

MONO1201212035

T000035797

발간등록번호

11-1541000-000884-01

소 동결생식세포에 인터페론을 활용한 혁신적인 임신증진 전략

Strategies for innovational increment of pregnancy rate by applied interferons to frozen reproductive cells(sperm & embryo) of bovine.

광개토탄우농업법인(주)

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “소 동결생식세포에 인터페론을 활용한 혁신적인 임신증진 전략”에 관한 보고서로 제출합니다.

2011년 4월 9일

주관연구기관명 : 광개토태농업법인(주)

주관연구책임자 : 김 소 섭

세부연구책임자 : 김 소 섭

연 구 원 : 이 구 혁

연 구 원 : 사 공 석

연 구 원 : 김 인 강

연 구 원 : 이 진 태

연 구 원 : 김 지 연

연 구 원 : 김 강 식

연 구 원 : 권 석 원

연 구 원 : 강 상 순

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 김 수 현

요 약 문

소 Interferon-gamma 및 tau를 유전자 재조합법에 의하여 생산, 정제하여 보존법을 개발하고, 소 정액 또는 수정란과 공동으로 활용할 수 있는 정액 희석액내 첨가법, 수정란의 체외배양체내에 첨가법, 스트로우내에 생식세포와 IFN의 공동봉입법 및 공동동결법, 스트로우내에 IFN의 단용봉입법, 스트로우 연결관과 연결방법을 개발하였고, IFN과 정액을 자궁내로 편리하게 동시에 주입할 수 있는 2단형 인공수정기를 발명하였다.

농가 및 임상 현장에서 이들 개발된 기술과 기구를 적합한 번식기술과 사양관리기술에 활용하여 암소의 자궁내에 IFN과 소의 생식세포를 공동으로 주입(이식)할 수 있는 기술을 확립함으로써 시술의 편리성과 임신율을 혁신적으로 개선할 수 있었고, 태어난 신생축의 안정성이 확립되었다. 세부 과제의 연구 결과는 다음과 같다.

1. 유전자 재조합기술을 활용하여 한우 및 젃소의 IFN-타우를 생산, 정제하여 활용 농도, 부형제의 도출 및 IFN의 보존법을 개발하였다.
2. 동일 스트로우 내에 IFN과 생식세포의 공동봉입기술 및 동결기술과 실용화 제품을 개발하였다.
3. 독립 스트로우 내에 IFN의 독립(단용)봉입기술, 보존 기술 개발 및 실용화 제품을 개발하였다.
4. 기성 정액(수정란)과 IFN을 동시에 주입할 수 있는 기술과 실용적인 스트로우 연결관 및 2단형 인공수정기구를 개발하였다.
5. IFN과 정액의 공동수정 및 IFN과 수정란의 공동이식을 위한 수란우의 최적 관리 기술을 확립함으로써 임신율이 현저히 증가하였다.
6. IFN과 정액의 공동수정 및 IFN과 수정란의 공동이식을 위한 생식기내의 최적 주입(이식) 기술을 확립함으로써 임신율이 현저히 증가하였다.
7. 야외 임상에서 자축의 건강성 평가를 통하여 IFN과 생식세포를 공동이식한 후 태어난 자축의 안전성을 확립하였다.

SUMMARY

We had developed the technology for storage and purification of recombinant bovine interferon-gamma or -tau by DNA cloning. The rIFNs were able to add to semen extender or in vitro fertilization system, and also to load and freeze semen or embryo combined with IFNs in the same straw, to connect easily the straws loaded semen(embryos) or IFNs. We had invented '2 step-artificial inseminator' conveniently injectable semen combined with IFNs to intra-uterus in the same time.

We had established the safety of newborn calves as well as innovationally increased pregnancy rates and improved practical conveniences by the installment of developed techniques and devices of co-insemination of semen or co-transfer of embryos with r-IFN into the uterus, in the field of advanced reproductive techniques with proper care & management for recipients. The detail results were as follow:

1. We had produced and purified the recombinant Hanwoo and Holstein interferon-gamma or -tau by DNA cloning, and investigated the applicable concentrations, appropriate adjuvant and storage method of IFNs.
2. We had developed techniques and practical goods for co-loading and freezing semen(embryos) with IFNs.
3. We had developed techniques and practical goods to load and preserve IFNs in the separated straw.
4. We had developed techniques and practical goods to co-inseminate ready-made semen or co-transfer embryos with IFNs simultaneously by 'AI-connector' and '2-step artificial inseminator'.
5. We had found the significant increase of pregnancy rates by the establishment of techniques of an optimizing care & management of recipient to co-load semen or co-transfer embryos with IFNs.
6. We had found the significant increase of pregnancy rates by the establishment of techniques of an optimizing technique to co-transfer embryo or co-inseminate semen with IFNs into uterus.
7. We had established the safety of newborn calves derived from co-transfer embryo or co-inseminate semen with IFNs by assessment of their health in the field practice.

CONTENTS

Chapter 1	Introduction ·····	12
	Section 1 Objects ·····	12
	Section 2 Necessity ·····	12
	Section 3 Range ·····	13
Chapter 2	Background ·····	15
Chapter 3	Substances and results ·····	16
	Section 1 Production of bovine interferon tau and its application ·····	16
	1. Cloning of bovine interferon cDNA and production of protein expression vector system ·····	16
	2. Expression and purification of IFN proteins ·····	16
	3. Biological activity ·····	20
	4. Assay of half-time to preserved temperature of IFNs ·····	23
	5. Development of adjuvant ·····	25
	A. Object ·····	25
	B. Methods ·····	25
	C. Results ·····	26
	(1)Phase separation after mechanical emulsification of adjuvant ·····	26
	(2)Assessment of physical and sensual character loaded in straw of adjuvant ·····	27
	(3)Assessment of application to reproduction after IFN addition to adjuvant ·····	27
	Section 2 Development of goods and freezing technique for reproductive cells co-loaded in the same straw ·····	28
	1. Assessment of semen movement mixed with IFNs ·····	28
	A. Object ·····	28
	B. Methods ·····	28
	C. Results ·····	30
	(1)Effect of additive dosage of IFN-tau on semen movement ·····	30
	2. Effect of additive dosage of IFN-tau on bovine blastocysts ·····	31
	A. Object ·····	31
	B. Methods ·····	31
	C. Results ·····	32
	(1)Effect of IFNs on development rate of blastocysts in IVF ·····	32
	3. Effect of additive dosage of IFNs on frozen embryo ·····	33
	A. Object ·····	33
	B. Methods ·····	34
	C. Results ·····	35
	(1)Effect of IFNs mixed anticryopectants on bioability and hatched rate of blastocysts ·····	35
	4. Technique for co-loading IFNs and reproductive cells in the same straw ·····	37
	A. Object ·····	37

	B. Methods	38
	C. Results	39
	(1)Technique for co-loading IFNs and sperm in the same straw	39
	(2)Technique for co-loading IFNs and embryos in the same straw	40
	D. Application of results	41
Section 3	Technique for uni-loading IFNs in the same straw and preservation	42
	1. Development of uni-loading technique in the same straw	42
	A. Object	42
	B. Methods	42
	C. Results	43
	(1)Development of uni-loading technique in the same straw	43
	D. Application of results	44
Section 4	Development of co-insemination instrument with IFNs and semen at the same time	45
	1. Development of connector for each other straws	45
	A. Object	45
	B. Methods	45
	C. Results	48
	(1)Effect of straw neck type on leakage and resistance in the combined region	48
	(2)Schematic figure of 2 step-artificial insemination instrument	50
	D. Application of results	50
	2. Development of 2 step-artificial insemination instrument	51
	A. Object	51
	B. Methods	52
	C. Results	53
	(1)Assesment of character and efficiency of 2 step-artificial insemination instrument	53
	(2)Development of 2 step-artificial insemination instrument	54
	D. Application of results	57
Section 5	Development of care and management technique for optimized recipients	57
	1. Recipient factors on pregnancy rate after co-transfer embryo and IFNs	58
	A. Object	58
	B. Methods	58
	C. Results	59
	(1)Effect of recipient factors on pregnancy rate after co-transfer embryo and IFNs	59
	(2)Effect of type of estrus on pregnancy rate	60
	(3)Effect of duration of estrus on pregnancy rate	60
	(4)Effect of grade of corpus luteum on pregnancy rate	61
	(5)Effect of direction of uterus on pregnancy rate	62
	(6)Effect of body condition score on pregnancy rate	63
	(7)Effect of transfer seasons on pregnancy rate	64
	(8)Effect of vaccination on pregnancy rate	64

	(9)Effect of type of ruphaege on pregnancy rate	65
2.	Effect of co-transfer IFN intrauterus on corpus luteum	66
A.	Object	66
B.	Methods	66
C.	Results	68
	(1)Effect of co-transfer IFN in uterus on morphology of corpus luteu m	68
	(2)Effect of co-transfer IFN in uterus on progesteron level	69
3.	Effect of co-transfer IFN on microorganisms in uterus	71
A.	Object	71
B.	Methods	72
C.	Results	72
	(1)Microorganisms flushed media in uterus after co-transfer IFN	72
4.	Effect of co-transfer IFN in uterus on white blood cells	73
A.	Object	73
B.	Methods	73
C.	Results	74
	(1)Differential count of white blood cells after co-transfer IFNs	74
Section 6 Development of optimized technique for practitioner and embryo production		75
1.	Technique for co-insemination with semen and IFNs by co-loading	76
A.	Object	76
B.	Methods	76
C.	Results	78
	(1)Effect of co-insemination with semen and IFNs on pregnancy rat e	78
	(2)Effect of co-insemination method and dosage of IFN on pregnancy rate	79
2.	Development of technique for co-transfer with embryo and IFNs by co-loading	80
A.	Object	80
B.	Methods	80
C.	Results	81
	(1)Technique for co-transfer with IFNs and embryos and dosage of IFNs	81
	(2)Dosage and kind of IFNs for co-loaded fresh embryos	82
	(3)Dosage and kind of IFNs for co-loaded cryo-embryos	84
3.	Practitional & embryonic factors on pregnancy rate of co-transfer embryo & IFN	84
A.	Object	84
B.	Methods	85
C.	Results	85
	(1)Effect of synchrony on pregnancy rate	85
	(2)Effect of direction of uterus on pregnancy rate	86

	(3)Effect of depth of uterus on pregnancy rate · · · · ·	87
	(4)Effect of grade of blastocyst on pregnancy rate · · · · ·	88
	(5)Effect of origin of blastocyst on pregnancy rate · · · · ·	88
	(6)Effect of development day of blastocyst on pregnancy rate · · · · ·	89
	(7)Effect of development stage of blastocyst on pregnancy rate · · · · ·	90
	D. Application of results · · · · ·	90
Section 7	Assesment of practical application on pregnancy and newborns · · · · ·	91
	A. Object · · · · ·	91
	B. Methods · · · · ·	91
	C. Results · · · · ·	92
	(1)Assesment of abortion in recipient and newborn calves · · · · ·	92
	(2)Effect of feeding volume of colostrum on disease & mortality · · · ·	93
	(3)Effect of feeding time of colostrum on disease and mortality · · · ·	94
Section 8	Conclusion · · · · ·	94
Chapter 4	Achievement of research goals and its contribution · · · · ·	97
Chapter 5	Application plan of research results · · · · ·	100
Chapter 6	External technical informations during research · · · · ·	101
Chapter 7	References · · · · ·	104

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	12
제 1 절 연구개발의 목적	12
제 2 절 연구개발의 필요성	12
제 3 절 연구개발의 내용	13
제2장 국내외 기술개발 현황	15
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절 소 IFN-타우의 생산 기술 및 제품, 활용 농도, 기재 개발	16
1. 소 IFN cDNA의 클로닝 및 단백질 발현계 벡터 제작	16
2. IFN 단백질 발현과 정제	16
3. 생물학적 활성 평가	20
4. 보존온도에 따른 IFN의 반감기 평가	23
5. 부형제 개발	25
가. 실험목적	25
나. 실험방법	25
다. 실험결과	26
(1) 부형제의 기계적인 유화후의 상분리 평가	26
(2) 부형제의 straw내 장착 시 물리적, 관능적 특성 평가	27
(3) 부형제 내 IFN 첨가 후 번식 적용성 평가	27
제 2 절 스트로 내 IFN과 생식세포의 공동봉입형 동결기술 및 제품 개발	28
1. IFN의 정자의 운동성에 대한 영향	28
가. 실험목적	28
나. 실험방법	28
다. 실험결과	30
(1) IFN 타우의 첨가량이 정자의 운동성에 미치는 영향	30
2. IFN의 수정란에 대한 영향	31
가. 실험목적	31
나. 실험방법	31
다. 실험결과	32
(1) 체외배양액내에 IFN의 첨가량이 배반포 발생율에 미치는 효과	32
3. IFN의 동결수정란에 대한 영향 평가	33
가. 실험목적	33
나. 실험방법	34
다. 실험결과	35
(1) 항동해제내 IFN 첨가량이 용해 후 수정란의 생존율과 부화율에 미치는 영향	35
4. 동일 스트로우내에 IFN과 정액(수정란)의 공동봉입 기술 개발	37
가. 실험목적	37
나. 실험방법	38

	다. 실험결과	39
	(1) 동일 스트로우내 IFN과 정액의 공동봉입 기술	39
	(2) 동일 스트로우내 IFN과 수정란의 공동봉입 기술	40
	라. 연구 결과의 활용 방안	41
제 3 절	독립 스트로우내 IFN의 단일봉입 및 보존 기술 개발	42
1.	공동봉입기술 개발	42
가.	실험목적	42
나.	실험방법	42
다.	실험결과	43
(1)	IFN 단용봉입 스트로우 개발	43
라.	연구 결과의 활용	44
제 4 절	정액과 IFN의 동시 주입용 기구 개발	45
1.	스트로우의 연결관 개발	45
가.	실험목적	45
나.	실험방법	45
다.	실험결과	48
(1)	스트로우 연결구의 형태가 누수율과 면실통과저항도에 미치는 영향	48
(2)	2단형 수정기에 결합된 모형	50
라.	연구 결과의 활용	50
2.	2단형 인공 수정기 개발	51
가.	실험목적	51
나.	실험방법	52
다.	실험결과	53
(1)	2단형 정액주입기의 특성 및 성능 평가	53
(2)	2단형 인공수정기의 발명	54
라.	연구 결과의 활용	57
제 5 절	최적의 수란우 관리 기술 개발	57
1.	IFN과 수정란의 공동이식시 수란우 및 사양관리 요인이 임신에 미치는 영향	58
가.	실험목적	58
나.	실험방법	58
다.	실험결과	59
(1)	IFN과 수정란의 공동이식시 수란우 요인이 임신에 미치는 영향	59
(2)	IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 발정형태가 임신에 미치는 영향	60
(3)	IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 발정경과일이 임신에 미치는 영향	60
(4)	IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 황체등급이 임신에 미치는 영향	61
(5)	IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 자궁각방향이 임신에 미치는 영향	62
(6)	IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 신체충실도가 임신에 미치는 영향	63
(7)	IFN과 수정란의 공동이식시 이식계절이 임신에 미치는 영향	64
(8)	IFN과 수정란의 공동이식시 백신접종이 임신에 미치는 영향	64
(9)	IFN과 수정란의 공동이식시 조사료가 임신에 미치는 영향	65

2. 자궁내 IFNs 주입시의 황체에 미치는 영향 평가	66
가. 실험목적	66
나. 실험방법	66
다. 실험결과	68
(1) 자궁내 IFN 주입이 황체 형태에 미치는 영향	68
(2) 자궁내 IFN 주입이 황체 호르몬 수준에 미치는 영향	69
3. 자궁내 IFN 주입이 자궁내 미생물에 미치는 영향	71
가. 실험목적	71
나. 실험방법	72
다. 실험결과	72
(1) IFN의 자궁내 주입시 자궁내 미생물에 미치는 영향	72
4. IFN 주입이 자궁내장 백혈구에 미치는 영향	73
가. 실험목적	73
나. 실험방법	73
다. 실험결과	74
(1) IFN의 자궁내 주입시 자궁내 백혈구에 미치는 영향	74
제 6 절 생식기내 IFN의 최적 이식 기술 개발	75
1. IFN과 정액의 공동봉입 인공 수정 기술 개발	76
가. 실험목적	76
나. 실험방법	76
다. 실험결과	78
(1) IFN과 정액의 공동주입이 임신율에 미치는 영향	78
(2) IFN과 정액의 공동주입 방법 및 용량이 임신율에 미치는 영향	79
2. IFN과 수정란의 공동봉입 수정란 이식 기술 개발	80
가. 실험목적	80
나. 실험방법	80
다. 실험결과	81
(1) 공동이식 방법 및 IFN 용량 평가	81
(2) 공동봉입 신선수정란 이식시 IFN의 종류와 함량이 임신율에 미치는 영향	82
(3) 공동봉입 동결수정란 이식시 IFN의 종류와 함량이 임신율에 미치는 영향	84
3. IFN과 수정란의 공동이식시 기술 및 수정란 요인이 임신에 미치는 영향	84
가. 실험목적	84
나. 실험방법	85
다. 실험결과	85
(1) 이식동기화가 임신에 미치는 영향	85
(2) 이식자궁각이 임신에 미치는 영향	86
(3) 이식깊이가 임신에 미치는 영향	87
(4) 배반포품질이 임신에 미치는 영향	88
(5) 배반포기원이 임신에 미치는 영향	88
(6) 배발생일이 임신에 미치는 영향	89
(7) 배발생단계가 임신에 미치는 영향	90
라. 실험결과와의 활용	90

제 7 절	임상적용시험 평가	91
가.	실험목적	91
나.	실험방법	91
다.	실험결과	92
	(1) 임신우의 유산 및 자축의 평가	92
	(2) 복합 초유 급여량이 자축의 질병율과 폐사율에 미치는 영향	93
	(3) 출생 후 복합 초유 급여시간에 따른 자축의 질병율과 폐사율	94
제 8 절	결론	94
제4장	연구개발 목표의 달성도 및 기술발전 기여도	97
제5장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	100
제6장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	101
제7장	참고문헌	104

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

동일한 스트로 내에 IFNs과 소 정액(수정란)을 동시에 봉입한 상태로 동결을 실시하여 이들을 동시에 용해 후 자궁내로 정액(수정란)을 주입(이식)함으로써 “시술시의 편리성”과 “임신율의 혁신성”을 도모하는 제반 기술과 제품을 개발함

제2절 연구개발의 필요성

◇ 개발대상기술(또는 제품)의 기술, 경제·산업적 중요성

- 생식세포(정액, 수정란)의 동결기술은 가장 활용도가 높은 생명공학 기술
- 소 정액의 동결기술을 활용한 인공수정기술은 가축개량과 번식에 가장 잘 보급된 기술
- 세계의 소 동결정액의 생산 활용은 연간 1억 개 이상, 가격은 개당 10만원~200만원

- 특히, 수정란이식 기술은 생명공학 기술과 번식육종에 관련된 학문이 융합된 꽃과 열매
- 세계의 소 수정란의 생산 활용은 연간 100만개 이상, 가격은 개당 50만원~250만원
- 북미, 유럽은 산업적·기술적 개화지, 최근 한국 및 중국은 수정란 수요 급부상 시장
- 전천후 활용 목적, 역간교역 및 수출을 위한 동결수정란의 수요 증가 및 임신율 보증 전제

- 동결생식세포를 활용한 산업화의 핵심적 관건은 우수한 육종가와 높은 임신율이 좌우
- 유량 및 육질이 우수한 소의 번식성적 저하 및 하절기 불임 문제 등 해결방안 미미
- 소, 돼지의 수정란이식 시 임신율 저하로 형질전환동물(인체유용물질) 개발 생산이 지연
- 동결생식세포의 획기적인 임신율 증대를 위한 기술적 진보가 요구됨

◇ 연구개발의 착안성

- interferons(IFN- α , β , γ , ω , τ)은 항바이러스, 항피부병, 세포활성, 황체퇴행억제 기능
- 생산체계가 이미 확립된 수종의 interferons이 의료 산업분야에서 광범하게 활용 중
- 특히, 소, 양, 돼지의 IFN- γ , τ 는 생식세포활성, 항황체퇴행 기능이 탁월함
- 이들 기성 interferons을 인공수정 및 수정란이식 등 번식기법에 활용한 예가 희소
- interferon- τ 를 분비하는 반추수 영양막세포와 수정란 공동이식 시 임신율 증가 보고

- 동결수정란의 생존율 대비 낮은 임신 원인은 동결손상 외에 착상관련 미지의 기전 관여
- 이에 착안하여 본 연구기관은 '07년, '08년 기성 IFN- γ 와 수정란 공동이식 선행연구 실시
- 연구결과[85.2%(23/27), 08.2), 68.2%(15/22, 08.11)]에 바탕한 관련 특허등록('08.12.12)

◇ 연구개발의 필요성

- 유우 및 한우 인공수정 시 임신율 저조 및 하절기 불임문제 심각(15~30% 임신율)
- 젖소, 한우 동결정액과 IFNs의 공동주입 시 임신율 70%의 획기적 기술개발 필요
- 한우 동결란과 IFNs의 공동이식 시 임신율 60% 수준의 획기적 기술개발 시급
- 위 기술에서 영양막세포의 작성, 보존, 활용기술은 번잡성과 대량생산의 문제점 내포
- 임상적용에 편리하고 혁신적인 임신성적을 달성할 수 있는 제반 기술개발이 시급
- IFNs를 공동장착·이식하는 방법은 “기술의 편리성”과 “임신율의 혁신성” 기술
- IFN- γ , τ 의 심층적 추가 연구를 통한 원천기술 특허 선점 및 사업화 연계추진 예정

◇ 연구개발의 기대효과(활용방안)

- 최적 IFNs 종류, 농도, 기재활용, 동결생식세포 생산판매, 제반 번식기술 개발에 활용
- 번식육종기술 및 시험관아기 기술 관련 원천특허 기술 개발에 활용
- 사람 및 각종 동물의 생식세포의 공동동결기술 및 공동이식기술 개발에 활용

제3절 연구개발의 내용

제1세부과제 : 소 IFN-타우의 생산 기술 및 제품, 활용 농도, 기재 개발

-협동기관 : 1차년도

- ◇ 유전자 재조합기술 활용 한우 IFN-타우의 생산 및 정제
- ◇ 유전자 재조합기술 활용 젖소 IFN-타우의 생산 및 정제
- ◇ IFN-타우, IFN-감마와 생식세포 활용 농도 도출
- ◇ IFN-타우, IFN-감마의 작용시간 및 방출 조절용 부형제(adjuvant) 개발

제2세부과제 : 동일 스트로 내 IFN과 생식세포의 공동봉입, 동결 기술 및 제품 개발

-주관기관 : 1, 2차년도

- ◇ IFN과 정액의 공동봉입 후 동결 기술 개발 : 독립구획, 공동구획
- ◇ IFN과 수정란의 공동봉입 후 동결 기술 개발 : 독립구획, 공동구획

제3세부과제 : 독립 스트로 내 IFN의 봉입, 보존 기술 및 제품 개발

-주관기관 : 1, 2차년도

- ◇ 독립 스트로 내 IFN의 봉입 기술 개발 : 독립구획, 공동구획
- ◇ 보존 기술 개발 : 상온, 냉장, 냉동

제4세부과제 : 기성 정액(수정란)과 IFN 스트로 동시 주입 가능한 기구의 개발

-주관기관 : 1차년도

- ◇ 기성정액·수정란과 독립충진 IFN의 연결용 스트로 개발 : 일체형, 독립형
- ◇ 개조식 주입(이식)기 개발 : AI형, ET형

제5세부과제 : 최적 수란우 관리 기술 개발

-주관기관 : 1, 2차년도

- ◇ 수란우 최적 영양관리 기술 개발 : 산차, BCS, 조농비
- ◇ 수란우 최적 발정관리 기술 개발 : 용모발정, 발정유기
- ◇ 수란우 최적 방역관리 기술 개발 : 백신접종, 전염병(Brucella 등)

제6세부과제 : 생식기내 IFN의 최적 주입(이식) 기술 개발

-주관기관 : 1, 2차년도

- ◇ 최적 주입(이식)시간 개발 : 발정기~8일
- ◇ 최적 주입(이식)순서 개발 : 동시, 독립(전, 후)
- ◇ 최적 수란우 이식 기술 개발 : 이식동기화, 숙련도

제7세부과제 : 임상적용시험 평가

-주관기관 : 1, 2차년도

- ◇ 임신, 유사산, 분만 평가
- ◇ 자축 평가 : 건강성, 산자수, 기형성
- ◇ 초유관리 : 초유량, 포유횟수, 포유방법

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내외 제품생산 및 시장 현황을 보면 아래의 표와 같다.

구 분	품 목	현재의 시장규모 (2006년)	예상 시장규모 (2012년)	단가 (천원)	수량 (천개)
한국 시장규모 (소동결정액)	한우동결수정란	200억원	200억원	10	2,000
	젓소동결수정란	100억원	100억원	10	1,000
	소 계	300억원	300억원		
☞농협중앙회 유우·한우개량부, 2007년 한우, 젓소정액 공급 300만개x1만원=300억원					
한국 시장규모 (수정란)	기존봉입형수정란	8억원	8억원	80	10
	IFNs공동봉입수정란	1억원	32억원	80	40
	IFNs독립봉입스트로	0	2억원	10	20
	IFNs수정란복합주입기	0	3억원	150	2
	IFNs공동봉입기술료	0	1억원	10	10
	소 계	9억원	46억원	-	-
☞축산과학원 추정 집계, 2006년 한우수정란(IVF) 공급량 1만개x8만원=8억원					
세계 시장규모 (소동결정액)	북미(미,캐,맥); 15백만두	3천억원	3천억원	10	30,000
	EU25개국; 19백만두	3천8백억원	3천8백억원	10	38,000
	기타유럽국; 16백만두	3천2백억원	3천2백억원	10	32,000
	중남미; 18백만두	3천6백억원	3천6백억원	10	36,000
	아시아,태평양; 17백만두	3천4백억원	3천4백억원	10	34,000
	소 계(85백만두)	1조7천억원	1조7천억원		170,000
☞Agricultural Statistics Board. NASS, USDA(2007), 젓소사육 추정두수x2회x1만원					
세계 시장규모 (수정란)	기존봉입형수정란	1조5천억원	1조5천억원	500	1,000
	IFNs공동봉입수정란	0	5천억원	500	500
	IFNs독립봉입스트로	0	50억원	10	500
	IFNs수정란복합주입기	0	15억원	150	10
	IFNs공동봉입기술료	0	50억원	10	500
	소 계	1조5천억	1조6천억원	-	-
☞세계수정란이식학회보고서(2006년), 세계수정란생산량 100만개x50만원=1조5천억원					

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 소 IFN-타우의 생산 기술 및 제품, 활용 농도, 기재 개발

1. 소 IFN cDNA의 클로닝 및 단백질 발현계 벡터 제작

소에서의 IFN 유전자 확보를 위하여 dsRNA virus의 analogue인 poly(I:C)를 이용하여 면역 자극을 주었다. 홀스타인 젖소와 한우의 혈액을 RPMI1640 배지와 1:1로 희석하고 poly(I:C)를 10 μ g/ml의 농도로 3, 6, 18시간 동안 자극한 후 QIAamp RNA Blood Mini Kit(QIAGEN)를 이용하여 혈액에서 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 Superscript II 역전사 효소(Invitrogen)를 이용하여 1 μ g의 RNA를 cDNA로 전환 후 IFN γ , IFN τ 의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 실험에 이용된 RNA의 normalization은 GAPDH primer를 이용하였다(그림 1).

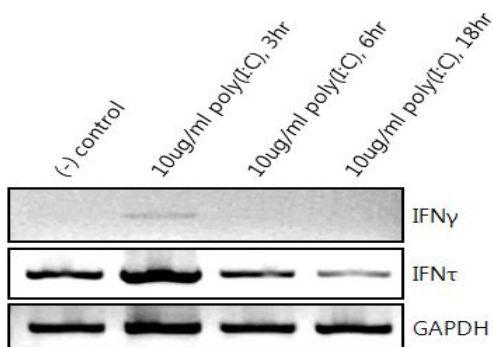


그림 1. 젖소 혈액을 이용한 IFN유전자 발현 확인. 젖소의 혈액에 10 ug/ml의 poly (I:C)를 3, 6, 18 시간동안 처리한 후 전혈로부터 total RNA를 분리하여 IFN γ 및 IFN τ 의 유전자를 RT-PCR 하였음. 이렇게 증폭시킨 cDNA는 TA cloning 작업을 하여 cDNA 유전자 서열을 sequencing analysis를 통하여 검증하였음.

