양 시간에 대해 연구하였다. 난포기의 난자에서 직경 110 μm 이상의 난자를 채취하여 실험을 하여 완전한 핵 성숙은 시험관내 배양 후 72시간 후 이루어짐을 보고하였다. 하지만 시험관내 수정한 개 난자의 최적 성숙기간은 난자의 최대 성숙률에 다다른 기간에 따라 시간이 달라질 수 있음을 보고하였다 (Otoi et al., *Reprod Nutr Dev.*, 2004).
- 개의 난자와 분리한 개 난관을 함께 배양하여 개 체외 난자의 배양에 관해 연구 하였으며 감수분열에 걸리는 시간과 개 난자의 생존률을 측정하였다. 이를 통해 난관이 난자와 긴밀한 생리학적 상호 작용을 통해 난자의 성숙에 긍정적인 영향을 미쳤음을 보고하였다 (Luvoni et al., *Reprod Domest Anim.*, 2003).
- 개 난자에 Progesterone 첨가가 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 배양액에 progesterone의 첨가는 성숙단계 중이거나 성숙 전의 감수분열 정지단계 난자의 시험관내 성숙률을 높이지 못했다. 하지만 발정주기가 시험관내 난자 성숙을 위한 난자의 채취에 중요한 요소임을 보고하였다 (Willingham-Rocky et

al., Reproduction, 2003).

- Estradiol-17 β 와 progesterone이 발정주기별 난자의 체외성숙에 미치는 영향을 연구하였다. 난포기에 Estradiol-17 β 를 첨가 시는 성숙율의 증진을 볼 수 있었으나 다른 시기에 첨가 시는 권장할 만한 결과를 얻지는 못하였다. 또한 progesterone의 경우 첨가 효과를 찾을 수 없었다 (Kim et al. Theriogenology, 2005).
- 발정주기별 개 혈청의 첨가가 난자의 체외성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 기본 배양 배지에 각각 무발정기, 발정기 또는 발정 후기의 혈청과 FBS를 첨가한 결과 10%의 발정기 혈청 첨가 시에 난포기 개 난자의 시험관 내 성숙률을 향상시켰음을 보고 하였다 (Oh et al., Zygote, 2005).
- 개과 동물 난자의 체외성숙을 위한 배양 방법을 연구하였다. 시험관내 성숙과정 중 물질을 첨가함으로써 배양환경을 바꾸어 주어 세포내부의 regulatory molecule의 발현정도를 바꾸거나 순차적으로 다른 배양시스템을 이용하여 개과 동물 난자의 생존률을 높임으로서 난자의 완벽한 성숙을 이루기 위해 연구하였다. 이 논문에선 개와 고양이 난자의 발달 연구에서 최근 진보된 점에 대해 review하였다 (Luvoni GC, Theriogenology, 2006).
- Human somatotropin (hST)의 첨가가 난자의 핵성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. TCM-199에 hST와 estradiol의 첨가는 개 난자의 핵과 세포질 성숙을 향상시켰음을 보고하였다 (Rodrigues et al., Mol Reprod Dev., 2004).
- Epidermal growth factor (EGF)와 Gonadotrophin, steroids, growth factor 등 다양한 호르몬의 첨가가 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 이 연구를 통해 EGF와 FSH, LH를 함께 첨가하였을 경우에 배양한 개 난자의 granulosa/cumulus expansion은 향상 시켰으나 제1중기, 제2중기에 도달한 무발정기, 초기 난포기 난자에는 아무런 영향을 주지 않았음을 보고하였다 (Bolamba D, Theriogenology, 2006).
- Human chorionic gonadotrophin (hCG)의 첨가가 난소자궁절제술을 통해 얻은 감수분열중인 개 난자의 시험관내 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 실험 결과 배양시간에 따라 감수분열이 향상되었는데 hCG에 96시간동안 배양 후 가장 높은 비율로 제2중기의 난자가 관찰되었다 (De los Reyes M, Theriogenology, 2005).
- 개 난자의 시험관내 수정 후 성숙을 위한 최적의 배양시간에 대해 연구하였다.

- 난포기의 난자에서 직경 110 μm 이상의 난자를 채취하여 실험을 하여 완전한 핵 성숙은 시험관내 배양 후 72시간 후 이루어짐을 보고하였다. 하지만 시험관내 수정한 개 난자의 최적 성숙기간은 난자의 최대 성숙률에 따라 다른 기간에 따라 시간이 달라질 수 있음을 보고하였다 (Otoi et al., *Reprod Nutr Dev.*, 2004).
- 다양한 발정 주기의 난소에서 얻은 개 난자에서 Estradiol-17 β 와 progesterone의 첨가가 개 난자의 체외 핵 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 배양 배지 내에 E₂ 또는 P₄의 단독 첨가를 통해 개 난자의 제2중기로 성숙률이 유의성 있게 증가하였으며 E₂와 함께 P₄의 첨가는 P₄ 농도에 따라 E₂ 단독의 영향을 받아 난자의 성숙이 향상되거나 감소됨을 보고하였다 (Kim et al., *Theriogenology*, 2005).
 - 개는 연구를 목적으로 하거나 멸종위기의 개과동물의 번식을 위해 유용한 model동물이 될 수 있다. 하지만 시험관내 난자 성숙률이 다른 포유동물에 비해 매우 낮아 시험관내 배아형성, 냉동보존 또는 핵이식 등과 같은 번식생명공학의 발전에 있어서 한계점이 되고 있다. 이 논문에서는 개 난자의 시험관내 성숙에 영향을 주는 요소들에 대해 고찰하고 앞으로 연구의 focus에 대해 논하였다 (Luvoni et al., *Theriogenology*, 2005).
 - β -mercaptoethanol 또는 epidermal growth factor의 첨가가 발정주기별 난자의 시험관내 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 시험관내 성숙 배지에 β -ME의 첨가는 여러 종에서 배아 발달이 향상되었음이 보고되었다. EGF는 사람난자의 시험관내 수정 후 시험관내 성숙과 배아발달을 향상시켰다 이 연구에서는 50 또는 100 μm β -ME와 20 ng/ml EGF의 첨가가 개 난자의 제2중기로 성숙률을 향상시켰음을 보고하였다 (Kim et al., *J Vet Sci.*, 2004).
 - 발정휴지기 난자를 다양한 조성의 배지 내에서 배양하여 체외 성숙률에 영향을 주는 요소에 대해 연구하였다. FBS, EGF, insulin, transferrin, selenium 등 다양한 조성으로 연구하였으나 난자의 체외 성숙에 유의적으로 영향을 미치지 못하였다. Insulin은 제1중기에서 제2중기로 핵 성숙에 긍정적인 영향을 미쳤으나 통계적으로 유의성을 가지지 못했음을 보고하였다 (Rota A, *Reprod Nutr Dev.*, 2004).

2. 국내의 경우

가. 개의 발정유기 및 과 배란 처리기술

- estrogen 제제인 Comifiene을 0.1 mg/Kg을 1일 2회 12시간 간격으로 5일간 경구투여 하여 73.3%의 발정전기의 징후를 관찰하였고, 60%의 발정기 징후를 관찰하였다 (이영락, 2002, 경상대학교 대학원 박사학위).
- anti-prolactin 제제인 bromocriptine을 50 μ g/Kg을 1일2회 12시간 간격으로 5일간 경구투여 하여 80%의 발정전기 징후와 74.3%의 발정기 징후를 관찰하였다 (이영락, 2002, 경상대학교 대학원 박사학위).
- Gonadotropin 제제인 GnRH를 500 IU 정맥주사하고 bromocriptine을 50 μ g /Kg를 하루에 2회씩 12시간 간격으로 5일간 경구 투여 후, 외음부 출혈 첫날 500 IU의 GnRH를 정맥주사하여, 85%의 발정전기 징후를 관찰 하였고 80%의 발정기 징후를 관찰하였다 (이영락, 2002, 경상대학교 대학원 박사학위).

나. 개 난자의 체외배양에 관한 연구

- 개의 미성숙 난자를 체외성숙 배양하여 각 배양액과 첨가단백질이 난자의 핵성숙을 크게 증가시키지 못하였다고 보고하였다 (이 등, 2003).
- 개의 난소를 4°C와 38°C에 저장한 후 채란하여 난자의 생존율을 조사한 결과 4°C에 저장한 난자는 48시간째 모두 죽어 개의 난자는 저온에 민감하다는 것을 보고하였다(이 등, 2003).
- 개의 난자를 체외에서 채취한 후 발정기 개의 생식기관에 배양하여도 난자의 핵성숙을 증가시키지 못하였음을 보고하였다 (이 등, 2005).
- 미성숙 난포란을 체외성숙 배양 하였을 때 48시간째 8.9%의 핵성숙율을 보였으며, 배양액에 20 ng/ml 의 EGF를 첨가한 처리구에 난자를 체외성숙 시켰을 때 핵성숙율이 좋다고 보고하였다 (김 등, 2006).

제 2 절 현기술상태의 취약성

개의 미성숙난자 체외성숙을 위해서는 다른 포유류의 생식세포와 확연하게 다른 생리적인 현상을 무시하고 그대로 적용한 결과 대부분 성공률이 매우 낮은 결과를 얻었다. 즉 포유류의 난자는 자연배란 시 수정적기인 metaphase II (MII)에서 배란되나, 개의 난자는 자연배란 시에도 GV-MII 에서 배란되어 난관 내에서 약 48-72시간 동안 수정적기인 MII 까지 성숙을 하는 특이한 발생체계를 가지고 있어 포유류의 미성숙난자의 체외성숙과 같은 방법을 그대로 적용한다는 것은 많은 문제점을 내포하고 있었다. 이와 같이 개의 미성숙 난포란의 체외성숙에는 기존의 미성숙 난포란의 체외성숙 방법을 적용하기보다는 새로운 개념에서 preantral follicle oocytes의 체외성숙조건으로 실시하여야 할 것으로 판단된다. 또한 년중 발정주기가 계속되는 가축의 난소에서는 미성숙 난포란의 발달이 계속되고 있으나, 개 난소에서는 발정발현 때 외에는 전혀 변화가 없고 다만 발정발현 시 난포 발달 및 배란이 일어난다. 즉 적당한 hormone 처리를 한다든가 또는 발정발현된 개를 실험동물로 하지 않는다면 항상 preantral follicle oocytes를 실험에 공시할 수밖에 없는 것이어서 궁극적으로 preantral follicle oocytes의 체외성숙에 대한 연구를 우선 실시해야 할 것이다. 지금까지 가축에 있어서는 체세포핵이식의 성공은 체내에서 회수된 난자를 사용하였으나 개에서는 아직 과배란 처리방법이 정립되어 있지 않고 발정유기방법은 본 실험실에서 효과적인 방법을 개발하여 사용하고 있으나 배란된 난관에서 난자의 채란 시 마리당 8개정만 채란가능하며 또 회수된 난자 중 제1 극체가 나와 있는 난자는 50% 정도밖에 되지 않아 실제 사용가능 한 난자는 4개 정도밖에 되지 않아 체세포 핵이식을 하려면 한번에 적어도 50정도 성숙난자가 필요한 것을 감안하면 경제적으로 판단할 때 개의 과배란 유기가 성공하지 않은 이상 체내난자의 사용은 현실성이 없다고 본다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. 질 상피 세포의 변화에 의한 배란적기 진단

진돗개 및 사살개의 번식을 위해서는 발정증상의 관찰 및 정확한 발정시기와 배란시기를 관정하는 것이 매우 중요하며, 혈중 번식 호르몬의 농도 측정은 교배적기 및 배란시기 관정의 가장 정확한 방법이라고 하였으나 이러한 호르몬 농도를 측정하기 위해서는 고가의 장비와 특수한 시설이 필요하며, 1일 2회 이상의 채혈을 하여야 하는 불편함이 있어 실제 임상에 응용하기에는 한계성이 있다. 이를 극복하기 위해서 가장 간단하게 발정징후를 관찰하고 배란적기를 판단하는 것이 질 상피세포의 변화 추이를 보는 것이다. 질 상피세포는 발정기 때 증가하는 estrogen의 영향을 받아 각화 및 박리가 일어나며 (Wildt 등, 1978), 이러한 각 발정주기별 질 상피세포의 출현율에 차이가 있기 때문에 발정주기 및 교배적기 관정에 이용될 수 있다. 질 상피세포에 의한 배란적기의 판단은 발정전기의 증상인 자궁 출혈소견이 처음 나타나면 1일째부터 생리식염수가 묻어있는 면봉을 이용하여 질 상피세포를 채취하고 Gimsa염색을 실시하고, Christie 등 (1972)의 방법에 준하여 질 상피세포의 형태학적 분석을 통해 배란적기를 판단하였다. 비발정기에는 2가지 세포가 주로 보이는데, parabasal cell (비각화 세포)과 intermediate cell로 parabasal cell은 질 상피세포의 표층세포로써 큰 핵과 작은 세포질을 가지고 있으며, intermediate cell은 parabasal cell의 약 2배정도 크며, 달걀형에서부터 다양하며, 세포질에 비해 핵이 작은 편이다. 발정기의 질 상피세포는 대부분 각화되어 죽은 Superficial cell (각화세포)이 80~100%에 달하며, 이때를 배란적기라 판단한다. 핵이 없거나 농축되어 작게 보이며 세포질이 매우 크다. 또한 모양도 불규칙하며 적혈구나 백혈구 세포는 보이지 않는다. Superficial cell이 감소하고 intermediate cell과 parabasal cell이 증가한다. 배란적기의 판단은 질 상피세포가 발정이 진행되면서 parabasal cell이 점점 각화되어 Superficial cell로 변하면서 Superficial cell의 분포가 거의 80-100%에 달할 때 배란적기라 판단하였다.

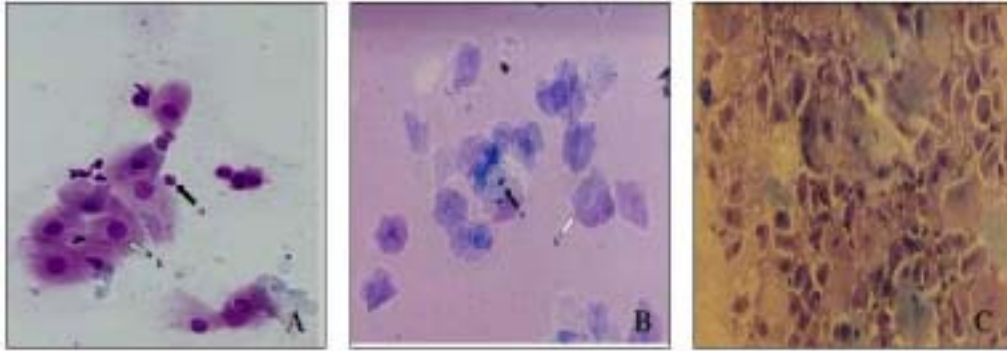


Fig. 1. Morphology of vaginal epithelial cells during estrus. A) anestrus, B) estrus and C) diestrus.

A) 비발정기: 비발정기에는 Fig. 1, A)에서 보듯이 2가지 세포가 주로 보이는데, parabasal cell (비각화 세포)과 intermediate cell로 parabasal cell은 질 상피세포의 표층세포로써 큰 핵과 작은 세포질을 가지고 있으며, intermediate cell은 parabasal cell의 약 2배정도 크고 달걀형에서부터 다양하며 세포질에 비해 핵이 작은 편이다.

B) 발정기: 발정기의 질 상피세포는 Fig. 1, B)에서 보듯이 대부분 각질화되어 죽은 Superficial cell (각질화세포)이 80~100%에 달하며, 이때를 배란적기라 판단한다. 핵이 없거나 농축되어 작게 보이며 세포질이 매우 크다. 또한 모양도 불규칙하며 적혈구나 백혈구 세포는 보이지 않는다.

C) 발정후기: Superficial cell이 감소하고 intermediate cell과 parabasal cell이 증가한다.

2. 초음파진단에 배란적기 관찰

현재 대부분의 발정관찰은 육안 상 외음부의 혈흔으로부터 시작되며, 발정의 진행 정도는 질 상피세포의 형태학적 분석을 통한 추측성 배란시점이다. 하지만, 혈중 번식 호르몬의 농도측정은 교배적기 및 배란시기 관정의 가장 정확한 방법이라고 하였으나 이러한 호르몬 농도를 측정하기 위해서는 고가의 장비와 특수한 시설이 필요하며, 1일 2회 이상의 채혈을 하여야 하는 불편함이 있어 실제 임상에 응용하기에는 한계성이 있다. 이를 극복하기 위해서 간단하게 발정징후를 관찰하고 배란적기를 판단하는 방법이 초음파를 통한 난소의 난포가 확대됨을 확인하는 것이 질 상피세포의 세포진

단보다 더욱더 좋은 방법이라 하겠다. 따라서 본 연구에서는 초음파를 이용한 난소의 난포크기를 조사한 후 정확한 배란적기를 결정하고자 발정유기전인 진도개를 조사하였다.

3. Hormone 투여에 의한 발정유기

가. 인위적인 발정유기 방법의 정립

개는 한번의 발정이 끝나고 나면 수개월동안 무 발정기가 계속되는 단 발정 동물로써 Bouchard 등 (1990)은 무 발정기간이 짧은 것은 5개월, 긴 것은 12개월간 지속된다고 보고하였다. 무 발정기의 암개를 발정 유도하는 방법으로는 dimethyl stilbestrol 의 경구투여와 FSH 또는 PMSG의 병용투여, anti-GnRH 제제투여 (Concannon, 1989), anti-prolactin 제제 또는 dopamine agonist 제제를 투여 (Kooistra 등, 1999; Zoldag 등, 2001)등 여러 가지 발정 유도제를 사용하고 있다. 또한, PMSG 및 Gonadotropin 등을 사용하고 있다. 하지만 Arnold 등 (1989)은 고농도의 PMSG 및 Gonadotropin을 피하 주사 하였을 때, 비정상적인 혈청 내 estrogen의 농도가 증가하고, 황체가 단축되면서 비정상적인 배란이 발생하였으며, 혈소판 감소증, 자궁내 질환, 유산과 같은 부작용이 유발되었다고 보고 하였다. 따라서 최근에는 Anti-prolactin 제제인 bromocriptine을 이용하여 발정유기를 하는 추세이다. prolactin은 임신기나 비 임신기의 황체를 퇴행시키는 작용을 하지만, 황체는 개의 임신초기에 나타나며 20일후부터는 prolactin이 증가하여 황체에 그대로 유지된다. 따라서 bromocriptine 제제의 발정 유도기전은 prolactin의 농도를 저하시키면서 지속적으로 prolactin이 억제되면 황체가 끝나고 무 발정기 상태가 되지만, 발달된 황체로 인한 무 발정 상태의 암개에 있어서는 FSH나 LH 의 직접적인 자극과 뇌하수체의 간접적인 자극은 효과적이지 않아 prolactin-antagonist 제제가 발달된 황체를 직접적으로 소멸시키므로 인해 발정이 유도 된다. 또한, 개에서 GnRH는 무 발정기에 영향을 주는데, 특히 무 발정기의 후기에 크게 영향을 주어 무 발정기를 단축시키고 발정을 유도 한다 (van Haaften 등, 1989). 또한, Alvarenga 등 (2001)은 말에서는 뇌하수체를 채취하여 이를 crude 한 단백질을 주사함으로 인해 발정을 유도 할 수 있다고 보고하였다. 일반적으로 개의 발정은 확실히 계절적이지는 않지만, 주 패턴을 보면 계절번식 경향을 띄고 있어 인위적인 발정유기가 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 Anti-prolactin 성분들을 처리하여 체내 혈중 prolactin 농도를 하강시킴으로써 난포발

육을 위한 positive feedback mechanism으로 유도하여 발정을 유도하고자 한다. 또한, 개의 뇌하수체를 회수하여 뇌하수체 단백질을 추출하여 이를 주사함으로써 인해 발정을 유도하고자 한다 (Fig. 2).