확인된 유전자로 TA 클로닝과 PCR을 수행하여 mature IFN 유전자를 얻은 후 대장균 발현계 벡터인 pProEx/HTa의 EcoRI/XbaI의 제한효소 부위에 삽입하여 클로닝하였다(그림 2). 소의 IFN γ 및 IFN τ 유전자와 pProEX/HTa 벡터는 내부에 *Pst*I 제한효소의 인식서열을 가지고 있기 때문에 제작된 벡터들은 IFN τ 의 경우 500 bp, IFN γ 의 경우 170 bp에 해당하는 DNA 절편으로 잘리게 된다. 이렇게 얻은 벡터로부터 소 IFN의 유전자 서열을 분석하였다(그림 3).

2. IFN단백질 발현과 정제

발현계 벡터를 지닌 대장균을 Luria Bertani(LB) 배지에 넣어 37°C에서 키운 뒤 600nm에서의 OD 값이 0.5-0.6 사이에 도달하였을 때 0.6 mM의 IPTG(Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside)를 넣고 37°C에서 3시간동안 배양시켜 대장균으로부터 대량의 단백질이 발현되도록 유도하였다. 그리고 4°C, 8000rpm에서 15분간 원심분리하여 대장균들을 모으고 정제에 쓰일 기본 용액(8M UREA 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)과 초음파 분해를 이용하여 대장균을 용해시켰다.

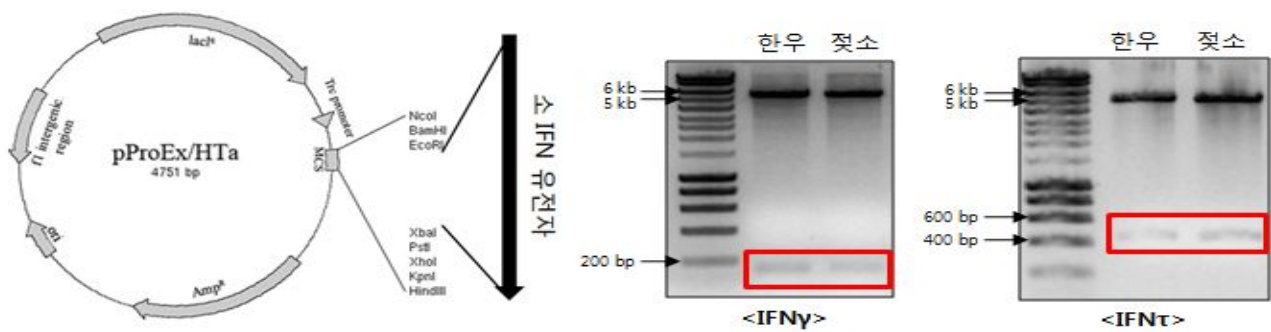


그림 2. 소 IFN의 발현계 벡터 pProEx/HTa로의 클로닝. TA cloning을 통하여 확보한 소 IFN의 cDNA에서 PCR 작업을 통하여 mature protein을 발현하는 부위의 유전자를 증폭시켰음. 이렇게 증폭시킨 DNA를 EcoRI과 XbaI 제한효소를 이용하여 처리한 후 단백질 발현계 벡터인 pProEx/HTa의 MCD 부위에 ligation을 시킨 벡터를 확보 하였음. 이렇게 얻은 벡터는 PCR, PstI 처리를 통한 restriction mapping 및 sequencing analysis를 통해 클로닝 작업을 검증하였음.

A

```

1 ATGGCCGTCA TGCTCTCTCT ACTGATGGCC CTGGTGCTTG TCAGCTACGG CCTGGGAGGA
61 TCCCTGGGCT GTGACCTGTC TCAGAACCAC ATGCTGGTTG GCAGGCAGAA CCTCAGGCTC
121 CTGGGCCAAA TGAGGAGACT CTCCCCTCGC TTCTGTCTAC AGGACAGAAA AGACTTTGCT
181 TCCCCCAGG AGATGGTGGG GGGTAGCCAG CTCCAGGAGG CTCAGGCCTT CTCTGTGCTC
241 CATGAGATGC TCCAGCAGAC CTTCAACCTT TTCAACACAG AGCACTCCTC TGCTGCCTGG
301 GACACCACTC TCCTGGAGCC ACTCCACACT GGACTCCATC AGCAGCTGGA TGACCTGGAT
361 GCCTGCCTGG GGCAGGTGAT GGGAGAGGAA GACTCTGCGC TGGGAAGGAC GGGCCCCACA
421 CTGGCCATGA AGAGGTACTT CCACGGAATC CACGTCTACC TGAGAGAAAA GGAATATAGT
481 GACTGCGCCT GGGAAATCGT CAGACTGGAA ATCATGAGAT CTTTGTCTTC ATCAACCAAC
541 TTGCAAGAAA GGTAAAGGAT GATGGATGGA GACCAGAATT AA

```

B

90.3% identity in 195 aa overlap

	10	20	30	40	50	60
Coreanae	MAVMLSLLMALV	LVSYGLGGS	LGCDLSQNHMLV	GRQNLRL	LLGQMRRLS	PRFCLQDRK
	::
Holstein	MAFLLSLLMALV	LVSYGPGGS	LGCDLSQNHVLV	GRQNLRL	LLGQMRRLS	PRFCLQDRK
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
Coreanae	FPQEMVEGSQ	LQEAQAFSVL	HEMLQQTFN	LFNTEHSSA	AWDTTLL	EPLHTGLHQ

Holstein	FPQEMVEGGQ	LQEPQAISV	LHEMLQQTF	NLFHTERS	SSAAWDT	TLLQLRTGL
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
Coreanae	ACLGQVMGEED	SALGRTGPT	LAMKRYFH	GIHVYLRE	KEYSDCA	WEIVRLEI

Holstein	ACLGQVMGEED	SALGRMGPT	LAVKRYFH	GIHVYLK	KEYSDCA	WEIVRLEI
	130	140	150	160	170	180
	190					
Coreanae	LQERLRMM	DGDQN--				
				
Holstein	LQERLRMM	DGDLNSP				
	190					

그림 3. The amino acid sequence of *B.T. coreanae* IFN- τ shows 90.3% identity to that of *Holstein* dairy cow. (A) The ORF of IFN- τ mRNA from *B.T. coreanae* was analyzed by DNA sequencing, the product of RT-PCR from the whole blood of *B.T. coreanae*. (B) The amino acids were predicted based on DNA sequence. Different amino acids of *B.T. coreanae* compared to *Holstein* are marked as bold cases.

그 후 37°C에서 15시간정도 배양하여 단백질을 용액에 충분히 녹여준 후 4°C, 1000rpm에서 20분동안 원심분리하여 상층액만 분리하였다. 상층액에 녹아있는 단백질을 분리하기 위하여 TALON affinity column(Invitrogen)에 his⁶-tag이 붙는 원리를 이용하였다. column에 상층액을 통과시키기 전에 기본 용액으로 column을 세척하였다. 그리고 상층액을 column에 두 번 통과시켜 단백질이 충분히 붙게 하였고, LPS를 제거하기 위해 0.1% Triton X-114를 기본용액에 섞어 중간 세척을 해주었다. 그리고 150mM imidazole을 기본 용액에 섞은 후 단백질을 column으로부터 분리시켰다. 이렇게 1차 정제된 단백질은 Coomassie Brilliant Blue 염색과 Western blot으로 확인되었다. Western blot에서 1차는 mouse anti-his⁶-tag 항체를, 2차는 goat anti-mouse IgG를 이용하였다. IFN γ 는 약 20kDa, IFN τ 는 약 26kDa의 위치에서 단백질이 확인되었다(그림 4).

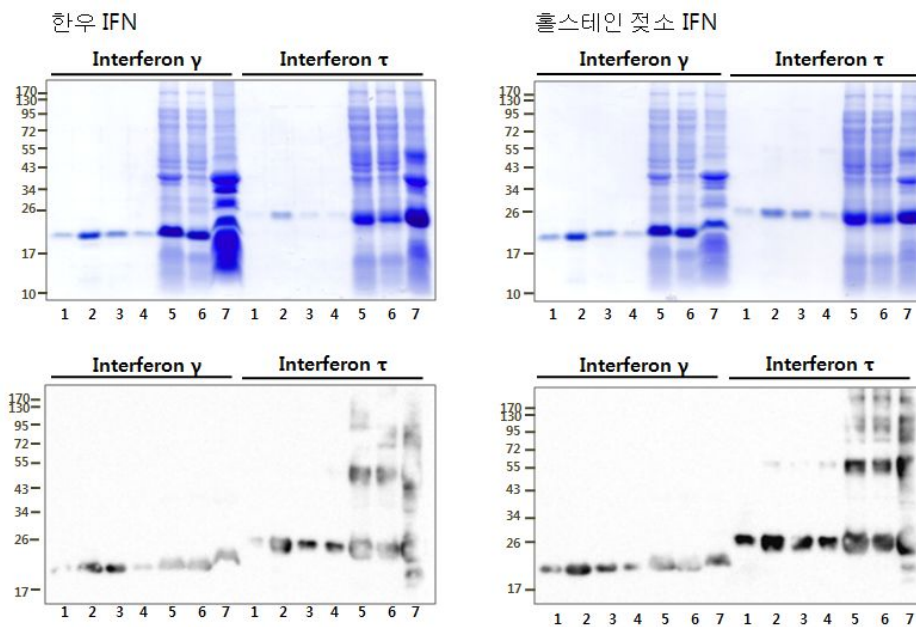


그림 4. Talon metal affinity chromatography를 이용한 6X His-tagged bovine IFN의 1차 정제. Talon column을 이용하여 발현이 된 소 IFN 제조합 단백질을 정제하였음. 정제 산물은 단백질의 순도 확인을 위한 Coomassie Brilliant Blue 염색(위)과 정확한 단백질의 identification을 위한 6X His-tag에 대한 Western blot(아래)을 통한 확인작업을 하였다(lane 1-4. 1차 정제한 IFN fraction 1-4; 5. 정제 전의 crude protein source; 6. 정제후의 crude protein source; 7. 단백질을 발현 시킨 대장균의 펠렛).

확인된 단백질 중 일부는 his⁶-tag 유무에 따른 활성차이를 비교하기 위해 20mM Tris-HCl(pH 8.0) 용액에 투석 후 TEV 단백질분해효소를 이용하여 tag를 제거하였다. 그리고 Coomassie Brilliant Blue 염색을 통해 tag가 제거되었는지 확인하였다(그림 5). his⁶-tag이 있는 단백질과 제거된 단백질을 각각 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 2차 정제하였다. HPLC를 이용하여 정제한 단백질은 동결 건조하여 유기용매를 제거하고 20mM Tris-HCl(pH 8.0)에 다시 녹여서 질산은 염색으로 단백

질의 순도를 확인하였다(그림 6, 7). 2차 정제된 단백질은 95%이상의 순도를 보였고 IFN γ 보다 IFN τ 가 더 높은 순도를 보였다.

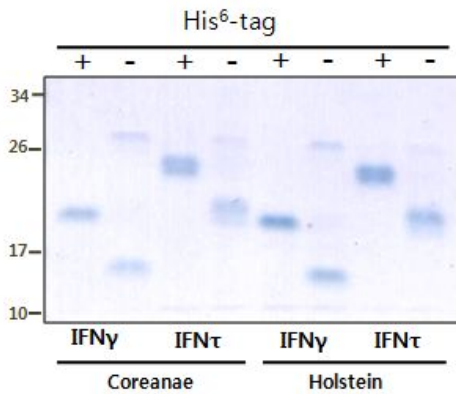


그림 5. His⁶-tag제거 전후의 소 IFN. TEV protease를 이용하여 단백질의 N-terminal에 존재하는 His⁶-tag 부위를 절단한 단백질을 확인하였다. TEV 처리 전후의 단백질을 한우 및 젓소로 구분하고 His⁶-tag의 유무에 따라 SDS-PAGE 작업을 수행하였다.

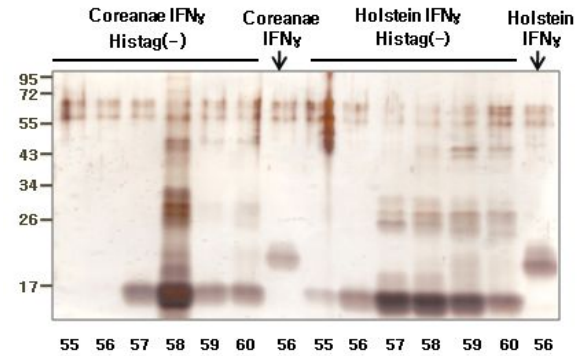


그림 6. HPLC를 통하여 2차 정제한 소 IFN γ . His⁶-tag을 제거한 소 IFN γ 단백질을 HPLC법을 이용하여 2차 정제 과정을 거친 후에 단백질의 순도 확인을 위하여 정제된 55-60번 fraction들을 SDS-PAGE작업 후 silver staining을 통하여 확인하였다.

3. 생물학적 활성 평가

2차 정제된 IFN의 생물학적 활성을 보기 위하여 WISH세포에 수포성 구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus, VSV)를 이용한 항바이러스능 실험을 하였다. 세포는 10% FBS(fetal bovine serum)가 든 MEM 배지에 한 well당 7만개씩 되도록 96-well plate에 배양한 후 IFN을 혈청이 없는 배지에 계단 희석하여 세포에 처리하였다. 이 때, 정제한 IFN의 활성정도를 비교하기 위해 IU값을 알고 있는 인간 IFN α 2a와 IFN γ 를 표준 단백질로 사용하였다. 그리고 IFN과 바이러스를 넣지 않은 세포와 IFN을 넣지 않고 바이러스만 넣은 세포를 대조군으로 두었다. 6시간 동안 세포 배양과 똑같은 조건에서 배양시킨 후 10% FBS가 든 MEM 배지에 VSV를 섞어 세포에 처리하였다. 바이러스를 처리한 세포들은 현미경으로 관찰하면서 바이러스만 넣어준 세포들이 모두 사멸할 때 상층액을 버리고 crystal violet으로 염색하여 살아있는 세포들을 확인하였다.

정제된 IFN γ 는 거의 항바이러스 효과를 보이지 않았고, IFN τ 에서는 항바이러스 효과가 나타나는 것으로 확인되었다. 하지만 his⁶-tag이 있는 경우 정제 후 단백질의 순도는 더 높았지만 생물학적 활성도는 his⁶-tag이 없는 단백질에 비해 현저히 감소하였다(그림 8).

이 결과를 토대로 본 연구진은 his⁶-tag을 제거한 단백질의 buffer에 따른 활성도 정도를 비교하기 위하여 PBS(phosphate buffered saline)와 Tris 용액에 각각 동결건조한 단백질을 녹여 항바이러스능 실험을 하였다. WISH세포는 인간세포주이기 때문에 단백질과 같은 종의 세포인 Madin-Darby bovine kidney(MDBK)에도 함께 실험하였다. MDBK세포주의 경우 실험방법은

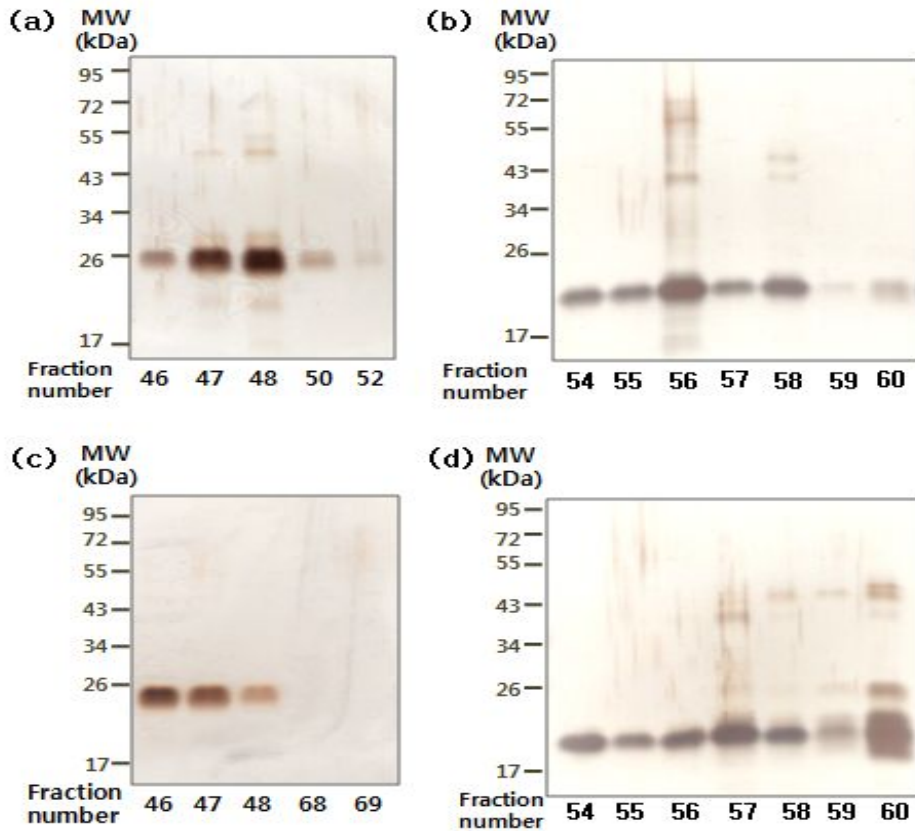


그림 7. HPLC를 통한 2차 정제를 거친 한우IFN τ (위)와 젖소IFN τ (아래). HPLC를 통하여 2차 정제를 마친 후에 elution을 한 단백질의 분획들을 SDS-PAGE 작업 후에 silver staining 과정을 거쳐서 확인하였다. (a), (c) His⁶-tag 제거하지 않은 IFN τ 의 단백질 정제 산물 분획; (b), (d) His⁶-tag 제거한 IFN τ 의 단백질 정제 산물 분획

WISH세포주와 동일하였으나 DMEM배지를 이용하였고, 인간IFN γ 는 항바이러스능을 보이지 않기 때문에 인간 IFN α 2a만 positive control로 설정하였다. 실험결과 한우 IFN τ 의 항바이러스능은 Tris 용액 기준으로 한우 IFN τ 의 경우 WISH세포와 MDBK세포에서 5×10^5 IU/mg였고 홀스테인 젖소 IFN τ 의 경우, WISH세포에서는 1.5×10^6 IU/mg, MDBK세포에서는 6.7×10^6 IU/mg로 나타났다(그림 9). 이러한 결과로 볼 때, PBS보다 Tris 용액에서 더 많은 활성을 보이고 WISH세포보다 MDBK세포에서 더 많은 항바이러스능을 나타낸다. 그리고 같은 세포와 같은 농도조건에서 한우 IFN τ 보다 젖소 IFN τ 가 더 많은 항바이러스 효과를 보인다.

항바이러스능이 확인된 단백질은 다음으로 이러한 항바이러스 효과를 나타내는 유전자를 확인하기 위해 WISH세포와 MDBK세포에 각각 IFN τ 를 1, 3, 9시간동안 처리한 뒤 RNA를 추출하여 항바이러스능 관련 유전자인 MX-1 protein(MX1), 2', 5'-oligo A synthetase(OAS1)의 primer로 RT-PCR하였다. 그 결과 IFN 처리 시간에 따라 두 유전자 모두 증가하였다(그림 10). 항바이러스능 실험과 RT-PCR결과를 통해서 연구진이 대장균을 통해 발현시킨 재조합 IFN τ 도 상용화되고 있는 인간 IFN과 같은 생물학적 활성이 있는 것으로 확인되었다.

위와 같은 실험과정 중에 IFN γ 는 IFN τ 에 비해 정제율과 단백질 순도가 떨어지고 어렵게 정제되어 확보한 단백질도 세포에서의 활성정도가 현저히 떨어지는 것으로 확인되었기 때문에

IFN τ 을 정제하여 다음 실험에 이용하였다.

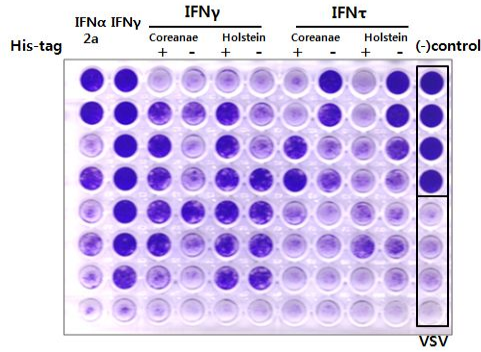


그림 8. WISH 세포주에서 실시한 소 IFN의 항바이러스능 실험. WISH세포가 자란 96-well culture plate에 바이러스를 감염시키지 않은 군(11열, 1-4행)과 Vesiculostomatitis virus(VSV)를 감염시킨 군(11열, 5-8행)을 negative control로 설정하고 상용화 되어있는 인간 IFN α 2a(1열) 및 인간 IFN γ (2열)를 항바이러스능의 positive control로 설정하여 각각 1행으로부터 8행까지 1ng/ml, 50ng/ml로부터 3-fold dilution을 통하여 희석하여 처리하였음. 본 연구진이 제작한 재조합 소 IFN는 250ng/ml의 농도로 1행부터 8행까지 4-fold dilution을 하여 처리하였음. 세포의 활성 여부는 Crystal violet 염색을 통하여 viable cell을 visualize하였음.

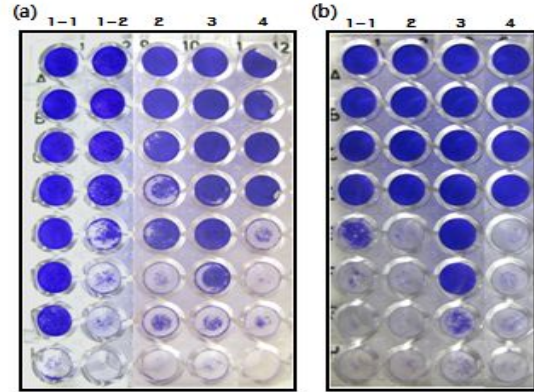


그림 9. WISH 세포주 및 MDBK 세포주를 이용한 재조합 소IFN의 항바이러스능 실험. WISH 세포주(a) 및 MDBK 세포주(b)를 96-well culture plate에 seeding한 후에 상용화 되어있는 인간 IFN α 2a(1-1열) 및 인간 IFN γ (1-2열)를 항바이러스능의 positive control로 설정하여 각각 1행으로부터 8행까지 5ng/ml, 50ng/ml로부터 3-fold dilution을 통하여 희석하여 처리하였음. 본 연구진이 제작한 재조합 한우 및 젖소의 IFN τ (각각 2행과 3행)는 500ng/ml의 농도로 1행부터 8행까지 4-fold dilution을 하여 처리하였음. 바이러스의 감염능 확인을 위해 IFN 처리 없이 바이러스 처리를 하지 않은 군(lane 4의 1-4행)과 VSV 감염을 시킨 군(lane 4의 5-8행)에 대한 확인작업도 하였음. 세포의 활성 여부는 Crystal violet 염색을 통하여 viable cell을 visualize하였음.

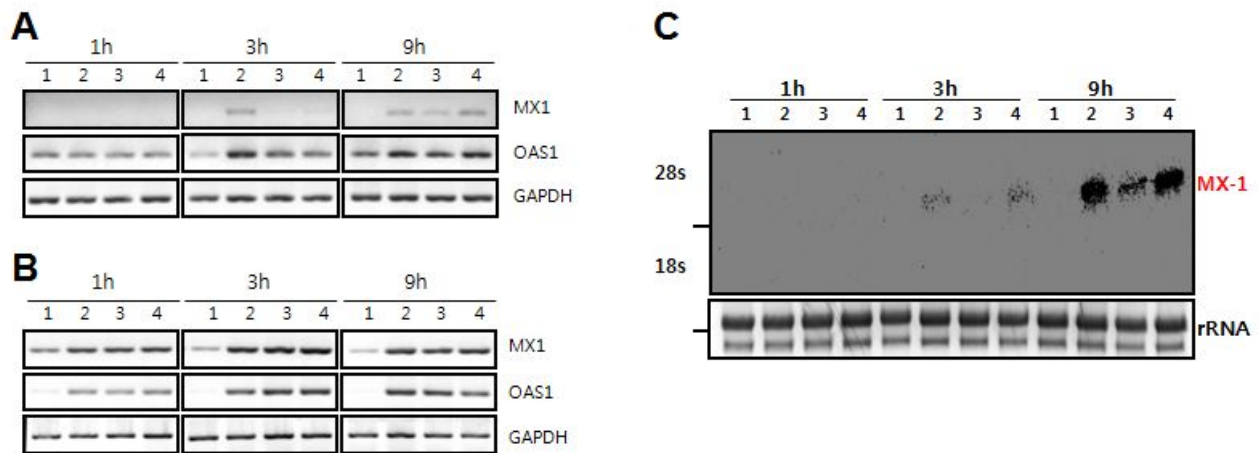


그림 10. Recombinant bovine IFN- τ induces antiviral genes. WISH(A and C) or MDBK(B) cells were treated with hIFN- α 2a(5 ng/ml, lane 2), *B.T. Coreanae* IFN- τ (250 ng/ml, lane 3) or *Holstein* IFN- τ (250 ng/ml, lane 4) at indicated time points(1, 3 and 9 h). Non-treated cells were prepared as negative control(lane 1). After treatment of interferons, total RNA was extracted for RT-PCR(A and B) and Northern blotting analysis(C).

4. 보존온도에 따른 IFN의 반감기 평가

가. 실험목적

재조합 IFN의 보존온도에 따른 반감기를 평가함으로써 정액 •수정란 생산시에 생식세포와 공동봉입하거나 임상현장에서 이들 생식세포와 IFN을 공동으로 이식하기 위한 최적의 보존조건을 확립하고, 그 특성에 따라 활용도를 증대시키기 위하여 본 실험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

소의 재조합 인터페론 감마와 타우의 단백질을 각 보존 온도별로 형성되는 반감기에 대한 평가를 수행하였다. 재조합 단백질을 생산한지 3일, 7일, 1개월, 6개월, 1년이 지난 후에 각 단백질의 정량을 위하여 그림 11, 12와 같이 silver staining을 수행하였다. 재조합 인터페론의 반감기 측정을 위하여 각 온도 및 기간별로 보존이 된 단백질을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동을 한 gel을 silver-staining을 통하여 염색을 한 후에 시각화된 단백질의 양을 standard protein의 양에 비교하였다.

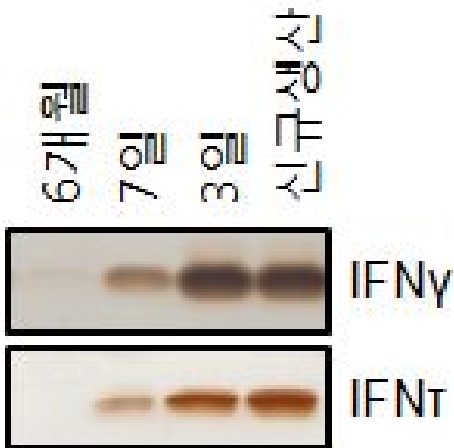


그림 12. 4°C에서 액상으로 보존된 소의 인터페론 단백질의 기간별 존재 상태에 대한 평가를 silver staining을 통하여 수행하였음.

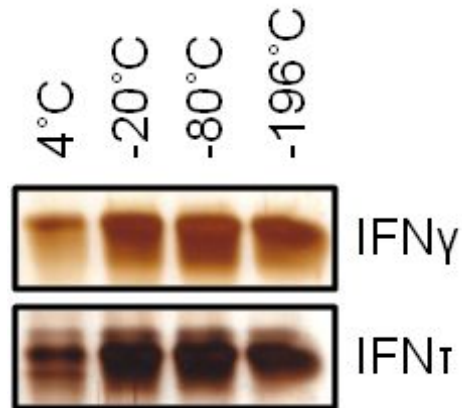


그림 11. 6개월간 동결건조 상태로 보존된 소의 인터페론 단백질을 각 온도에 따라서 보존 상태에 대한 평가를 silver staining을 통하여 수행하였음.

다. 실험결과

표 1. 보존온도에 따른 재조합 IFN의 반감기 평가

보존 온도(°C)	감마		타우	
	액상	동결건조	액상	동결건조
4(냉장)	3일 이내	6개월	3일 이내	6개월
-20(냉동)	7일	1년 이상	7일	1년 이상
-80(Dee freezer)	6개월 이상	1년 이상	6개월 이상	1년 이상
-196(액체질소)	6개월 이상	1년 이상	6개월 이상	1년 이상

보존온도에 따른 재조합 IFN의 반감기는 표 1과 같다. IFN-감마, -타우의 반감기는 일반적인 냉장고 상태(4°C)에서 용액상태로 보존시에는 3일 내외, 동결건조상태로 보존시에는 약 6개월이었으며, 냉동상태인 영하 20°C에서 용액상태로 보존시에는 7일 내외, 동결건조 상태로 보존시에는 약 1년간이었으며, 영하 80°C와 액체질소내의 영하 196°C에서 용액상태로 보존시에는 6개월 내외, 동결건조상태로 보존시에는 약 1년이었다. 현재까지 개발이 된 소의 인터페론 감마 및 타우 항체가 존재하지 않으므로 ELISA 및 western blotting을 통한 정확한 정량평가에는 키트 개발을 위하여 1-2년의 기간이 추가적으로 소요될 것이라 사료된다.

본 연구의 결과로 보아 재조합 단백질의 사용에 있어서 반감기를 충분히 고려하여 사용함으로써 제 2, 3, 5, 6 세부과제의 연구개발 목적을 충분히 달성할 수 있을 것이며, 특히 야외 임상현장에서 편리하게 사용하기 위해서는 실험실내에서 IFN이 봉입된 스트로우를 작성하여 정액보존용 액체질소통내에 보존하였다가 인공수정 및 수정란 이식시에 용해후 사용하면 그 역가를 6개월 정도 충분히 유지할 수 있을 것이라 사료된다.

5. 부형제 개발

가. 실험목적

IFN을 정액 또는 수정란과 공동으로 주입시 IFN의 효과를 증대시키고 체외 또는 체내환경에서 접촉시 IFN의 생리학적 활성을 증가시키기 위하여 적절한 부형제의 선택이 요구된다. 사용되는 부형제는 IFN에 대하여 이화학적으로 안정하여야 하며, 또한 생식세포에 대하여서도 안전성이 있어야 한다.

생식세포의 활성을 유지하고 사용이 편리한 정액 완충액, 수정란 이식용 미디어에 이들 물질을 첨가 용해하여 쓰는 것이 가장 일반적인 방법이지만 황체의 기능 및 착상기전과 관련하여 자궁 내에서 생리학적 활성기간을 연장시키는 것도 의의가 있다고 가정하였다. 지질의 일종인 홍화유, 참기름 등은 단백질의 일종인 IFN을 직접적으로 용해하지는 못하지만, 혼합 또는 유화시켜 사용 시 여러 약제의 방출을 지연시키는 서방형 부형제로 알려져 있다.

따라서 본 세부과제의 연구는 선택된 수종의 부형제와 IFN을 혼합 또는 용해하였을 때의 그 특성을 평가하고, straw에 장착시의 문제점, 반감기를 고려한 저장법을 평가하고, 각 부형제와 수정란을 공동으로 적용한 임신율을 평가함으로써 최종적으로 사용에 적합한 부형제를 도출하기 위하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 서방형 부형제의 준비는 IFN 감마, 타우를 0.50ml 스트로우당 1만단위, 2만단위가 포함되게 각 용량별로 산정한 후 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 용해한 후 홍화유, 참기름과 혼합하여 2,000rpm으로 30분간 처리함으로써 유화하였다.

(2) 정액 희석제의 준비는 세부과제의 TriladyI(Minitube, 독일), 이식용 media는 PBS를 준비하였다.

(3) 이화학적 평가항목은 IFN의 직접적 용해도, IFN이 포함된 Tris buffer와의 유화성, 상온 보존 또는 동결 시에 유화물의 상분리성을 육안적으로 평가하였다.

(4) straw에 장착한 부형제의 사용 및 취급 시에 발생할 수 있는 또 다른 특성으로써, 스트로우내에 봉입 후의 활주성, 세우거나 기울였을 때의 유출성, 동결보존 후 용해 시 sealing powder의 터짐현상, straw 외부에 묻었을 시의 끈적거림, 면실링으로의 번짐 등에 대하여 관능검사를 실시하였다.

(5) 각각의 항목을 평가한 결과 물리적 특성이 강한 경우는 [o], 보통인 경우는 [△], 약한 경우는 [x]로 표기하였다

- (6) IFN을 첨가한 부형제에 따른 번식 적용 평가는 관련된 각 세부과제에서 개발된 기술과 방법을 활용하여 예비적으로 실시하였다.
- (7) 이들을 활용하여 제 4, 5세부과제의 방법에 준하여 인공수정 및 수정란 이식을 예비적으로 실시하여 임신율을 일차적으로 평가하였다.
- (8) 임신율에 관한 통계처리는 χ^2 -test를 실시하였고, $P < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

다. 실험결과

(1) 부형제의 기계적인 유화후의 상분리 평가

표 2에서 보는 바와 같이 부형제로서의 지질은 연구의 목적으로 사용하기 위하여 기계적 유화를 실시하여 상온 또는 냉동 보존 기간 중 상분리 현상이 발생하는 물리적 특성이 관찰되었다. 그러나, 정액 완충액 및 이식용 media에서는 이러한 상분리 현상이 나타나지 않았다.

이러한 상분리 현상은 첨가한 단백질을 일정수준으로 함유하기가 용이하지 않다. 비록 이들 지질은 약리적으로 기대하였던 서방형 특성이 있다고 할지라도 유화에 대한 기술적인 과정이 더 연구되어야 할 것이며, 이들의 현실적 채택성 여부에 관해서 번식생리학적 기전을 포함하여 심층적으로 검토되어야 할 사항이다.

따라서 본 연구에서는 IFN의 약리학적 특성을 효과적으로 활용할 수 있는 기재의 선택을 일반적으로 널리 사용하는 정액 희석제 또는 수정란 이식용 미디어를 활용할 수 있는 방안을 동시에 고려하여 실험을 추진하였다.

표 2. 부형제의 기계적인 유화후의 상분리성

부형제	상온			동결			예상 용도	
	용해성	유화*	상분리	용해	유화	상분리		
Oils	홍화유	x	o	x	x	o	o	AI, ET
	참기름	x	o	x	x	o	o	
Media	Triladyl	o	x	x	o	x	x	AI
	PBS	o	x	x	o	x	x	ET

*유화성 : IFN을 Tris Buffer(20mM Tris-HCl pH 8.0)에 넣은 후 기계적 유화

*상분리 : 24시간 정치 후 육안적 검사

(2) 부형제의 straw내 장착 시 물리적, 관능적 특성 평가

표 3. 부형제의 straw내 장착 시 물리적, 관능적 특성

부형제		봉입 시 straw 내외 성상					비고
		활주성	유출성	터짐	끈적임	변짐	
Oils	홍화유	o	o	△	o	o	불편
	참기름	o	o	△	o	o	불편
Media	Triladyl	△	x	x	x	x	적정
	PBS	△	x	x	x	x	적정

부형제의 straw내 장착 시 물리적, 관능적 특성은 표 3과 같다. 지질 부형제를 사용하였을 때 straw내에서의 활주성, 활주에 의한 straw외부로의 유출성, 동결보존 후 용해 시 sealing powder의 터짐 현상과 이에 동반된 내용물의 분사, straw 외부에 묻었을 시 끈적거림, 면실마개로의 변짐현상이 강하게 발생하였다. 이에 반하여 media의 경우는 상대적으로 중등도 또는 약한 특성을 보였다.

(3) 부형제 내 IFN 첨가 후 번식 적용성 평가

표 4. IFN 첨가한 부형제에 따른 임신율

부형제	주입 (두)	AI (No. of)		이식 (두)	ET (No. of)	
		임신 (두)	임신율 (%)		임신 (두)	임신율 (%)
Oils	홍화유	25	12	48.0	23	43.5
	참기름	20	8	40.0	21	38.1
Media	Triladyl	31	16	51.6	-	-
	PBS	-	-	-	29	55.2

*IFN 감마 또는 타우 2만 IU 독립봉입 후 추가 주입법 실시

** χ^2 -test, P<0.05

인공수정 및 수정란 이식 후 IFN 2만 IU와 각 부형제를 straw내에 독립봉입 후 추가 주입한 예비실험 결과는 표 4와 같다. 인공수정에서의 결과는 부형제의 종류에 따라 임신율의 차이가 없었지만, 수정란이식에서의 임신율은 지질 부형제를 사용한 경우가 이식용 미디어에 비하여 낮았다. 특히 IFN 타우를 사용하였을 경우에 발정 재귀율도 낮은 현상이 발생하였다. 이러한 예비실험의 결과는 서방형 부형제를 개발한다는 처음의 목표와는 다소 차이가 있었다. 따라

서, 본 세부과제의 제 1, 2, 3 실험의 소견을 종합하여 판단한 결과 가장 보편적으로 사용하는 수정 및 이식용 미디어를 부형제로 사용하여 본 연구의 세부과제를 수행하였다.

제 2 절 스트로 내 IFN과 생식세포의 공동봉입형 동결기술 및 제품 개발

1. IFN의 정자의 운동성에 대한 영향

가. 실험목적

일반적으로 정액 또는 수정란은 동일한 straw내에 봉입되어 있다. 기성 생식세포로써의 동결정액 또는 동결수정란을 착상유도물질로써의 IFN과 함께 자궁내로 주입할 때에는 이러한 물질이 별도로 충전된 스트로우가 준비되어야 한다. 또한 착상유도물질 또는 기타 목적물질을 충전하는 방법으로써 동일한 스트로우내에 생식세포와 IFN을 공동봉입하는 경우 및 동일한 스트로우내에 IFN 단일물질만으로 충전하는 방법이 있다. 따라서 본 세부과제에서는 이들 물질을 생식세포와 인공수정 또는 수정란이식 시 자궁내로 동시에 주입하기 위한 공동봉입기술을 개발하기 하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 생식세포의 준비 및 평가

① 정액의 준비를 위하여 공시 종모우는 경상북도 축산기술연구소에서 사육중인 후보종모우 2두를 공시하였다.

② 정자의 준비

후보종모우 정액을 채취하기 위한 인공질법으로써, 인공질(FHK, 일본) 내피에 49~52℃의 온수를 첨가하였으며, 후보종모우를 충분히 시정한 후 승가를 실시하고, 인공질을 종모우 음경에 삽입하여 사정을 유도하였다.

③ 난황-완충액의 제조

난황-완충액은 Triladyl(Minitube, 독일)을 이용하였다. 750ml의 초순수 물에 250g의 난황을

첨가하여 3시간 동안 교반하면서 250g의 triladyl을 첨가하였다. 교반된 난황-완충액은 8,000rpm에서 1시간 동안 원심분리를 하였다. 상층액만을 모아서 0.8 μ m에서 필터 후 냉장실에서 1일간 보관하였다. 다음날 완충액은 0.4 μ m 필터로 여과 후 동결 때까지 냉장 보관하였다.

④ 정자의 동결

채취한 정액을 동량의 난황-완충액으로 혼합하였다. 혼합액에서 정자수를 측정하여 100×10^6 이 되도록 완충액을 첨가하였다. 희석된 정액은 0.5ml straw를 이용하여 0.5ml 씩 분주하였고, sealing powder를 이용하여 봉입하였다. 제조된 정액은 4 $^{\circ}$ C의 BOD incubator에서 2시간 동안 냉장하였다. 냉각된 정액 스트로우는 영하 80~85 $^{\circ}$ C의 액체질소내에서 40분간 예비동결을 한 후 액체질소에 완전히 침지하여 동결하였다.

⑤ interferon 첨가

0.5ml의 straw 내에 첨가한 interferon- τ 의 양은 미첨가(대조군), 10,000 IU(T1군) 및 20,000 IU(T2군)씩 각각 첨가하였다.

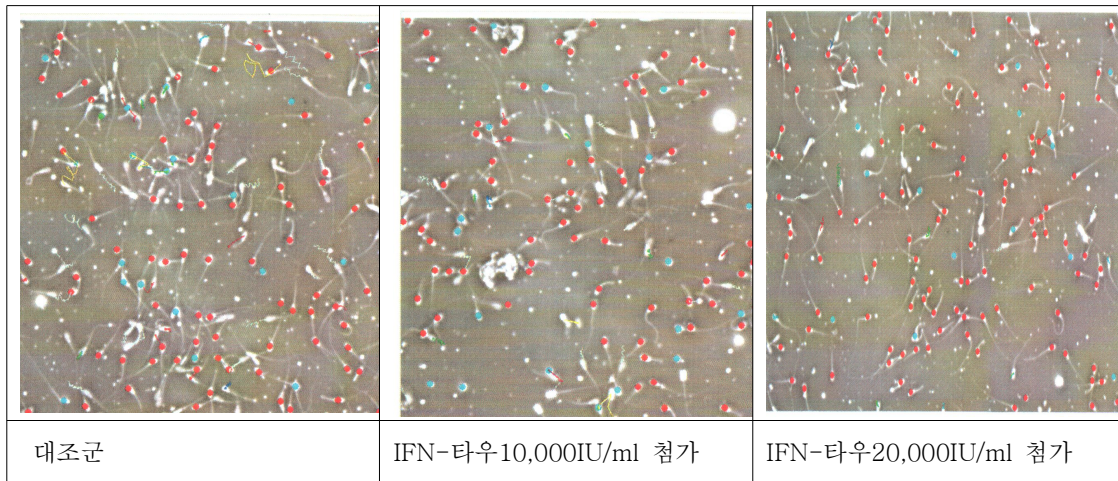
⑥ 동결정액의 활력 검사

동결정액의 활력 검사는 CASA system(Spermvision, Minitube, 독일)을 이용하여 운동성 및 진행성을 측정하였다.

⑦ 통계 처리

TM과 PM은 Mean \pm SE로 나타냈으며 각각의 평균에 대한 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 분산 분석 후 Duncan's 다중 검정을 실시하였고, P<0.05 수준에서 유의차를 검정하였다.

그림 13. IFN 타우의 첨가량에 따른 정자의 운동성



Left : control, Middle : addition of IFN-tau 20,000 IU, Right : addition of IFN-tau 20,000 IU.

다. 실험결과

(1) IFN 타우의 첨가량이 정자의 운동성에 미치는 영향

표 5. IFN 타우의 첨가량에 따른 정자의 운동성

IFN-타우 첨가량	Motility(운동성)		progressive motility(진행성)	
	average	SE	average	SE
Control	30.1	2.3	18.5	2.2
10,000 IU	30.9	2.9	17.0	1.3
20,000 IU	23.9	1.0	23.9	1.0

Mean±SE : standard error, P < 0.05

IFN 타우의 첨가량에 따른 정자의 운동성은 표 5와 같다. 예비 종모우로부터 채취된 정액에 IFN-타우를 첨가한 정자의 운동성은 대조군, 1만 단위군, 2만 단위군에서 각각 30.1, 30.9, 23.9 이었으며, 진행형 운동성은 대조군, 1만 단위군, 2만 단위군에서 각각 18.5, 17.0, 23.9로서 첨가량에 따른 유의성이 없었다.

정액의 운동성과 생존율은 수정율에 있어서 매우 중요한 요소이므로, 이를 위하여 Caffeine의 첨가가 운동성을 증대시킨다는 보고(Nyachio A 등, 2010; Peláez J 등, 2006), Vitamin B12의 첨가가 생존율을 증대시킨다는 보고(Watanabe T 등, 2007; Chen Q 등, 2001), heparan sulfate의 첨가를 통해 침체 반응을 높여 수정율을 증대시킨다는 보고(Revel A 등, 2005; Thérien I 등, 2005; Romanato M 등, 2003), TGF-β의 첨가가 임신율을 증대시킨다는 보고(Odhiambo JF 등, 2009) 등의 다양한 물질을 첨가한 연구가 보고 되고 있다.

또한, 소 정자의 동결보존을 위하여 희석액에는 난황 또는 milk serum 등이 다양하게 첨가되고 있다. 특히 정자의 수정능획득을 향상시키기 위하여 콜레스테롤 등이 첨가되고 있다 (Purdy와 Graham, 2004). 동결융해 후 정자의 활력 증가를 위하여 비타민 B12(Hu 등, 2010a), low-density 난황추출액(Moussa 등, 2002) 등이 사용되고 있다. 하지만 직접적인 임신율을 비교하는 보고는 거의 없다.

따라서, 본 연구의 결과로 보아 정액 내에 IFN-타우를 첨가하더라도 유해성이 없으므로, 임신율의 증대 또는 다른 목적을 위하여 정액의 제조 시에 IFN의 적정량을 직접적으로 첨가할 수 있으며, 다른 보고에서 보는 바와 같이 정액희석제와 병용할 수 있을 것으로 사료된다.

2. IFN의 수정란에 대한 영향

가. 실험목적

IFN의 수정란 첨가시 유해성 평가를 위해 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 체외수정란의 준비 및 평가

① 도축장에서 ovary 채취를 위하여, 종축개량협회와 축산물품질평가원의 전산망을 활용하여 개체의 바코드를 조회하여 난소채취를 할 공란우를 먼저 선정하고, 도축 현장에서 선발된 공란우의 바코드(도체번호)를 확인한 후 해당된 암소의 개체별로 난소를 채취, 처리한 후, 20~25℃의 보온병에 담아 실험실로 이송하였다.

② 도축 난소 개체별로 난자를 흡인하여 회수한 난포란은 IVMD101 배양액으로 1~2회 세척한 후 6well dish에 IVMD101 배양액을 800 μ l씩 분주하고 각 well당 각 개체별 난소로부터 채취, 처리한 난자를 20~40개씩 넣어 39℃, 5% CO₂와 혼합가스를 사용하는 Incubator(Hera Cell, 독일)에서 22~24시간 동안 각각 체외성숙을 유도하였고, 난구세포가 잘 확산된 난포란만을 선발하여 체외수정에 사용하였다.

③ 체외성숙 개시 이후 20~22시간 후에 피펫팅으로 난구세포를 적당히 제거한 후 수정 drop(IVF-100)으로 옮겨 전처리된 정자로써 24시간 동안 체외수정을 실시하였으며, 수정 개시 20~24시간 후 체외배양액(CR-1+10% BSA)으로 난자를 이동하여 초기 배양을 실시하였으며, 48시간 후 체외배양액(CR-1+10% FBS)에 이동하여 후기 배양을 실시하였다.

④ 체외배양의 48시간마다 배양액(CR-1+10% FBS)으로 난자를 옮긴 후 7일~8일째 배반포배를 확인하여 이식 및 동결 여부를 판단하였다.

- ⑤ 본 실험에 사용한 배양액은 난포란 회수용 배양액으로 10% Fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 tissue culture medium-199(TCM-199), 정자의 세정 및 체외수정을 위한 배양액은 BO 배양액(Brackett and Oliphant, 1975)에서 구성성분을 일부 변경한 IVF-100 용액을 사용하였고, 수정 후 초기 배양을 위한 배양액은 10%의 BSA가 포함된 CRI-aa, 후기 배양액은 10%의 FBS가 포함된 CRI-aa를 사용하였다.
- ⑥ IFN-감마와 타우는 각각 1만, 2만, 4만 단위용량으로 구분하여 각각의 체외성숙, 체외수정, 체외배양의 단계별로 배양 drop내에 첨가하여 배양하였다.
- ⑦ 임신율에 관한 통계처리는 χ^2 -test를 실시하였고, $P < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

다. 실험결과

(1) 체외배양액내에 IFN의 첨가량이 배반포 발생율에 미치는 효과

수정란과 IFN을 첨가하여 공동배양을 실시하는 배양체계에서 IFN이 생식세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 각각의 배양 drop내에 상기 IFN-감마와 타우를 각각 1만 단위, 2만 단위, 4만 단위씩 첨가하여 수정란과 공동배양한 후 배반포 발생율과 부화율에 관한 시험 결과는 표 6과 같다.

표 6. 체외배양액내에 IFN의 첨가량에 따른 배반포의 발생율

첨가량	oocyte	No. of (%)				hatched blastocyst
		2cell	8cell	blastocyst		
Control	120	70(58.3)	52(43.3)	24(20.0)	21(17.5)	
10,000IU	100	50(50.0)	41(41.0)	21(21.0)	18(18.0)	
IFN-감마	20,000IU	100	52(52.0)	39(39.0)	19(19.0)	17(17.0)
	40,000IU	90	44(48.9)	36(40.0)	15(17.8)	13(14.4)
	10,000IU	200	118(59.0)	83(41.5)	43(21.5)	33(16.5)
IFN-타우	20,000IU	200	112(56.0)	85(42.5)	43(21.5)	36(18.0)
	40,000IU	200	103(51.5)	82(41.0)	40(20.0)	34(17.0)

* χ^2 -test, $P < 0.05$

채취, 처리된 난자에 대한 IFN-감마의 첨가용량으로써 대조군, 1만 단위군, 2만 단위군, 4만 단위군에서의 수정율은 각각 70(58.3%), 50(50.0%), 52(52.0%), 44(48.9%)이었으며, 8세포기 발

생율은 각각 52(43.3%), 41(41.0%), 39(39.0%), 36(40.0%)이었으며, 배반포 발생율은 각각 24(20.0%), 21(21.0%), 19(19.0%), 15(17.8%)이었으며, 부화율은 각각 21(17.5%), 18(18.0%), 17(17.0%), 13(14.4%)이었다.

채취, 처리된 난자에 대한 IFN-타우의 첨가용량으로써 대조군, 1만 단위군, 2만 단위군, 4만 단위군에서의 수정율은 각각 70(58.3%), 118(59.0%), 112(56.0%), 103(51.5%)이었으며, 8세포기 발생율은 각각 52(43.3%), 83(41.5%), 85(42.5%), 82(41.0%)이었으며, 배반포발생율은 각각 24(20.0%), 43(21.5%), 43(21.5%), 40(20.0%)이었으며, 부화율은 각각 21(17.5%), 33(16.5%), 36(18.0%), 34(17.0%)이었다.

본 실험의 결과에서 보는 바와 같이 다른 군에 비하여 4만 단위 첨가군에서는 배반포 발생율과 부화율이 다소 저하되는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 이러한 결과로 보아 배양 drop내에 1만 단위에서 2만 단위의 IFN 감마 및 타우를 직접적으로 첨가하여 배양하더라도 배반포의 생산과정에 유해한 영향을 미치지 않는 것이 증명되었다.

체외배반포의 생산성 향상을 위한 배양체계에 첨가하는 다양한 물질로서 IGF(Shabankareh HK 등, 2009; Shamsuddin M 등, 1994), TGF(Keefer CL 등, 1994), 아미노산(Sinclair KD 등, 2008; Jung YG 등, 1998; Sturmey RG 등, 2010), MMP(Baka S 등, 2009; Lee DM 등, 2005) 등에 대한 많은 보고가 있었다. 본 연구에서는 IFN을 첨가한 공동배양시에 수정란의 생산성 증대에는 효과적인 영향을 미치지 않는 않았지만, 수정란의 배발생율과 부화율에 대한 유해한 영향도 역시 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

본 연구의 결과로 보아, 이식용 스트로우내에 수정란과 IFN을 공동으로 봉입하여도 무해함은 물론, 동일한 이식용 straw내에 IFN과 수정란이 공동봉입되어 이식 장소에까지 이송하는 과정에서 충격, 진동, 기울임 등의 외부적 물리력이 작용하여 수정란과 IFN이 직접적으로 접촉하는 경우에도 스트로우내에서 IFN이 수정란에 유해한 영향을 미칠 수 없을 것으로 사료된다.

따라서, IFN과 생산된 체외수정란을 암가축의 자궁내에 공동으로 이식하기 위한 방법으로써, 이식하기 전에 0.25ml의 동일한 straw내에 수정란과 IFN을 공동으로 봉입하는 것이 가능하다. 동일한 스트로우내에서 수정란, 이식용 미디어, IFN 등을 혼합되게 봉입하거나, 수정란과는 다른 독립구획에 IFN과 수정란을 봉입하는 세부기술개발 과제에 제공되었다.

3. IFN의 동결수정란에 대한 영향 평가

가. 실험목적

동결수정란 제조시 IFN 첨가의 유해성 평가를 위하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 한우 체외수정란의 동결

① 동결액 준비

Slow-freezing을 위하여 7~8일째의 확장배반포를 준비하고, 동결보존액을 위하여 0.5%의 bovine serum albumin(BSA)을 첨가한 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS) 용액과 동해방지제의 농도는 각각 0.2 M 과 0.3 M sucrose가 포함된 1.5 M과 1.8 M Ethylene glycol(EG)을 준비하였다. 제조된 동결 보존액은 0.22 μ m의 필터로 여과하여 일회 사용량만큼 나누어 -20 $^{\circ}$ C의 냉동고에 보관하였다.

② 수정란의 동결

이식 가능한 확장배반포를 선발하여 각각의 배반포를 sucrose의 농도가 점차적으로 높은 동결보존액으로 옮겨 가면서 각 단계마다 10분간씩 정치하여 sucrose가 배반포내로 충분히 침투할 수 있도록 평형시키고, 0.25ml-straw내에 항동해제와 수정란을 봉입하였다. 미리 -7 $^{\circ}$ C로 환경이 맞추어진 세포동결기[PLANER, KRYO-100]를 이용하여 실온에서 식빙온도(-5 $^{\circ}$ C~-7 $^{\circ}$ C)까지는 약 1 $^{\circ}$ C/min으로 straw를 빠르게 냉각시키고, 이 온도에서 2분간 정치한 후에 식빙을 실시하였고, 식빙온도에서 8분간 정치한 후에 -35 $^{\circ}$ C까지 0.3 $^{\circ}$ C/min의 속도로 냉각하고, 액체질소(LN₂)에 그대로 침지하여 최소 3일간 보존하였다.

③ 수정란의 봉입 및 동결

㉠ 수정란의 시험 및 이식을 위하여 3가지 방법으로 봉입하였고, 3가지 봉입법 모두 상기의 완만동결 과정을 준용하였다.

㉡ 단일구획내 단일봉입 수정란 동결 : 동결란의 용해후 수정란의 활력 검사 후 이식을 하거나, 직접이식 후 IFN을 추가적으로 이식할 수 있도록 일반적으로 방법으로써 동일 스트로우내에 항동해제와 수정란만을 봉입하여 동결하였다.

㉢ 단일구획내 공동봉입 수정란 동결 : 직접용해 후 자궁내 이식을 하기 위하여 동일한 straw내에 포함될 IFN을 함량을 산정하여 준비된 항동해제에 첨가하였으며 IFN, 수정란, 항동해제가 동일한 구획내에 포함되도록 봉입하여 완만동결법을 준용하였다.

㉣ 독립구획내 공동봉입 수정란 동결 : 직접용해 후 자궁내 이식을 하기 위하여 1개의 이식용

스트로우내에 수정란과 항동해제가 포함된 별도의 구획과 IFN이 포함된 부형제 구획으로 각각 구분되게 봉입하여 완만동결법을 준용하였다.

④ 동결수정란의 용해

㉠ 수정란 용해 : 동결된 수정란 straw를 액체질소통에서 꺼내어 공기중에 약 10초간 노출시키고, 이어서 35~37℃의 물에 약 20초간 침적하여 용해하였다.

㉡ 수정란의 활력 판정을 위하여 용해된 수정란을 인산완충액이 포함된 배지에서 수회 세척 후 배양용 배지로 옮겨 체외수정란의 배양법을 준용하였으며, 배양 24~72시간 동안의 배반포의 생존성과 부화율을 확인하였다.

㉢ 용해후 재봉입 수정란 이식 : 해동된 수정란의 생존성 검사후 형태학적으로 온전한 배반포를 선별하여 이식용 미디어와 IFN을 상기의 봉입법 중 하나를 선택하여 봉입후 수란우에 이식하였다.

㉣ 수정란의 직접용해 이식법으로써는 야외에서 상기의 수정란 용해법을 준용하여 준비된 수란우에 이식하였다.

⑤ 임신율에 관한 통계처리는 χ^2 -test를 실시하였고, $P < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

다. 실험결과

(1) 항동해제내 IFN 첨가량이 용해후 수정란의 생존율과 부화율에 미치는 영향

직접용해법을 적용하여 이식하기 위하여 동결액 준비 과정에서 항동해제내에 직접적으로 인터페론을 첨가하여 완만동결을 실시하였고, 동결수정란을 용해하여 재배양한 후 평가한 수정란의 생존율과 부화율은 표 7과 같다.