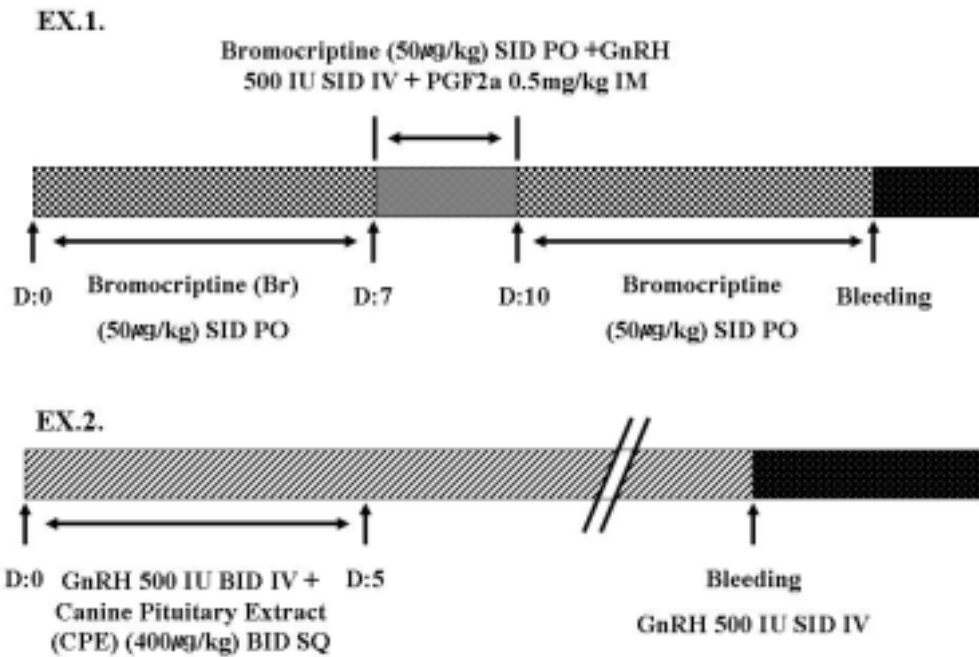


Fig. 2. Schedule of induce estrus in canine.

나. 뇌하수체 추출물을 이용한 발정유기 및 과배란 처리

말에서 Equine pituitary extract (EPE)는 crude gonadotropin 물질로서 말의 과배란처리에 이용되고 있다. 개에서는 아직까지 canine pituitary extract (CPE)를 이용한 예가 없다. 그리하여 본 연구에서는 CPE를 추출/정제하여 이를 발정견 또는 무작위 개에 투여하여 과배란 가능성을 검토하고자 한다. CPE의 추출방법은 500 g 뇌하수체를 40% ethanol, 6% ammonium acetate (pH 6.0)의 용매 2,000 ml 로 2차례 반복 호르몬을 추출한 후, 차가운 100% ethanol을 첨가하여 최종 알콜 농도 80%로 조절하여 침전을 유기하였다. 침천물은 원심 분리하여 (27,000xg, 4°C, 30분), pellet를 수집하였

고 수집된 pellet는 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2)에 용해시켜 투석(dialyzed)을 실시하였다. 투석된 용액은 냉동건조(lyophilized)하여 호르몬을 분리하였다. 분리된 crude 호르몬은 10 mg/ml의 농도로 생리식염수에 희석하여 -20℃에 저장하여 사용하였다. 사용 시 0.4 mg/ml의 양을 투여하여 발정을 유도하였다 (Fig. 3).

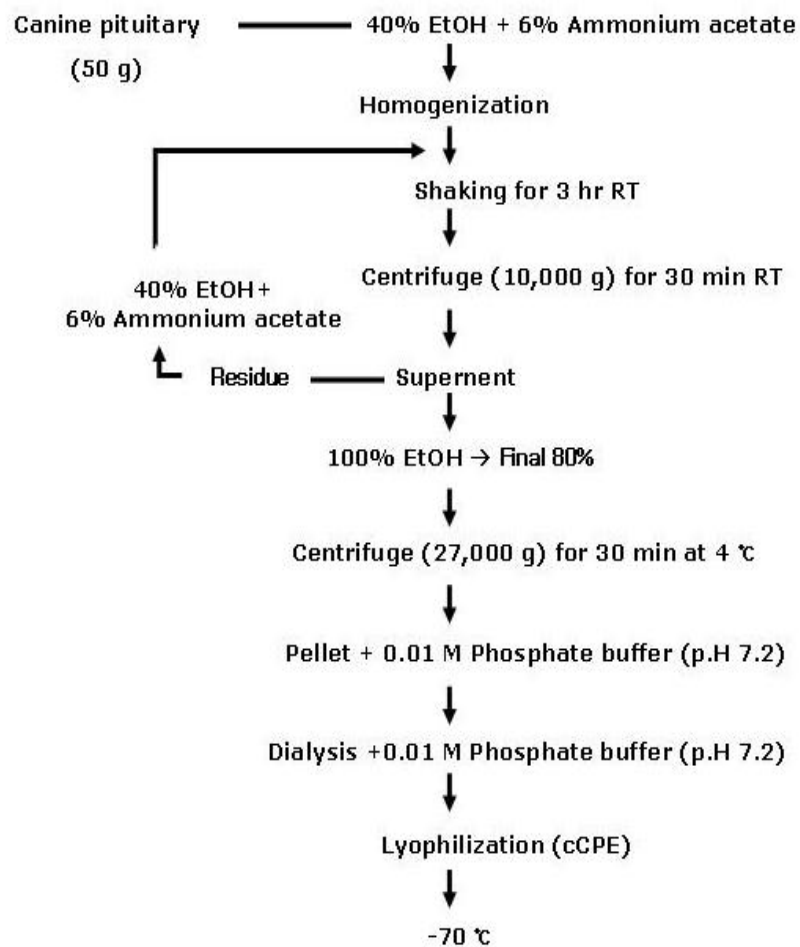


Fig. 3. Scheme of extract of canine pituitary extract (CPE).

4. 유기 발정견의 난소의 배란점 및 배란율 조사

발정을 유기하여 발정이 확인된 개체의 배란점 및 배란율을 조사하였다. 전신 마취를 위해 진정제인 세다젝트 (삼우 화학공업 주식회사, 한국)를 0.05 ml/kg을 근육 주사하여 15분간 진정시킨 후 케타민 (유한양행, 한국) 22 mg/kg을 주사하여 전신마취를 유도하였다. 전신마취 후 복부 정중선을 절개하여 난소와 난관을 회수하였다. 모든 포유류는 난소에서 난자가 배출되어 자궁으로 내려가기 전에 난관으로 이송되기 때문에 난관에서 배란된 난자를 회수할 수 있다. 배란된 난자의 회수를 위하여 TL-Hepes를 50 ml 주사기에 loading 하여 난관에 넣어 하부 쪽으로 관류하여 배란된 난자를 회수하였다.

5. 발정유기 또는 자연발정 개의 과배란 유기방법 개발

개는 한번의 발정이 끝나고 나면 수개월동안 무 발정기가 계속되는 단 발정 동물로써 Bouchard 등 (1990)은 무 발정기간이 짧은 것은 5개월, 긴 것은 12개월간 지속된다고 보고하였다. 무 발정기의 암개를 발정유도하는 방법으로는 dimethyl stilbestrol의 경구투여와 FSH/PMSG의 병용 투여, anti-GnRH 제제 투여 (Concannon, 1989), anti-prolactin 제제 또는 dopamine agonist 제제를 투여 (Kooistra 등 1999; Zoldag 등 2001) 등 여러 가지 발정 유도제를 사용하고 있으나 그 효과는 미비한 실정이다. 말에서는 Equine pituitary extract (EPE)는 crude gonadotropin 물질로서 말의 과배란치리에 이용되고 있다. 그러나 개에서는 아직까지 canine pituitary extract (CPE)를 이용한 예가 없다. 호르몬에 의한 발정유기 및 과배란 유도는 이 등 (2002)의 방법을 변형하여 사용하였다. 발정유기는 GnRH 500 IU/ml를 정맥주사 후 3일째와 5일째 CPE를 0.4 mg/Kg을 2회 근육주사 하였다. CPE 주사 후, 최초 출혈이 관찰되는 시점에 다시 한번 GnRH 500 IU/ml를 정맥주사하여 질 상피세포의 변화 추이를 관찰하여 배란시점을 조사하였다. 과배란 유기는 GnRH 용량을 2배로 하여 과배란을 유도하였다. 처리 방법은 GnRH 1000 IU/ml를 정맥주사 후 3일째와 5일째 CPE를 0.4 mg/Kg을 2회 근육주사하였다. CPE 주사 후, 최초 출혈이 관찰되는 시점에 다시 한번 GnRH 1000 IU/ml를 정맥 주사하여 질 상피세포의 변화 추이를 관찰하여 배란시점을 조사 하였다. 또한, 황체퇴행 인자인 PGF_{2a} (0.5 mg/kg)을 근육주사하고, 24시간 후에

eCG (50 IU/Kg)을 정맥주사하고 120시간째 배란유기를 위해 hCG를 20 IU/Kg을 정맥주사하여 발정 및 과배란을 유도하였다.

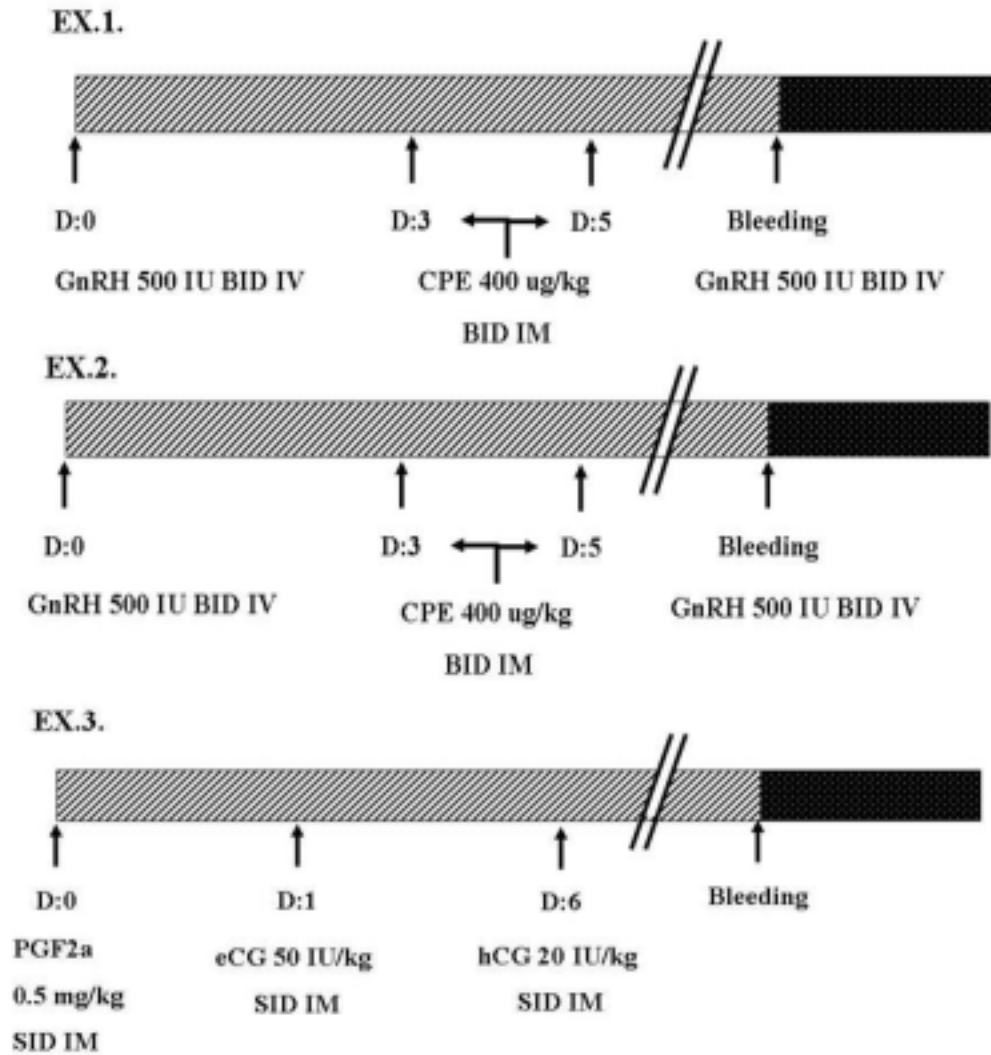


Fig. 4. Scheme of induction of superovulation from estrus or anestrus dog.

6. 외과적 수술방법에 의한 채란방법의 정립

모든 포유류는 난소에서 난자가 배출되어 자궁으로 내려가기 전에 난관으로 이송되기 때문에 난관을 관류하여 배란된 난자를 회수할 수 있다. 자연발정 및 발정유기견의 난소 및 난관을 확인과 난관에서 배란된 난자의 회수를 위하여 마취가 필수적인데 이를 위하여 진정제인 세다젝트 (삼우 화학공업 주식회사, 한국)를 0.05 ml/kg을 근육 주사하여 15분간 진정시킨 후 케타민 (유한양행, 한국) 22 mg/kg을 주사하여 전신마취를 유도하였다. 전신마취 후 복부 정중선을 절개하여 난소와 난관을 확인한 후, 50 ml 주사기에 난자 회수액인 TL-Hepes를 loading하여 1 ml 주사기를 부착하여 난관/자궁 접합부에 주입하여 수술용 실을 이용하여 난관과 주사기를 견고하게 부착하였다. 또한, 난관체에는 Tom cat 카테터를 주입하여 배란된 난자를 회수하였다.

7. 배란된 난자의 회수율

자연 발정견과 발정유기견의 체내 배란된 난자의 회수를 위하여, 공시견의 전신마취를 위해 진정제인 세다젝트 (삼우 화학공업 주식회사, 한국)를 0.05 ml/kg을 근육 주사하여 15분간 진정시킨 후 케타민 (유한양행, 한국) 22 mg/kg을 주사하여 전신마취를 유도 하였다. 전신마취 후 복부 정중선을 절개하여 난소와 난관을 확인한 후, 난소의 배란점을 조사하였고, 난관을 관류하여 회수된 난자의 회수율을 조사하였다.

8. 체내생산 된 난자의 핵 발달을

체내 생산된 난자의 핵 발달을 조사하기 위하여, 회수된 난자를 0.2% Hyaluronidase 에 침지하여 유리피펫으로 난구세포를 제거하였고, 난구세포가 제거된 난자를 10 ug/ml의 Hoechst33342가 첨가된 2.5% paraformaldehyde 에 30분간 고정 후 slide에 정착시켜 형광현미경 하에서 핵상을 관찰하였다. 핵의 형태에 따라 핵막이 뚜렷이 존재하는 것을 GV, 염색체가 적도판에 배열하고 극체가 확인되지 않은 난자를 MI, 극체가 확인된 난자를 MII 라 판단하였다.

9. 미성숙 난자의 체외성숙

포유동물 난자의 체외성숙에 관한 연구는 토끼의 미성숙 난포란을 채취하여 체외 배양하면 체내에서 일어나는 일련의 핵 성숙과정이 자발적으로 일어난다는 것을 최초로 보고한 이래 (Pincus와 Enzmann, 1935), 여러 연구자에 의해서 다양한 동물에서 연구 발전되어 왔다. 그러나 개는 발정주기가 일정한 타 동물과는 달리 단 발정동물로써 가을에 번식하는 Bsenji 종을 제외하고는 일반적으로 뚜렷한 번식계절이 없다. 또한 대부분의 동물은 난포란이 성숙된 후 배란되어 난관에서 수정을 하지만, 개는 난포란의 성숙과 수정이 난관에서 이루어지고 난관 체류기간도 다른 종에 비해 길기 때문에 체외성숙 및 수정이 타 동물에 비해 어려운 실정이다. 체외성숙배양에서 개의 미성숙 난포란은 48~72시간 후에 핵 성숙이 일어나지만 핵 성숙을 또한 20% 내외로 타 동물에 비해 낮다 (Otoi 등, 2002; Bogliolo 등, 2002; Songsasen 등, 2002).

가. 다양한 배양액과 단백질원이 난자의 체외성숙에 미치는 영향

1). 난소 및 난자의 회수

난소는 동물병원에서 2002년 11월부터 2003년 1월까지 1.5~5 년령의 비 발정기의 잠종견 및 애견에서 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 38°C physiological saline [0.9% (w/v) NaCl]이 들어있는 보온병에 넣어 2시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 다음 난소를 면도날로 세절하여 난포란을 회수하였다. 난자의 선택은 Hewitt와 England (1998), Otoi 등 (2000)의 결과의 따라 난구세포가 2~4층으로 둘러싸여 있고, Corona 세포를 제외한 난자의 크기가 110 μ m 이상의 세포질이 균등한 색조를 지니는 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

2) 체외성숙

실험1) 체외성숙 배양액에 따른 난포란의 체외성숙

체외성숙 배양액으로 TCM-199 (Earle's salt, Sigma,7528), DMEM (Gibco, 11995-065), NCSU37, m-NCSU37에 각각 10% FBS (Gibco, 26140-079)를 첨가하고,

1 mg/ml cysteine (C-2529, Sigma), 0.2 mM pyruvic acid (P-4562, Sigma), 20 ng/ml E₂ (E-8875, Sigma), 1 μg/ml recombinant bovine Somatotropin (rbST) (S-8648, Sigma)을 첨가하였다. 배양액은 4-well dish (Nunc, Denmark)에 500 μl씩 분주한 후 10~15개의 난자를 주입하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양 후 난포란의 성숙을 확인하였다. 발정기의 개 혈청을 채취하여 -70°C에 보관하여 체외성숙 배양 시 사용하였다.