항동해제내의 IFN 첨가량에 따른 동결 용해후 수정란의 생존율과 부화율은 표 7과 같다. IFN 감마의 첨가용량으로써 대조군, 1만 IU, 2만 IU, 4만 IU군에서의 동결수정란의 용해 후 생존율은 각각 65(54.2%), 16(59.2%), 12(44.4%), 12(50.0%)이었으며, 부화율은 각각 45(37.5%), 13(48.1%), 10(37.0%), 9(37.5%)이었다. 또한, IFN 타우의 첨가용량으로써 대조군, 1만 IU, 2만 IU, 4만 IU군에서의 동결수정란의 용해 후 생존율은 각각 65(54.2%), 20(69.0%), 16(57.1%), 18(64.3%)이었으며, 부화율은 각각 45(37.5%), 12(41.4%), 12(42.9%), 12(42.9%)이었다.

표 7. 항동해제내 IFN 첨가량에 따른 융해후 수정란의 생존율과 부화율

첨가량	No. of blastocyst(%)		
	동결	생존	부화
Control	120	65(54.2)	45(37.5)
IFN-감마	10,000IU	27	16(59.2)
	20,000IU	27	12(44.4)
	40,000IU	24	12(50.0)
IFN-타우	10,000IU	29	20(69.0)
	20,000IU	28	16(57.1)
	40,000IU	28	18(64.3)

*직접융해 이식을 위한 스트로우내 완만 동결법

** χ^2 -test, P<0.05

본 연구의 결과에서 보는 바와 같이 항동해제내에 1만 단위에서 2만 단위의 IFN을 직접적으로 첨가하여 완만 동결을 실시하더라도 배반포의 동결 융해 과정에 유해한 영향을 미치지 않았다. 동결란 생존율 향상을 위해 동결체계에 첨가하는 다양한 물질로서 IGF, TGF, 아미노산, MMP 등에 대한 많은 보고(Hasler JF, 2010; Yu XL 등, 2009; Kaidi S 등, 2001)가 있다. 신선 수정란의 체외배양과정에 IFN을 첨가시 수정란에 유해한 영향을 미치지 않은 것과 같이, 본 세부과에서도 동결용 미디어(항동해제)에 IFN을 첨가하여 동결을 실시하더라도 동결수정란의 생존율과 부화율에 대한 유해한 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다.

또한, 그림 14에서 보는 바와 같이 항동해제내에 IFN 감마 및 타우를 첨가하여 동결을 실시하더라도 그 종류 및 첨가량에 관계없이 확장배반포 및 부화반포의 형태는 일반적인 동결수정란의 그것과의 차이가 관찰되지 않았다.

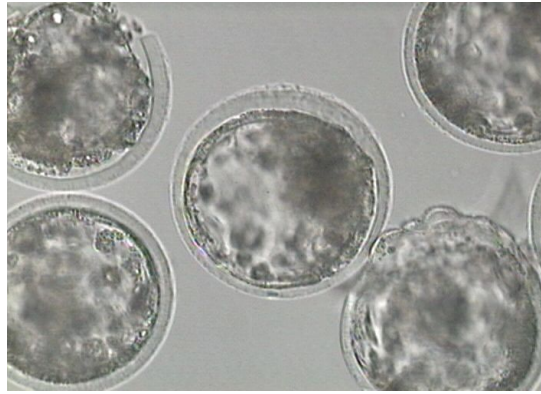
한편, 수정란과 IFN을 봉입하는 방법으로써 수정란을 동결하기 전에 0.25ml내의 이식용 straw내에 수정란과 항동해제로써 봉입하거나 또는 수정란, 항동해제, IFN 등을 혼합되게 공동봉입하거나, 항동해제내의 수정란과는 다른 독립구획에 IFN을 봉입하였다.

따라서, 동결용 미디어(항동해제)내에 수정란과 IFN을 공동으로 봉입하여 동결을 실시하여도 생식세포에 대하여 무해함은 물론, 동결 융해 후의 수정란이 IFN과 직접적으로 접촉되거나, 일차적으로 수정란이 자궁내로 이식되고 연속하여 IFN이 추가적으로 이식되더라도 유해한 영향을 받지 않을 것으로 사료된다.

그림 14. 동결 수정란의 용해 후 형태



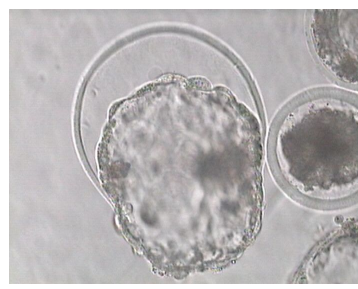
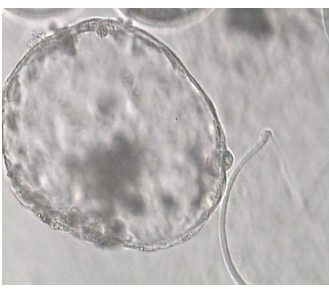
a. IFN-타우 10,000IU, 공동동결. 40X



b. IFN-타우 10,000IU, 공동동결. 100X



c. IFN-타우 10,000IU, 공동동결. 200X

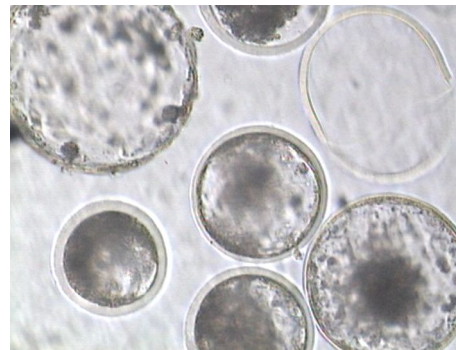


d. IFN-타우 20,000IU, 공동동결. 100X

200X



e. IFN-타우 40,000IU, 공동동결. 100X



200X

4. 동일 스트로우내에 IFN과 정액(수정란)의 공동봉입 기술 개발

가. 실험목적

정액 또는 수정란을 보존, 이송, 주입하기 위하여 0.25ml 또는 0.50ml의 폴리비닐관내에 회석

액 또는 미디어와 함께 이들 생식세포를 충전하여 스트로우의 양단을 밀봉하는 것을 ‘봉입’(loading)이라고 한다. 희석액 또는 미디어와는 별도로 이들 동일한 스트로우내에 특수한 목적물질을 동시에 충전하기 위한 방법으로써 목적물질을 희석액 또는 미디어에 용해하거나 혼합한 후 생식세포를 봉입하는 것을 ‘공동봉입’이라고 한다. 동일한 스트로우내에 목적물질과 생식세포를 공기방울을 활용하여 독립된 구획별로 봉입하는 방법을 ‘독립구획봉입’이라고 하며, 주로 생식세포와 목적물질을 양측 자궁각 또는 일측 자궁각내로 주입하거나, 자궁내로 주입하기 전까지 생식세포와 목적물질의 접촉을 피하기 위해 활용된다.

한편, 스트로우내에 생식세포의 충전없이 목적물질만으로써 충전 봉입된 것을 ‘단일봉입’이라고 하며, 복수의 목적물질을 여러 개의 독립구획에 충전 봉입하는 것을 ‘병렬봉입’이라고 한다. 주로 기성 생식세포를 자궁내에 먼저 주입한 후 임신증진을 위한 다양한 복합물을 추가로 주입하기 위하여 활용된다.

따라서, 본 세부과제는 인공수정 및 수정란 이식시에 IFN의 활용도를 높이기 위한 다양한 봉입방법을 개발하기 위하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) IFN과 생식세포의 준비

① AI용 0.50ml straw, ET용 0.25ml straw를 준비하였고, IFN, 정액, 난자는 세부과제에서 제공받았다.

(2) 공동구획내 봉입 방법

① IFN과 정액의 공동봉입 방법은 IFN의 사용량을 정액 희석액 또는 완충액내에 첨가 용해한 후 채취된 정액을 희석하여 0.25, 0.50ml의 스트로우에 충전, 봉입 후 상기에서 기술된 방법으로 동결을 실시하였다.

② IFN과 신선수정란의 공동봉입 방법은 IFN의 사용량을 tris buffer에 용해한 후 이식용 미디어에 수정란을 공동으로 봉입하여 신선란으로써 세부과제의 시험에 제공하였다

③ IFN과 동결수정란의 공동봉입 방법은 IFN을 동결용 미디어에 첨가한 후 0.25, 0.50ml의 스트로우에 충전 봉입하여 상기 세부과제의 방법에 따라 동결을 실시하였다.

(3) 독립구획내 봉입 방법

- ① IFN과 정액의 독립구획 봉입 방법은 IFN의 사용량을 tris buffer, 정액 희석액 또는 완충액 내에 첨가 용해한 별도의 미디어를 작성한 후 희석된 정액을 0.50ml의 스트로우내에서 공기방울 구획, 생식세포 구획, IFN 구획의 각각 독립구획으로 분리되게 충전, 봉입 후 상기에서 기술된 방법으로 정액의 동결을 실시하였다. [그림 15]
- ② IFN과 신선수정란의 공동봉입 방법은 IFN의 사용량을 tris buffer, 이식용미디어, 동결미디어에 첨가 용해한 별도의 미디어를 작성하였고, 세부과제에서 생산된 수정란을 활용하여 0.25ml의 스트로우내에서 공기방울 구획, 수정란 구획, IFN 구획의 각각 독립구획으로 분리되게 설정하여 충전, 봉입한 후 신선수정란으로써 이식에 제공하였다.
- ③ 동결수정란의 공동봉입 방법은 IFN의 사용량을 tris buffer, 동결미디어에 첨가 용해한 별도의 미디어를 작성하였고, 상기 기술된 바와 같이 봉입하여 동결방법을 준용하였고, 보존 후 수정란 이식에 제공하였다. [그림 16]

다. 실험결과

(1) 동일 스트로우내 IFN과 정액의 공동봉입 기술

IFN과 정액의 공동봉입형 스트로우의 모식도는 그림 15와 같다. 0.50ml 1개 스트로우내에 정액(적색점)과 IFN(녹색부)이 잘 혼합되어 동일구획내에 봉입되었으며(그림 15의 1), 스트로우의 양단은 면마개와 sealing powder로 봉인되었다. 이 방법은 정액희석액내에 IFN을 동시에 첨가하여 혼합되게 봉입할 수 있는 방법이다.

또한, 동일 스트로우내에 3개 구획을 설정하고 공기를 활용하여 중앙부와 전후방부의 3개 구획으로 나누어 정액구획(적색점)과 IFN구획(중앙부)으로 각각 독립구획내에 봉입되었으며(그림 15의 2), 스트로우의 양단은 면마개와 sealing powder로 봉인되었다. 이 방법은 정액과 IFN(기타 목적물질)을 스트로우내에서 직접적으로 혼합되지는 않지만 자궁내에 주입시에 혼합된다.

따라서, 이들 각각의 봉입방법은 정액생산 과정에서 여러 조건에 따라서 결정될 수 있으며 사용목적에 따라서도 조정이 가능하다. 특히 정액의 생산은 농협개량부에서 전담하므로 개발된 기술은 해당기관에서 활용할 수 있는 방안이 모색되어야 할 것이다.

그림 15. IFN과 정액의 공동봉입형 스트로우의 모식도

□ 정액+IFN 공동봉입 모식도



1. 동일한 스트로우내에 IFN(중앙부 녹색 바탕)과 정액(적색 점)을 공동구획내에 봉입한 모식도. 도의 1과 같이 봉입을 실시한 후 동결을 실시함
2. 동일한 스트로우내에 IFN(중앙부 녹색 바탕)과 정액(전방부, 후방부의 적색 점)을 독립구획내에 봉입한 모식도. 도의 2와 같이 봉입을 실시한 후 정액을 동결함

**[특허출원 : 10-2010-0011422]. PCT출원 : PCT/KR2011/000800

**[상표출원 : SemenAID. 40-2011-0008173]

(2) 동일 스트로우내 IFN과 수정란의 공동봉입 기술

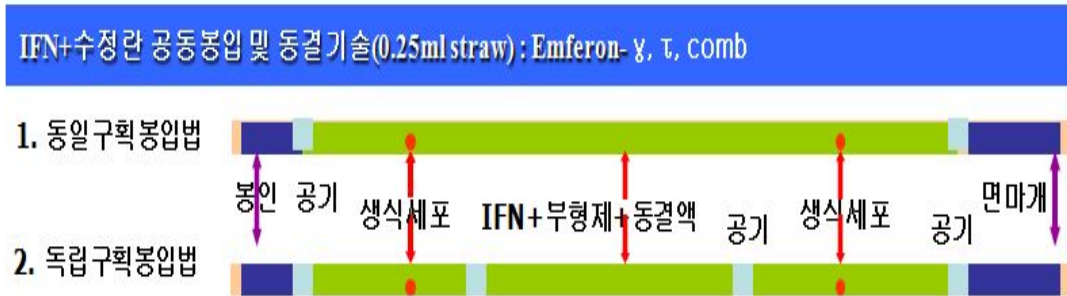
IFN과 수정란의 공동봉입형 스트로우의 모식도는 그림 16과 같다. 0.25ml 1개 스트로우내에 정액(적색점)과 IFN(녹색부)이 잘 혼합되어 동일구획내에 봉입되었으며(그림 16의 1), 스트로우의 양단은 면마개와 sealing powder로 봉인되었다. 이 방법은 이식용 미디어내에 IFN을 동시에 첨가하여 혼합되게 봉입할 수 있는 방법이다.

또한, 동일 스트로우내에 3개 구획을 설정하고 공기를 활용하여 중앙부와 전후방부의 3개 구획으로 나누어 수정란구획(적색점)과 IFN구획(중앙부)으로 각각 독립구획내에 봉입되었으며(그림 16의 2), 스트로우의 양단은 면마개와 sealing powder로 봉인되었다. 이 방법은 정액과 IFN(기타 목적물질)을 스트로우내에서 직접적으로 혼합되지는 않지만 자궁내에 주입시에 혼합된다.

따라서, 이들 각각의 봉입방법은 수정란 생산 과정과 사용목적에 따라 선택이 가능하다. 특히 국내의 수정란 생산업체가 지역마다 위치하고 있고 소량의 수정란을 생산하고 있으므로 이들 업체에서 그 활용방안이 강구되어야 할 것이다.

그림 16. IFN과 수정란의 공동봉입형 스트로우의 모식도

□ 수정란+IFN 공동봉입 모식도



1. 동일한 스트로우내에 IFN(중앙부 녹색 바탕)과 수정란(적색 점)을 공동구획내에 봉입한 모식도. 도의 1과 같이 봉입을 실시한 후 신선수정란으로 이식하거나 동결수정란을 작성함
2. 동일한 스트로우내에 IFN(중앙부 녹색 바탕)과 수정란(전방부, 후방부의 적색 점)을 독립구획내에 봉입한 모식도. 도의 2와 같이 봉입을 실시한 후 신선수정란으로 이식하거나 동결수정란을 작성함

**[특허출원 : 10-2010-0011422]. PCT출원 : PCT/KR2011/000800

라. 연구 결과의 활용 방안

(1) 정액과 IFN의 공동봉입 기술의 활용

- ① 공동봉입 : 정액 희석액내에 IFN등 착상복합물을 포함한 정액 제조 기술에 활용할 수 있으며, 한우·유우개량부 등 정액생산업체에 제공할 수 있음
- ② 독립봉입 : AI후 착상복합물을 추가적으로 자궁내로 주입하는 기술로써 양축가, 수정사, 수의사 등이 야외 번식 현장에서 손쉽게 활용할 수 있음
- ③ 주입방법 : 일반 인공수정기구와 주입법을 활용할 수 있으며, 또한 주입에 편리한 별도의 기구가 본 연구개발 과제에서 추가적으로 개발되었음
- ④ 지적재산권 등록 : 특허출원 10-2010-0011422, PCT출원 : PCT/KR2011/000800
상표출원 40-2011-0008173호 : SemenAID

(2) 수정란과 IFN의 공동봉입 기술의 수정란 이식에의 활용

- ① 공동봉입 : 이식용 미디어내에 IFN등 착상복합물을 포함한 수정란 제조 기술에 활용할 수 있으며, 수정란 생산업체에 제공할 수 있음(신선란, 동결란)
- ② 독립봉입 : 이식후 착상복합물을 추가적으로 자궁내로 주입하는 기술로써 양축가, 수정사, 수의사 등이 야외 수정란이식 현장에서 손쉽게 활용할 수 있음

③ 주입방법 : 일반 이식기구와 이식법을 활용할 수 있음

④ 지적재산권 활용 : 특허출원 10-2010-0011422, PCT출원 : PCT/KR2011/000800

상표출원 : Emferon. 40-2011-0008172호 : SemenAID

제 3 절 독립 스트로우내 IFN의 단일봉입 및 보존 기술 개발

1. 공동봉입기술 개발

가. 실험목적

제 2세부과제의 동일 스트로우내에 생식세포와 IFN을 공동봉입한 경우와는 달리, 기성 생식세포로써의 동결정액 또는 동결수정란을 산업 현장에서 활용함에 있어서, 이들 생식세포와 본 연구과제에서 개발된 착상유도물질로써 IFN을 동시에 자궁내로 주입할 때에는 IFN이 별도로 충전된 스트로우가 준비되어야 한다. 착상유도물질 또는 기타 목적물질을 별개의 straw내에 충전하는 방법으로써 동일한 스트로우내에 IFN 단일물질만으로 충전하는 방법과 IFN과 함께 기타 목적물질을 병렬(병치)된 독립구획으로 충전하는 방법이 있으며, 이들을 산업현장에 활용하기 쉽도록 개발하였다.

나. 실험방법

(1) IFN 및 봉입용 straw의 준비

- ① IFN 및 생식세포는 세부과제에서 제공된 IFN, 정액, 수정란을 준비하였다.
- ② 인공수정용 및 이식용에 활용되는 0.25ml, 0.50ml 용량의 straw를 준비하였다.

(2) 스트로우내 IFN의 단용봉입 기술

- ① 스트로우의 단일구획내에 IFN을 봉입하는 방법으로서는 0.25 또는 0.50ml의 스트로우내에 필요한 IFN량을 부형제에 용해한 후 정액을 충전하는 동일한 방법으로 면실부까지 흡인하여 봉입하였다(그림 17).
- ② 스트로우의 병렬구획내에 IFN을 봉입하는 방법으로서는 0.25 또는 0.50ml의 스트로우내에 필요한 IFN량을 부형제에 용해한 후 기타 목적물질을 공기방울로써 수개의 독립구획으로 교대하면서 면실부까지 흡인하여 봉입하였다(그림 15).

(3) IFN이 봉입된 스트로우의 보존 및 용해

- ① 냉장 또는 저온 냉동법으로써 별도의 예냉 또는 저온 처리의 과정없이 IFN이 충전된 스트로우를 보존용기에 담아 냉장고 또는 -20°C 의 냉동실에 보존하였다. 필요시에 실온에서 용해 후 목적에 따라 사용할 수 있는 방법으로 단기간에 한정된다.
- ② 초저온 냉동법으로써 별도의 예냉 또는 저온 처리의 과정없이 IFN이 충전된 스트로우를 보존용기에 담아 액체질소에 급속 침적하여 보존하였다. 정액보존용 액체질소통에 보존하는 방법으로 IFN의 역가가 장기간 유지되는 방법이다.
- ③ 상온 용해법으로서는 정액, 수정란의 용해에 앞서 외기에 수초간 노출하거나 정액용해용 온수에 수초 동안 침적하여 용해하였다.
- ④ 제1 세부과제의 IFN의 보존 기간에 따른 역가 변화를 고려할 때 냉장 보존 및 냉장 이송시에는 3일내, -20°C 에 보존하는 경우에는 7일내, 정액보존용 액체 질소에 보존시에는 6~12개월에 사용하는 것이 바람직하다.
- ⑤ 스트로우는 인공수정용 동결정액 보존용 질소 탱크내에서 외부로 노출 및 용해시에는 스트로우를 재동결하지 않는 것이 바람직하다.

다. 실험결과

(1) IFN 단용봉입 스트로우 개발

IFN 단용봉입 스트로우 모식도는 그림 17과 같다. 단수구획 봉입방법(그림 17의 1)은 0.25, 0.50ml의 스트로우내에 정액희석제 또는 이식용 미디어에 용해한 IFN을 공기방울 구획없이 충전하고 양단은 면실링과 sealing powder로 봉인하였다.

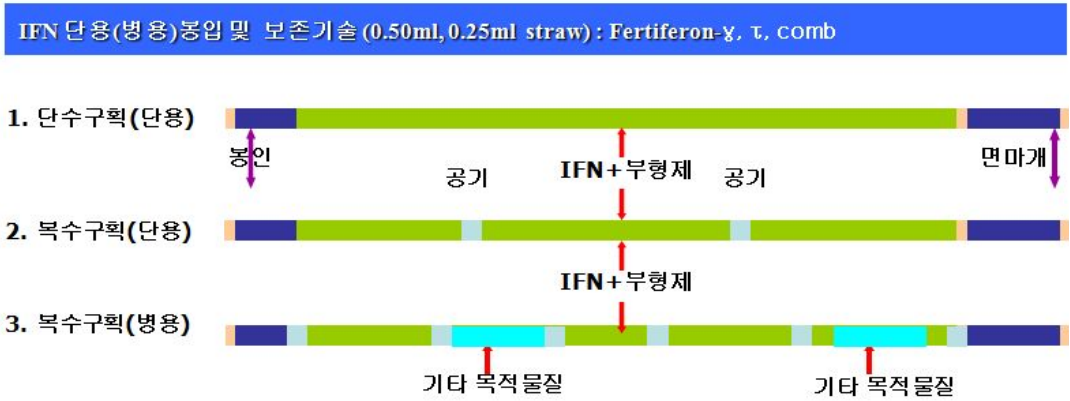
복수구획 단용봉입 방법(그림 17의 2)은 0.25, 0.50ml의 스트로우내에 정액희석제 또는 이식용 미디어에 용해한 IFN을 공기방울에 의하여 복수구획으로 충전하고 양단은 면실링과 sealing powder로 봉인하였다.

또한, 복수구획 병용봉입 방법(그림 17의 3)은 0.25, 0.50ml의 스트로우내에 정액희석제 또는 이식용 미디어에 용해한 IFN 또는 기타 목적물질을 공기방울에 의하여 복수구획으로 충전하고 양단은 면실링과 sealing powder로 봉인하였다.

이들 3가지 방법은 농협개량부에서 생산 공급된 기성 정액으로 인공수정을 실시한 후에 임신증진 목적을 위하여 IFN을 추가적으로 자궁내에 주입하거나, 수정란 생산업체에서 생산된 기성 수정란의 이식후 IFN을 추가적으로 자궁내에 주입할 수 있는 방법이다.

그림 17. IFN 단용(병용)봉입 스트로우 모식도

□ IFN 단용(병용)봉입 모식도



1. 동일한 스트로우내의 단일구획내에 IFN(중앙부 녹색)만을 단용 봉입하여 사용하거나 동결제품을 작성함
2. 동일한 스트로우내에 복수구획내에 IFN(중앙부 녹색)만을 단용 봉입하여 사용하거나 동결제품을 작성함
3. 동일한 스트로우내에 복수구획내에 IFN(녹색부)과 기타 목적물질(하늘색)을 병용 봉입하여 사용하거나 동결제품을 작성함

라. 연구 결과의 활용

(1) 인공수정 후 추가주입 기술의 활용

- ① 단용봉입 : IFN 등 착상복합물이 포함된 0.50ml 스트로우내 봉입법 및 주입방법
- ② 주입제품 : 인공수정 후 추가주입이 가능한 IFN 등이 봉입된 straw 제품
- ③ 주입방법 : 일반 인공수정기구와 주입법을 활용할 수 있으며, 또한 주입에 편리한 별도의 기구가 본 연구개발 과제에서 추가적으로 개발되었음
- ④ 지적재산권 : 특허출원 10-2010-0011422
PCT출원 : PCT/KR2011/000800

(2) 수정란이식후 추가이식 기술의 활용

- ① 단용봉입 : IFN 등 착상복합물이 포함된 0.25ml 스트로우내 봉입법 및 주입방법
- ② 봉입제품 : 수정란이식후 추가이식이 가능한 IFN 등이 봉입된 straw 제품
- ③ 주입방법 : 일반 수정란이식 후 추가적으로 이식함

(3) 지적재산권 : 상표출원 Emferon. 40-2011-0008172

- ① 스트로우내 IFN 단용봉입 기술의 발명
- ② 스트로우내 봉입된 IFN의 상표출원

(4) 실용화 제품 생산, 판매(계획)

- ① 인공수정용 : 내수 및 수출 ; 5,000/개, 5\$/straw
- ② 수정란이식용 : 내수 및 수출 ; 10,000/개, 10\$/straw

제 4절 정액과 IFN의 동시 주입용 기구 개발

1. 스트로우의 연결관 개발

가. 실험목적

본 연구 기술에 의하여 개발된 IFN과 생식세포가 동일한 straw내에 공동봉입된 경우에는 특별한 기술없이 대량으로 보급된 기성 주입기를 활용하면 IFN과 생식세포를 동시에 자궁내에 주입할 수 있다. 그러나, IFN과 정액이 각각 별도로 준비되어 있는 경우에는 이들을 자궁내에 동시에 주입하기 위해서 기성 정액 또는 수정란을 이식한 후에 또 다른 1회의 장착과정과 주입작업이 요구되므로 추가적인 시술에 따른 번거로움, 경비상승 및 자궁내로의 오염 등이 필연적으로 뒤따른다.

착상유도물질로서의 IFN을 번식현장에서 실용화하기 위하여 고려되어야 할 사항으로서 기성 생식세포가 봉입된 스트로우와 IFN 스트로우를 직접적으로 연결하고 동일한 주입기에 장착하여 1회의 주입과정으로 인공수정 또는 수정란 이식을 실시한다면 자궁내 오염 방지, 시술의 편리함, 경비절감의 이점을 동시에 달성할 수 있다. 이를 위하여 정액 스트로우와 IFN이 봉입된 스트로우를 동시에 연결할 수 있는 연결구(관)의 개발과 결합된 2개의 스트로우를 동시에 자궁내에 주입할 수 있는 효율적인 주입기를 개발하고자 한다.

나. 실험방법

(1) 기성정액과 IFN의 단용봉입형 스트로우의 연결관 개발

- ① 0.25ml, 0.50ml straw와 외경과 내경이 일치될 수 있는 폴리비닐관을 준비하였다.
- ② 연결관의 내경내에 IFN이 봉입된 스트로우와 정액 스트로우가 밀착되어 동시에 연결될 수 있는 방법으로써 ㉠직경이 동일한 연결관형, ㉡기성 정액의 straw의 한쪽 말단과 결합시에 감돈되게 IFN을 포함하는 straw의 끝부분을 넓힌 확장한 형태, ㉢straw의 끝부분을 좁힌 형태의 3가지 방법을 고안하였다.

(2) 동경형 연결관(Equivalent neck type connector) 개발

① 연결관의 형태 및 사용 방법(AIconnector)

- ㉠ 연결구의 제작은 0.25 또는 0.50ml 스트로우의 외경과 일치하는 내경을 가진 폴리비닐관을 15~20mm 길이로 제작한 연결용 관으로서 IFN 스트로우의 말단 결합부와 생식세포 스트로우의 끝부분이 연결구내부에서 서로 접촉하여 결합되는 방법으로써, IFN이 봉입된 스트로우에 결합한 후 면실 반대측 끝부분을 sealing powder로 봉인한다(그림 18).
- ㉡ 사용방법은 실링물질을 절단한 후 기성생식세포 스트로우를 결합하여 주입기에 장착한 후 자궁내로 삽입하며, 주입기의 피스톤을 조작시 누수가 발생하지 않고 저항감도 거의 발생하지 않는다.
- ㉢ 부착하지 않은 별도의 연결구는 각개로 멸균 포장하여 상용화하는 경우에는 2개의 기성정액 스트로우 또는 2개의 수정란 스트로우를 결합하여 1회의 주입조작에 의하여 시술을 완료할 수 있다.
- ㉣ 특히 다양한 목적물질을 생식세포와 동시에 결합하여 자궁내로 주입할 수 있는 중요한 장치이며, 야외 임상에서 손쉽게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

그림 18. 동경형 연결관(컨넥터) 모식도



1. 내경이 동일한 별도의 연결관(connector)이다(그림 중앙).
2. 정액 및 IFN 스트로우의 외경을 연결관의 내경안으로 결합한 후에 정액 주입기에 장착한다.

(3) 전구 확장형 연결관(Fallopian neck type straw : 광경형) 개발

① 광경형 IFN 봉입관의 연결구(관)의 형태 및 연결 방법

㉓ 전구 확장 방법

IFN이 봉입된 스트로우의 한쪽 말단을 가열, 신진, 성형하여 확장함으로서 기성정액 스트로우의 말단부가 IFN 스트로우의 확장부내로 감돈되도록 결합하는 방법으로서, IFN이 봉입된 스트로우의 면실 반대측 끝부분을 봉인한다(그림 19).

㉔ 연결 방법

사용방법은 실링물질을 절단한 후 기성 생식세포 스트로우에 결합하여 주입기에 장착한 후 자궁내로 삽입하며, 주입기의 피스톤을 조작시 누수가 발생하지 않지만 추진면실부가 결합부를 통과시 중등도의 저항감이 발생한다.

그림 19. 전구 확장형 스트로 연결 모식도



1. 그림 중앙의 2개의 스트로우의 결합 예정부를 절단한다(중앙).
2. IFN이 봉입된 스트로우 연결부(좌측)가 생식세포가 봉입된 스트로우(우측)의 외경내로 감입되게 결합한다.
3. 이어서 2차 절단부(우측)를 절단하고 정액 주입기에 장착한다.

(4) 협경형 IFN 봉입관의 연결구(관)의 형태 및 연결 방법

① 전구 협소형(Narrow neck type straw : 협경형)

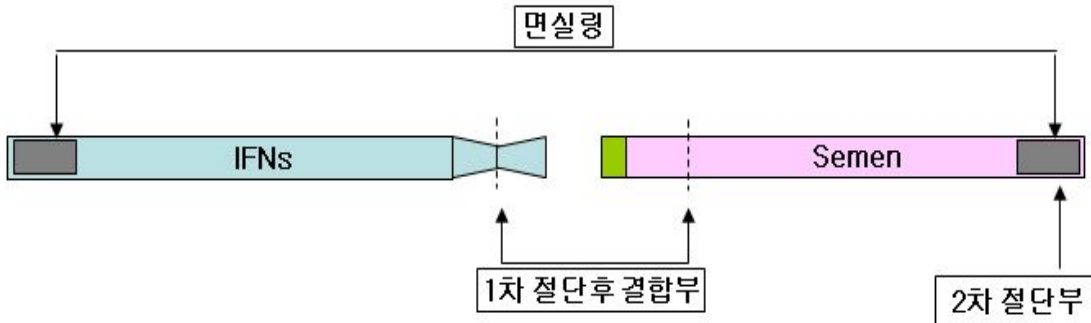
㉓ 전구 협소형의 제작 방법은 IFN이 봉입된 스트로우의 한쪽 말단을 가열, 신진, 성형하여 축소함으로서 기성정액 스트로우의 말단부내로 생식세포 스트로우의 내부로 감돈되게 결합될 수 있는 방법으로써, IFN이 봉입된 스트로우의 면실 반대측 끝부분을 봉인한다(그림 20).

② 연결 방법

㉓ 사용방법은 실링물질을 절단한 후 기성 생식세포 스트로우에 결합하여 주입기에 장착한 후 자궁내로 삽입하며, 주입기의 피스톤을 조작시 누수가 발생하지 않지만 추진면실부가 결합부를

통과 시 중등도의 저항감이 발생한다.

그림 20. 전구 협소형 스트로(협경형 straw) 연결 모식도



1. 그림 중앙의 2개의 스트로우의 결합 예정부를 절단한다(그림 중앙).
2. IFN이 봉입된 스트로우 연결부(좌측)가 생식세포가 봉입된 스트로우(우측)의 내경안으로 삽입되게 결합한다.
3. 이어서 2차 절단부(우측)를 절단하고 정액 주입기에 장착한다.

(5) 스트로우의 연결관 성능 평가

- ① 면실 통과도 시험은 정액 및 미디어가 봉입된 2개의 straw를 개발된 연결법에 따라 연결하고 정액주입기에 장착한 후 주입기 내심을 주입방향에 따라 추진하였을 때 손으로 느끼는 관능적 저항도를 평가하였다.
- ② 느껴지는 저항도를 일반적으로 정액 주입시와 비교하여 유사한 경우와 심한 정도에 따라서 중등, 경도 또는 없음으로 구분하였다.
- ③ 누수율 시험은 정액 및 미디어가 봉입된 2개의 straw가 장착된 주입기를 추진하였을 때 누출되는 내용물에 대하여 관능검사를 실시하였다.

다. 실험결과

(1) 스트로우 연결구의 형태가 누수율과 면실통과 저항도에 미치는 영향

기성 생식세포가 봉입된 스트로우와 IFN이 봉입된 각종 스트로우를 결합하여 개조된 주입기에 장착하여 자궁내에 주입하기 위한 결합부에서의 누수율과 면실 통과시의 저항도를 평가한 실험 결과는 표 8과 같다.

표 8. 스트로우 연결구의 특징, 누수율과 면실 통과성 시험(2단형 인공수정기 활용)

연결구형태	연결부 특징	결합방법	누수율		면실 통과 저항도
			시쓰 결합부	스트로 결합부	
협경형	스트로 내외경 대비 전구부 협소	생식세포 스트로 내부로 전구부를 압박하여 결합	0%	0%	중등도
확장형	스트로 내외경 대비 전구부 확장	생식세포 스트로 외부로 전구부를 압박하여 결합	0%	0%	없음~경도
동경형	스트로 내외경 대비 일정한 내경	생식세포 스트로 외부와 IFN 스트로 외부를 압박하여 결합	0%	0%	없음~경도

* 본 연구개발 과제에서 발명된 2단형 인공수정기에 결합하여 시험하였음

생식세포 스트로우와 결합한 각종 스트로우 연결부의 특징과 결합 방법 역시 표 8과 같다. 협경형, 확장형, 연결구형의 시쓰 결합부와 스트로우 결합부에서의 누수는 없었다. 또한, 2개의 스트로우가 결합된 부분에서 면실이 통과할 때의 저항도는 협경형에서 중등도, 확장형과 연결구형에서 경도로써, 협경형 스트로우에서 면실 통과시 다소의 어려움이 발생하였으나, 확장형과 연결구형에서는 저항감이 거의 발생하지 않았다.

특히 협경형 스트로우를 사용할 때 발생하는 저항감은 생식세포 스트로우의 내부로 감돈된 부분의 내경이 좁아져 면실의 통과가 어렵기 때문이므로, 보다 얇고 탄력성이 있는 폴리비닐판 스트로우를 개발하면 이 문제가 해결될 것으로 사료된다.

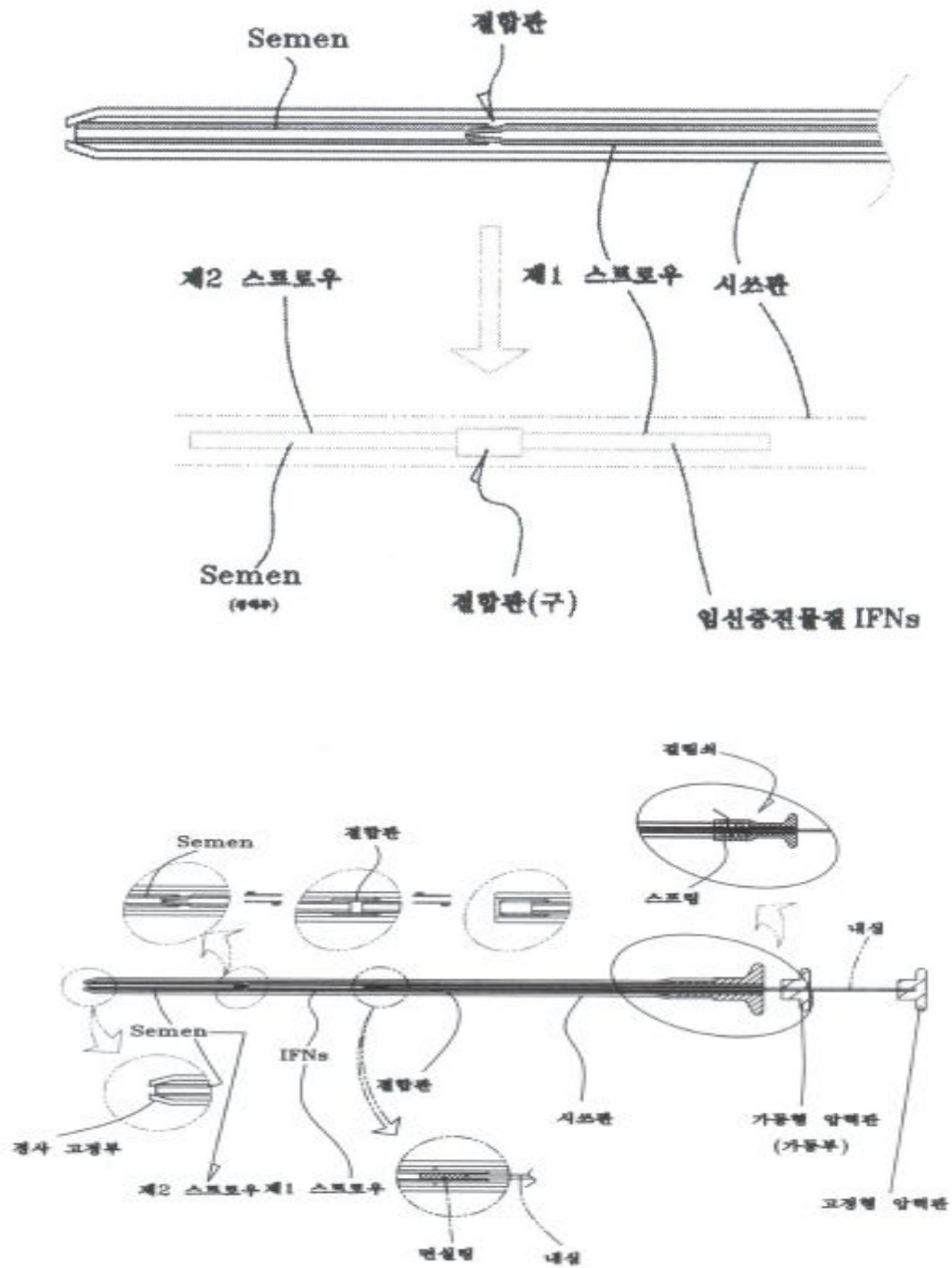
본 연구에서 연결구의 중요성은 차후 기술되는 바와 같이 주입기내에 동시에 장착하여 1회의 주입 조작에 절대적이므로 필요한 결합의 용이성, 연결부의 견고성, 결합부의 누수율, 결합부의 면실 통과성을 엄밀히 평가하여 제작되었다. 사용이 간편하고 응용이 용이한 스트로우 연결관을 우선적으로 개발 제작하여 추후 관련된 연구를 진행하였다.

이들 3가지형태의 스트로우(연결관)가 2단형 수정기에 결합된 모형은 그림 21과 같다. IFN 봉입 스트로우와 정액이 연결관에 의해 결합되면 인공수정기의 전방부에 기성정액이 장착되어 추진용 압력판을 전진시키면 정액이 먼저 자궁내로 주입되고 이어서 IFN이 주입되므로 1회의 시술로써 인공수정과 동시에 IFN을 주입할 수 있다.

또한, 동경형 연결관(그림 22) 10개씩을 1set으로 구성된 제품을 제작하여 인공수정 현장에서 손쉽게 활용할 수 있도록 제품 고안 및 상표 출원을 하였고 제품생산을 목전에 두고 있다.

(2) 2단형 수정기에 결합된 모형

그림 21. 2단형 수정기에 결합된 모형



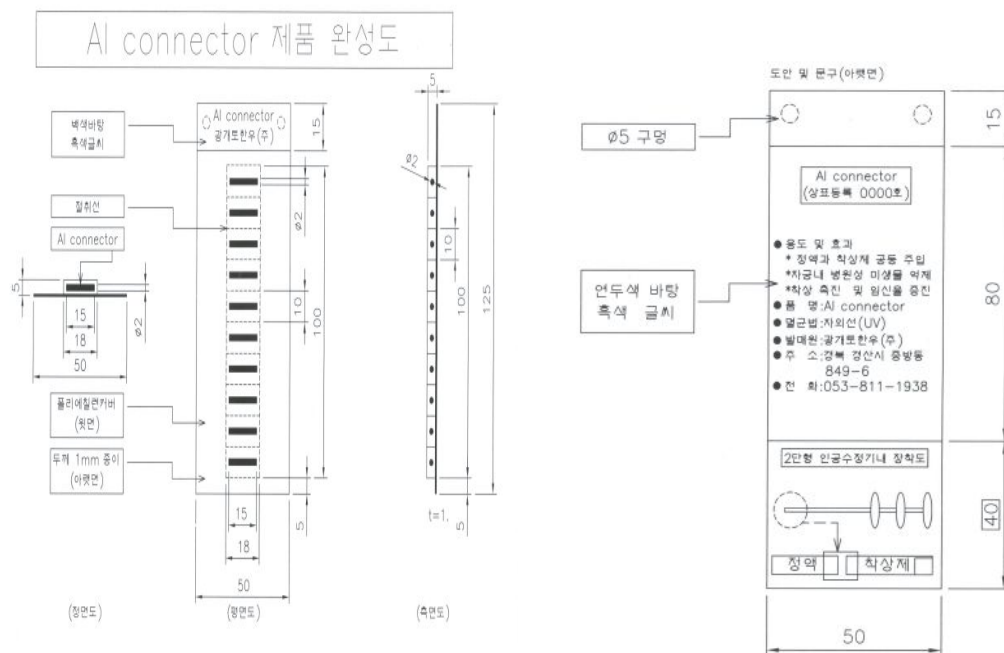
라. 연구 결과의 활용

(1) 인공수정 기술에 동경형 연결관의 활용

- ① 기성 정액과 단일구획 봉입 IFN straw를 동시에 연결 후 1개의 주입기에 장착
- ② 기성 수정란과 단일구획 봉입 IFN straw를 동시에 연결 후 1개의 주입기에 장착
- ③ 기성생식세포와 기타 목적물질 straw를 동시에 연결 후 1개의 주입기에 장착

(2) 동경형 연결관의 제품화

- ① 제품명 : AIconnector
- ② 용도 : 2단형 인공수정기내에 정액 straw와 IFN 봉입 straw를 동시에 결합하는 연결관으로써 인공수정 시에 1회의 주입으로 시술을 완료할 수 있는 제품
- ③ 그림 22. 동경형 연결관 제품 완성도



- 1. 전면도면(좌측) - 동경형 연결관이 10개씩 포장된 제품완성의 정면도, 평면도, 측면도이다.
- 2. 후면도면(우측) - 연결관 제품의 후면 도안 및 사용 설명서이다.

(3) 지적재산권 등록

- ① 특허등록 : 특허출원 10-2010-0011422
- ② 동경형 연결관의 상표등록 : AIconnector. 40-2011-0008170

2. 2단형 인공 수정기 개발

가. 실험목적

기존의 모든 인공수정기는 1개의 스트로우만을 장착하여 주입하도록 제작되어 있으므로 정액 및 IFN이 각각 봉입된 2개의 스트로우를 주입기에 장착하여 자궁내에 주입하기 위해서는 필수적으로 2회의 장착과 1회의 시술이 요구된다. 그러나, 기성주입기를 개조하여 2개의 스트로우를 동시에 장착한다면 1회의 주입으로써 인공수정 또는 수정란 이식을 완료할 수 있다. 따라서, 활용이 용이한 동시주입용 인공수정기구를 개발하고자 한다.

나. 실험방법

(1) 주입기 재료의 준비

- ① 고안된 주입기에 대하여 설계도를 의뢰하여 작성하였다.
- ② 외관 제작을 위한 stainless 재질관, 추진용 내심봉, 추진용 압력관에 사용할 원관을 시중에서 구입하였다.

(2) 가공 및 제작

- ① 설계도에 따라 각 재료를 선반가공 및 용접 등의 방법에 따라 시험제작을 의뢰하였다.

(3) 제작된 2단형 수정기의 특성

① 주입기의 내외관부 단축

기성 주입기의 내외관을 짧게 개조함으로써 기성 시쓰내에 2개의 스트로우를 결합하여 장착할 수 있도록 하였다. 기성 주입기에 장착된 시쓰의 모습은 외관부를 완전히 피복하지만 본 개조식 주입기에 장착된 시쓰의 모습은 스트로우 1개의 길이 만큼은 외관부를 피복하지 못하며, 2개의 시쓰 결합부를 육안적으로 확인할 수 있으며, 또한 시쓰의 전반부는 외관부 금속에서 노출되어 있으므로 굴신성이 매우 높았다.

② 추진기의 후반부 성형

개조식 주입기의 내심부 추진기의 후반부는 외관부의 단축된 길이만큼 더 길어지게 되며, 시술자가 피스톤을 추진시에 수반되는 파지의 어려움을 해소하기 위하여 가동형의 압력판을 추가로 장치한 것이다. 스트로우 길이만큼 내심 철선의 양면을 연마하여 레일형으로 성형하고 여기에 가동형 압력판을 설치하였다. 레일의 단면은 능형, 삼각형, 반월형이 가능하며, 본 발명품은 능형 또는 사각형이다.

③ 내심 추진판의 가동형 압력판 개발

레일형의 내심 철선의 양면에서 전후방으로 스트로우 길이만큼 활주할 수 있으며, 파지가 용이한 원형의 압력판을 설치하여 2단계의 압력판 조작에 의하여 피스톤을 전방으로 추진할 수 있었다.

④ 스트로우의 장착, 시쓰 고정 및 주입 방법

시쓰의 고정은 종래의 주입기가 내관에 의존하는 반면에 발명품은 외관부와 연결부의 압력에 의해서도 견고히 고정되는 특징이 있다. 스트로우의 장착 및 주입 방법으로서 2개의 스트로우를 먼저 결합하여 기성 시쓰내에 결합된 스트로우를 압박삽입한 후 주입기의 외관을 시쓰 후반부로부터 밀고 시쓰의 후반부를 결합부에 고정시킨 후 슬리브에 끼어 흡원보온을 유지한 상태로 이동하였다.

또한, 자궁내 주입 방법으로써 일반적인 인공수정 또는 이식의 방법에 따라 시술하며 주입기 술에 익숙해지는 데는 5~10회 정도의 시술이 필요하다.

(4) 성능 시험

① 연결된 straw에 수정용 시쓰를 씌운 후 개발된 주입기에 장착 후 직접적으로 이식에 적용하면서 주입기 전단부의 굴신성과 추진기의 가동상태를 평가하면서 수회에 걸쳐 결합을 보완하였다.

다. 실험결과

(1) 2단형 정액주입기의 특성 및 성능 평가

기성 생식세포가 봉입된 스트로우와 IFN이 봉입된 각종 스트로우를 결합하여 개조된 주입기에 장착하여 자궁내에 주입하기 위해 발명한 2단형 인공수정기의 특징과 성능을 평가한 결과는 표 9와 같다.

표 9. 정액주입기의 종류에 따른 특징 및 성능 평가

		특징			성능 평가	
주입기 종류	주입기 내심의 레일 설치	추진용 압력관 형태	장착 후 시쓰 피복 형태	전방부 굴신성	시쓰 사용량	자궁내 주입법
기성형 수정기	없음	고정형 1단 압박추진	완전 피복	없음	2개	독립주입 2회
2단형 수정기	원형+ 레일형	가동형 2단 압박추진	1/2 노출	45°	1개	동시주입 1회

일반적으로 인공수정과 수정란이식에 활용되는 주입기는 시쓰의 안쪽에 장착되어 시쓰가 꺾이거나 부러지지 않도록 지지하는 외관부, 생식세포가 봉입된 스트로우가 주입기 외관의 후반부로 밀리지 않게 고정되게 하는 내관부, 시쓰와 외관부를 고정시켜 주는 결합부, 내관부와 결합부 및 파지부를 고정시켜 주는 체부, 장착된 스트로우의 후반부 면실을 전방으로 추진시키는 내심(피스톤)부로 구성되어 있다.

한편, 기성 정액주입기와 2단형 인공수정기의 성능 평가에서 전방부 굴신성은 기성 정액주입기에서 선단부의 굴신성이 거의 없는 것에 비하여 2단형 인공수정기는 45° 정도이다. 생식세포와 IFN의 주입에 소모되는 시쓰량은 기성형에서 2개, 2단형에서는 1개였으며, 자궁내 주입 횟수는 기성형이 2회, 2단형이 1회이었다.

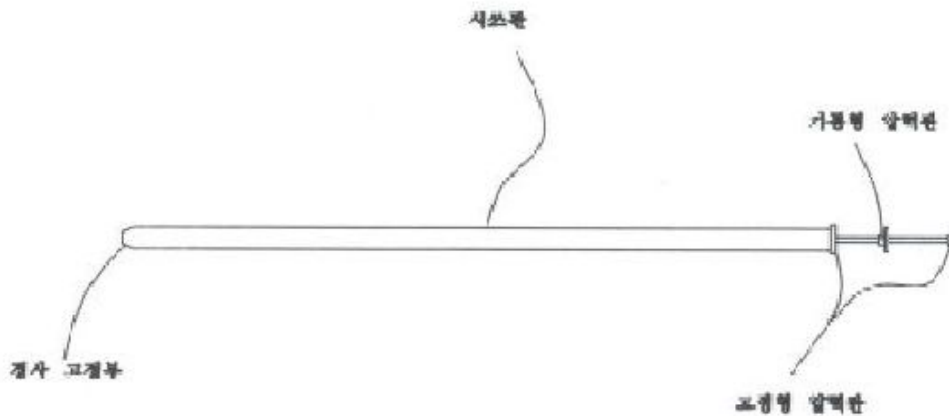
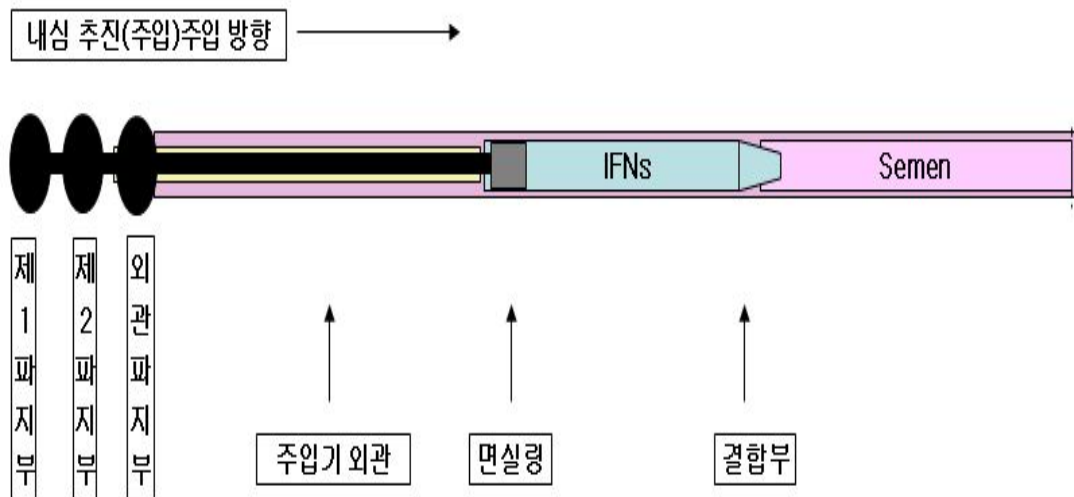
기성 정액주입기에서 선단부의 굴신성이 거의 없는 것에 비하여 2단형 주입기는 45° 정도를 굴신할 수 있으므로 주입 자궁각, 자궁내부에서의 주입 깊이 등을 적절히 조절하기가 매우 용이하며, 자궁내막의 상처를 적게 유발함으로써 임신성을 개선할 수 있다. 또한, 생식세포와 IFN의 주입에 소모되는 시쓰량을 1/2로 절감할 수 있으며, 자궁내 주입 횟수 역시 기성형에서 2회인 것에 비하여 2단형 주입기에서는 1회로써, 시술에 소요되는 시간과 노력이 절감되어 편리한 효과가 있었다.

(2) 2단형 인공수정기의 발명

발명한 2단형 인공수정기의 모식도, 완성도는 그림 23과 같으며, 난선고정식(그림 24)과 버튼 고정식(그림 25)의 2종류를 시험 제작하였다. 기성형 정액주입기에 비하여 발명된 2단형 인공수정기의 특징으로써 주입기 내심은 원형부와 양측면을 가공한 레일부로 구성되어 있으며, 피스톤을 전후방으로 추퇴할 수 있는 가동형 압력관을 레일부에 설치하여 전후 10cm 정도 자유

롭게 가동할 수 있고, 주입기의 내심을 2단계로 압박추진이 가능한 점과 시쓰, 정액 스트로우, IFN 스트로우, 주입기를 결합한 후의 형태는 주입기의 전반부에 장착된 정액주입부가 주입기의 외관내에 완전 매몰되지 않고 시쓰와 스트로우가 결합된 상태로 노출되어 굴신성이 뛰어난 3가지의 중요한 특징이 있다.

그림 23. 2단형 인공수정기 모식도 및 완성도 : CombiGun™



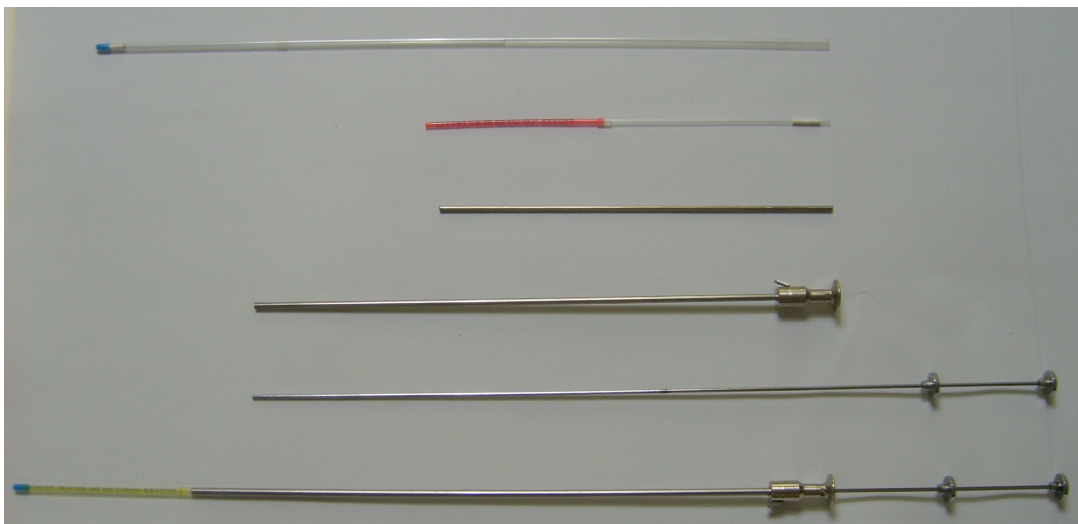
1. 생식세포가 봉입된 스트로우와 IFN이 봉입된 스트로우를 동시에 장착하여 1회의 시술로써 자궁내로 주입할 있는 2단형 인공수정기이다.
2. 후방부, 결합부, 전방부의 3부분으로 구성되어 있으며, 중반부에 기성정액과 IFN straw가 연결관에 의하여 결합된 상태로 장착되며, 정액이 장착된 전방은 굴신성이 확보된다.
3. 제 1, 3 파지부는 수정기에 고정된 반면에 제 2파지부는 가동형 압력판, 압력판을 전후로 활주하도록 설계된 레일부, 주입기 전방부의 우수한 굴신성이 본 특허발명품의 특징이다.
4. 2단형 인공수정기의 완성된 모습이다(하단그림).

그림 24. 2단형 인공수정기 시험제작품 사진 : CombiGun™(나선 고정식)



1. 2단형 인공수정기와 시쓰를 고정하는 부분이 나선식으로 되어 시쓰를 회전하여 고정시키는 장치가 부착된 정액주입기 부품 및 결합후의 실제 형태
2. 하단에서부터 완전히 장착된 형태, 2번째는 가동형 압력판과 레일유도형으로 가공된 내심(추진기), 3번째는 수정기의 외관, 4번째는 내심유도관, 5번째는 정액스트로우와 IFN 스트로우가 동경형 연결관에 의해 결합된 모습, 6번째는 시쓰내에 스트로우 2개가 결합된 그림이다.

그림 25. 인공수정기 시험제작품 사진 : CombiGun™(버튼 고정식)



1. 버튼식 고정기가 부착된 정액주입기 부품 및 결합후의 실제 형태로써 시쓰와 2단형 수정기를 결합하는 부분이 버튼형으로 된 점이 상기 그림의 나선식과의 차이점이다.
2. 위로부터 2개 스트로우가 결합된 시쓰, 결합된 스트로우, 내심유도관, 외관, 가동판이 설치된 레일형 내심, 완전히 장착된 형태이다.