실험2) 첨가 단백질에 따른 난포란의 체외성숙

실험 1의 결과로부터 72시간 체외성숙 후 가장 선명한 난구세포 확장을 보인 m-NCSU37을 기본배양액으로 하고 단백질 첨가제로서 10% FBS, 10% estrus dog serum (EDS), 0.3% BSA (A-6003, Sigma) 및 대조구로 0.1% PVA를 각각 첨가한 후 1 mg/ml cysteine, 0.2 mM pyruvic acid, 20 ng/ml E₂, 1 μg/ml rbST를 첨가하여, 4-well dish에 500 μl씩 분주한 후 10~15개의 난자를 주입하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양 후 단백질 첨가종류에 따른 난포란의 성숙을 비교 검토하였다.

나. 개 난소의 수송온도가 개의 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

1). 난소 및 난자의 회수

난소는 동물병원에서 발정기 및 비발정기의 잡종견의 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 μg/ml streptomycin이 첨가된 4°C와 38°C의 0.9% saline이 들어있는 보온병에 넣어 5시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 μg/ml streptomycin이 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 난소를 면도날로 세절하여 난자를 회수하였다. 난자의 선택은 Hewitt와 England (1998)의 결과의 따라 난구세포가 2~4층 이상으로 둘러싸여 있고, Corona 세포를 제외한 난자의 크기가 110 μm 이상의 세포질이 균등한 색조를 지닌 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

2) 난자의 체외성숙

38°C에 수송한 난소에서 채취한 미성숙 난자가 체외성숙에 미치는 영향을 검토하

기 위하여 미성숙 난자를 상기 체외성숙 배양액에서 24, 48, 96시간 동안 39°C, 5% CO₂ incubator에서 체외성숙 배양 후 난자의 핵성숙을 확인하였다. 체외성숙 후 핵상의 관찰은 0.2% HY용액에 난자를 침지하여 glass pipette으로 난구세포를 제거한 후 PBS-PVA에 3회 세척 후 400배 도립 현미경 하에서 형태상 세포막이 깨끗한 난자만을 분리하여 고정하고 핵성숙을 평가하였고, 약 10~20%의 난자는 외관상 lysis로 판단되어 실험에서 제외하였다. 난자의 고정은 10 µg/ml의 Hoechst 33342 염색액이 첨가된 2.5%의 paraformaldehyde에 30분간 고정 후 slide에 정치시켜 cover slip으로 덮고 형광현미경 하에서 핵상을 관찰하였다. 핵의 형태에 따라 핵막이 뚜렷이 존재하는 것을 GV라 판단을 하였으며, chromosome이 적도판에 배열하거나 동시에 제1 극체가 확인된 난자를 MI-MIII라 판단하였으며, 핵상을 알 수 없거나 구분하기 어려운 상태를 unclear로 구분하였다.

다. 개의 생식기내에 난자의 이식인 난자의 성숙에 미치는 영향

1). 공시동물

본 연구에 사용된 암캐는 임상적으로 건강하고, 자견 생산경험이 있는 2년생 이상의 발정이 개시된 잡종견 3두를 구입하여 공시하였다.

2). 난소 및 난자의 회수

난소는 발정주기에 관계의 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 38°C의 0.9% 생리식염수가 들어있는 보온병에 넣어 2시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin 및 0.3% BSA (A-9647, Sigma)가 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 난소를 면도날로 세절하여 난자를 회수하였다. 난자의 선택은 (Otoi 등, 2001)의 난자 분류기준에 따라 난구세포가 2~4층으로 둘러싸여 있고 세포질의 직경이 110 µm 이상이면서 세포질이 균등한 색조를 지닌 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

3). 미성숙난자의 체외성숙

체외성숙 배양액으로 TCM-199 (M-7528, Sigma)에 10% FBS (26140-079, Gibco), 1 mg/ml cysteine (C-2529, Sigma), 0.2 mM pyruvic acid (P-4562, Sigma), 20 ng/ml E₂ (E-8875, Sigma)를 첨가하였다. 배양액은 4-well dish (Nunc, Denmark)

에 500 μ l씩 분주한 후 20~30개의 난자를 주입하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 24, 48 및 72시간 동안 배양 후 난자의 핵성숙을 조사하였다.

4). 미성숙난자의 발정견 생식기내의 이식 및 회수

미성숙난자의 핵성숙을 유도하기 위하여 자연발정이 진행된 개의 생식기관에 이식하였다. 난자이식은 개의 발정진행 상태를 확인하여 배란적기를 판단하고 외과적 수술방법으로 이식하였다. 배란적기의 판단기준은 Feldman과 Nelson (1996)의 방법에 준하여 질 상피세포의 각질화상태를 조사하여 실시하였다. 질 상피세포의 채취는 멸균된 면봉을 질 내에 삽입 후 질 상피세포를 채취하였고, 슬라이드에 도말한 후 Gimsa 염색액을 이용하여 염색 후 질 상피세포의 각질화 변화를 관찰하여 배란적기를 판단하였다. 미성숙 난자의 생식기관내 이식은 Table 1과 같이 설계하여 이식하였다. 배란적이인 암개를 200 ug/kg Sedaject (삼우메디안 한국)에 15분간 진정시킨 후 20 mg/kg Ketamine (유한양행 한국)을 이용하여 15분간 마취하였다. 마취 후 복강의 정중선을 절개하여 난소와 생식기관 (난관, 난소낭, 자궁)에 미성숙난자를 이식하였다. 이식 4, 5 및 6일 후 위와 동일한 방법으로 마취 후 복강을 절개하였으며, 난소를 포함한 자궁절제술을 통해 생식기관을 회수 후 연구실에서 난관, 난소낭, 자궁을 관류하여 난자를 회수하였다. 관류액은 100 IU/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin 및 0.3% BSA (A-9647; Sigma)가 첨가된 D-PBS를 사용하였다. 회수된 난자는 회수율, 생존율, 사멸율 및 제1극체 유무 등을 조사한 후, 생존된 난자만을 이용하여 난자의 핵성숙율을 조사하였다. 채취된 난자의 생사유무는 세포질이 깨지거나, 투명대만 존재하는 것을 사멸된 난자로 판단하였고, 난자의 세포질과 세포질의 외막이 온전한 것을 생존난자로 판단하였다.

라)FSH및LH를첨가하여난자의체외성숙에미치는영향

1). 난소 및 난자의 회수

난소는 동물병원에서 발정기 및 비발정기의 잡종견의 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 38°C의 0.9% saline이 들어있는 보온병에 넣어 3시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 난소를 면도날로 세절하여 난자를 회수하였다. 난자의 선택은 Hewitt와 England

(1998)의 결과의 따라 난구세포가 2~4층 이상으로 둘러싸여 있고, Corona 세포를 제외한 난자의 크기가 110 μm 이상의 세포질이 균등한 색조를 지닌 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

2) 난자의 체외성숙

체외성숙 배양액으로 TCM-199 (Earle's salt, Sigma,7528)에 10% FBS (Gibco, 26140-079)를 첨가하고, 1 mg/ml cysteine (C-2529, Sigma), 0.2 mM pyruvic acid (P-4562, Sigma)를 첨가한 배양액을 기본으로 사용하였다. FSH (Follitropin V Vetrepharm, Canada)와 LH (Sigma)는 control, 0.5, 5 or 50 ug/ml을 배양액에 첨가하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양 후 난포란의 성숙을 확인하였다.

마)발정기와GV모양에 따라 난자의 체외성숙

1). 난소 및 난자의 회수

난소는 동물병원에서 발정기 및 비발정기의 잡종견의 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 첨가된 38°C의 0.9% saline이 들어있는 보온병에 넣어 3시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 난소를 면도날로 세절하여 난자를 회수하였다. 난자의 선택은 Hewitt와 England (1998)의 결과의 따라 난구세포가 2~4층 이상으로 둘러싸여 있고, Corona 세포를 제외한 난자의 크기가 110 μm 이상의 세포질이 균등한 색조를 지닌 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

2) 난소의 발정기 상태에 따른 분류

난소의 분류는 Otoi 등 (2002)의 기준에 따라 1) 비발정기: 난포 및 pronounced 황체 조직이 존재하며, 2)발정기: 2-10 mm의 난포가 존재한다. 또한 3) 황체기: 황체가 1개 이상보이는 난소를 발정후지기라 판단하였다. 실험에 공시된 비발정기의 난소는 14개, 발정기 12개 그리고 황체기 22개를 이용하여 연구를 진행하였다.

3) 발정의 관찰

발정의 관찰은 Lee 등 (2005)의 방법에 준하여, 질 상피세포의 변화를 관찰하여 조사 하였고, 또한, 혈중 progesterone의 농도를 DSL-3900 ACTIVE progesterone Kit (Diagnostic System Laboratories, Inc., TX)를 통해 혈중 progesterone의 농도를 조사

하여 progesterone 농도가 4 to 7.5 ng/ml이 되는 시점을 배란시점으로 정하였다.

4) 배란된 난자의 회수

배란된 난자의 회수는 Reynaud 등 (2005)의 방법에 준하여 실시를 하였다. 즉, 공시견을 전신마취를 위해 진정제인 세다젝트 (삼우 화학공업 주식회사, 한국)를 0.05 ml/kg을 근육 주사하여 15분간 진정시킨 후 케타민 (유한양행, 한국) 22 mg/kg을 주사하여 전신마취를 유도하였다. 전신마취 후 복부 정중선을 절개하여 난소를 절제하여 실험실에서 난관을 관류하여 난자를 회수하였다.

5) 체외성숙

체외성숙 배양액으로 TCM-199 (Earle's salt, Sigma,7528)에 10% FBS (Gibco, 26140-079)를 첨가하고, 0.6 mM cysteine (C-2529, Sigma), 0.2 mM pyruvic acid (P-4562, Sigma) 및 50 μ g/ml gentamycin과 20 μ g/ml E₂를 첨가한 배양액을 기본으로 사용하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양 후 난포란의 성숙을 확인하였다.

6) 난자의 크기 측정

회수된 난자의 난구세포를 제거하고 도립현미경의 접안렌즈의 micrometer를 이용하여 100배하에서 난자의 크기를 측정 하였다.

7) GV 난자의 분류

난자의 GV 모양의 분류는 Chohan and Hunter (2003)의 방법에 준하여 실시하였다.

GV-I: filamentous chromatin clumps are condensed around the nucleolus and nuclear membrane.

GV-II, the filamentous chromatin clumps are localized around the nucleolus.

GV-III, the filamentous chromatin clumps are distributed in the nucleus and nucleolus has disappeared.

GV-IV, the chromatin is condensed into thick clump.

GV-V, the chromatin condensed into a single clump.

Metaphase I (MI): present in equatorial view of chromosomes.

Metaphase II (MII): second metaphase with the extrusion of the first polar body.

degeneration (DE): oocyte was no visible chromatin material.

바. 개의 뇌하수체 호르몬을 이용하여 난자의 체외성숙

1). 난소 및 난자의 회수

난소는 동물병원에서 발정기 및 비발정기의 잡종견의 난소를 적출하여 이용하였다. 적출한 난소는 즉시 100 IU/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 38°C의 0.9% saline이 들어있는 보온병에 넣어 3시간 이내에 연구실로 운반하여 난소를 100 IU/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척 후 난소를 면도날로 세절하여 난자를 회수하였다. 난자의 선택은 Hewitt와 England (1998)의 결과의 따라 난구세포가 2~4층 이상으로 둘러싸여 있고, Corona 세포를 제외한 난자의 크기가 110 μ m 이상의 세포질이 균등한 색조를 지닌 것만을 회수하여 실험에 공시하였다.

2) 난자의 체외성숙

기본성숙 배양액으로 NCSU-37 배양액에 10% FBS, 0.25 mM pyruvate, 0.6 mM cysteine, 50 μ g/ml gentamycin 및 20 μ g/ml E₂를 첨가하여 대조구, 뇌하수체 추출물을 각각 40, 400 그리고 4000 μ g/ml을 첨가하였고, 마찬가지로, 기본배양액에 0.1 IU/ml human menopausal gonadotrophin (hMG, Teikokuzoki, Tokyo, Japan)를 첨가하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양 후 난포란의 핵성숙을 확인하였다.

사. Insuline이 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향

기본성숙 배양액으로 SOF 배양액에 10% EBS 및 20 μ g/ml E₂를 첨가하여 대조구, 10, 100 및 1000 μ g/ml의 인슐린을 첨가하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양 후 난포란의 핵성숙을 확인하였다.

아. 개 태아혈청 및 각종 단백질원이 개 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

기본성숙 배양액으로 NCSU-37 배양액에 10% dog fetal serum, 10% FBS, 10% estrus bitch serum (EBS) 및 0.3% BSA를 첨가하여 39℃, 5% CO₂ incubator에서 72 시간 동안 배양 후 개의 미성숙 난포란의 핵 성숙을 확인하였다.

자. Ovarian bursa fluid가 개 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

기본성숙 배양액으로 NCSU-37 배양액에 10% ovarian bursa fluid 첨가하여 39℃, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양 후 개의 미성숙 난포란의 핵 성숙을 확인하였다.

제 2 절 연구수행 결과

1. 질 상피세포의 변화에 의한 배란적기 진단

자연발정 진도견 2두 및 발정유기 진도견 9마리 중 5마리가 발정징후가 확인되어 개의 질 상피세포의 진행상태를 확인한 결과 발정이 확인된 모든 개에서 아래 그림에서와 같이 질 상피세포의 각질화 상태가 진행되었다. 즉, 비발정기에는 Fig. 5 a)에서 보듯이 2가지 세포가 주로 보이는데, parabasal cell (비각화 세포)과 intermediate cell로 parabasal cell은 질 상피세포의 표층세포로서 큰 핵과 작은 세포질을 가지고 있으며, intermediate cell은 parabasal cell의 약 2배정도 크며, 달걀형에서부터 다양하며, 세포질에 비해 핵이 작게 보인다. 또한, 발정이 진행되면서 발정진기에는 Fig. 5 b, c, d, e, f, g, h 에서 보듯이 질 상피세포가 점점 각질화 되어가며, 세포의 핵이 사라짐을 확인할 수 있다. 그리고 발정기의 질 상피세포는 Fig. 5, i, j, k, l, m, n 에서 보듯이 대부분 각질화 되어 죽은 Superficial cell (각질화세포)이 80~100%에 달하며, 이때를 배란적기라 판단한다. 핵이 없거나 농축되어 작게 보이며 세포질이 매우 크다. 또한 모양도 불규칙하며 적혈구나 백혈구 세포는 보이지 않는다. 마지막으로, 발정이 끝나고 발정휴지기가 되면 Fig. 5, 의 o, p, q에서 보듯이 질 상피세포가 점점 회복되어 핵이 보이기 시작한다. 또한, 발정이 완전히 끝나면 Fig. 5, r과 같이 질 상피세포가 비발정기 같이 회복된다. 그러나 본 연구에서 질 상피세포의 진행상황을 보고 발정징후를 관찰 하였으나, Table 2의 결과를 보면 질 상피세포의 세포진단학적 상태만을 조사하여 배란적기와 배란된 난소를 확인하기 어렵다고 생각된다.

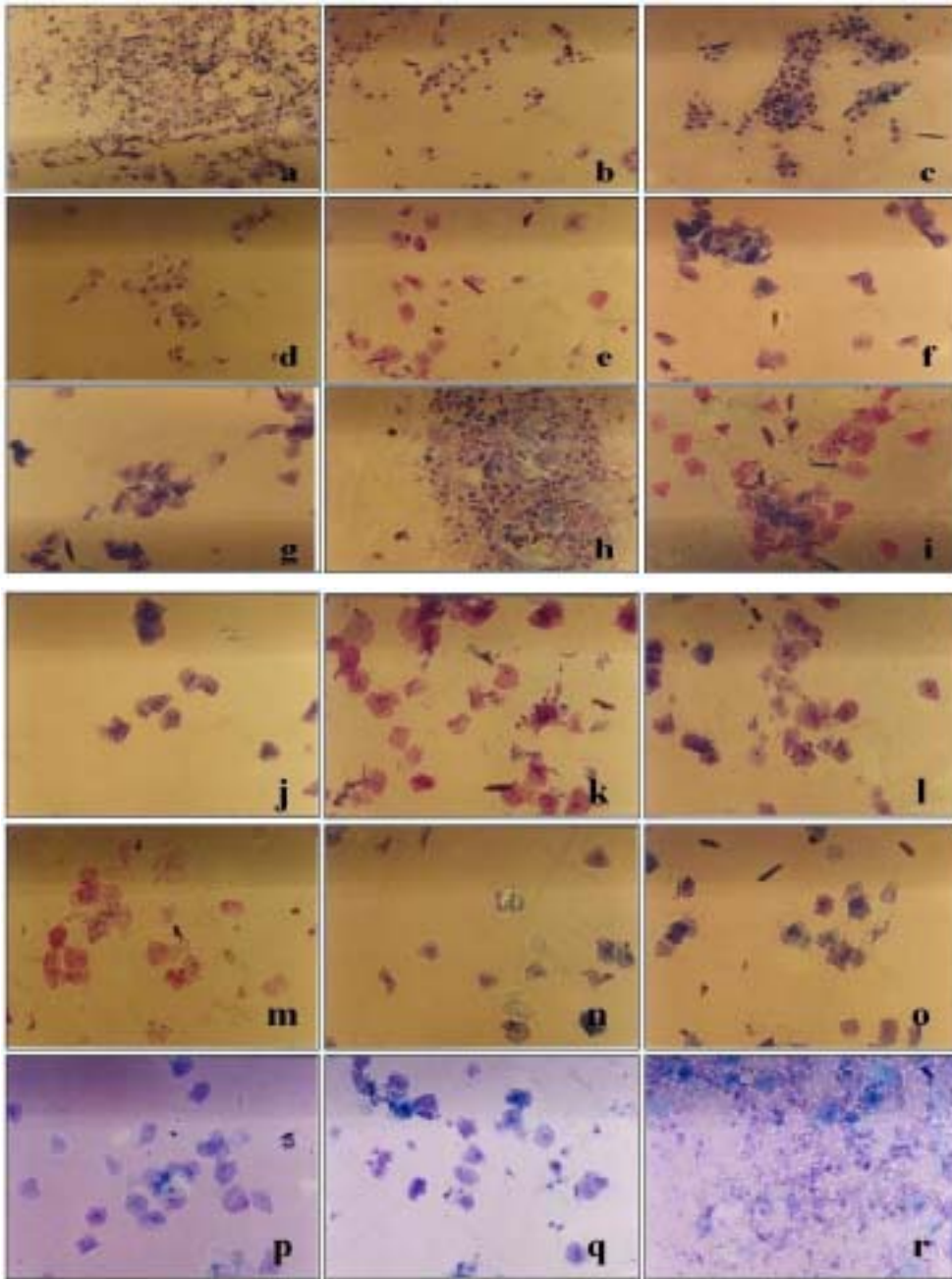


Fig. 5. Vaginal epithelial cells depend on estrus stage, a) anestrus, b,c,d,e,f,g,h) proestrus, i,j,k,l,m,n) estrus, o,p,q) metestrus, and r) diestrus.