라. 연구 결과의 활용

(1) 인공수정에의 활용

- ① 기성 정액과 단일구획 봉입 IFN straw를 동시에 1개의 주입기에 장착 후 자궁내 주입이 가능하므로 인공수정에 IFN 활용
- ② 기성 수정란과 단일구획 봉입 IFN straw를 동시에 1개의 주입기에 장착 후 자궁내 이식이 가능하므로 수정란 이식에 IFN 활용
- ③ 2 배수의 기성 생식세포를 동시에 1개의 주입기에 장착 후 자궁내 주입, 이식이 가능하므로 다배란처리 후 인공수정 및 수정란 이식에 의한 쌍자 생산에 활용
- ④ 기성 생식세포와 기타 목적물질 straw를 1개의 주입기에 장착 후 자궁내 주입 및 이식이 가능하므로 야외 임상 및 시험에 활용
- ⑤ 야외 시험에서 IFN 다양한 용량 시험 및 기타 목적물질과의 융복합 시험에 활용

(2) 지적재산권

- ① 특허출원 : 10-2010-0011422
-소 생식세포와 임신증진물질을 동시 장착 후 1회로 자궁내에 주입이 가능한 2단형 인공수정기
- ② PCT 특허출원 : PCT/KR2011/000800, 출원일 2011.02.08
-소 생식세포와 임신증진물질을 동시 장착 후 1회로 자궁내에 주입이 가능한 2단형 인공수정기
- ③ 상표출원 : Combigun. 40-2011-0008171

(3) 제품화

- ① 시작품 제작 : 20개 제작 후 성능 시험 중
- ② 내수 및 수출 예정 : 30,000원/개, 30\$/ea

제 5 절 최적의 수란우 관리 기술 개발

수정란 이식 후 임신에 미치는 영향에 대한 평가 방법은 연구의 목적과 각 연구자마다 다양한 분류 기준을 설정한다. 수정란 이식 후 임신에 미치는 영향에 대해 종합적으로 검토하여 수란우, 사양관리, 이식기술, 수정란의 4가지 요인으로 대별하고 각 요인과 변인을 세분하여 평가

할 필요가 있다.

특히, 본 연구의 세부과제에서 개발된 IFN과 수정란을 공동으로 이식한 후 각 요인이 임신율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실제 임상에서 판정이 용이하고 임상적 관련성이 높아 일반적으로 널리 활용할 수 있는 요인들을 대별하여 평가할 필요가 있다.

또한, 수정란과 IFN 공동이식시 자궁내의 미생물학적 변화, 황체 호르몬적 변화, 황체의 형태학적 변화도 병행하여 평가할 필요가 있다.

1. IFN과 수정란의 공동이식시 수란우 및 사양관리 요인이 임신에 미치는 영향

가. 실험목적

수정란 이식에 있어서 최종적인 임신율을 좌우하는 중요한 요소로서 수란우의 비중은 매우 높다. 본 연구과제에서 수행한 각 세부과제의 결과물을 활용하여 최종적으로 수정란 이식을 실시함에 있어서 임신에 미치는 수란우의 중요한 요인들을 대별하였고, IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 변인들에 따르는 임신 결과를 판정하기 위하여 본 세부 과제를 수행하였다.

나. 실험방법

(1) 수란우 준비와 선발

- ① 수란우는 미경산 유우 365두, 경산 유우 38두를 선발하였다.
- ② 선발된 수란우는 시험목적에 따라 발정관리와 적합한 사양관리를 실시하였다.

(2) IFN과 수정란이식 후 임신율에 영향을 미치는 요인 분류

① 임신율에 영향을 미치는 수란우 요인

- ㉠ 산차 : 분만 경력을 기준으로 미경산, 경산
- ㉡ 발정형태 : 증가허용을 기준으로 용모발정, 둔성발정
- ㉢ 발정경과일 : 증가허용일을 기준으로 Day0~Day9
- ㉣ 황체등급 : 황체크기와 크라운 유무를 기준으로 A, B, C
- ㉤ 발정 자궁각 : 황체가 위치한 수란우의 좌측 또는 우측 자궁각
- ㉥ 신체충실도 : 살 붙임 정도를 기준으로 수척, 적정, 과비

② 임신율에 영향을 미치는 사양관리 요인

- ㉠ 이식계절 : 월령 기준으로 봄(3~5), 여름(6~8), 가을(9~11), 겨울(11~2)
- ㉡ 백신접종 : BVDV를 포함하는 백신 실시 여부를 기준으로 실시, 비실시
- ㉢ 조사료 종류 : 급여 건초를 기준으로 건초, 볏짚

③ 임신율에 관한 통계처리는 χ^2 -test를 실시하였고, $P < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

다. 실험결과

(1) IFN과 수정란의 공동이식시 수란우 요인이 임신에 미치는 영향

표 10. IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 산차가 임신에 미치는 영향

산차	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
	미경산	133	65	48.9 ^b	44	30	68.2 ^a	44	31	70.5 ^a	44	23	52.3	100	53
경산	19	9	47.4	3	1	33.3	3	1	33.3	1	0	0.0	12	6	50.0

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, $P < 0.05$

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 산차에 따른 임신율은 표 10과 같다. 미경산군과 경산군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 48.9%, 47.4%이었으며, G1군에서 각각 68.2%, 33.3%이었으며, G2군에서 각각 70.5%, 33.3%이었으며, T1군에서 각각 52.3%, 0.0%이었으며, T2군에서 각각 53.0%, 50.0%이었다.

한편, IFN의 공동이식시의 IFN의 종류와 첨가량에 따른 미경산우의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나($P < 0.05$) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여, IFN 감마 1만, 2만 IU를 미경산우에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

수란우의 산차간에 임신율의 차이가 없다는 보고(Dochi 등, 1998; Chagas 등, 1999)와 경산우(70.6%)가 미경산우(59.1%)보다 오히려 임신율이 높다는 보고(황 등, 2004)가 있다. 그러나 미경산우가 경산우에 비해 임신율이 유의적으로 높다(Hasler, 2001)는 보고가 있다. 이것은 미경산우가 자궁의 상태가 양호하고 경산우에 비해 영양적인 스트레스를 적게 받기 때문이라고 하였다.

(2) IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 발정형태가 임신에 미치는 영향

표 11. IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 발정형태가 임신에 미치는 영향

발정형태	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
용모	137	65	47.4 ^b	47	31	66.0 ^a	37	26	70.3 ^a	45	23	51.1 ^{ab}	107	57	53.3 ^{ab}
둔성	150	10	6.7 ^b	47	31	66.0 ^a	10	6	60.6 ^a	0	0	0.0	5	2	40.0 ^{ab}

**G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 발정형태에 따른 임신율은 표 11과 같다. 용모군과 둔성군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 47.4%, 6.7%이었으며, G1군에서 각각 66.0%, 66.0%이었으며, G2군에서 각각 70.3%, 60.6%이었으며, T1군에서 각각 51.1%, 0.0%이었으며, T2군에서 각각 53.3%, 40.0%이었다.

한편, IFN의 공동이식시의 IFN의 종류와 첨가량에 따른 용모발정 및 둔성발정우의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여, IFN 감마 1만, 2만 IU를 발정형태에 관계없이 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

발정 발견은 수정란 이식에 있어서 이식시기를 결정하는 중요한 지표이며 생식기의 기능이 정상적인 경우는 외부적 발정징후가 쉽게 탐지된다. 그러나 본 연구에서와 같이 발정 발견의 실패 또는 발정 증상이 없더라도 외음부의 출혈을 확인한 경우(둔성발정)에는 약 2일 전 (22.2±8시간)에 발정이 왔던 것으로 산정하여 수정란 이식을 한 경우에도 용모발정과 비슷한 임신율을 얻을 수 있었기 때문에 수정란 이식에 충분히 활용할 수 있다고 사료된다.

(3) IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 발정경과일이 임신에 미치는 영향

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 발정경과일에 따른 임신율은 표 12와 같다. Day6군, Day7군, Day8군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 40.0%, 48.4%, 43.9%이었으며, G1군에서 각각 62.5%, 71.4%, 55.6%이었으며, G2군에서 각각 42.9%, 74.2%, 66.7%이었으며, T1군에서 각각 50.0%, 60.0%, 60.0%이었으며, T2군에서 각각 57.1%, 54.7%, 42.1%이었다.

표 12. IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 발정경과일이 임신에 미치는 영향

발정경과일	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
Day 6	15	6	40.0	8	5	62.5	7	3	42.9	4	2	50.0	7	4	57.1
Day 7	95	46	48.4 ^b	28	20	71.4 ^a	31	23	74.2 ^a	36	18	60.0 ^{ab}	86	47	54.7 ^{ab}
Day 8	41	18	43.9	9	5	55.6	9	6	66.7	5	3	60.0	19	8	42.1

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

한편, IFN의 공동이식시의 IFN의 종류와 첨가량에 따른 Day 6, 7, 8의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여, IFN 감마 1만, 2만 IU를 Day 7, 8에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구와 같이 수란우의 일령이 7일인 경우가 6일과 8일인 경우보다 유의적으로 임신율이 높다는 보고(Hasler, 2001)가 있다. 임신율은 이식시의 이식동기화 등 여러 요인에 의해 영향을 받을 수 있기 때문에 발정경과일수 자체의 의미는 물론 이식동기화를 위한 중요한 지표로 활용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

(4) IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 황체등급이 임신에 미치는 영향

표 13. IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 황체등급이 임신에 미치는 영향

황체등급	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
A	100	48	48.0 ^b	43	29	67.4 ^a	45	31	68.9 ^a	38	18	47.4 ^{ab}	99	53	53.5 ^{ab}
B	13	3	23.1 ^b	4	2	50.0 ^{ab}	2	1	50.0 ^{ab}	7	5	71.4 ^a	12	6	50.0 ^{ab}

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 황체등급에 따른 임신율은 표 13과 같다. 황체등급A군과 황체등급B군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 48.0%, 23.1%이었으며, G1군에서 각각 67.4%, 50.0%이었으며, G2군에서 각각 68.9%, 50.0%이었으며, T1군에서 각각 47.4%, 71.4%이었으며, T2군에서 각각 53.5%, 50.0%이었다.

한편, IFN의 공동이식시의 IFN의 종류와 첨가량에 따른 황체 A등급의 임신율은 감마군이 대조군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보였으며, 또한 감마군과 타우군에서도 유사한 소견을 보여, 황체 A 또는 B등급군의 경우에도 IFN 감마를 공동이식하면 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

황체가 뚜렷하게 형성된 것은 progesterone 분비가 왕성하여 이식 후 임신율을 향상시킨다(석 등, 1983; 황 등, 2004)고 하였다. 이와는 달리 황체상태가 A, B 및 C등급에서 각각 54.2%, 42% 및 60%의 임신율을 나타냈다는 보고(Niemann 등, 1985)도 있다. 이는 대부분 야외 임상 의 실제상 황체의 등급 평가를 수기적 촉진법에 의존하기 때문에 시술자의 평가 차이에 기인하는 것 같다.

초기 임신동안 소 배아는 황체용해기전을 억제시키는 interferon-tau라는 단백질을 반드시 생산해야 한다. 황체용해억제의 실패는 임신실패의 가장 중요한 요인이 이므로 배아는 황체용해를 막기 위해 16일까지 interferon-tau를 충분히 분비해야 한다(Mann GE 등, 1999). 자궁내면역 세포의 분포와 사이토카인 생산은 초기 임신 중 모두 변화하고, 착상과 배아(태아)에 대한 모체의 면역반응을 방지하는데 중요한 IFN-tau는 소의 초기임신 중 자궁내 면역세포의 재분포에는 기능을 수행하지 않는다(Leung ST 등, 2000).

(5) IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 자궁각방향이 임신에 미치는 영향

표 14. IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 자궁각방향이 임신에 미치는 영향

자궁각방향	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
좌측	65	29	44.6 ^b	23	16	69.6 ^a	27	11	40.7 ^b	27	11	40.7 ^b	48	28	58.3 ^{ab}
우측	87	40	46.0	24	15	62.5	18	12	66.7	18	12	66.7	64	31	48.4

**G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 자궁각방향이 따른 임신율은 표 14와 같다. 좌측군과 우측군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 44.6%, 46.0%이었으며, G1군에서 각각 69.6%, 62.5%이었으며, G2군에서 각각 40.7%, 66.7%이었으며, T1군에서 각각 40.7%, 66.7%이었으며, T2군에서 각각 58.3%, 48.4%이었다.

한편, IFN의 공동이식시의 IFN의 종류와 첨가량에 따른 자궁각방향이 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을

보여, IFN 감마 1만, 2만 IU를 우측 자궁각에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

자연임신의 경우에도 우측자궁의 임신율이 다소 높은 경향(Ghafouri 등, 1980)을 보이며 우측 자궁각에 이식한 수란우의 임신율이 좌측 자궁각에 이식한 경우보다 약간 높다는 보고(황 등, 2004)가 있다. 이것은 이식 시 시술자의 수기적 조작 과정의 용이성 때문인지 우측 난소의 기능이 더 활발하기 때문인지는 불분명하다. 한편, 자궁의 좌우 방향성과는 별도로 황체 반대측의 자궁각에 이식되었을 경우에는 두 자궁각 사이의 progesterone 농도 차이(Pope 등, 1982; Weems 등, 1988)와 황체와 자궁각의 부조화로 인해 태아 생존력이 낮다고 하였다(Campo 등, 1983).

(6) IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 신체충실도가 임신에 미치는 영향

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 신체충실도에 따른 임신율은 표 15와 같다. 걱정군과 미흡군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 47.3%, 33.3%이었으며, G1군에서 각각 62.8%, 50.0%이었으며, G2군에서 각각 70.7%, 42.9%이었으며, T1군에서 각각 51.2%, 50.0%이었으며, T2군에서 각각 55.1%, 40.0%이었다.

표 15. IFN과 수정란의 공동이식시 수란우의 신체충실도가 임신에 미치는 영향

신체충실도	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
적정	131	62	47.3 ^b	43	27	62.8 ^{ab}	41	29	70.7 ^a	43	22	51.2 ^{ab}	107	59	55.1 ^{ab}
미흡	21	7	33.3	4	2	50.0	7	3	42.9	2	1	50.0	5	2	40.0

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

한편, IFN의 공동이식시의 IFN의 종류와 첨가량에 따른 신체충실도 걱정군의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여, IFN 감마 1만, 2만 IU를 걱정군에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

수정란은 착상된 후 태아 성장에 필요한 영양분을 모체로부터 공급받아야 하므로 영양상태가 나쁜 수란우는 태아 성장과 임신진행을 최적 상태로 유지할 수 없고 수정란 이식 효율에 나쁜 영향을 미친다(Dunn, 1980). 신체충실지수가 2~3일 때 53~55%의 임신율을 나타내어 1

과 4이상의 신체충실지수의 임신율보다 유의하게 높다는 보고(Mapletoft 등, 1986)가 있다. 따라서, 수란우를 선정할 때에 너무 야위거나 과비된 소는 제외하는 것이 임신율 향상에 도움이 될 것으로 사료된다.

(7) IFN과 수정란의 공동이식시 이식계절이 임신에 미치는 영향

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 이식계절에 따른 임신율은 표 16과 같다. 봄군, 여름군, 가을군, 겨울군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 46.2%, 48.9%, 0.0%, 48.0%이었으며, G1군에서 각각 72.7%, 50.0%, 0.0%, 0.0%이었으며, G2군에서 각각 0.0%, 68.9%, 50.0%, 0.0%이었으며, T1군에서 각각 0.0%, 0.0%, 50.0%, 57.1%이었으며, T2군에서 각각 0.0%, 0.0%, 50.7%, 56.1%이었다.

여름철의 임신율(77.3%)이 겨울철보다 높다(Schneider 등, 1980)는 보고와는 달리 계절에 따른 임신율의 차이가 없다(Hasler, 2001; Putney 등, 1988)고 하였다. 또한 25℃ 이상의 기온은 소의 임신율과 수정란생산 능력에 나쁜 영향을 미친다는 보고(Tucker, 1982)가 있다. 자연 상태하의 소의 번식율이 봄에서 초여름 사이가 다른 계절에 비해 좋은 것과 같이 수정란 이식에 있어서도 같은 경향(이 등, 1989)을 보인다고 하였다.

표 16. IFN과 수정란의 공동이식시 이식계절이 임신에 미치는 영향

이식계절	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
봄	39	18	46.2 ^b	33	24	72.7 ^a	0	0	0.0	0	0	0.0	0	0	0.0
여름	88	43	48.9 ^b	14	7	50.0 ^{ab}	45	31	68.9 ^a	0	0	0.0	0	0	0.0
가을	0	0	0.0	0	0	0.0	2	1	50.0	38	19	50.0	71	36	50.7
겨울	25	12	48.0	0	0	0.0	0	0	0.0	7	4	57.1	41	23	56.1

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

본 연구의 결과에서 여름군이 비록 겨울군보다는 임신율이 유의적으로 높았으나(P<0.05) 우리나라의 경우는 7, 8월의 여름철이 고온다습하여 임신율 저하가 일반적인 현상이므로 적어도 6월말 이내로 이식시기를 조절하는 것이 바람직하다고 사료된다.

(8) IFN과 수정란의 공동이식시 백신접종이 임신에 미치는 영향

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 백신접종에 따른 임신율은 표 17과 같다. 접종군과 미접종군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 48.0%, 50.0%이었으며, G1군에서 각각 67.6%, 61.5%이었으며, G2군에서 각각 65.8%, 77.8%이었으며, T1군에서 각각 52.0%, 50.0%이었으며, T2군에서 각각 52.6%, 53.3%이었다.

한편, IFN의 공동이식에 따른 백신접종군의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 IFN 감마를 백신접종군에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

표 17. IFN과 수정란의 공동이식시 백신접종이 임신에 미치는 영향

백신접종	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
접종	148	71	48.0 ^b	34	23	67.6 ^a	38	25	65.8 ^a	25	13	52.0	97	51	52.6
미접종	4	2	50.0	13	8	61.5	9	7	77.8	20	10	50.0	15	8	53.3

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

소전염성비기관염(IBR) 불활성백신을 소에 접종한 결과 IBR 백신 접종 후 21일과 2차 접종 후 3주에 항체역가는 약 4배인 1:16~1:128이 되어 높은 면역형성을 하고 자궁내의 태아도 역시 이 virus에 감염되지 않는다(Pospisil 등, 1996)고 하였다. 또한 생독백신을 실시하면 4주안에 신속한 면역 반응을 유기할 수 있지만(Kovacs 등, 2003) 생독백신은 유산, 태아감염, 면역억제 및 호흡기 증상과 같은 부작용을 초래할 수도 있다(Nettleton과 Entrican, 1995; Oirschot 등, 1999)고 하였다. 또한 소바이러스점막병(BVD)을 효과적으로 예방하기 위해서는 BVDV 백신접종이 필수적이며(Bolin, 1995), 인공수정 4주전에 생독백신을 안전하게 적용할 수 있다는 보고(Kovacs 등, 2003)로 보아 수정란 이식을 위해서는 백신 접종 후 4주 이상 경과한 후에 이식을 실시하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

(9) IFN과 수정란의 공동이식시 조사료가 임신에 미치는 영향

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 조사료에 따른 임신율은 표 18과 같다. 벧짚군과 건초군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 42.9%, 49.2%이었으며, G1군에서 각각 44.4%, 71.1%이었으며, G2군에서 각각 54.5%, 72.2%이었으며, T1군에서 각각 50.0%, 51.3%이었으며, T2군에서 각각 40.0%, 54.6%이었다.

한편, IFN의 공동이식에 따른 건초군의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 IFN 감마를 건초군에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있음을 알 수 있다.

표 18. IFN과 수정란의 공동이식시 조사료가 임신에 미치는 영향

조사료	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
벚짚	28	12	42.9	9	4	44.4	11	6	54.5	6	3	50.0	15	6	40.0
건초	124	61	49.2 ^b	38	27	71.1 ^a	36	26	72.2 ^a	39	20	51.3 ^{ab}	97	53	54.6 ^{ab}

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

벚짚은 조사료의 특성상 이용될 수 있는 섬유소의 양과 품질에 있어서 건초에 비해 현저히 떨어지며 그 섭취량에 있어서도 건초의 약 1/2에 불과하므로 섭취하여야 할 적정 건물량의 부족을 일으킨다. 양질의 조섬유 부족은 임신에 필요한 수란우의 만성적인 영양부족과 조농비의 불균형으로 인한 혈중 요소농도(자궁내 암모니아) 증가를 유발하여 난자 또는 초기 수정란의 사멸에 직접적으로 독성작용을 일으킬 수 있다(McEvoy 등, 1997). 우리나라의 축산 여건이 비록 어렵지만 수정란이식을 위한 수란우의 사육에는 본 연구에서와 같이 고품질의 조사료를 충분히 급여하고 벚짚위주의 조사료 급여는 지양하여야 할 것으로 사료된다.

2. 자궁내 IFNs 주입시의 황체에 미치는 영향 평가

가. 실험목적

IFN의 자궁내 투입 후 황체호르몬 수준에 대한 영향성을 평가하기 위하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) IFN의 자궁내 투여

- ① 수란우는 생후 13개월 이상 미경산 유우를 각 군당 3두씩 4군으로 편성하여 발정을 유기하여 용모발정이 확인된 개체만 선발하였고, 수정란 이식에 적합한 사양조건을 확립하였다.
- ② 발정 7일의 수란우에게는 일반적인 이식방법을 준용하였고, 수정란의 준비는 세부과제에서 기술한 바와 같이 항동해제만 포함된 동결수정란을 직접용해 이식법을 실시하였다.

- ③ IFN은 0.25ml 이식용 스트로우에 IFN-감마 2만 단위, 타우 2만 단위, IFN-감마 2만+타우 2만 단위를 이식용 미디어에 첨가하여 동결보존 후 이식시에 용해하였다.
- ④ IFN의 자궁내 주입은 별도의 이식기에 장착하여 수정란이식 직후에 이식과 같은 방법으로 자궁내에 주입하였다.
- ⑤ 동결수정란만 이식한 대조군, 동결수정란 이식후 IFN-감마 2만 단위(G2군), 동결수정란 이식후 IFN-타우 2만 단위(T2군), 동결수정란 이식후 IFN-감마 2만+IFN-타우 2만 단위(G2T2군)를 각각 추가 이식하였다.

(2) 혈액 채취

- ① 상기 4군 12두의 수란우는 이식일부터 3일 간격으로 발정주기의 25일까지 경정맥으로부터 7~10ml의 혈액을 채취하였다.
- ② 채취된 혈액은 원심분리후 2ml의 Effendrof tube에 넣어 샘플번호를 기록하고 혈청을 냉동보존하여 혈중 progesterone 분석에 제공하였다.
- ③ 혈액채취는 초음파 진단일과 병행하여 실시하였다.

(3) 황체형태 판정

- ① 이식후 발정재귀를 판정하기 위하여 새벽, 정오, 오후에 수란우의 승가행동, 질점액 배출, 울음, 미근부의 승가 흔적을 확인하였다.
- ② 상기 공시우 12두는 이식일로부터 발정주기의 24일까지 3일간격으로 초음파 진단장비(7MZ, Medison, Korea)를 활용하여 황체와 난포의 형태를 확인하고 초음파영상을 촬영하여 개체번호와 일시를 기록하였다.
- ③ 이식 후 30일에 초음파검사를 실시하여 양막낭의 초음파 영상으로 임신판정을 하였다.

(4) 황체호르몬 분석(프로게스테론 ELISA)

- ① 96-well Immunoplate(Nunc, NY)를 준비한 다음 1 µg/ml 농도로 프로게스테론에 대한 capture antibody를 PBS에 희석하여 100 µl씩 넣은 다음 하룻밤 사이 상온에서 보관하여 coating하였다. 플레이트의 capture antibody를 제거한 후에 3% BSA를 포함하는 PBS를 200 µl 넣어준 다음 상온에서 2시간 동안 보관하여 blocking하였다.
- ② 혈청 중의 프로게스테론을 측정하기 위하여 샘플을 1/5로 PBS희석하여 100 µl씩 well에 넣어주고 상온에서 2시간 동안 보관하여 capture antibody에 binding시켰다. 1% tween-20을 포함하는 PBS를 이용하여 각 well을 3회에 걸쳐 린스하였다.
- ③ 비오틴화된 프로게스테론에 대한 detection antibody를 0.2 µg/ml의 농도로 희석한 다음 각

well에 100 μ l씩 넣은 다음 상온에서 2시간 동안 binding시켰다. 다시 린스를 3회 수행한 다음 Streptavidin-HRP를 1/5000으로 PBS에 희석하여 각 well에 100 μ l씩 넣은 다음 상온에서 40분 간 binding시켰다.

④ 다시 린스를 3회 수행하고 tetramethyl benzidine(TMB) solution을 각 well에 100 μ l씩 넣은 다음 10분 가량 발색을 기다린 후, 발색이 충분히 진행되고 난 후에 1N의 H₂SO₄ 용액을 각 well에 100 μ l씩 넣은 다음 microplate reader를 이용하여 450nm 파장에서 optical density (OD)값을 측정하였다.

다. 실험결과

(1) 자궁내 IFN 주입이 황체 형태에 미치는 영향

발정주기의 7일에 동결수정란을 이식후 IFN을 추가적으로 자궁내로 주입한 후 황체의 형태학적 변화에 관한 초음파 영상 소견은 그림 26, 27, 28에서 보는 바와 같이 Day 7~Day 13에서의 황체의 형태적 변화는 거의 관찰되지 않았다. 그러나, Day 19~Day 21의 황체의 형태학적 변화에 관한 초음파 영상 소견은 임신된 개체를 제외하고 황체의 퇴행이 관찰되었다.