2. 초음파진단에 배란시기 관찰

현재까지 개의 배란시점을 확인하는 것은 질 상피세포의 세포학적 변화를 이용하여 배란시점을 확인 하였으나, 이는 정확한 배란시점을 확인하기 어렵다는 단점이 있다. 따라서 정확한 배란시점을 확인하기 위하여 초음파를 이용하여 난포의 파열시점을 확인하고 정확한 배란 시점을 조사하였다. 발정이 유기되어 외음부 출혈이 보인 후 12 일째 개의 난소크기는 24.1 mm 이며 난포크기는 6.7 mm 였다. 여기에서 더 진행된다면 난포가 사라짐으로 인해 6.7 mm를 전후하여 배란이 되는 것으로 판단된다 (Fig. 6).

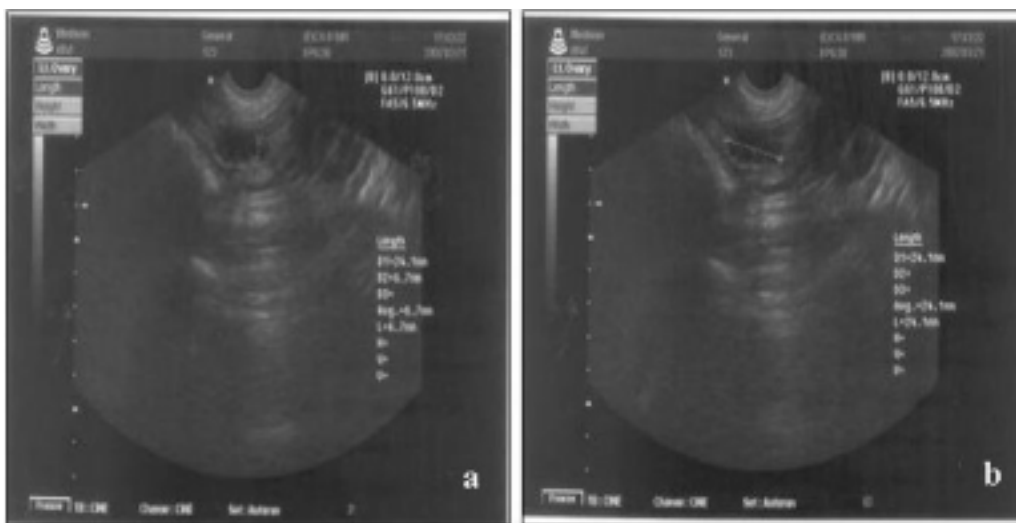


Fig. 6. Diagnosis of follicle and ovary from estrus dog by ultrasonography, a: Diameter of follicle (6.7 mm), b: Diameter of ovary (24.1 mm).

Table 1. Ovulation rate of induced dog by ultrasonography

Ovulation	No. of dogs	No. of ovulation points	No. of oocytes ovulated
Unovulation	4	0	0
Ovulation	3	15	16

3 Hormone 투여에 의한 발정유기

본 연구에 사용된 발정유기 재는 bromocriptine과 GnRH, PG 및 CPE이다. Anti-prolactin 제재인 bromocriptine은 임신 시기나 비 임신시기 황체의 luteotrophic 요소인 prolactin의 농도를 저하시켜 난소 내 황체의 퇴행을 유도하여 무 발정기의 상태를 유지하게 하고, 지속적으로 투여하면 발정을 재개 할 수 있는 약물이다. 따라서 본 연구에서는 anti-prolactin 제재인 bromocriptine과 GnRH 그리고 황체퇴행 인자인 PGF_{2a}를 사용하여 발정을 유도하였으며, 개의 뇌하수체 추출물을 이용하여 Fig 2와 같은 실험 계획과 같이 연구를 진행 하였다. Table 2에서 보듯이 Group 1의 경우 9마리의 처리구중 4마리가 발정이 확인되어 44.4%의 효율을 보였으며, Group 2 처리구에서는 9마리 중 5마리가 발정이 확인되어 55.6%의 효율이 조사되었다. 따라서, GnRH와 개의 뇌하수체 호르몬을 병행 투여하는 것은 개의 발정을 유기 할 수 있다고 판단된다.

Table 2. Induction of estrus by different hormone treatments

Group	Treatments	No. of dogs	No. of estrus (%)	
1	Br (50 µg/kg) SID PO / Br (50 µg/kg) SID PO + GnRH 500 IU SID IV + PGF _{2a} 0.5 mg/kg IM / Bre (50 µg/kg) SID PO	9	4 (44.4)	Estrus induce
	GnRH 500 IU BID IV + CPE (400 µg/kg) BID SQ/GnRH 500 IU SID IV			
3	Natural estrus	2	2 (100.0)	Natural estrus

* SID PO : 하루 1번 경구 투여, BID PO : 하루 두 번 경구투여, BID SQ: 하루 두 번 피하주사.

4 유기 발정견의 난소의 배란점 및 배란율 조사

발정이 유기된 개의 난소에서 배란된 난자와 배란점 조사는 Table 3과 같다. 호르몬을 처리하여 발정이 유기된 발정견의 난소를 채취한 결과 난소 내 다량의 대란포가 확인 되었으며 (Fig. 7), Group 1, 2 처리구 및 자연 발정견에서 배란점 및 배란된 난자를 확인할 수 있었다. 호르몬 처리구 1의 경우 배란된 개 2두에서 12개의 배란점을 확인 하여 두당 평균 6개의 난자가 배란되었다. 또한, 호르몬 처리구 2의 경우 배란된 개 3두에서 25개의 배란점을 확인하여 두당 8.3개의 난자가 배란되었다. 하지만, 회수된 난자는 배란점보다 낮게 회수 되었는데 이는 아마도 개 난소 주머니, 즉, ovarian bursa 때문에 정확하게 카테터를 난관에 넣지 못해 회수율이 떨어지는 것으로 판단된다.

Table 3. Ovulation rate of induced estrus dogs

Group	Treatment Group	No. of dogs	No. of dogs ovulated (%)	No. of point ovulated	No. of collected oocytes
1	Br(50 μ g/kg) SID PO/Br (50 μ g/kg) SID PO + GnRH 500 IU SID IV + PGF2a 0.5 mg/kg IM / Br (50 μ g/kg) SID PO	4	2 (50.0)	12	8
2	GnRH 500 IU BID IV + Canine Pituitary Extract (400 μ g/kg) BID SQ / GnRH 500 IU SID IV	5	3 (60.0)	25	21
3	Natural estrus	2	1 (50.0)	6	6

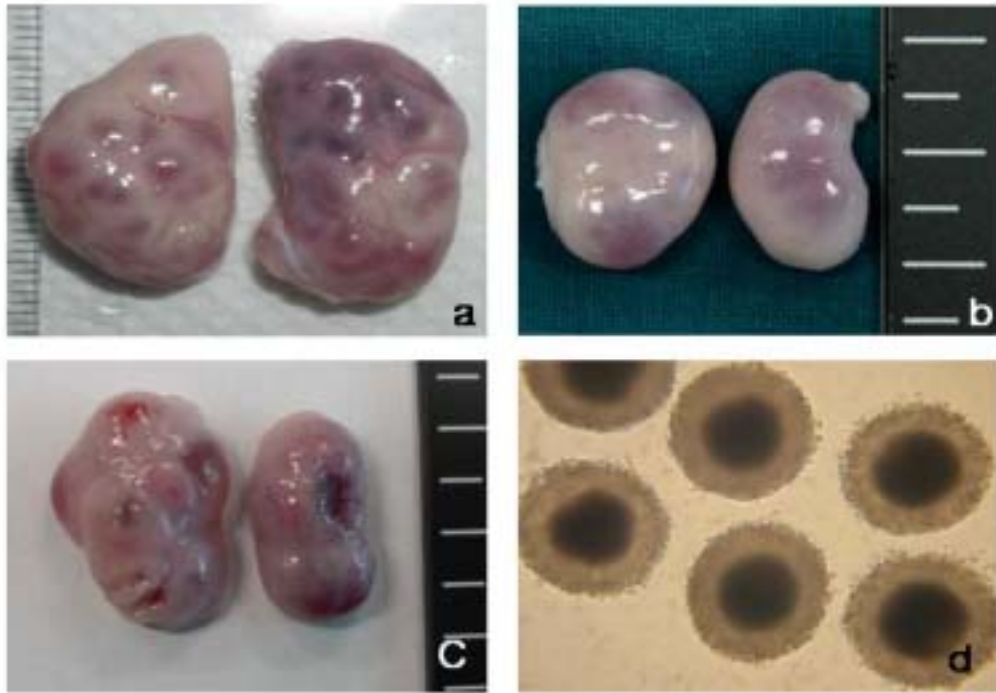


Fig. 7. Ovaries of induced estrus dog (a, b), confirmation of ovulation point in induced estrus ovaries (c), and oocytes collected from oviduct (d).

5. 발정유기 또는 자연발정 개의 과배란 유기방법 개발

호르몬을 투여하여 발정을 유기한 2번 처리구 모두 10두 중 1두를 제외한 9두가 외음부 출혈을 보였다 (Fig. 8, Table 4), 하지만, 외음부 최초 출혈시점은 각 개체마다 약간의 차이가 있었다. 과배란 유기는 발정유기와 유사한 처리를 하였는데, GnRH 처리용량을 2배로 하여 과배란을 유도하였다. 처리방법은 GnRH 1000 IU/ml를 정맥주사 후 3일째와 5일째 CPE를 0.4 mg/Kg을 2회 근육 주사하였다. CPE 주사 후, 최초 출혈이 관찰되는 시점에 다시 한번 GnRH 1000 IU/ml를 정맥 주사하여 질 상피세포의 변화 추이를 관찰하여 배란시점을 조사하였다. 2배의 GnRH를 투여하여 과배란을 유도한 처리구 10두 중 1두를 제외한 9두가 외음부 출혈을 보였다 (Table 4). 발정유도와 마찬가지로 외음부 최초 출혈시점은 각 개체마다 약간의 차이가 있었다. 이런 결과로 보아 개의 뇌하수체 추출물과 GnRH의 병용투여는 개의 발정을 유기할 수 있는 것으로 판단된다. 또한, 황체퇴행 인자 인 0.5 mg/kg PGF_{2a} 와 난포를 성장시키는 50 IU/kg eCG 및 성숙된 난포를 배란시키는 hCG (20 IU/kg)를 병용처리 하여 과배란을 유기되었다. Group 2의 경우 50%의 개가 발정이 유기 되었으며, Group 3의 경우 90.0%의 발정율을 보여 GnRH 의 농도를 높임으로 인해 높은 효율의 발정정후를 보였다.

Table 4. Induction of estrus and superovulation by hormone treatment

Group	Treatment	No. of dogs	No. (%) of estrus	
1	Natural estrus	3	3 (100)	
2	GnRH (500 IU) + CPE + GnRH (500 IU)	8	4 (50.0)	Induction of estrus
3	GnRH (1000 IU) + CPE + GnRH (1000 IU)	10	9 (90.0)	Induction of superovulation
4	0.5 mg/kg PGF _{2a} + 50 IU/kg eCG + 20 IU/kg hCG	10	2 (20.0)	Induction of superovulation



Fig. 8. Vulva of induced estrus dog by hormone treatment.

6. 외과적 수술방법에 의한 채란방법의 정립

외과적 수술은 발정 및 과배란이 유기된 개의 질 상피세포 변화 추이를 관찰하면서 질 상피세포의 각질화 정도가 Fig. 9, a, b, c, d 와 같은 상태가 80-90% 이상일 때를 기준으로 3~4일 후를 배란 적기로 판단하였다.

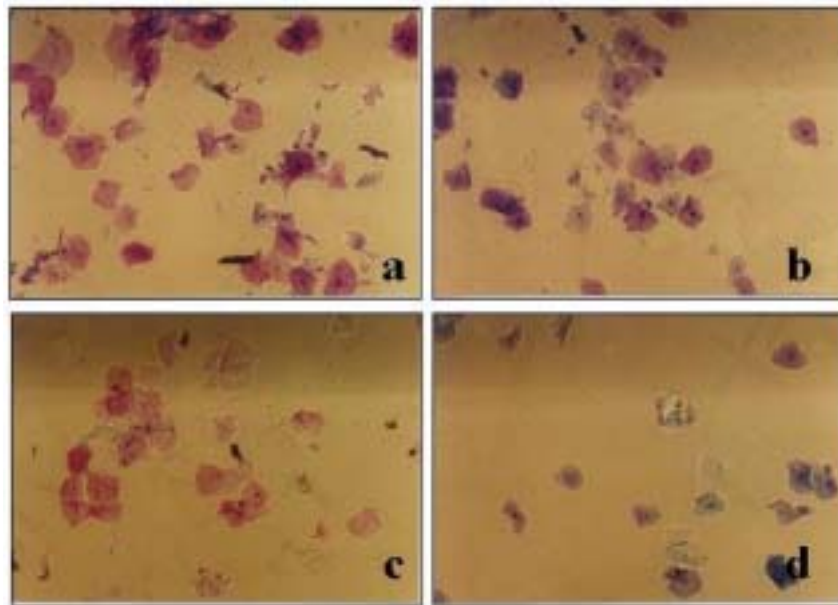


Fig. 9. Vaginal epithelial cell of induced estrus dog by hormone treatment.

배란적으로 판단된 공시견은 배란된 난자의 회수를 위해 전신마취 후 복부 정중선을 절개하여 난소와 난관을 확인한 후, 50 ml 주사기에 난자 회수액인 TL-Hepes를 loading하여 1 ml 주사기를 부착하여 난관 끝과 자궁이 만나는 자리에 주입하여, 수술용 실을 이용하여 난관과 주사기를 견고하게 부착하였다. 또한, 난관체에는 Tom cat 카테터를 주입하여 배란된 난자를 회수하였다 (Fig. 10).

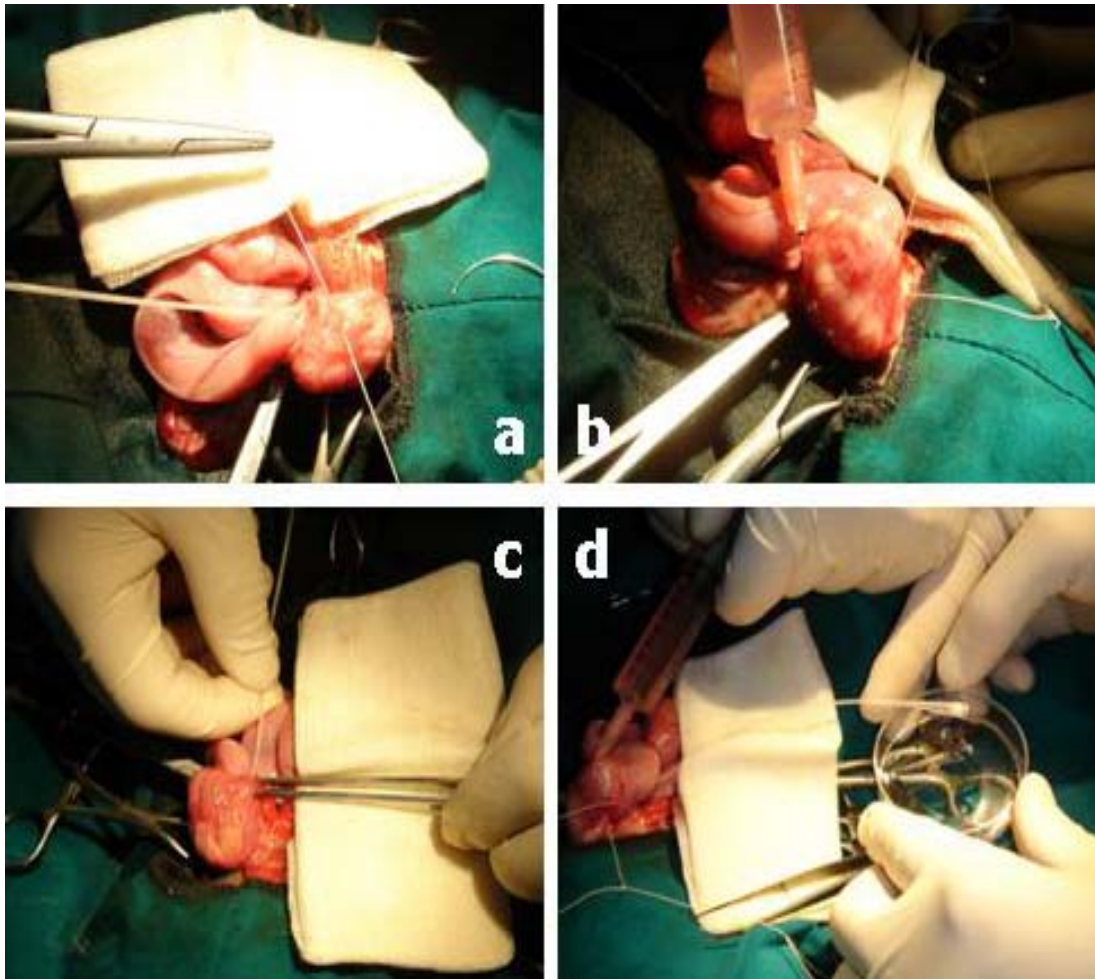


Fig 10. Collection of ovulated oocytes by surgical method. a) Confirm of ovary and oviduct, b) Insert of needle into oviduct, c) Insert of Tom cat into oviduct, d) Flush of flushing media.

7. 배란된 난자의 회수율

자연발정견과 발정유기견의 체내 배란된 난자의 회수를 위하여 정중선을 절개하여 난소와 난관을 확인한 후 (Fig. 10), 난소의 배란점을 조사하였고 난관을 관류하여 회수된 난자의 회수율을 조사하였다. 자연발정견의 경우 총 5두가 배란되어 50%의 배란율을 보였으며, 배란점은 총 17개가 조사되었고, 회수된 난자는 76.5%가 회수되었다. 또한, 호르몬을 처리하여 발정유기 및 과 배란을 통해 배란을 유도한 처리구는 처리구 1의 경우 9두 중 6두, 처리구 2의 경우 10두중 7두가 배란되었다. GnRH 500 IU/ml 처리구의 개에서는 배란점이 28개가 조사되었고, 총 24개의 난자가 회수되어 난자의 회수율은 85.7%로 조사되었으며, GnRH 1000 IU/ml 처리구에서는 배란점이 53개 관찰되었고, 총 45개의 난자를 회수하여 난자 회수율은 84.9%로 조사되었다. 또한, 과배란을 위해 PGF_{2a} 와 eCG을 병용사용하고 배란유기를 위해 hCG를 처리한 처리구 또한 9두 중 5두가 배란되어 발정은 유기할 수 있으나, 과배란은 실패하였다. 이러한 결과로 보아 개는 정확한 배란시점을 파악하기 어려운 것으로 판단된다. 또한, 자연발정견과 호르몬 처리구의 배란점을 비교하였을 때 호르몬을 처리한 처리구가 배란된 난자의 개수가 늘어나지 않은 것으로 조사되어 개의 과 배란 처리방법 정립이 시급하다 판단된다.

Table 5. Collection rate of in vivo oocytes from natural or induced estrus dog

Group	Treatment Group	No. of dogs	No. (%) of dogs ovulated	No. of point ovulated	No. (%) of oocytes collected
1	Normal Estrus	10	5 (50.0)	17	13 (76.5)
2	GnRH(500 IU) + CPE + GnRH(500 IU)	9	6 (66.7)	28	24 (85.7)
3	GnRH(1000 IU) + CPE + GnRH(1000 IU)	10	7 (77.8)	53	45 (84.9)
4	PGF _{2a} (0.5 mg/kg) + eCG (50 IU/kg) + hCG (20 IU/kg)	9	5 (55.6)	21	17 (81.0)

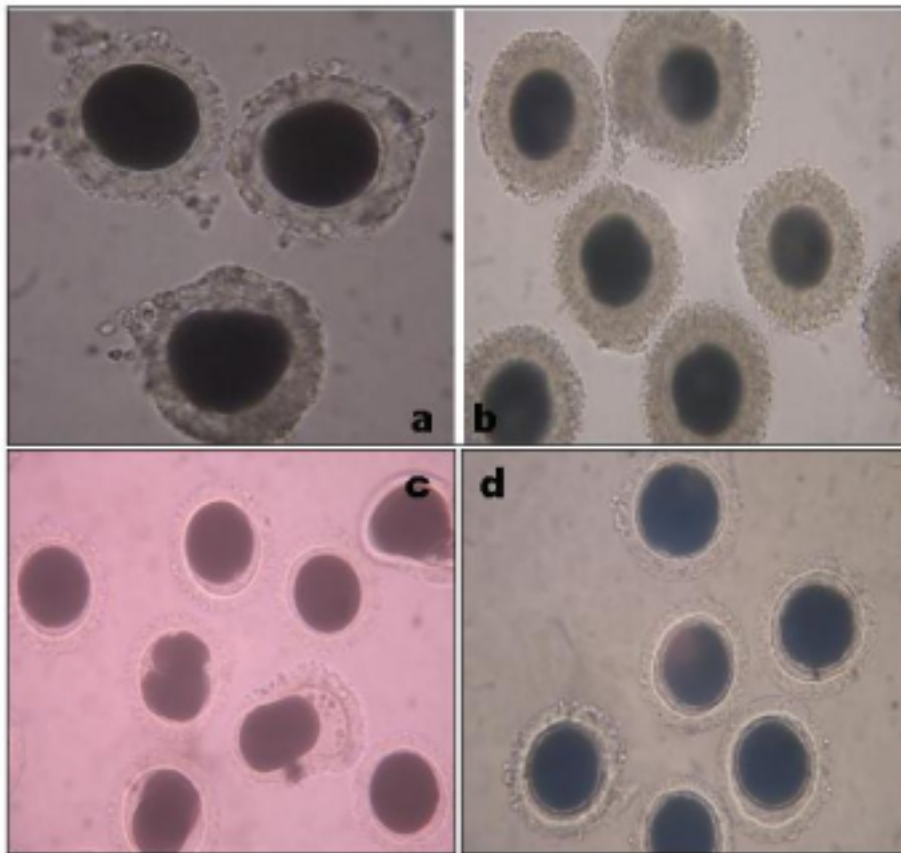


Fig. 11. Collected oocytes by flushing of oviduct, a) Matured oocytes, b) Immatured oocytes, c, d) aging oocytes.

8. 체내생산 된 난자의 핵 발달을

체내 생산된 난자의 핵 발달을 조사하기 위하여 회수된 난자를 0.2% Hyaluronidase 에 침지하여 유리피펫으로 난구세포를 제거 하였고 난구세포가 제거된 난자를 10 ug/ml의 Hoechst33342가 첨가된 2.5% paraformaldehyde에 30분간 고정 후 slide에 정착시켜 형광현미경 하에서 핵상을 관찰하였다 (Fig. 12, b, c). 또한, 고정을 실시하지 않고 10 ug/ml의 PI가 첨가된 PBS-PVA에 30분간 염색을 실시하였다 (Fig. 12, a). 핵의 형태에 따라 핵막이 뚜렷이 존재하는 것을 GV, 염색체가 적도판에 배열하고 극체가 확인되지 않은 난자를 MI, 극체가 확인된 난자를 MII로 판단하였다. 관류된 난자의 핵상태는 정상발정견의 경우 성숙난자가 23.1%가 조사되었고, GnRH 500 IU/ml을 처리한 처리구는 37.5%, GnRH 1000 IU/ml 처리구는 34.4%의 난자가 성숙난자로 판명 되었다. 또한 미성숙 난자의 비율은 정상발정견의 경우 69.2%, 발정유기견의 경우 54.2%, 과배란 유기견의 경우 53.1%가 미성숙 난자로 판명되어 성숙된 개 난자의 획득을 위해서는 수술시간의 조정과 정확한 배란시점을 파악할 수 있는 연구가 선행되어야 할 것으로 생각한다.

Table 6. Nuclear development rate of oocytes in vivo

Group	Treatment Group	No. of oocytes	GV (%)	MI	MIII (%)
1	Natural estrus dog	13	9 (69.2)	1 (7.7)	3 (23.1)
2	GnRH(500IU) + CPE + GnRH(500IU)	24	13 (54.2)	2 (8.3)	9 (37.5)
3	GnRH(1000IU) + CPE + GnRH(1000IU)	32	17 (53.1)	4 (12.5)	11 (34.4)
4	PGF _{2a} (0.5 mg/kg) + eCG (50 IU/kg) + hCG (20 IU/kg)	12	8 (66.7)	1 (8.3)	3 (25.0)

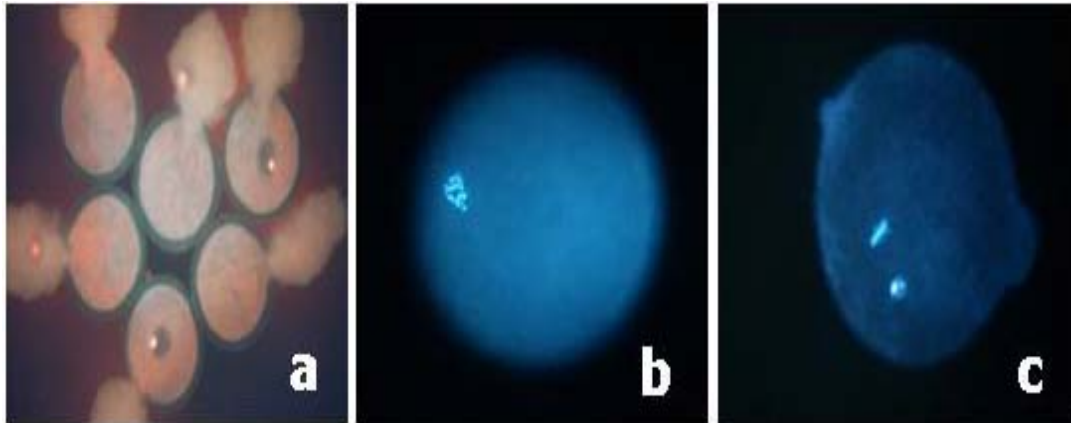


Fig. 12. Nuclear development of in vivo collected oocytes by staining method. a) GV, b) MI, and c) MII.

9. 미성숙 난자의 체외성숙

가. 다양한 배양액과 단백질원이 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향

1) 각기 다른 체외성숙 배양액에 10% FBS를 첨가하여 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 규명하기 위하여 난포란을 72시간 배양 후 성숙율을 확인한 결과는 Table 7과 같다. 72시간 배양 후 배양액에 따라 GV, MI-MII로 핵 성숙율은 TCM-199 (64.9, 5.2%), DMEM (60.0, 5.0%), NCSU37 (46.4, 7.2%), m-NCSU37 (47.1, 5.9%)로 배양액에 따라 성숙율에 차이를 보이지 않았다.

Table 7. Effect of culture medium on the nuclear progression in canine oocytes 72 h after culture

Culture media	No. of oocyte cultured	No. (%) of oocytes developed to		
		GV	MI-MII	Unclear
TCM-199 + 10% FBS	57	37 (64.9)	3 (5.2) ^a	17 (29.8)
DMEM + 10% FBS	40	24 (60.0)	2 (5.0) ^a	14 (35.0)
NCSU37 + 10% FBS	69	32 (46.4)	5 (7.2) ^a	30 (43.4)
m-NCSU37 + 10% FBS	34	16 (47.1)	2 (5.9) ^a	16 (47.1)

^aValues with same superscripts were not significantly different ($P < 0.05$).

*All of the experiments were replicated at least 3 times.

2) 첨가 단백질이 개 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

Mouse 난관액의 조성을 참조하여 Na, K 등의 이온농도를 조절하여 m-NCSU37 배양액을 조정한 성숙배양액에 첨가 단백질이 개 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 확인한 결과는 Table 8과 같으며, 핵의 상태는 Fig. 13과 같다. 72시간 성숙배양 후 배양액에 따라 GV, MI-MII로 핵 성숙율은 10% FBS (26.7, 13.3%), 10% EDS (50.0, 25.0%), 0.3% BSA (58.3, 25.0%) 및 0.1% PVA (61.5, 15.4%)로 발정기의 개 혈청

(EDS)을 첨가한 배양액과, 0.3%의 BSA가 첨가된 배양액에서 다소 높은 핵 성숙율을 보였다. 그리고 타 첨가 단백질보다 10% FCS가 첨가된 배양액에서 핵발달 상태를 확인하기 어려운 난포란이 많았다.

Table 8. Nuclear progression rates of canine oocytes according to different culture media

Kind of protein source	No. of cultured oocyte	No. (%) of oocytes developed to		
		GV	MI-MII	Unclear
m-NCSU37 + 10% FBS	30	8 (26.7)	4 (13.3) ^a	18 (60.0)
m-NCSU37 + 10% EDS	16	8 (50.0)	4 (25.0) ^a	4 (25.0)
m-NCSU37 + 0.3% BSA	24	14 (58.3)	6 (25.0) ^a	4 (16.7)
m-NCSU37 + 0.1% PVA	26	16 (61.5)	4 (15.4) ^a	6 (23.1)

^aValues with same superscripts mean not significantly different ($P < 0.05$).

*All of the experiments were replicated 3 times.

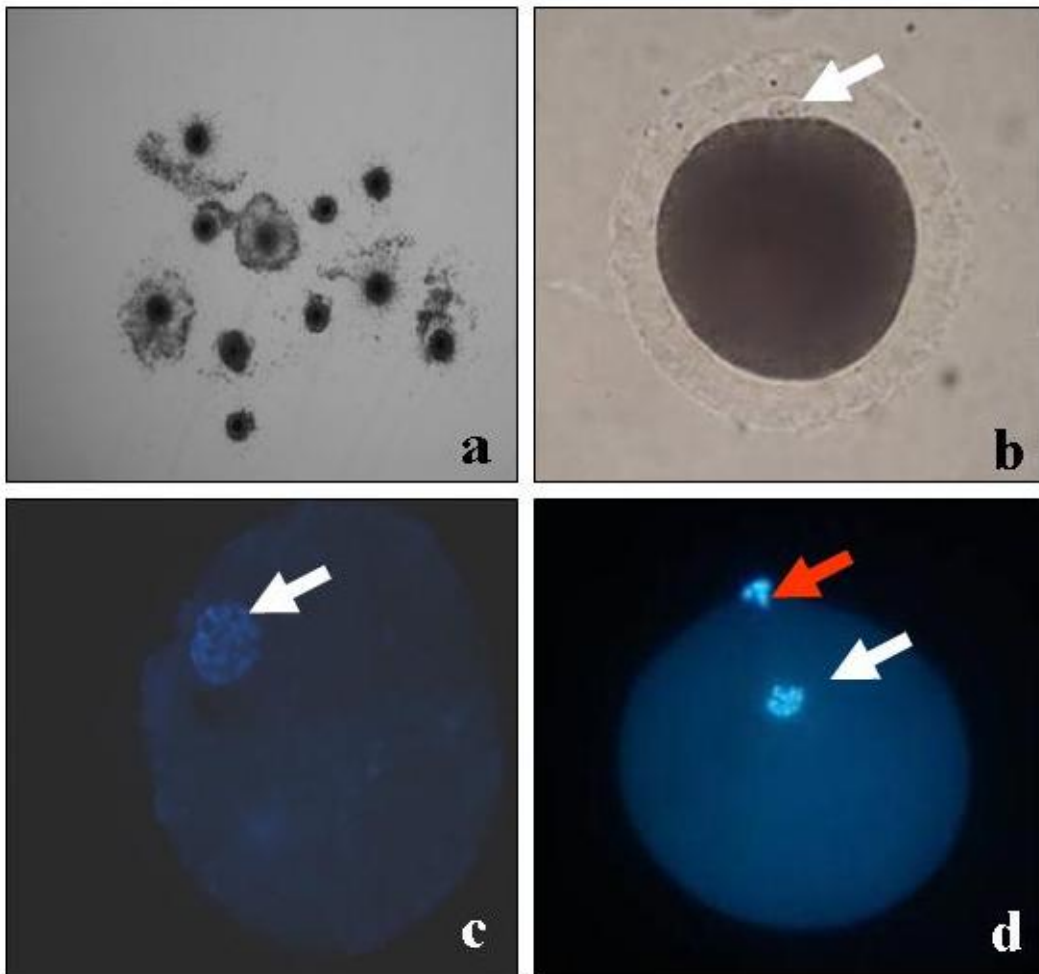


Fig. 13. Morphology of canine oocytes 72 h after IVM and *In vitro* matured canine oocytes stained with Hoechst33342. a) cumulus expansion, and b) 1st polar body(white arrow) (c) GV (white arrow), (d) Metaphase II plate (white arrow: MII plate, and red arrow: 1st polar body).

나. 개 난소의 수송온도가 개의 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향조사

1) 난소 수송온도가 난자의 생존율에 미치는 영향을 규명하기 위하여 체외성숙 24, 48시간 배양 후 미성숙 난자의 생사를 확인한 결과는 Table 9와 같다. 난소를 각각 38℃와 4℃에 수송하여 5시간 이내로 연구실로 운반하는 과정에서 생리식염수의 온도가 떨어지거나 올라가는 현상이 발생하였으며, 38℃의 식염수는 최대 4℃ 정도 떨어지는 현상이 있었고, 4℃ 식염수는 최대 5℃ 정도 상승하는 현상이 있었다. 체외성숙 24, 48시간째 난자의 vital 염색을 실시하여 난자의 생존율을 확인한 결과 38℃와 4℃에서 각각 77.8, 13.2% 와 72.8, 0.0%로 4℃에 수송한 난소에서 채란한 난자는 성숙배양 24시간에 83%, 48시간에는 100%의 난자가 죽는 것을 알 수 있었다. 난자의 생존 확인은 400배 도립 현미경으로 형태상 난자 세포막의 정상과 비정상 상태 (Fig. 14, a)를 구분하였고, PI 염색 (Fig. 14, b)을 통하여 난자 세포질내 PI침투 여부로 난자의 생존을 판단하였다

Table 9. Effect of ovary transport temperature upon the survivability of canine oocytes after 24 and 48 hours culture

Culture time (h)	Ovary transport temperature (°C)	No. of oocytes used	No. (%) of surviving (vital staining)
24	4 ~9	114	15 (13.2) ^a
	34~38	135	105 (77.8) ^b
48	4 ~9	129	0 (0.0) ^a
	34~38	177	129 (72.9) ^b

^{ab}Values with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

*All of the experiments were replicated at least 5 times.

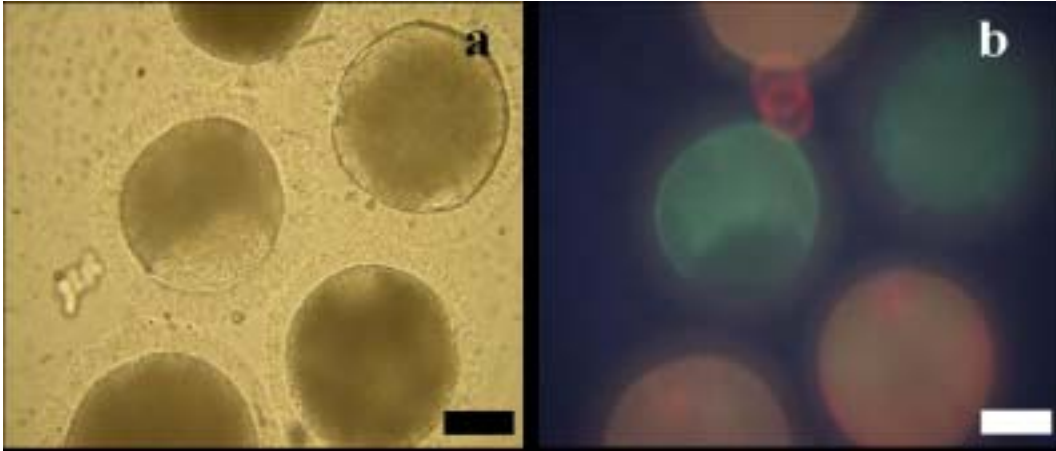


Fig. 14. Photomicrograph of canine oocytes after 24h IVM. (a) Morphological appearance of viable and nonviable canine oocytes. (b) Fluorescein PI staining of canine dead oocytes were shown red color (bar = 50 μ m).

2) 체외성숙 시간에 따른 핵성숙율

38°C에서 수송한 난소에서 난자를 채취하여 체외성숙 24, 48, 96 시간 체외배양 후 난자의 핵 성숙률을 확인한 결과는 Table 10과 같다. 체외성숙배양 24, 48 및 96시간 배양 후 0.2% HY에서 난구세포를 제거한 후 형태상 생존한 난자만을 실험에 공시하여 핵 염색을 검사한 결과 GV, MI-MII로 핵 성숙율은 24시간째 66.7, 8.3%, 48시간째 73.3, 8.9% 그리고 체외배양 96시간째 40.5, 9.5%로 나타내어 체외성숙 시간을 96시간 까지 배양하여도 MI-MII까지의 핵 성숙율이 증가하지 않았으나, GV단계의 감소와 unclear 난자의 증가에서 유의적 차이를 나타내었다.

Table 10. In vitro nuclear maturation of canine oocytes cultured for 24, 48 and 96 hours

Culture time (hr)	No. of oocytes examined	No. (%) of GV	No. (%) of MI-MII	No. (%) of unclear oocytes
24	72	48 (66.7) ^a	6 (8.3) ^a	18 (25.0) ^a
48	101	74 (73.3) ^a	9 (8.9) ^a	18 (17.8) ^a
96	84	34 (40.5) ^b	8 (9.5) ^a	42 (50.0) ^b

^{ab}Values with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

*All of the experiments were replicated at least 5 times.