그림 26. 자궁내 동결수정란과 IFN 주입 후 G2군의 초음파 영상

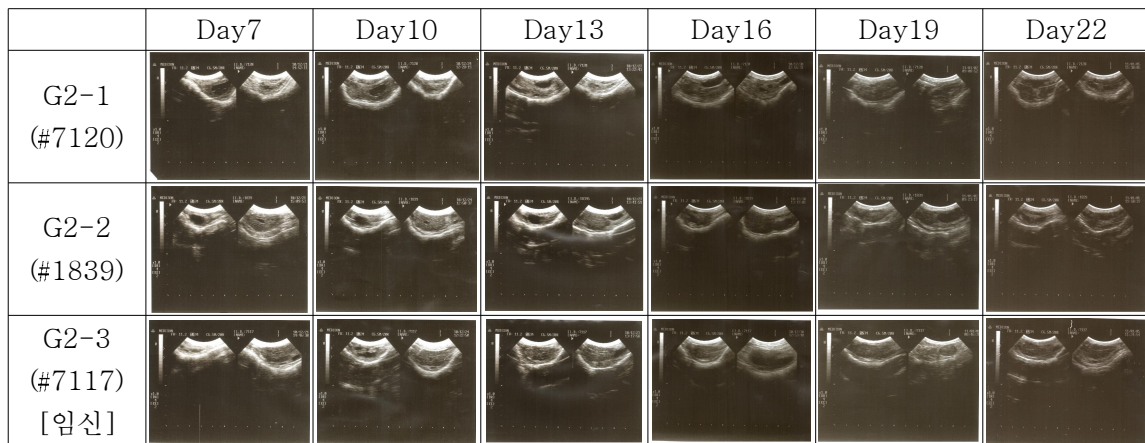


그림 27. 자궁내 동결수정란과 IFN 주입 후 T2군의 초음파 영상

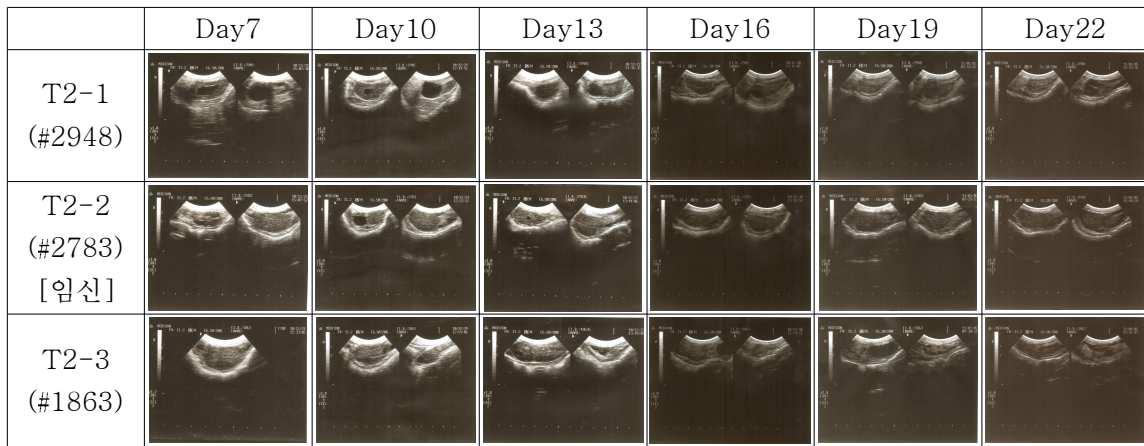
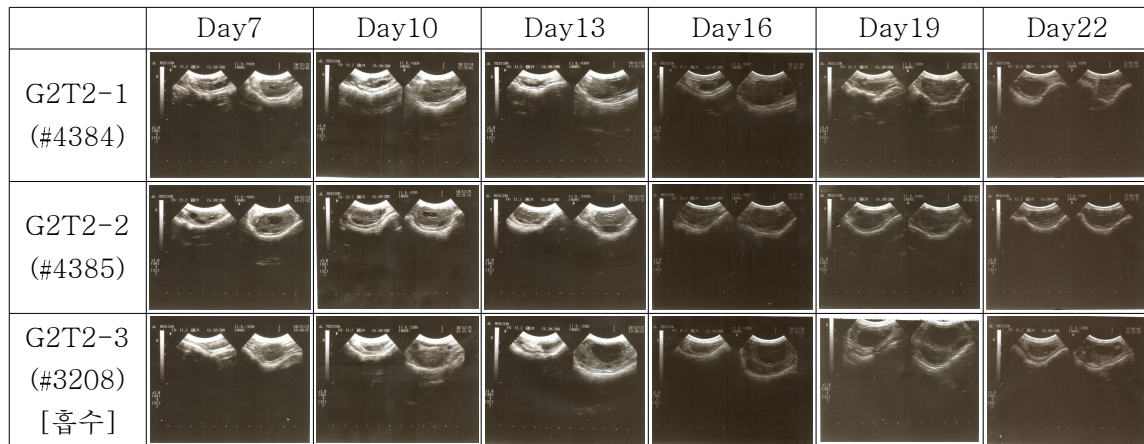


그림 28. 자궁내 동결수정란과 IFN 주입 후 G2+T2군의 초음파 영상



대조군에서는 임신이 성립되지 않은 경우에 Day 15에 2차적 난포파(follicular wave)의 영향으로 대난포가 형성되지만 T2군에서는 이러한 소견이 보이지 않았다. 또한, 표 19에서 보는 바와 같이 형태학적 시험과 병행하여 측정한 Day 21의 progesterone의 농도 또한 T2군에서는 저하되지 않았다. 이러한 결과는 IFN의 주입이 황체세포의 퇴행을 억제하는 작용을 함으로써 황체의 형태적 수준을 일정기간동안 유지하며, 또한 호르몬 수준도 연장 또는 유지하는 것으로 사료된다.

(2) 자궁내 IFN 주입이 황체 호르몬 수준에 미치는 영향

표 19. 자궁내 IFN과 동결수정란 공동 주입에 따른 황체 호르몬 변화

	Code	progesterone level(pg/ml)							임신허정
		Day 7	Day10	Day13	Day16	Day19	Day22	Day25	
Control	#4908	2,479	2,229	3,378	530	252	110	240	미이식
	#4909	1,630	2,760	3,620	2,890	140	290	680	미이식
G2	#7120	1574	2,060	3,059	1,864	86	69	244	x
	#1839	1,035	2,566	2,537	2,462	245	170	803	x
	#7117	3,787	7,719	9,374	11,302	9,090	10,031	8,402	임신
T2	#2948	1,455	4,206	3,845	3,601	393	429	1,093	x
	#2783	2,961	3,482	5,070	7,531	4,761	5,681	5,561	임신
	#1863	1,766	2,731	2,694	949	216	388	630	x
G2T2	#4384	1642	1,557	1,524	2,079	782	94	161	x
	#4385	1,011	2,156	2,719	3,357	2,437	2,268	1,329	흡수
	#3208	1,408	3,827	5,383	4,892	1,170	200	339	x

*G2 : IFN-gamma 2만 IU, T2 : IFN-tau 2만 IU, G2T2 : IFN-gamma 2만 IU + IFN-tau 2만 IU.

발정주기의 7일에 동결수정란을 이식후 IFN을 추가적으로 자궁내에 주입후 황체호르몬 농도 변화에 대한 결과는 표 19에서 보는 바와 같다. 대조군에서 Day 7~Day 10의 progesterone 농도는 일정하게 유지되어 Day 13에 증가하였다가 Day 16부터 현저한 감소의 소견을 보였다. G2군에서 Day 10의 progesterone 농도는 Day 7의 수준에 비하여 2배로 증가되어 Day 13에 최고치에 이르고 증가된 progesterone의 농도는 Day 16까지 Day 7의 수준으로 유지하다가 급속히 감소하였다. T2군에서 Day 10의 progesterone 농도 역시 Day 7의 수준에 비하여 2배로 증가되어 Day 13에 최고치에 이르고 증가된 progesterone의 농도는 Day 16까지 Day 7의 수준으로 유지하다가 급속히 감소하였다. 또한, G2T2군에서 Day 10의 progesterone 농도 역시 Day 7의 수준에 비하여 2배로 증가되어 Day 13에 최고치에 이르고 증가된 progesterone의 농도는 Day 16까지 Day 7의 수준으로 유지하다가 급속히 감소하였다.

프로게스테론은 태아의 생존과 발달의 모체의 지원을 위해 명백히 필요하며, 발정주기의 면양에서 프로게스테론은 역설적으로 억압에 관여하고 그 다음 자궁내막 황체용해기전의 발달을 시작시킨다(Spencer TE 등, 2004). 순차적인, 프로게스테론 작용의 중복, IFN-tau, 태반 lactogen과 성장호르몬(GH)은 호르몬의 자동제어기구를 구성하고, 이것은 임신 중에 자궁내막 샘의 형태형성과 최종적으로 분화된 기능을 조절한다(Spencer TE 등, 2004)

배아는 자궁내막의 내강상피상에 옥시토신 수용체의 발달과 옥시토신에 의해 유도되는 PGF2 alpha의 분비를 억제하고 prostaglandin 합성억제인자의 유도에 의해 황체용해를 막는다(Mann GE 등, 1999). 황체용해억제를 달성하는 능력은 모체 프로게스테론 생산의 패턴에 달려 있고, 배란후 프로게스테론의 낮은 상승 혹은 황체기 동안의 프로게스테론 분비 부족은 임계시기에서 배아의 interferon-tau 생산 저하 또는 미생산을 초래한다(Mann GE 등, 1999).

암양에서 자궁정맥내로 주입된 IFN-tau는 자궁정맥밖으로 방출되어 황체내에서의 ISGs를 유도하는 내분비적 매커니즘을 통해 황체용해를 지연시킨다(Bott RC 등, 2010; Rebecca C. 등, 2010). IFN-tau는 자궁상피에 작용하여 에스트로젠 및 옥시토신 수용체를 위한 유전자 전사를 억제하는 것은 자궁의 황체용해 매커니즘 발달을 차단하고 PGF2 α 의 황체용해매독 방출을 차단하기 때문이지만, 프로게스테론 수용체의 발현에는 영향을 미치지 않는다(Bazer FW 등, 1997).

IFN-tau 처리시 비임신 암양에서 황체의 수명을 연장시키는 효과로써 임신을 모방할 수는 있으나 완전한 자궁내막성 반응을 이끌어내기 위해서는 상대적으로 높은 용량의 IFNT 근육투여가 필요하다(Chen Y 등, 2006). 면양의 IFN-alpha와 -tau 두가지 모두 동일역가의 양을 정맥내로 투여했을 때 비임신양에서 발정주기의 연장을 유발하며, IFNT의 황체퇴행억제제로써의 특성은 특별한 생물학적 역가라기보다는 대부분 그 자체의 독특한 발현패턴에 있다(Green MP 등, 2005).

한편, Peripheral blood mononuclear cells(PBMCs)을 발정기의 3-4일에 자궁내에 주입하였을 때 임신율이 증가하고, PBMCs군의 lymphoid cells내에는 macrophage-colony stimulating factor의 전사량이 풍부하고, 태아도 유의적으로 신장되었는데, 이는 자궁내로의 PBMCs 주입이 자궁환경을 개선하고 태아의 조기부착을 촉진하기 때문이라고 하였다(Atsushi Ideta 등, 2010).

본 실험의 결과에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 IFN을 동결수정란과 공동으로 이식한 경우에 혈중 progesterone 농도는 매우 높게 증가하였으며, 그 증가된 수준이 3일 이상 더 유지되는 소견을 보였다. 한편 G2군과 T2군에서 임신된 것으로 판정된 2두는 높은 수준을 유지하였다.

이러한 결과는 표 19에서 보는 바와 같이 IFN 추가이식 후 임신 성립이 되지 않은 수란우에서도 황체호르몬의 증가는 물론 그 수준이 대조군에 비하여 연장되는 것은 아마도 IFN의 주입이 황체퇴행을 억제하여 혈중 progesterone 수준을 유지하기 때문인 것으로 사료된다. 본 결과와 유사한 연구로써 외래성 IFN-타우의 혈관내 투여가 황체세포의 퇴행을 억제함으로써 황체호르몬 수준을 일정기간 유지하며 발정 재귀를 억제한다고 하였다.

3. 자궁내 IFN 주입이 자궁내 미생물에 미치는 영향

가. 실험목적

자궁내 IFN 주입이 미생물에 미치는 영향성을 평가하기 위하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 자궁내 미생물의 채취 배양

① 자궁내용물의 채취는 질강, 외음부, 기구 소독을 엄수하여 무균적으로 실시하였으며, 자궁내 백혈구에 대한 영향성 평가도 동시에 수행하였다.

(2) 자궁 미생물의 배양 및 분리

① 채취, 처리, 계상된 총시료 중 10ml를 무균적으로 채취하여 혈액배지에 접종한 후 37°C CO₂ 인큐베이터에 24~48시간 배양하였으며, 형성된 집락수를 계산하였다.

② 형성된 각 집락으로부터 채취된 미생물은 그람염색과 catalase test를 실시하였다.

다. 실험결과

(1) IFN의 자궁내 주입시 자궁내 미생물에 미치는 영향

IFN 감마 2만 IU(G2군), 타우 2만 IU(T2군)를 발정 7일의 자궁내에 주입한 후 발정 9일에 회수한 자궁내용물 중 미생물의 집락은 대조군, G2군, T2군 모두에서 형성되지 않았다. 본 연구의 결과로 보아 자궁내에는 병원성 미생물의 증식을 억제하는 고유의 기전이 있거나, 자궁내에 주입된 IFN이 자궁내 환경과 협동적으로 작용하여 미생물을 억제하는 것으로 사료된다.

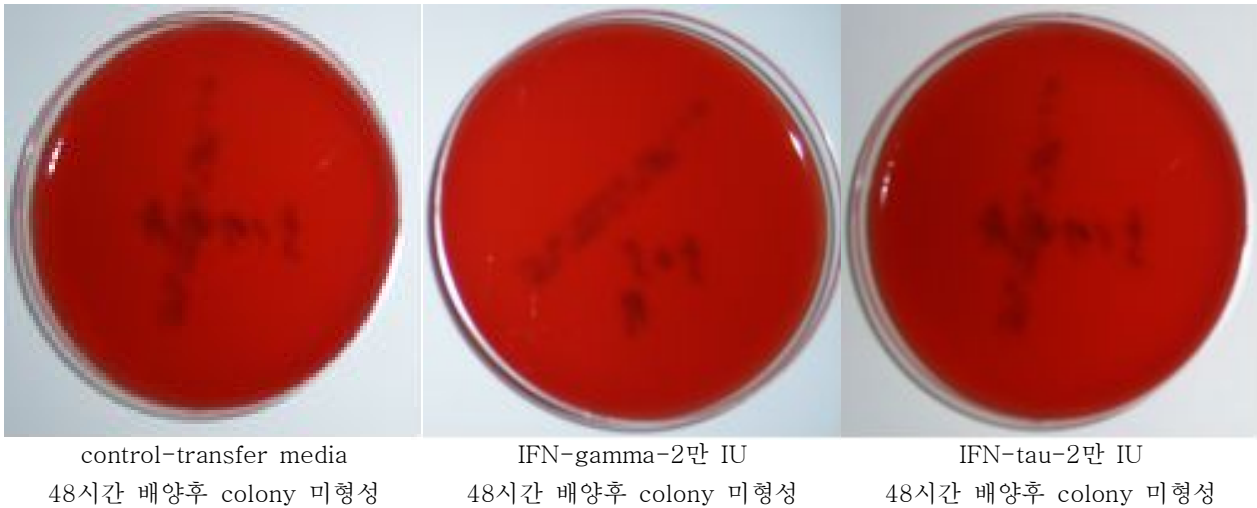
한편, 자궁내 감염은 인공수정시, 수정란 이식시, 모체의 전신성 경로에 의하여, 태아 착상을 방해하여 조기배아사멸을 유기하는 주요 요인으로 지적되고 있으며, 중요한 병원성 미생물로서는 바이러스점막병(BVD), IBR, 대장균, 포도상구균 등을 들 수 있다.

다양한 혈관내피세포 감염 평가에서, *S. aureus* 감염 전과 후의 ECs 배양에 IFN- γ 를 적용하면 감염 수준의 현저한 감소와 감염세포 당 세포내 적어진 세균으로 나타난다. *S. aureus*에 유기된 염증전구성 혈관내피반응의 제거없이 사람의 혈관내피세포에서의 내인성 포도구균억제 효과 매커니즘을 증대시키는 독점적 능력과 혈액 유래성 *S. aureus* 감염에 대한 혈관내피세포 보호 효과를 가진다(Beekhuizen H 등, 2007).

본 연구의 제 1세부과제에서 IFN의 바이러스 억제작용이 증명된 바와 같이, IFN- γ 는 사람

혈관내피세포에서의 *Staphylococcus aureus* 감염에 대한 저항성을 제공하는데, 이는 협동적인 염증진구성(proinflammatory) 작용 및 내인성 항세균작용(intrinsic antibacterial activities)의 향진에 의한다고 하였다(Beekhuizen H와 van de Gevel JS, 2007).

그림 29. IFN의 자궁내 주입 후 자궁세정액을 배양한 세균집락



따라서, 본 연구의 결과에서 보는 바와 같이 인공수정 및 수정란 이식시에 IFN을 자궁내 공동으로 주입 또는 이식하는 것은 자궁내 태아에 대하여 해로운 미생물의 증식을 억제하여 착상에 유익한 결과를 가져올 것으로 사료된다.

4. IFN 주입이 자궁내강 백혈구에 미치는 영향

가. 실험목적

자궁내 IFN 주입이 백혈구에 미치는 영향성을 평가하기 위하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 자궁액 관류 및 처리

- ① 자궁내용물 관류액의 준비는 멸균생리식염수 1000ml에 heparin을 첨가하였고, 질세정액은 10% 포비딘 요오드액을 준비하였으며 사용시 체온 정도로 가온하였다.
- ② 보정 및 마취 : 위생적 작업이 용이하도록 보정틀내에 시험우를 보정하였고, 직장내 배변을 제거한 후 림폰 1cc를 근육주사하여 진정시켰다.
- ③ 내경 10mm 카테터를 질내에 삽입후, 10배 희석된 povidone iodide 1000ml를 투입과 배제를 2회 이상 반복하면서 질내강 및 외음부를 세정하였고 연이어 멸균생리식염수 1,000ml로 질내

의 포비딘액을 완전히 헹구어 낸 후 질내 공기를 제거하고, 위생상태를 유지하였다. 질세정이 끝난 직후에 2% 염산리도케인 7ml를 사용하여 경막외 마취를 실시하였다.

- ④ 사전에 멸균 및 전처리된 3-way 소 수정란 회수기를 자궁경관 경유 수정란 회수방법에 따라 황체존재측 자궁각에 설치하였다.
- ⑤ heparin이 첨가된 식염수 총량 100ml를 30~50ml씩 2~3회 나누어 주입과 회수를 반복하면서 자궁을 관류하였고, 주입량 대비 회수량을 계측하였다.
- ⑥ 사용하는 기구와 채취과정은 무균적으로 실시하였다. 회수액 10ml를 진탕하여 무균적으로 분할하고 냉장처리 후 미생물학적 검사를 위하여 실험실로 송부하였다.
- ⑦ 계측된 잔여 회수액은 2000rpm으로 원심분리후 하층액만을 채취하여 혈액도말 작성에 제공하였고, 자궁내 IFN의 잔류량을 분석하기 위하여 상층액은 기록후 -20℃에 보존하였다.
- ⑧ 혈액도말은 Wright-Giemsa 염색을 하였고, 하층액 내용물 1ml에 포함된 백혈구 분별 검사(differential count)를 실시하였다. 각각의 혈액소견은 임상병리검사에 준하여 판정하였다.

다. 실험결과

(1) IFN의 자궁내 주입시 자궁내 백혈구에 미치는 영향

IFN의 자궁내 주입시 자궁내 백혈구에 미치는 영향은 표 20과 같다. IFN 감마 2만 IU(G2군), 타우 2만 IU(T2군)를 발정 7일의 자궁내에 주입한 후 발정 9일에 회수한 자궁내용물의 총량은 대조군 82ml, G2군 92ml, T2군 99ml 내외였다. 또한, 백혈구 감별계산에서 보면 대조군과 시험군 모두에서 호중구의 비율 차이가 뚜렷하지 않았다. 그러나, 대식구의 백분율은 대조군에서 각각 16%, 23%이었으며, G2군에서 각각 3%, 0%이었으며, T2군에서 각각 28%, 2%로써 G2군이 다소 낮았다.

표 20. IFN의 자궁내 주입시 자궁내 백혈구 상

	주입	회수액(ml)			백혈구(%)					
		회차	회수	합계	호중구	호염구	호산구	림파구	단핵구	대식구
Control	100	1차	54	82	4	-	-	80		16
		2차	38		9	-	-	77		23
G2군	100	1차	49	92	0	-	-	97		3
		2차	53		8	-	-	92		0
T2군	100	1차	50	99	0	-	-	72		28
		2차	49		9	-	-	98		2

*총관류액 100ml 중 1차, 2차에 회수된 양

**총백혈구수(total count) : 자궁내용물 하층액 1ml 당 백혈구수

***감별계산(differential count) : 하층액 도말 표본내 백혈구 백분율(%)

대식세포는 발정주기간 및 임신된 포유류 자궁의 주요한 세포이다. 그들의 장기에서 조직분포 패턴 및 밀도는 순환하는 여성 스테로이드 호르몬, 에스트로겐 그리고 프로게스테론의 농도에 따라 다양하며, 여러 형태의 효과성 분자는 호르몬적으로 조절될 것이다(Hunt JS 등, 1998).

대식세포는 발정기와 발정휴지기-I 중 자궁내에서 증가하고(Huang 등, 1995), 착상을 따라 자궁내로 이주하며(Hunt와 Pollard, 1992), 에스트로겐 또는 CSF-1, GM-CSF와 같은 에스트로겐 자극성 자궁 성장 요소가 그들의 이주를 촉진한다(Hunt 등, 1998; Joan S 등, 1998). 임신 초기 단계에서 대식세포는 CSF-1과 GM-CSF가 존재하지 않을 때에도 자궁내로의 도착을 지속한다(Hunt 등, 1993; Hunt와 Robertson, 1996).

대식세포의 수는 발정휴지기-II와 발정진기의 자궁내에서 극적으로 감소하고 임신자극성 대식세포의 유입은 임신의 중기단계 중 정지하는 듯하다. 이 단계 중 프로게스테론은 에스트로겐에 비해 높기 때문에 프로게스테론이 대식세포 이주를 방해한다. 프로게스테론이 대식세포의 이주를 방해하는 것은 (1) 특정 점착성 물질을 위한 수용체처럼 이주를 촉진하는 대식세포 유전자에 대한 직접적인 호르몬성 효과이거나 (2) 자궁 주화성인자(chemoattractants)의 감소와 연관되거나 (3) 활성화된 조혈성 세포의 이주를 제한하는 Fas ligand와 같은 분자들의 발현을 증진시키기 때문일 수 있다(Griffith 등, 1995)

에스트로겐은 대식세포 활성화 profile을 촉진하고 프로게스테론이 대식세포 억제유전자 profile을 촉진하며(Hunt 등, 1998; Joan S 등, 1998), 프로게스테론은 자궁 비만세포(uterine mast cell)내의 iNOS를 하향조절하며(Huang 등, 1995), 프로게스테론은 대식세포가 표적 세포를 죽이는 능력을 저해한다(Feinberg 등, 1992).

또한, Nitric oxide(NO)는 활성화된 대식세포의 주요 생산물로, 임신 중 많은 양이 생산된다면 해로운 효과를 가져올 수 있으므로 제한되어야 하는 염증전구성 물질중 하나이다. 그러므로 이것은 프로게스테론이 이 효능있는 물질의 생산을 억제한다는 점에서 임신과 관련하여 상당히 흥미롭고 잠재적인 중요성을 가지고 있다(Hunt 등, 1998; Joan S 등, 1998).

본 연구에서 IFN 주입시 Day 9의 자궁내 백혈구상은 전신성 또는 생식관을 경유한 외래성 미생물의 영향을 받지 않은 자궁내 정상적인 기능 또는 면역기전에 의한 것으로 보인다.

제 6 절 생식기내 IFN의 최적 이식 기술 개발

본 연구의 세부과제에서 개발된 재료와 기구를 활용하여 수정란 이식시의 임신율의 극대화를 달성하기 위하여 각 시술자는 주입기술의 향상은 물론 수정란을 생산하는 기술로써 체내수정란, 체외수정란, 동결수정란의 생산 기술을 극대화하여야 한다.

수정란을 이식 후 임신에 미치는 영향에 대한 평가 방법은 연구의 목적과 각 연구자마다 다양한 분류 기준을 설정한다. IFN과 생식세포를 공동으로 주입 또는 이식후 실제 임상에서 관정이 용이하고 임상적 관련성이 높아 활용할 수 있는 요인들을 분류하였다. 이 중에서 이식기술 및 수정란 생산기술과 밀접한 관련이 있는 기술 요인과 수정란 요인으로 대별하고 관련된 변인을 설정하여 그 임신율을 평가하였다.

1. IFN과 정액의 공동봉입 인공 수정 기술 개발

가. 실험목적

IFN을 활용한 인공수정 기술 개발을 위하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 번식우(수란우)의 선발

① 인공수정용 번식우 및 이식용 수란우는 한우와 젃소를 사육하고 있는 농가에서 품종, 산차, 신체충실지수, 발정형태, 발정유기를 참조하여 선발하였으며, 발정은 자연발정을 이용하거나 PGF_{2a}를 사용하여 발정을 인위적으로 유기하였다.

② 경산 또는 미경산의 한우와 젃소 중에서 신체충실지수를 기준으로 2.0~3.5인 경우를 '적정', 이 범위를 벗어난 경우를 '미흡'으로 구분하여 선발하였다.

(2) 발정 판정

① 발정행동을 보인 후 승가를 허용하는 경우를 용모발정, 발정증상을 발견하지는 못하였으나 발정 후 출혈이 확인된 경우를 둔성발정으로 구분하였다.

(3) 발정의 유기

① 발정의 외부적 징후가 뚜렷하지 않은 번식우나 발정의 유기가 필요로 하는 경우에는 직장검사 소견에서 황체의 크기가 2cm 이상이고 크라운이 뚜렷한 발정주기 7~17일의 암소에

PGF_{2a} 처리법, 배란동기화법, CIDR 삽입법 등을 활용하여 발정을 유도하였다.

표 21. 인공수정 공시용 번식우의 선발 및 번식 현황

품종	산차		BCS		발정유기		발정형태	
	미경산	경산	적정	미흡	자연	유기	둔성	용모
한우	58	212	202	68	114	156	45	225
유우	-	174	152	22	121	53	-	174

(4) IFN의 준비

① 스트로우당 1만 또는 2만 단위의 IFN 감마, 타우가 포함되어 냉동된 0.50ml 스트로우를 액체질소 또는 냉동고에서 꺼내어 미온수에 넣거나 외기 온도에서 약 수초간 방치함으로써 용해하였으며, 연구목적에 따라 인공수정시에 제공하였다.

(5) 인공수정

① 인공수정 및 IFN의 주입 방법은 공동봉입 또는 단일봉입법에 의하여 준비된 생식세포와 IFN을 기성 주입기를 활용하거나 2단형 수정기와 동경형 연결관으로 결합하여 인공수정 및 수정란이식을 실시하였다.

② 기성 주입기를 활용한 방법(추가주입법)은 동결정액의 용해, 장착, 주입의 방법에 준하여 실시하였으며, 2회의 시술로써 자궁내에 IFN과 정액을 주입하였다.

③ 2단형 정액 주입기를 활용한 방법(동시주입법)은 개조된 정액 주입기에 IFN이 봉입된 연결관과 기성 정액을 동시에 결합한 후 주입기에 장착하여 1회의 시술로써 자궁내에 IFN과 정액을 동시에 주입하였다.

(6) 임신판정

① 인공수정 후 발정증상 없이 40~50일이 경과한 시험축을 대상으로 초음파기를 활용한 태아영상을 판정하거나 직장검사를 통하여 태막활, 임신황체, 자궁의 비대칭성을 종합적으로 검토하여 임신을 판정하였다.

② 임신율에 관한 통계처리는 χ^2 -test를 실시하였고, $P < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

(7) 자축 평가

① 성별, 체중, 건강성, 기형성을 판정하였고, 기형성 판정은 신체검사 시 임상적 소견으로 보아 현저한 기능장애나 기형적 특징 여부를 기준으로 하였다.

다. 실험결과(인공수정)

(1) IFN과 정액의 공동주입이 임신율에 미치는 영향

인공수정 시에 IFN-감마 또는 타우를 정액을 주입한 직전 또는 직후에 자궁내에 주입한 결과는 표 22와 같다. 한우 대조군 농가의 임신율은 55.1%(농가 1, 2 각각 64.7%, 49.1%)이었으며, IFN의 추가 주입에 따른 한우 시험군 농가의 임신율은 61.3%(농가 1, 2 각각 63.8%, 59.4%)이었다. 또한, 젖소 경산우에서의 대조군 농가의 임신율은 33.7%(농가1, 2 각각 31.3%, 36.8%), 시험군 농가의 임신율은 48.6%(농가 1, 2 각각 43.5%, 45.9%)이었다.

표 22. 번식우 품종별 IFN과 정액의 공동 주입법에 따른 임신율

품종	정액 단용 주입 (두). (%)		정액+ IFN 공동 주입 (두). (%)	
	수정 (두)	임신 (%)	수정 (두)	임신 (%)
한우	농가1	34 22 (64.7)	80	51 (63.8)
	농가2	55 27 (49.1)	101	60 (59.4)
소계	89	49 (55.1)	181	111 (61.3)
유우 (경산우)	농가1	48 15 (31.3)	46	23 (43.5)
	농가2	38 14 (36.8)	61	28 (45.9)
소계	86 (100.0)	29 ^b (33.7)	107 (100.0)	52 ^a (48.6)

*IFN 감마 1만~2만 IU/ml W/O(홍화유), IFN 타우 1만~2만 IU/ml W/O(참기름)

***a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

한편, IFN의 공동이식에 따른 미경산우의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 IFN 감마의 사용이 미경산우에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있음을 알 수 있다.

표 22에서 보는 바와 같이 인공수정후 IFN을 추가적으로 자궁내에 주입하였을 때 한우의 임신율은 대조군에 비하여 다소 높았으나, 젖소군에서의 임신율은 유의적으로 높았다(P<0.05).

젖소의 수정률은 현재 매년 1%정도 감소한다. 대략, 35%의 배아가 임신 첫 3주간 동안 황체 용해를 저지하는데 실패한다. 황체, 자궁내막 그리고 배아 사이의 상호작용은 성공적인 임신 성립에 중요하며 상호작용의 부적절함은 배아 치사의 결과를 가져온다(Robinson RS 등, 2008).