다. 개의 생식기내에 난자를 이식하여 난자의 성숙을 확인

1). 미성숙난자의 체외 성숙율

개의 미성숙난자를 배양시간에 따라 체외성숙을 확인한 결과는 Table 11과 같다. 미성숙난자를 체외배양 24, 48 및 72시간 동안 체외성숙을 유도하여 각각 83.8, 74.0 및 73.0% 난자가 GV상태에 존재하는 것으로 조사되었다. 또한, 체외성숙시간이 길어 질수록 핵상을 판별하기 어려운 Unclear (11.3, 14.8 및 21.7%) 상태의 난자가 많아졌 으며, 미성숙 난자를 24, 48 및 72시간 동안 체외성숙을 유도 하였을 때 각각 1.3, 3.7 및 4.7%의 MII 난자가 조사되어 성숙시간에 따른 체외 성숙율에는 유의적 차이는 인정되지 않았다.

Table 11. Effect of in vitro culture time on the nuclear maturation in canine oocytes

Culture time	No. of cultured oocyte	No. (%) of oocytes			
		GV	MI	MII	Unclear
24	80	67 (83.8) ^a	2 (2.5)	1 (1.3) ^a	10 (11.3)
48	54	40 (74.0) ^a	4 (7.4)	2 (3.7) ^a	8 (14.8)
72	63	46 (73.0) ^a	5 (7.2)	3 (4.7) ^a	9 (21.7)

^a Value with same superscript was not significantly different ($P < 0.05$).

2) 미성숙난자의 체내이식 후 회수율

미성숙난자를 개의 생식기관에 이식 후 4, 5 및 6일 후 회수한 결과는 Table 12와 같다. 난관 이식 후 4일째 (Bitch NO. 1) 좌우 난관 관류를 통해 회수한 난자의 회수율은 30.8% (48/156)와 42.3% (22/52)로 유의적 차이는 없었다. 회수된 난자의 생존율은 56.3% (27/48)와 68.2% (15/22) 및 사멸난자의 회수율은 43.8 (21/48)와 31.8% (7/22)로 조사되었고, 오른쪽 난관에서 회수한 난자 중 1개 (4.6%) 만이 제1극체가 확인 되었다. 난자를 난소낭에 (Bitch NO. 2) 이식한 후 5일째 오른쪽 난소낭에서 이식한 난자를 회수하였을 때 17.7% (53/300)의 난자가 회수되었으며, 회수된 난자 중 생존해 있는 난자는 30.2% (16/53)로 조사되었으며, 사멸된 난자는 69.9% (37/53)로 조사되었다. 회수된 난자중 제 1극체가 조사된 난자는 없었다. 개의 미성숙난자를 오른쪽 난소낭 및 왼쪽 난관과 자궁에 이식한 후 (Bitch NO. 3) 6일째 회수한 난자의 회수율은 난소낭 5.7% (10/175), 난관 4.6% (8/175) 및 자궁 0% (0/180)로 조사되었고, 회수된 난자의 생존율은 난소낭 40.0% (4/10), 난관 37.5% (3/8) 및 자궁 0.0% (0/0)로 조사되었으며, 사멸된 난자의 회수율은 난소낭 60.0% (6/10), 난관 62.5% (5/8) 및 자궁 0.0% (0/0)로 조사되었다. 또한, 체외채취 난자를 체내배양 하였을 때 배양시간이 길어질수록 난자의 회수율은 유의적으로 떨어졌다 ($P < 0.05$).

Table 12. The recovery rate of transferred canine oocytes

Bitch NO	OT site	OT organs	No. of oocyte transferred	No.(%)of collected oocyte	No. (%) of survival	No. (%) of Deg.	1stpolar body
1	Right	FT	52	22 (42.3) ^a	15 (68.2) ^a	7 (31.8) ^a	1 (4.6)
	Left	FT	156	48 (30.8) ^a	27 (56.3) ^a	21 (43.8) ^a	0 (0.0)
2	Right	OB	300	53 (17.7) ^b	16 (30.2) ^b	37 (69.9) ^b	0 (0.0)
	Right	OB	175	10 (5.7) ^c	4 (40.0) ^{ab}	6 (60.0) ^a	0 (0.0)
3		FT	175	8 (4.6) ^c	3 (37.5) ^{ab}	5 (62.5) ^a	0 (0.0)
	Left	Utrus	180	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

*OT: oocyte transfer; FT: Fallopian tube; OB: Ovarian bursa.

^{abc}Values with different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$).

3) 체내이식 후 회수된 난자의 핵성숙율

체내 배양기간별로 회수된 난자의 핵성숙율을 조사한 결과는 Table 13과 같다. 배양기간별로 회수된 난자는 4 일째 58.8% (20/34), 5 일째 40.0% (6/15), 6 일째 57.1% (4/7)가 GV 상태로 존재하며, 성숙된 난자는 체내배양 4 일째 5.9% (2/34)가 조사되었다. 염색 후 핵상을 정확히 구별하기 어려운 난자가 체내 배양기간이 길어질수록 증가하였다 (35.3, 60.0 및 42.9%).

Table 13. Meiotic maturation of canine oocytes cultured for 4,5,and 6days in reproductive tract

Culture period (days)	No. of oocytes	No. (%) of oocytes			
		GV	MI	MII	Unclear
4	34	20 (58.8)	0 (0.0)	2 (5.9)	12 (35.3)
5	15	6 (40.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (60.0)
6	7	4 (57.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (42.9)

라)FSH및LH를 첨가가개 난자의 체외성숙에 미치는 영향

FSH 및 LH를 첨가하여 개 난자의 난구세포의 확장을 조사한 결과 Table 14와 같다. FSH를 첨가 하였을 때에는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 처리구는 $286 \pm 69.7 \mu\text{m}$ 로 조사되었고, 5 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 처리구는 $397.2 \pm 64.3\mu\text{m}$ 그리고 50 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 처리구는 $300 \pm 84.3 \mu\text{m}$ 로 조사되어 FSH는 개 난자의 난구세포를 대조구 ($168.3 \pm 19.1 \mu\text{m}$)에 비해 유의적으로 확장시켰다 (Fig 15). 그러나 Table 15에서와 같이 LH를 control, 0.5, 5 그리고 50 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가 하였을 때는 대조구에 비해 개 난자의 난구세포를 확장시키지 못했다 (control, 165.6 ± 20.2 ; 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 160 ± 26.5 ; 5 $\mu\text{g/ml}$, 172.4 ± 20.5 ; 50 $\mu\text{g/ml}$, $168.3 \pm 23.1 \mu\text{m}$; Fig. 16). 난구세포의 확장과 난자의 체외성숙의 관계를 확인하기 위하여 난자의 핵성숙을 조사한 결과 Table 16에서와 같이 0.5 $\mu\text{g/ml}$ FSH 처리한 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로 높은 핵성숙을 보인 반면, Table 17에서와 같이 LH는 대조구에 비해 난자의 핵성숙을 증가시키지 못했다. 또한, FSH와 LH를 병용 처리하여 난자의 핵성숙을 조사한 결과 (Table 18), 마찬가지로 난자의 핵성숙을 증가시키지 못하는 것으로 조사되었다. 이상의 결과로 볼 때 FSH는 개 난자의 난구세포 확장 및 핵성숙에 영향을 미치지만, LH는 난구세포 확장 및 핵성숙에 영향을 미치지 못하는 것으로 판단된다.

Table 14. Cumulus cell expansion of canine oocytes in different FSH concentrations before and after 72 h IVM

Conc. of FSH ($\mu\text{g/ml}$)	IVM	No. of oocytes examined	Diameter of cumulus cell expansion (Mean \pm SE, μm)
	Before	43	160.2 \pm 17.0 ^a
Control		135	168.3 \pm 19.1 ^a
0.5	After	125	286.0 \pm 69.7 ^b
5		145	397.2 \pm 64.3 ^c
50		127	300.0 \pm 84.3 ^b

^{abc}Values with different superscripts within column are significantly different ($P < 0.05$).

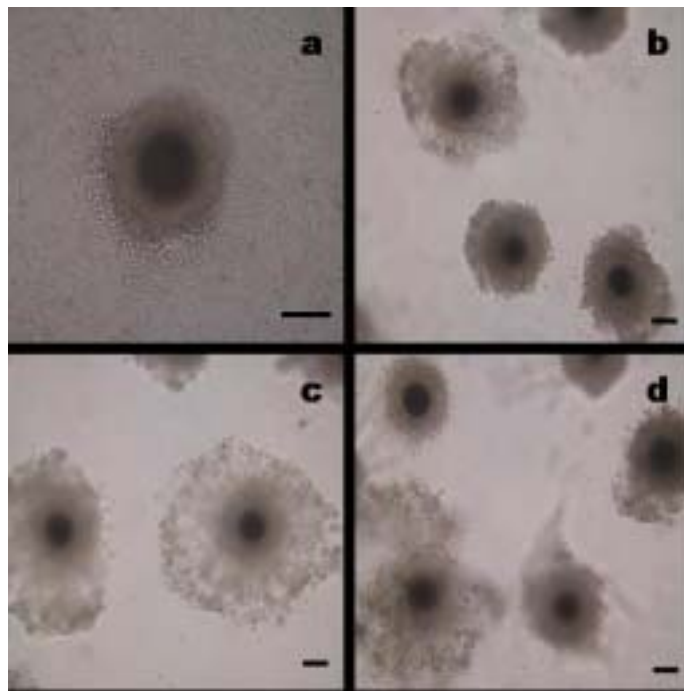


Fig. 15. Effect of addition of FSH in IVM media on cumulus cell expansion in canine oocytes after 72 h IVM. (a) control, (b) 0.5 g/ml FSH, (c) 5 g/ml FSH, and (d) 50 g/ml FSH. Scale bar = 100 μm .

Table 15. Cumulus expansion of canine oocytes in different LH concentrations before and after 72 h IVM

Conc. of FSH ($\mu\text{g/ml}$)	IVM	No. of oocytes examined	Diameter of cumulus cell expansion (Mean \pm SE, μm)
	Before	37	158.0 \pm 25.4
Control	After	127	165.6 \pm 20.2
0.5		143	160.0 \pm 26.5
5		81	172.4 \pm 20.5
50		125	168.3 \pm 23.1

Table 16. Nuclear progression of canine oocytes in different FSH concentrations after 72 h IVM

Conc. of FSH ($\mu\text{g/ml}$)	No. of oocytes examined	No. of oocytes developed to (%)			
		GV	GVBD	MI-MII	DE
Control	116	76 (65.5)	24 (20.7)	1 (0.9) ^a	15 (12.9)
0.5	94	51 (54.2)	18 (19.1)	14 (15.1) ^b	11 (11.7)
5	124	70 (56.5)	28 (22.3)	8 (6.5) ^a	18 (14.5)
50	113	63 (53.8)	27 (23.9)	9 (8.0) ^{ab}	14 (12.4)

^{ab}Values with different superscripts within column are significantly different ($P < 0.05$).

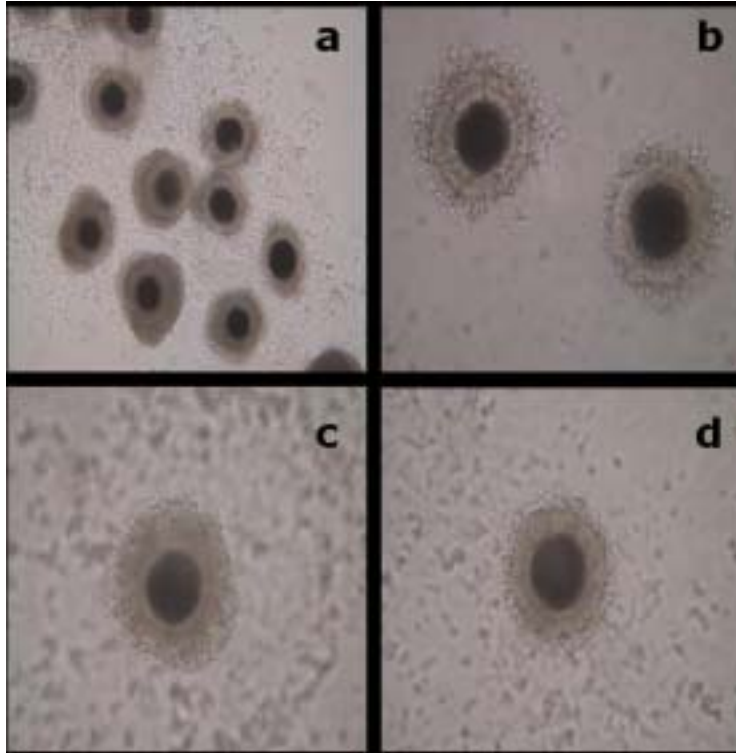


Fig. 16. Effect of addition of LH in IVM media on cumulus cell expansion in canine oocytes after 72 h IVM. (a) control, (b) 0.5 g/ml LH, (c) 5 g/ml LH, and (d) 50 g/ml LH.

Table 17. Nuclear development of canine oocytes in various LH groups after 72 h IVM

Conc. of LH(μ g/ml)	No. of oocytes examined	No. of oocytes develop to (%)			
		GV	GVBD	MI-MII	DE
Control	108	62 (57.4)	26 (24.1)	5 (4.6)	15 (13.9)
0.5	130	76 (58.5)	24 (18.5)	3 (2.3)	27 (20.7)
5	73	37 (50.7)	17 (23.3)	4 (5.4)	15 (20.5)
50	116	64 (55.2)	22 (19.0)	10 (8.6)	20 (17.2)

Table 18. Nuclear development of canine oocytes in gonadotropins after 72 h IVM

Treatments	No. of oocytes examined	No. of oocytes developed to (%)			
		GV	GVBD	MI-MII	DE
Control	105	57 (54.3)	25 (23.8)	9 (8.6)	14 (13.3)
*Gonadotropins	141	76 (53.9)	34 (24.1)	14 (9.9)	17 (12.1)

* Gonadotropins denoted 0.5 g/ml FSH and 50 g/ml LH group.

마) 발정기와GV 모양에 따라 난자의 체외성숙조사

1) 난자의 크기

개 난자의 크기를 Fig. 17과 같이 비발정기, 발정기, 황체기 및 체내배란 난자로 구분하여 측정 하였을 때 체내 배란된 난자가 총 크기 $167.5 \pm 12.7 \mu\text{m}$, 투명대를 제외한 세포질의 크기 $133.9 \pm 5.3 \mu\text{m}$ 및 투명대의 두께 $133.9 \pm 5.3 \mu\text{m}$ 가 비발정기 (총 크기: $151.2 \pm 7.4 \mu\text{m}$, 세포질의 크기: 115.3 ± 7.6 , 투명대의 두께: $15.6 \pm 4.8 \mu\text{m}$), 발정기 (총 크기: $153.1 \pm 8.8 \mu\text{m}$, 세포질의 크기: $122.1 \pm 4.9 \mu\text{m}$, 투명대의 두께: $16.8 \pm 3.3 \mu\text{m}$) 및 황체기 (총 크기: $152.8 \pm 5.4 \mu\text{m}$, 세포질의 크기: $114.3 \pm 6.6 \mu\text{m}$, 투명대의 두께: $17.9 \pm 2.0 \mu\text{m}$) 보다 유의적으로 크게 조사되었다 (Fig. 18).

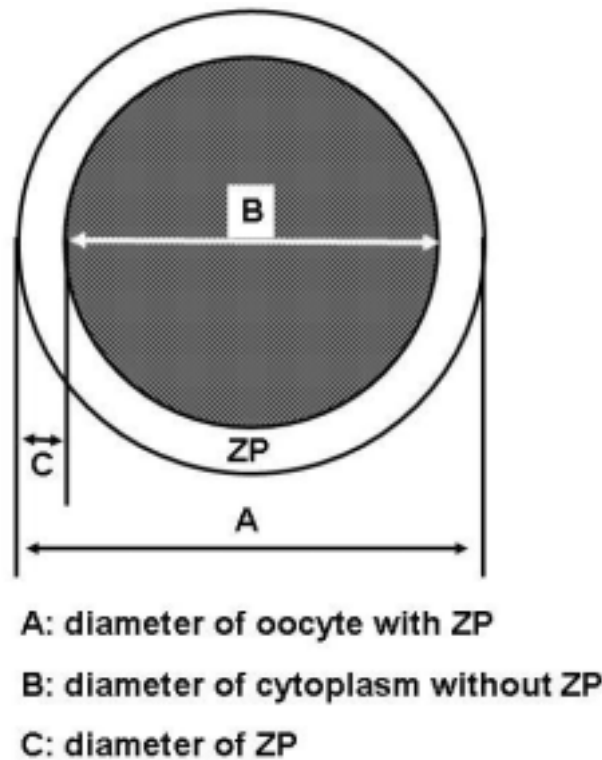


Fig. 17. Diagram for diameter measurement of canine oocyte.

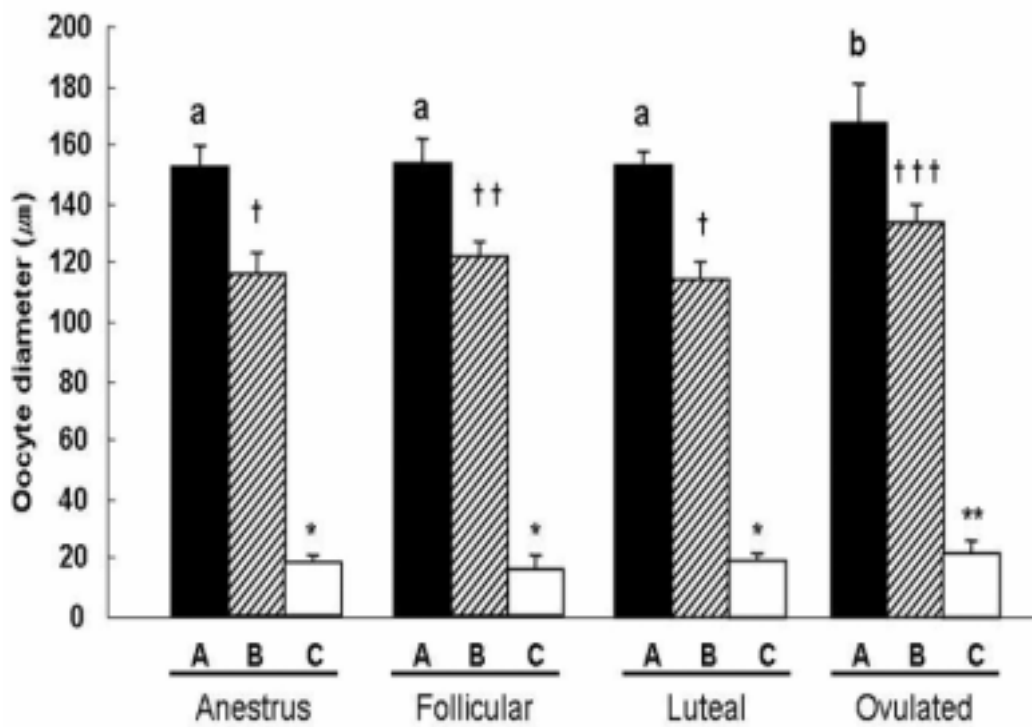


Fig. 18. Diameter of canine oocytes relative to estrus phase phases before IVM. ^{a,b,t,tt,†††,*} Different superscripts denote significant different in the A, B and C, respectively ($P < 0.05$). A) diameter of oocyte with ZP, B) diameter of oocyte without ZP, and C) diameter of ZP.

2) 발정주기에 따른 GV 단계의 구분

GV 난자의 단계를 체외성숙 0시간째 조사한 결과 Table 19와 같다. 총 322개의 난자를 조사하였는데 (비발정기: 151, 발정기: 61, 황체기: 97 및 체내 배란난자: 13) 체외성숙 0시간째 95%의 난자가 GV 단계로 조사되었고, 5%의 죽은 난자로 조사되었다. 또한 Fig. 19와 같은 기준으로 GV 단계를 구분 하였을 시 비발정기의 난자는 GV-II 단계가 다른 발정단계의 난자보다 유의적으로 높게 조사 되었고, GV-V 단계는 발정기와 배란난자가 유의적으로 높게 조사되었다. 또한 Table 2에서 보듯이 IVM 72시간째 난자의 핵성숙율을 조사한 결과 체내 배란된 난자의 경우 50%가 핵성숙을 보여 체외체란 난자 보다 유의적으로 높은 핵 성숙율을 보였다. 이것은 난자의 source가 중요하다고 판단된다.

Table 19. Germinal Vesicle Configuration of Canine Oocytes before In Vitro Maturation (0 hr)

Phase of reproductive phase	No. of oocytes examined	No. (%) of GV phase	No. and (%) of GV phase oocytes					DE
			I	II	III	IV	V	
Anestrus	151	141 (93.4)	15 (9.9) ^a	96 (63.6) ^a	18 (11.9) ^a	9 (6.0) ^a	3 (2.0) ^a	10 (6.6) ^a
Follicular	61	59 (96.7)	0 (0.0) ^a	9 (14.8) ^b	8 (13.1) ^a	7 (11.5) ^a	35 (57.4) ^b	2 (3.3) ^a
Luteal	97	93 (95.9)	10 (10.3) ^a	32 (33.0) ^b	16 (16.5) ^a	13 (13.4) ^a	22 (22.7) ^{ab}	4 (4.1) ^a
In vivo ovulated	13	13 (100.0)	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^b	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	13 (100.0) ^b	0 (0.0) ^a
Overall	322	306 (95.0)	25 (7.8)	137 (42.5)	42 (13.0)	29 (9.0)	73 (22.7)	16 (5.0)

^{a,b} Values with different superscript letters within same columns are significantly different ($P < 0.05$).

Table 20. Meiotic Development of Canine Oocytes after In Vitro Maturation (for 72 hr)

Phase of reproductive phase	No. of oocytes examined	No. and (%) of oocytes developed to							
		GV					MI	MII	DE
		I	II	III	IV	V			
Anestrous	110	6 (5.5) ^a	69 (62.7) ^a	2 (1.8) ^a	3 (2.7) ^a	6 (5.5) ^a	1 (0.9) ^a	6 (5.5) ^a	7 (6.4) ^a
Follicular	104	0 (0.0) ^a	11 (10.6) ^b	9 (8.7) ^a	8 (7.7) ^a	40 (38.5) ^b	2 (1.9) ^a	12 (11.5) ^a	22 (21.2) ^a
Luteal	66	1 (1.5) ^a	13 (19.7) ^b	3 (4.6) ^a	4 (6.1) ^a	19 (28.8) ^{ab}	0 (0.0) ^a	6 (9.1) ^a	20 (30.3) ^a
In vivo ovulated	18	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^b	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	3 (16.7) ^a	4 (22.2) ^b	9 (50.0) ^b	2 (11.1) ^a

^{a,b} Values with different superscript letters within columns are significantly different ($P < 0.05$).

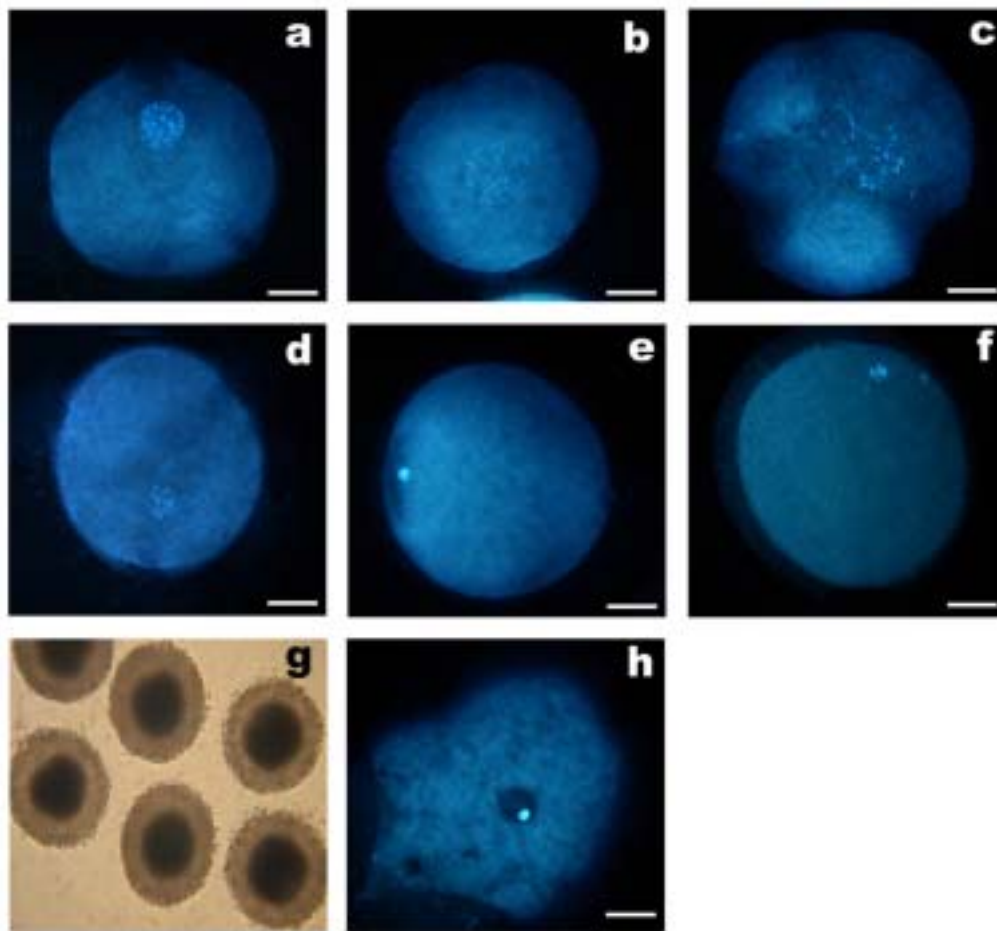


Fig. 19. Typical configuration of GV in the canine oocyte: a) GV-I, condensed filamentous chromatin clumps around the nuclear membrane; (b) GV-II, localized filamentous chromatin clumps around the nucleolus; (c) GV-III, distributed filamentous chromatin clumps in the nucleus and disappeared nucleolus; (d) GV-IV, condensed into thick clumps of chromatin; (e) GV-V, condensed into a single clump of chromatin; (f) MII, apparent first polar body; (g) in vivo collected oocytes (h) GV-V configuration of in vivo collected oocyte. Bar = 50 μ m.

바. 개의 뇌하수체 호르몬을 이용하여 난자의 체외성숙조사

개의 뇌하수체에서 뇌하수체 호르몬을 추출하여 뇌하수체 호르몬이 개의 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 21과 같다. 개의 뇌하수체 호르몬을 control, 40, 400, 4000 $\mu\text{g/ml}$ 을 체외성숙배양액에 첨가하여 난자의 난구세포의 확장은 400 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 처리구가 대조구에 비해 확장력이 좋았으며 (Fig. 20), 난자의 체외성숙율을 조사한 결과 40 및 400 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 처리구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 핵성숙율을 보였다. 이것으로 보아, 개의 뇌하수체 호르몬은 난자의 체외성숙에 있어 유용한 기능을 하는 것으로 판단된다.

Table 21. The in vitro nuclear maturation rate of canine oocytes exposed to different heterologous hormone supplementation

Hormone treatment ($\mu\text{g/ml}$)	Cumulus Expansion	No. of cultured oocyte	No. (%) of oocytes		
			GV	MI-MII	Others
0	+1	23	10(43.5) ^a	1(4.3) ^a	12(52.2)
40	+1	23	6(26.1) ^b	4(17.4) ^b	13(56.5)
400	+2	26	6(23.1) ^b	4(15.4) ^b	16(61.5)
4000	+1	26	10(38.5) ^{ab}	1(3.8) ^a	15(57.7)

^{ab}Values with different superscripts within column are significantly different ($P < 0.05$).

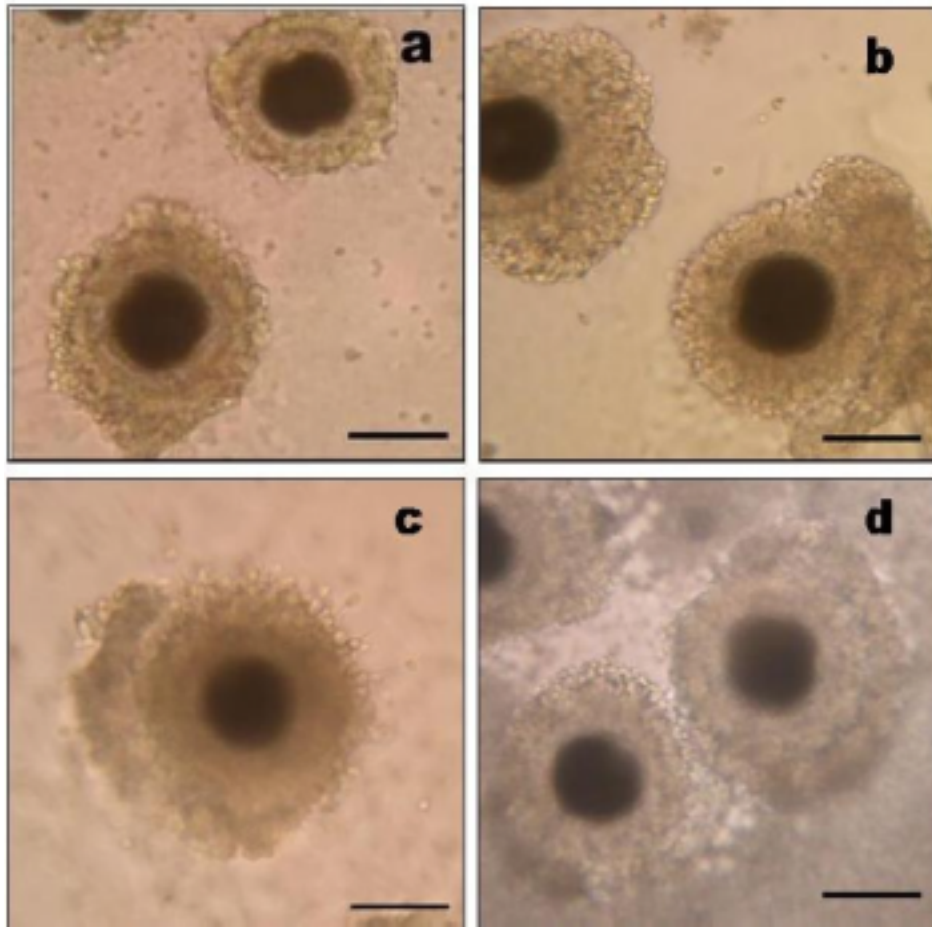


Fig. 20. The effect of adding c CPE protein or hMG on cumulus cell expansion. (a), COCs were cultured in control medium. (b), COCs were cultured with 40 ug/ml cCPE protein for 72 h. (c) COCs were cultured with 400 ug/ml cCPE protein for 72 h. (d), COCs were cultured with 4000 ug/ml cCPE protein for 72 h.

사. Insulin이 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향

인슐린이 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SOF 배양액에 인슐린 농도를 각각 control, 10, 100 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 후 체외성숙 72시간 후에 난자의 체외성숙율을 조사한 결과 Fig 21과 같이 난자의 핵성숙은 크게 차이가 없었으며, 전핵과 같은 핵 또는 2-4 Cell 단계가 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리구와 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리구에서 높게 조사되었다 (Fig. 22).

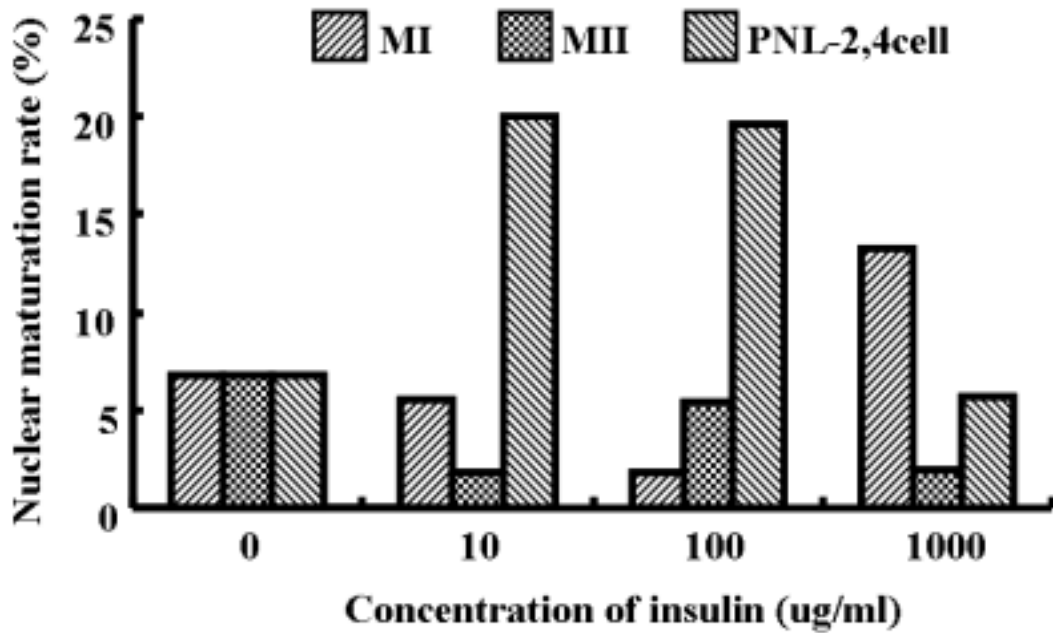


Fig. 21. Effect of insulin on nuclear progression in canine oocytes 72 h after culture.

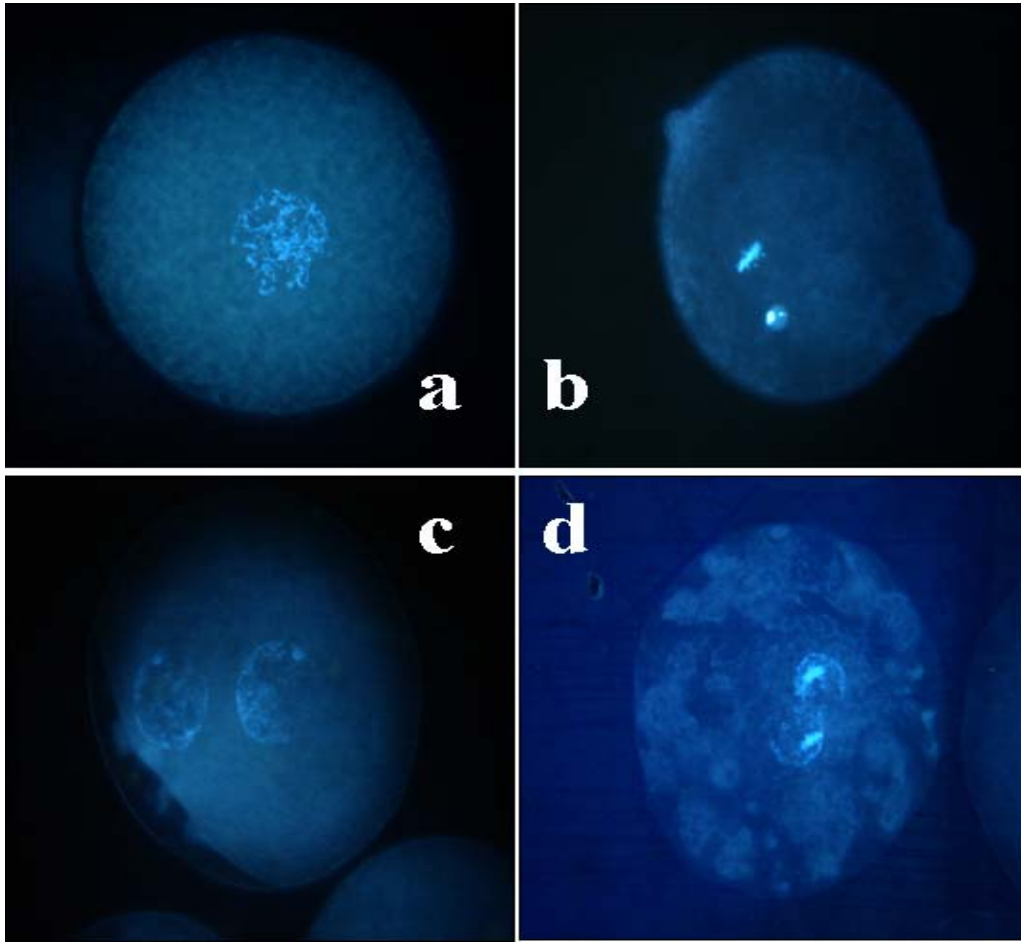


Fig. 22. Canine oocytes showing different meiotic stages, a) GV, b) MII, c, d) pronuclear-like structure (PNL).

아.개 태아혈청 및 각종 단백질원이 개 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

개 태아혈청 및 각종 단백질원이 개 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 알아보기 위해 NCSU-37 배양액에 10%의 dog fetal serum (DFS), 10% FBS, 10% estrus bitch serum (EBS) 및 0.3%의 BSA를 첨가하여 체외성숙 72시간째 체외성숙을 확인한 결과 23과 같다. 10%의 개 태아혈청 및 0.3%의 BSA를 사용하였을 시 대부분의 난자가 GV 단계에 머물러 있었으며, 10%의 FBS 및 10% 발정기 개 혈청을 사용 하였을 때에는 GV 단계는 줄어들었으나, 많은 난자가 죽는 현상을 보였다. 또한, 핵성숙을 조사한 결과 처리구간의 차이는 없었다.

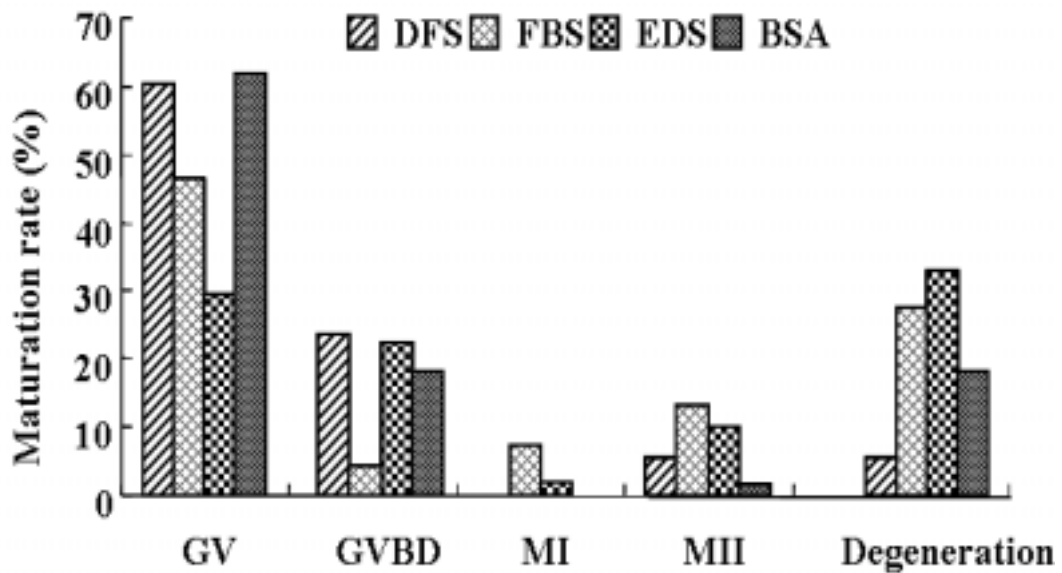


Fig. 23. Effect of various protein source on nuclear progression in canine oocytes 72 h after culture.

자.Ovarianbursafluid(OBF)가개 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

개의 난소는 주머니 모양의 조직에 감싸져 있으며, 개가 발정이 오면 Ovarian bursa에 fluid 가 고이게 되는데 배란 후 최대 5 ml 까지 생성이 된다. 따라서 본 연구에서는 OBF 가 개의 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 대하여 조사 하였다 (Table 22). Table 22를 보면 개의 미성숙 난포란의 체외성숙을 보면 32.8%로 조사되어 선행연구에 비해 상당한 진전된 결과를 보았다. 하지만, 지속적인 반복 실험 시 재현성이 떨어지는 현상도 함께 보여 앞으로 이에 대한 연구가 지속 되어야 할 것으로 판단된다.

Table 22. Effect of ovarina bursa fluid (OBF) on nuclear progression in canine oocytes 72 h after culture.

Replicated	No. of cultured oocyte	No. of oocytes developed to (%)				
		GV	GVBD	MI	MII	DE
1	26	21 (80.8)	2 (7.7)	0 (0.0)	3 (11.5)	0 (0.0)
2	19	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (100.0)	0 (0.0)
3	27	25 (92.6)	1 (3.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
4	26	20 (76.9)	3 (11.5)	0 (0.0)	3 (11.5)	0 (0.0)
5	18	14 (77.8)	1 (5.6)	0 (0.0)	3 (16.7)	0 (0.0)
6	10	0 (0.0)	5 (50.0)	0 (0.0)	5 (50.0)	0 (0.0)
7	93	10 (10.8)	2 (2.2)	25 (26.9)	56 (60.2)	0 (0.0)
8	27	20 (74.1)	3 (11.1)	0 (0.0)	3 (11.1)	1 (3.7)
9	53	25 (47.2)	2 (3.8)	0 (0.0)	6 (11.3)	5 (9.4)
	299	135 (45.2)	19 (6.4)	25 (8.4)	98 (32.8)	6 (2.0)

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구발의 목표

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2003)	발정유기방법의 정립	<ul style="list-style-type: none"> - 발정유기방법의 정립 * 질상피 세포의 변화에 의한 배란적기 진단 * 초음파진단에 배란적기 관찰 * Hormone 투여에 의한 발정유기 * 유기발정견의 난소의 배란점 및 배란을 조사
2차년도 (2004)	과배란치리에 의한 체내난자의 체외성숙 정립	<ul style="list-style-type: none"> - 과배란치리에 의한 체내난자의 체외성숙체계 정립 * 발정유기 또는 자연발정 개의 과배란 유기방법 개발 * 외과적 수술방법에 의한 채란방법의 정립 * 배란된 난자의 회수율 * 체내생산된 난자의 핵발달율
3차년도 (2005)	체외난자의 체외성숙조건 정립	<ul style="list-style-type: none"> - 체외난자의 체외성숙조건 정립 * 개 뇌하수체 추출물을 이용한 체외성숙 조사 * 개 태아혈청의 첨가에 따른 체외성숙 조사 * 체외성숙 시 hormone 및 각종 첨가제의 첨가 농도 및 종류의 결정

제 2 절 연도별 평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척도(점수)	달성도(%)
1차년도(2003)	* 질상피 세포의 변화에 의한 배란적기 진단 * 초음파진단에 배란적기 관찰 * Hormone 투여에 의한 발정유기	30 30 40	100 100 100
2차년도(2004)	* 발정유기 또는 자연발정 개의 과배란 유기방법 개발 * 배란된 난자의 회수율 * 체내 생산된 난자의 핵발달율	30 30 40	90 100 90
3차년도(2005)	* 개 뇌하수체 추출물을 이용한 체외성숙 조사 * 난포낭액 첨가에 의한 체외성숙 조사 * 개 태아혈청의 첨가에 따른 체외성숙 조사	30 30 40	100 90 100
최종평가	○ 발정유기 방법개발 ○ 과배란처리기술 개발 ○ 난자의 체외성숙체계 건립	30 30 40	100 90 80

제 3 절 관련분야에의 기여도

“진돗개와 삼살개 난자의 체외배양체계 개발”을 위한 연구수행 과정에서 얻은 각종 결과들의 활용을 통해 다음과 같은 관련 분야의 기술 발전에 기여를 할 수 있는 학문적 기초를 갖추게 되었다.

- 개 난자의 체외성숙에 관한 기초 연구 자료를 제공하여 앞으로 개과동물의 번식 생리를 이해하는데 기여하였다.
- 개발된 기초기술은 학술지 논문을 통해 관련 연구진과 산업계에 보급함으로써 우수인력 양성을 가능케 하였다.
- 멸종위기 개과동물의 번식생리를 이해하는데 기초 자료를 제공 하였다.

제 4 절 연구실적

이효상, 윤희준, 이영호, 강태영, 공일근. 2003a. 성숙배양액과 첨가 단백질이 개 미성숙난자의 체외성숙에 미치는 영향. Korean J Emb Trans 18 (1):75-80.

이효상, 윤희준, 이영호, 공일근. 2003b. 개 난소 수송온도에 따른 미성숙 난자의 생존율과 핵 성숙율. Korean J Emb Trans 18(2):85-90.

이효상, 윤희준, 이영호, 공일근. 2005. 개 미성숙난자의 체내이식 배양이 핵성숙에 미치는 영향. Korean J Emb Trans 20(1):63-69.

H.S. Lee, X.J. Yin, I.K. Kong. Sensitivity of canine oocytes to low temperature. Theriogenology. *In press*.

Young-Ho Lee, Hyo-Sang Lee, Xi-Jin Yin, Se-Jin Chun, Young-Il Suh, Keum-Ju Park, Jin-Sung Seo, Su-Jin Jo, and Il-Keun Kong. Effect of Ovary Transport Temperature on Survivability and Maturation Rate of Canine Oocytes.

Developmental and Reproduction. 2003; 3 .pp. 122.

Hyo-Sang Lee, Xi-Jin Yin, Young-Ho Lee, Se-Jin Chun, Young-Il Suh, Keum-Ju Park, Jin-Sung Seo, Su-Jin Jo, and Il-Keun Kong. Effect of IVM Medium and Protein Source on In Vitro Maturation of Canine Oocytes. Developmental and Reproduction. 2003; 3 .pp. 123.

Hyosang Lee, Xijun Yin, Youngho Lee, Sejin Jeon, Young Il Suh, Sujin Jo, Eugene Choi, Seongkyun Cho, and Ilkeun Kong. Nuclear development of canine oocytes in various estrus stages. Reprod. Dev. Biol. 2004; 28(2).pp. 241.

Hyosang Lee, Xijun Yin, Youngho Lee, Seongkyun Cho, and Ilkeun Kong. Effect of various estrus cycles on in vitro maturation of canine oocyte. Developmental and Reproduction. 2004; 4 .pp. 100.

Hyosang Lee, Youngho Lee, Xijun Yin, Sejin Jeon, Young Il Suh, Sujin Jo, Eugene Choi, and Ilkeun Kong. Effect of ovarian bursa fluid on in vitro maturation of canine oocytes. Reprod. Dev. Biol. 2005; 29(2).pp. 101.

윤희준, 이효상, 이영호, 조수진, 전세진, 서영일, 최유진, 공일근. 개 뇌하수체 부분정제된 호르몬 추출 및 호르몬 함량 측정. Reprod. Dev. Biol. 2005; 29(2).pp. 148.

Hyo sang Lee, Xijun Yin, Young Il Suh, Su jin Cho, In Hue Bae and Ilkeun Kong. Effect of FSH and LH on cumulus expansion and nuclear maturation of canine oocyte. 제5회 발생공학 국제심포지엄 및 학술대회. P. 105.

H. S. Lee, Y. I. Seo, X. J. Yin, S. G. Cho, I. H. Bae, D. H. Oh and I. K. Kong Effect of Insulin on In Vitro Maturation of Canine Oocytes. Reproduction, Fertility and Development. 2006;18(1,2).pp. 274.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구는 진돗개 및 삼살개 난자를 이용한 체외성숙 배양시스템 개발로써 체외성숙율을 높이고 이를 토대로 한국 고유 유전자원인 진돗개 및 삼살개의 유전자원을 보존하는데 주목적이 있다.

- 체외성숙 난자를 통한 개과 동물의 자성 생식세포의 생리를 이해하는데 활용할수 있다.
- 체외성숙 난자를 이용한 개과의 복제동물 생산에 응용 할 수 있다.
- 멸종 위기 개과동물의 번식생리를 연구하는데 기초 자료로 활용 할 수 있다.
- 개과 동물의 체외수정란 생산에 응용할 수 있다.
- 개과 동물의 발정유기 및 과배란 처리에 응용할 수 있다.
- 개발된 기초기술은 학술지 논문을 통해 관련 연구자나 산업계에서 응용할 수 있다.

제 6 장 참고문헌

- Alvarenga MA, McCue PM, Bruemmer J, Neves Neto JR, Squire EL. 2001. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology* 56(5):879-887.
- Archbald LF, Baker BA, Clooney LL, Godke RA. 1980. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim Clin* 75(2):228-238.
- Arnold S, Arnold P, Concannon PW, Weilenmann R, Hubler M, Casal M, Dobeli, Fairburn A, Eggenberger E, Rusch P. 1989. Effect of duration of PMSG treatment on induction of oestrus, pregnancy rates and the complications of hyper-oestrogenism in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 39:115-122.
- Bolamba D, Russ KD, Harper SA, Sandler JL, Durrant BS. 2006. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. *Theriogenology* 65(6):1037-1047.
- Bouchard GF, Gross S, Ganjam VK, Youngquist RS, Concannon PW, Krause GF, Reddy CS. 1993. Oestrus induction in the bitch with the synthetic oestrogen diethylstilboestrol. *J Reprod Fertil Suppl* 47:515-516.
- Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD, Youngquist RS. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 34(1):147-157.
- Cain JL, Cain GR, Feldman EC, Lasley BL, Stabenfeldt GH. 1988. Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. *Am J Vet Res* 49(11):1993-1996.
- Chaffaux S, Locci D, Pontois M, Deletang F, Thibier M. 1984. Induction of ovarian activity in anoestrous beagle bitches. *Br Vet J* 140(2):191-195.
- Chakraborty PK, Wildt DE, Seager SW. 1982. Induction of estrus and ovulation in the cat and dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 12(1):85-92.
- Chohan KR, Hunter AG. 2003. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following in vitro maturation. *Anim Reprod Sci* 76(1-2):43-51.

- Christie DW, Bailey JB, Bell ET. 1972. Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle. *Br Vet J* 128(6):301-310.
- Concannon P, Lasley B, Vanderlip S. 1997. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 51:41-54.
- Concannon PW. 1989. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. *J Reprod Fertil* 39(Suppl.):149-160.
- Concannon PW. 1993. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 47:3-27.
- Concannon PW, Verstegen J. 1997. Estrus induction in dogs: use of gonadotropins, therapies and dopamine agonists. *Proc Ann Meet Soc Theriogenology Montreal* 245-247.
- De los Reyes M, de Lange J, Miranda P, Palominos J, Barros C. 2005. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 64(1):1-11.
- Hewitt DA, England GC. 1997. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J Reprod Fertil Suppl* 51:83-91.
- Inaba T, Tani H, Gonda M, Nakagawa A, Ohmura M, Mori J, Torii R, Tamada H, Sawada T. 1998. Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology* 49(5):975-982.
- Jeukenne P, Verstegen J. 1997. Termination of dioestrus and induction of oestrus in dioestrous nonpregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline. *J Reprod Fertil Suppl* 51:59-66.
- Jones GE, Boyns AR, Bell ET, Christie DW, Parkes MF. 1973. Immunoreactive luteinizing hormones and progesterone during pregnancy and following gonadotrophin administration in beagle bitches. *Acta Endocrinol (Copenh)* 72(3):573-581.
- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. 2004. Effect of beta-mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *J Vet Sci* 5(3):253-258.

- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. 2005. Effects of estradiol-17beta and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63(5):1342-1353.
- Kutzler MA, Wheeler R, Lamb S, Volkmann DH. 2002a. Deslorelin implant administration beneath the vulvar mucosa for the induction of synchronous estrus in bitches. *Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod Liege* [abstract].
- Kutzler MA, Wheeler R, Lamb S, Volkmann DH. 2002b. Deslorelin implant administration beneath the vulvar mucosa for the induction of synchronous estrus in bitches. *Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod Liege* [abstract].
- Kutzler MA, Wheeler R, Volkmann DH. 2001a. Canine estrus induction using the GnRH agonist, deslorelin. *Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod Milan* 147-148 [abstract].
- Kutzler MA, Wheeler R, Volkmann DH. 2001b. Serum deslorelin concentrations in bitches after Ovuplant1 administration. *Proc Ann Meet Soc Theriogenology Vancouver* 13 [abstract].
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436(7051):641.
- Luvoni GC, Chigioni S. 2006. Culture strategies for maturation of carnivore oocytes. *Theriogenology*.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Domest Anim* 38(5):410-414.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. 2005. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63(1):41-59.
- Nakao T, Aoto Y, Fukushima S, Moriyoshi M, Kawata K. 1985. Induction of estrus in bitches with exogenous gonadotropins, and pregnancy rate and blood progesterone profiles. *Nippon Juigaku Zasshi* 47(1):17-24.
- Oh HJ, Fibrianto YH, Kim MK, Jang G, Hossein MS, Kim HJ, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. 2005. Effects of canine serum collected from dogs at different

- estrous cycle stages on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Zygote* 13(3):227-232.
- Otoi T, Shin T, Kraemer DC, Westhusin ME. 2004. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. *Reprod Nutr Dev* 44(6):631-637.
- Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer DC, Westhusin M. 2002. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 124(6):775-781.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, de Lesegno CV, Chastant-Maillard S. 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130(2):193-201.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL. 2003. Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reprod Domest Anim* 38(1):58-62.
- Rodrigues Bde A, dos Santos LC, Rodrigues JL. 2004. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev* 67(2):215-223.
- Rota A, Cabianca G. 2004. In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reprod Nutr Dev* 44(2):105-109.
- Rota A, Mollo A, Marinelli L, Gabai G, Vincenti L. 2003. Evaluation of cabergoline and busserelin efficacy for oestrous induction in the bitch. *Reprod Domest Anim* 38(6):440-443.
- Shille VM, Thatcher MJ, Lloyd ML, Miller DD, Seyfert DF, Sherrod JD. 1989. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch. *J Reprod Fertil Suppl* 39:103-113.
- Shille VM, Thatcher MJ, Simmons KJ. 1984. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *J Am Vet Med Assoc* 184(12):1469-1473.
- Thun R, Watson P, Jackson GL. 1977. Induction of estrus and ovulation in the bitch, using exogenous gonadotropins. *Am J Vet Med* 38(4):483-486.
- van Haaften B, Dieleman SJ, Okkens AC, Bevers MM, Willemse AH. 1989a.

- Induction of estrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine. *J Reprod Fertil* 39(Suppl.):330-331 [abstract].
- van Haften B, Dieleman SJ, Okkens AC, Willems AH. 1989b. Timing the mating of dogs on the basis of blood progesterone concentration. *Vet Rec* 125(21):524-526.
- Vanderlip SL, Wing AE, Felt P, Linkie D, Rivier J, Concannon PW, Lasley BL. 1987. Ovulation induction in anestrous bitches by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. *Lab Anim Sci* 37(4):459-464.
- Verstegen J, Onclin K, Silva L, Concannon P. 1997. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH. *J Reprod Fertil* 111(1):35-40.
- Verstegen JP, Onclin K, Silva LD, Concannon PW. 1999. Effect of stage of anoestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology* 51(3):597-611.
- Wanke MM, Farina J, Loza MH, Rebuelto M, Concannon PW. 1997. Induction of estrus in bitches with normal and persistent anoestrus using human menopausal gonadotropin (hMG). *Theriogenology* 47(4):935-942.
- Wildt DE, Chakraborty PK, Panko WB, Seager SW. 1978. Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol Reprod* 18(4):561-570.
- Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME, Kraemer DC. 2003. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro. *Reproduction* 126(4):501-508.
- Wright PJ. 1980. The induction of oestrus and ovulation in the bitch using pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. *Aust Vet J* 56(3):137-140.
- Wright PJ. 1982. The induction of oestrus in the bitch using daily injections of pregnant mare serum gonadotrophin. *Aust Vet J* 59(4):123-124.
- Zoldag L, Fekete S, Csaky I, Bersenyi A. 2001. Fertile estrus induced in bitches by bromocriptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology*

55(8):1657-1666.

- 김영희, 이만휘, 김상근. 2006. 개 난자의 채취시기, EGF 및 호르몬첨가가 체외성숙율에 미치는 영향에 관한 연구. *Korean J Emb Trans* 21(1):29-34.
- 이영락. 2002. 개의 발정유도후 인공수정에 의한 번식효율 향상에 관한 연구. 경상대학교 대학원 박사학위 논문 수의학과.
- 이효상, 윤희준, 이영호, 강태영, 공일근. 2003a. 성숙배양액과 첨가 단백질이 개 미성숙난자의 체외성숙에 미치는 영향. *Korean J Emb Trans* 18 (1):75-80.
- 이효상, 윤희준, 이영호, 공일근. 2003b. 개 난소 수송온도에 따른 미성숙 난자의 생존율과 핵 성숙율. *Korean J Emb Trans* 18(2):85-90.
- 이효상, 윤희준, 이영호, 공일근. 2005. 개 미성숙난자의 체내이식 배양이 핵성숙에 미치는 영향. *Korean J Emb Trans* 20(1):63-69.