IFN을 추가적으로 주입한 농가의 임신율이 높은 것은 IFN 감마와 타우가 정액의 활력 등에 직접적인 영향을 미치지 않지만 IFN 감마는 착상에 관련하여 맥관계 형성을 촉진함으로써 임신에 중요한 역할을 하며(Jansen RG 등, 2010; Murphy SP 등, 2009), 자궁내 미생물을 억제한다(Thatcher와 Meyer, 1995)는 보고로 보아 임신율이 증가하는 것으로 사료된다. 또한, IFN 타우는 황체퇴행을 억제하고, 초기의 배발생에 있어서의 임신신호전달 체계에 관여하며(Ealy AD와 Yang QE, 2009), progesterone의 분비를 촉진하여 임신 유지에 중요한 역할을 한다(Bazer FW 등, 2009)고 보고하였다.

(2) IFN과 정액의 공동주입 방법 및 용량이 임신율에 미치는 영향

표 23. IFN와 정액의 공동주입시 주입 방법 및 횟수에 따른 임신율

IFN 주입 방법	임신율 (No. of)		[시쓰 소모량]	[슬리브 소모량]
	인공수정	임신(%)	(개/회)	(개/회)
2회 주입 방법 (기성형 주입기)	107	49(44.8)	2	2
1회 주입 방법 (2단형 수정기기)	28	15(53.6)	1	1

*2회 주입군 : 정액을 기성 주입기에 장착하여 주입한 후 2차로 IFN를 기성 주입기에 장착하여 주입하는 2회 시술

**1회 주입군 : 정액 스트로우와 IFN 스트로우를 결합하여 2단형 주입기에 장착하여 주입하는 1회 시술

***IFN 감마 1만~2만 IU/ml W/O(홍화유), IFN 타우 1만~2만 IU/ml W/O(참기름)

*** χ^2 -test, P<0.05

주입방법에 있어서 2회 주입군과 1회 주입군의 임신율은 각각 44.8%, 53.6%로써, 1회 주입군의 임신율이 2회 주입군에 비하여 다소 높았다. 또한, 시쓰와 슬리브 소모량에서는 각각 2개, 1개이었다.

각 시험군에 따른 유의성은 인정되지 않았지만 정액을 기성 주입기에 장착하여 자궁내에 주입한 후 2차로 IFN을 기성 주입기에 장착하여 주입하는 2회 시술법에 비하여 정액 스트로우와 IFN 스트로우를 결합하여 2단형 주입기에 장착하여 주입하는 1회 시술법은 편리함은 물론 시쓰의 절감, 시술횟수의 감소, 시술시간의 절약 효과가 있을 뿐만 아니라, 자궁내 오염의 최소화를 기대할 수 있을 것이다.

2. IFN과 수정란의 공동봉입 수정란 이식 기술 개발

가. 실험목적

IFN을 활용한 수정란 이식 기술 개발 및 이식현장에서의 활용을 위하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) IFN의 준비

① 제 3세부과제에서 IFN 감마와 타우를 각각 1만 IU 내지 2만 IU를 실험 목적에 따라 준비하였다

(2) 수정란의 준비

① 실험목적 및 방법에 따라 제 1, 2세부과제에서 IFN의 종류, 용량, 봉입방법을 결정하여 실시간으로 준비하여 사용하거나 동결보존 후 용해하여 사용하였다.

② 시험에 공시할 수정란은 도축장 유래 한우 난자를 TCM199와 CR1을 기초 배지로 활용한 체외배양체계에서 생산하였으며, 채취처리된 체외수정란은 각 개체별로 공란우의 혈통을 유지하였다.

③ 신선수정란은 배발생 6~9일의 배반포중에서 형태적으로 우수한 품질의 것만 골라서 이식에 제공되었으며, 0.25ml straw에 수정란만을 이식용 미디어와 단독으로 봉입하거나 IFN과 공동으로 봉입을 하여, 보온병에 담아 이식 현장으로 이송되었다.

④ 동결수정란의 작성은 ethylene glycol을 항동해제로 사용하였고, 완만동결법을 준용하여 동결을 실시하였다.

⑤ 동결 수정란은 실험실에서 용해후 활력을 평가한 후 재봉입후 이식하거나 야외에서 직접용해후 이식하였다. 직접용해 이식방법으로써는 상온의 공기중에서 10초, 35℃의 온수에서 20초 동안 침적하였고, 5분 이내에 자궁강내에 이식을 완료하였다.

(3) 시술자의 선정

① 이식 시술을 위하여 임상경력 10년 이상의 의사 또는 수정사 중에서 수정란이식 1,000회 이상의 시술 경력이 있는 숙련된 자를 선발하였다.

② 연구와 관련된 제반 사항을 숙지시키고, 필요한 기술은 교육 훈련을 통하여 향상시켰으며 상호보완적인 시술을 할 수 있도록 조치하였다.

(4) 주입순서 및 방법

- ① 선발된 수란우는 이식직전에 2% 염산리도케인 4~5ml로 수란우의 미근부 또는 1, 2 미추간에 마취를 실시하고, 외음부를 소독하고 주입기 외부에 위생비닐을 씌워 자궁경관 경유법으로 자궁내에 이식하였다.
- ② IFN 추가이식법은 수정란 이식시 시험목적에 따라 이식용 주입기에 미리 장착된 IFN straw를 수정란이식 직후에 외음부를 소독하고 주입기 외부에 위생비닐을 씌운 후 비외과적 방법으로 자궁내에 이식하였다.
- ③ 공동이식법은 1개의 이식용 straw에 수정란과 IFN을 공동봉입한 후 상기방법에 따라 1회 주입으로 이식을 완료하였다.
- ④ 추가 이식시에는 시험목적에 따라 상기와 같은 방법으로 수정란 또는 IFN의 주입순서를 결정하였다.

다. 실험결과

(1) 공동이식 방법 및 IFN 용량 평가

수정란 이식시의 IFN의 공동이식 방법에 따른 임신율은 표 24와 같다. 체외생산된 한우 수정란을 젖소 자궁에 IFN을 추가이식 또는 공동이식 후의 신선수정란의 임신율은 대조군, IFN+추가이식군, IFN+공동이식군에서 각각 46.2%, 58.1%, 74.5%로서 유의적인 차이가 있었으며($P < 0.05$), 동결수정란의 임신율은 대조군, IFN+추가이식군, IFN+공동이식군에서 각각 27.3%, 30.8%, 30.0%로써 유의적인 차이가 없었다.

표 24. 수정란 이식시의 IFN의 공동이식 방법에 따른 임신율

IFN 이식 순서	(No. of)			
	신선수정란		동결수정란* ³	
	이식	임신(%)	이식	임신(%)
Control	39	18(46.2) ^b	11	3(27.3)
IFN+ 추가이식* ¹	43	25(58.1) ^{ab}	26	8(30.8)
IFN+ 공동이식* ²	51	38(74.5) ^a	20	6(30.0)

*¹ : IFN 감마 1만~2만 IU/straw, IFN 타우 1만~2만 IU/straw

*² : IFN 감마, 타우 1만~2만 IU/straw 당 transfer media에 용해

*³ : 완만 동결 후 직접용해 이식법

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, $P < 0.05$

IFN과 신선수정란을 공동으로 이식한 군에서 대조군에 비하여 유의적으로 임신율이 높은 것

은 자궁내 이식된 IFN이 착상초기의 착상부위의 맥관계 형성을 촉진하고 황체퇴행을 억제하여 임신환경을 개선한다는 보고(Thatcher와 Meyer, 1995)와 부합되는 결과로 사료된다. 또한 추가 주입법에 비하여 공동주입법에서의 임신율이 높은 것은 1회 이식법이 2회 이식법에 비해 질내 미생물의 자궁내 오염의 기회가 줄고, 자궁경관 또는 자궁내막의 손상을 덜 유발하기 때문(Taponen J, 2009)일 것으로 사료된다.

한편, IFN과 동결수정란을 이식한 군에서의 유의적인 차이가 없는 것은 시험측의 수가 적고 동결기법과 실험자에 따른 수정란의 생존율과 부화율의 차이가 크기 때문인 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구에서의 직접 용해 이식법 이외에도 다양한 동결기법을 활용하고, 이식전에 용해 및 재배양을 실시하여 최종적으로 생존성을 판단한 후에 IFN의 공동봉입 이식법 또는 추가 이식법을 실시하여 평가하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

(2) 공동봉입 신선수정란 이식시 IFN의 종류와 함량이 임신율에 미치는 영향

IFN과 신선수정란을 공동봉입하여 이식한 결과는 표 25와 같다. 각 시험군의 임신율로써 대조군 47.4%, G1군에서 66.0%, G2군에서 68.1%, T1군에서 51.1%, T2군에서 52.7%이었다. G1군과 G2군의 임신율이 대조군과 T1군, T2군에 비해 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

체외에서 생산된 IFN-tau의 양은 체외배양 수정란[4311 IU/mL]이 체세포 복제수정란[626 IU/mL]과 처녀생식수정란[1595 IU/mL]보다 높고, IFN-tau의 최대 생산은 배양의 day14에 측정되고, day23에 이르러 최소로 감소한다(Talbot NC 등, 2008).

BRL cell-조건배지에서 개별적인 부화 배반포가 배양되었을 때 IFN-tau 분비(antiviral units/ml/48h)는 day11에 1200, day13에 5000이며, 모든 배아로부터 영양배세포(TE)의 특이적인 분비를 특징화하기 위해 day13에 미세수술에 의해 내세포괴(ICM)가 제거된 후 영양배조직의 IFN-tau 분비는 day23에 평균 level $> 10^5$ antiviral units/ml/48h로 상승하고, 약 1주일간 높게 유지 후 10^3 antiviral U/ml/48h 아래 수준으로 천천히 감소한다(Stojkovic M 등, 1995).

IFN-감마는 임신초기에 자궁으로부터 분비되는 pro-inflammatory cytokine으로서 모체자궁내막에 존재하는 NK cell에 의해 풍부하게 생산된다(Lindgren A 등, 2010). 마우스의 정상 임신과정에서 IFN-감마는 자궁내막 착상부위에서의 맥관계통 리모델링과 혈관생성에 중요한 역할을 하며, 태반의 모체측 취약 부위를 유지시켜 준다(Murphy SP 등, 2009).

표 25. 공동봉입 신선수정란 이식시 IFN의 종류와 함량에 따른 임신율

IFN 종류	IFN 단위 (IU)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
Control	-	152	72 ^b	47.4
IFN-gamma	1만 IU(G1)	47	31 ^a	66.0
	2만 IU(G2)	47	32 ^a	68.1
IFN-tau	1만 IU(T1)	45	23 ^{ab}	51.1
	2만 IU(T2)	112	59 ^{ab}	52.7

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

또한, IFN-감마는 자궁내에 이식된 초기 배아의 착상 방해와 관련된 미생물학적 요인인 이식시의 질내 미생물의 자궁내 오염, 감염된 모체의 IBR virus(Reber AJ 등, 2006), BVD virus(Gentilomi G, 2006) 등에 대하여 억제력이 높으며, 임신 중반기 이후의 네오스포라(Serrano-Martínez E 등, 2007), 부르셀라(Cha SB 등, 2010), 가성결핵(Meyer R 등, 2005) 등의 감염에 대해서도 억제력이 높다고 보고되었다(Boysen P와 Storset AK, 2009).

BVD-MD 백신 접종 후 면역 반응의 지표 중 하나로 인터페론-감마를 사용한 시험에서 대조군에 비해 임신율이 증가한 것은 인터페론-감마가 BVD-MD의 면역 반응에 중요한 역할을 하는 것을 반증한다(Reber AJ 등, 2006)고 하였으며, 재조합된 인터페론-감마는 BVD-MD에 대한 항바이러스 효과를 나타낸다는 보고(Giovanna Gentilomi, 2006), 백신접종시 interleukin-2와 함께 인터페론-감마 또는 알파를 같이 사용할 경우 면역 반응의 활성도가 유의적으로 높아지며, 특히 interferon-alpha는 IBR에 효과적인 예방 물질로서 interferon과 백신을 동시에 사용하는 것은 면역력을 위한 예방적 물질로 가능성이 높다(Hughes HP 등, 1992)고 하였다.

한편, IFN-타우는 임신초기에 자궁으로부터 분비되어 임신의 모성 인식을 위한 호르몬(bIFN- τ)으로써 trophoblast cell에서 풍부하게 생산된다(Stewart DM 등, 2001). 임신이 성립되면 인접분비기전으로 자궁내막에 전달되어 estrogen-receptor의 발현을 억제함으로써, oxytocin-receptor의 수가 증가되는 것이 억제되고, 황체에서의 oxytocin 방출을 억제, PGF_{2a}의 분비를 저지함으로써 progesterone의 분비를 원활하게 하고 임신황체의 유지 및 임신상태를 지속시킨다(Thatcher와 Meyer, 1995; Ealy AD와 Yang QE, 2009).

여러 연구의 결과로 보아, 본 연구에서 수정란과 IFN-감마의 공동이식은 이식후의 착상과 관련된 자궁내 환경개선의 역할을 유기함으로써 임신율을 증가시키는 것으로 사료된다. 자궁내에서 생성되는 IFN-타우의 함량이 약 5천 단위 내외라는 보고(Bazer FW 등, 2009)와 본 연구의 결과로 볼 때, 보존 조건 및 경과시간에 따라 재조합 IFN의 생리활성이 떨어진다는 점을 고려하더라도 지나친 함량의 IFN-타우를 첨가하는 것은 바람직하지 않을 것이다.

따라서, 4만 단위를 첨가하여 배양한 수정란의 배반포 발생율, 생존율, 부화율을 고려한 유해성 평가의 결과와 고단위의 IFN 첨가에 따른 경비 등을 고려해 볼 때 1만~2만 단위를 첨가하는 것이 적정할 것으로 판단된다.

또한, 실험실적 또는 임상적 연구에 의해 착상유도물질로서 주요한 기전이 상당히 밝혀져 있는 IP-10(Boomsma CM 등, 2009), TGF- β , IGF(Neira JA 등, 2009), TNF(Ma CH 등, 2009), MMP(Baka S 등, 2009), fluxamine(Bridges PJ 등, 2000) 등의 다양한 물질을 주입에 편리하도록 스트로우내에 생식세포와 공동봉입, 단용봉입 또는 병용봉입하여 자궁내로 직접 주입하는 추가적인 연구가 필요하다.

(3) 공동봉입 동결수정란 이식시 IFN의 종류와 함량이 임신율에 미치는 영향

표 26. 공동봉입된 동결수정란 이식시 IFN의 종류와 함량에 따른 임신율

IFN 종류	IFN 단위 (IU)		이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
Control	-		21	4	19.0
IFN-gamma	G1	10,000	30	10	33.3
	G2	20,000	24	7	29.2
IFN-tau	T1	10,000	22	6	27.3
	T2	20,000	24	7	29.2

*G1, G2 : IFN 감마 1만 IU, 2만 IU; T1, T2 : IFN 타우 1만 IU, 2만 IU/straw in transfer media

** χ^2 -test, P<0.05

공동봉입 동결수정란 이식시 대조군과 IFN-감마 1만 단위와 2만 단위를 첨가한 군의 임신율은 각각 19.0%, 33.3%, 29.2%이었으며, IFN-타우 1만 단위와 2만 단위를 첨가한 군의 임신율은 각각 27.3.0%, 29.2%로서 각 시험군에 따른 유의성은 없었다.

이러한 결과는 시험축의 수가 적고 직접이식법에 따라 동결수정란의 생존성을 실험실에서 이식 직전에 최종적으로 판정하지 않은 상태로 이식한 때문이라고 사료되며, 나아가 이식 직전에 융해하여 생존성을 판단한 후 이식하는 것도 바람직한 방법이라고 생각된다. 또한 동결란의 직접융해 이식법 및 초자화법 등의 다양한 기술을 증진시키고, 쌍자 수정란의 독립구획내 봉입 후 동결방법도 개발중이다.

3. IFN과 수정란의 공동이식시 기술 및 수정란 요인이 임신에 미치는 영향

가. 실험목적

IFN과 수정란의 공동이식시 최적의 이식 기술을 개발하기 위하여 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 기술 요인 평가

기술적 요인으로써 이식동기화, 이식자궁각, 이식깊이에 관한 분류기준을 설정하여 임신율을 평가하였다.

- ① 이식동기화 : 수란우의 발정경과일에 대한 배반포 발생일을 대비하여 -, 일치, +
- ② 이식자궁각 : 황체존재측과 수정란을 주입한 방향을 기준으로 동측, 대측, 양측
- ③ 이식깊이 : 수정란이 이식된 자궁각 깊이(부위)를 기준으로 천부, 심부

(2) 수정란 요인

수정란 요인으로써 배반포품질, 배반포기원, 배발생일, 배발생단계에 대한 분류기준을 설정하여 임신율을 평가하였다.

- ① 배반포품질 : IETS의 형태학적 기준으로 Grade 1~3
- ② 배반포기원 : 동결여부를 기준으로 신선란, 동결란
- ③ 배발생일 : 체외수정일(Day 0)을 기준으로 1~9
- ④ 배발생단계 : 난할을 기준으로 상실배, 초기배, 중기배, 확장배, 부화배

(3) 임신율에 관한 통계처리는 χ^2 -test를 실시하였고, $P < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

다. 실험결과

(1) 이식동기화가 임신에 미치는 영향

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 이식동기화에 따른 임신율은 표 27과 같다. -군, 일치군, +군에 따른 대조군에서의 임신율은 각각 47.5%, 47.9%, 46.0%이었으며, G1군에서 각각 68.4%, 71.4%, 58.3%이었으며, G2군에서 각각 66.7%, 71.4%, 78.6%이었으며, T1군에서 각각 27.3%, 56.5%, 63.6%이었으며, T2군에서 각각 40.0%, 58.8%, 54.7%로써 일치군의 임신율이 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

한편, IFN의 공동이식에 따른 이식동기화의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여

유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 IFN 감마를 이식동기화일 및 전후일에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 것으로 사료되며, IFN 2만 단위를 이식동기화일에 이식하는 것이 유의적으로 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

표 27. IFN과 수정란의 공동이식시 이식동기화가 임신에 미치는 영향

이식동기화	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
-	40	19	47.5	19	13	68.4	12	8	66.7	11	3	27.3	25	10	40.0
일치	48	23	47.9 ^b	14	10	71.4 ^{ab}	21	15	71.4 ^a	23	13	56.5 ^{ab}	34	20	58.8 ^{ab}
+	63	29	46.0	12	7	58.3	14	11	78.6	11	7	63.6	53	29	54.7

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

이식동기화의 불일치는 체내란과 체외란의 수정란 이식시에 있어서 임신율을 저하시키는 것으로 알려져 있다(Newcomb와 Rowson, 1975; Farin PW와 Farin CE, 1995). 경산우에서는 plus synchrony가 유리한 반면에 미경산우에서는 이식동기화 0일이 가장 높은 임신율을 나타내었다는 보고(Kajihara 등, 1992)가 있다. 배란 후 프로게스테론의 상승이 하루만 지연이 되어도 배아의 발달과 생존에 중요한 결과를 초래한다. LH 유지, 맥관 형성 정도, 황체세포의 스테로이드 생성능력이 황체의 발달과 기능에는 필수적인 요소이지만, 황체 불완전성에 책임이 있는 주요 인자는 아니다(Robinson RS 등, 2008). 또한 수정란과 수란우의 이식동기화 시간이 ± 24 시간인 경우에는 임신율이 영향을 받지 않으므로(Hasler, 2001) 임상적용 시 이식동기화는 0일을 기준으로 ± 24 시간 범위 안에서 이식을 실시하는 것이 바람직하다고 사료된다.

(2) 이식자궁각이 임신에 미치는 영향

표 28. IFN과 수정란의 공동이식시 이식자궁각이 임신에 미치는 영향

이식자궁각	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
동측	16	8	50.0	6	3	50.0	4	3	75.0	4	1	25.0	22	8	36.4
대측	5	2	40.0	0	0	0.0	2	1	50.0	0	0	0.0	6	2	33.3
양측*	131	62	47.3 ^b	41	28	68.3 ^a	41	28	68.3 ^a	41	22	53.7 ^{ab}	86	49	57.0 ^{ab}

*: 수정란을 각각 1개씩 양측자궁각에 이식함

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 이식자궁각에 따른 임신율은 표 28과 같다. 동측군, 대측군, 양측군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 50.0%, 40.0%, 47.3%이었으며, G1군에서 각각 50.0%, 0.0%, 68.3%이었으며, G2군에서 각각 75.0%, 50.0%, 68.3%이었으며, T1군에서 각각 25.0%, 0.0%, 53.7%이었으며, T2군에서 각각 36.4%, 33.3%, 57.0%이었다.

한편, IFN의 공동이식에 따른 쌍자 수정란의 양측자궁각 이식시의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 각각 1개씩의 수정란과 IFN 감마를 양측자궁각에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

자연임신의 경우에도 우측자궁의 임신율이 다소 높은 경향(Ghafouri 등, 1980)을 보이며 우측 자궁각에 이식한 수란우의 임신율이 좌측 자궁각에 이식한 경우보다 약간 높다는 보고(황 등, 2004)와 유사한 결과였다.

(3) 이식깊이가 임신에 미치는 영향

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 이식 자궁각 깊이에 따른 임신율은 표 29와 같다. 심부군과 천부군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 56.3%, 25.0%이었으며, G1군에서 각각 70.7%, 33.3%이었으며, G2군에서 각각 75.0%, 28.6%이었으며, T1군에서 각각 55.0%, 20.0%이었으며, T2군에서 각각 52.8%, 50.0%이었다.

한편, IFN의 공동이식에 따른 자궁각 심부이식의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 IFN 감마를 자궁각 심부에 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

표 29. IFN과 수정란의 공동이식시 이식깊이가 임신에 미치는 영향

이식깊이	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
심부	142	80	56.3 ^b	41	29	70.7 ^{ab}	40	30	75.0 ^a	40	22	55.0	108	57	52.8
천부	12	3	25.0	6	2	33.3	2	2	28.6	5	1	20.0	4	2	50.0

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

자궁각의 너무 얇은 부위에 이식하는 것은 수정란이 자궁으로부터 배출될 위험이 있고, 미숙

련자가 심부에 이식하려고 하면 자궁내막을 손상시켜 수태에 악영향을 줄 수 있다고 생각된다. 이러한 이식깊이에 대한 판단은 시술자에 따른 주관성이 개입될 수 있지만 자궁내 이식의 깊이(범위)로는 본 연구의 결과에서 보는 같이 2/3 지점(만곡부보다 전방)에 이식하는 것이 좋다.

(4) 배반포품질이 임신에 미치는 영향

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 배반포품질에 따른 임신율은 표 30과 같다. 1등급군과 2등급군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 54.3%, 46.7%이었으며, G1군에서 각각 70.1%, 62.5%이었으며, G2군에서 각각 70.0%, 64.7%이었으며, T1군에서 각각 40.1%, 43.5%이었으며, T2군에서 각각 56.5%, 48.0%이었다.

표 30. IFN과 수정란의 공동이식시 배반포품질이 임신에 미치는 영향

배반포품질	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
1등급	92	50	54.3	31	22	70.1	30	21	70.0	32	13	40.1	62	35	56.5
2등급	60	28	46.7	16	10	62.5	17	11	64.7	23	10	43.5	50	24	48.0

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

** χ^2 -test, P<0.05

한편, IFN의 공동이식에 따른 1등급 배반포의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 높았으나 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 IFN 감마를 1등급 배반포와 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구와 같이 1등급 수정란을 이식하였을 때가 2등급 수정란을 이식하였을 때보다 임신율이 높았으며, 특히 7, 8일째의 1등급 초기 배반포와 중기배반포의 이식 시에 임신율은 2등급 배반포보다 높다(Hasler, 2001)고 하였다. 이러한 결과는 1등급 배반포의 생리활성이 우수하기 때문인 것으로 사료된다.

(5) 배반포기원이 임신에 미치는 영향

표 31. IFN과 수정란의 공동이식시 배반포기원이 임신에 미치는 영향

배반포기원	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
	신선란	152	74	48.7 ^b	47	31	66.0 ^a	47	32	68.1 ^a	45	23	51.1 ^{ab}	112	59
동결란	11	3	27.3	12	4	33.3	14	5	35.7	9	3	33.3	11	3	27.3

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 배반포기원에 따른 임신율은 표 31과 같다. 신선란군과 동결란군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 48.7%, 27.3%이었으며, G1군에서 각각 66.0%, 33.3%이었으며(P<0.05), G2군에서 각각 68.1%, 35.7%이었으며(P<0.05), T1군에서 각각 51.1%, 33.3%이었으며, T2군에서 각각 52.7%, 27.3%이었다. 동결수정란의 임신율이 낮은 것은 신선수정란에 비하여 동결수정란은 동결과정에서 수정란의 손상에 기인하는 것으로 사료된다.

한편, IFN의 공동이식에 따른 신선수정란의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나(P<0.05) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 IFN 감마를 신선수정란과 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

(6) 배발생일이 임신에 미치는 영향

표 32. IFN과 수정란의 공동이식시 배발생일이 임신에 미치는 영향

배발생일	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
	Day 6	59	28	47.5	12	6	50.0	14	10	71.4	17	10	58.8	50	27
Day 7	49	26	53.1	12	8	66.7	17	10	58.8	17	8	47.1	37	22	59.5
Day 8	44	20	45.5 ^b	23	17	73.9 ^a	16	12	75.0 ^a	11	5	45.5 ^{ab}	24	10	41.7 ^{ab}

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 배발생일에 따른 임신율은 표 32와 같다. Day 6군, Day 7군, Day 8군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 47.5%, 53.1%, 45.5%이었으며, G1군에서 각각 50.0%, 66.7%, 73.9%이었으며, G2군에서 각각 71.4%, 58.8%, 75.0%이었으며, T1군에서 각각 58.8%, 47.1%, 45.5%이었으며, T2군에서 각각 54.0%, 59.5%, 41.7%이었다.

한편, IFN의 공동이식에 따른 배발생 8일의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 유의적으로 높았으나($P<0.05$) 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 IFN 감마를 배발생 일 8일의 수정란과 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

이식한 체외수정란 중에서 배발생일령이 7일인 경우의 임신율은 56%로 8일 수정란 43%, 9일 수정란 41%에 비해 높다(Hasler 등, 1995)는 보고와는 달리 8일의 체외수정란이 7일의 체외수정란보다 임신율이 높다(Suzuki 등, 1991)고 하여 연구자간의 차이가 있다.

(7) 배발생단계가 임신에 미치는 영향

수정란과 IFN의 공동이식시 수란우의 배발생단계에 따른 임신율은 표 33과 같다. 초기배군, 중기배군, 확장기배군에 따른 임신율은 대조군에서 각각 47.0%, 47.6%, 58.3%이었으며, G1군에서 각각 61.1%, 75.0%, 70.0%이었으며, G2군에서 각각 68.2%, 76.9%, 63.6%이었으며, T1군에서 각각 52.2%, 50.0%, 50.0%이었으며, T2군에서 각각 56.3%, 48.0%, 47.1%이었다.

한편, IFN의 공동이식에 따른 중기배 및 확장기배의 임신율은 감마군이 대조군과 타우군에 비하여 높았으나 대조군과 타우군에서는 유사한 소견을 보여 IFN 감마를 배발생단계의 중기배 또는 확장기배와 공동이식하는 것이 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

표 33. IFN과 수정란의 공동이식시 배발생단계가 임신에 미치는 영향

배발생단계	Control			G1			G2			T1			T2		
	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)	이식 (두)	임신 (두)	임신율 (%)
초기배반포	100	47	47.0	18	11	61.1	22	15	68.2	23	12	52.2	71	40	56.3
중기배반포	42	20	47.6	16	12	75.0	13	10	76.9	12	6	50.0	25	12	48.0
확장배반포	12	7	58.3	10	7	70.0	11	7	63.6	12	6	50.0	17	8	47.1

*G1, G2 : interferon gamma 1만, 2만 IU ; T1, T2 : interferon tau 1만, 2만 IU

** χ^2 -test, $P<0.05$

본 연구의 결과는 중기배반포 및 확장배반포를 이식하였을 경우에 임신율이 다소 높은 소견을 보였다. 한편, 배반포란의 이식이 상실배 이식시보다 임신율이 높다는 보고(Putney 등, 1988)와 중기배반포와 확장배반포를 이식시 임신율이 차이가 없었다는 보고(Leeuw et al 등, 1997)가 있다.

라. 실험결과의 활용

- (1) IFN과 공동봉입 동결수정란의 직접 이식법 개발로 동결수정란 사용의 편리성과 대량 생산이 가능하므로 실용화에 활용
- (2) IFN과 쌍자 수정란의 독립구획내 동결법 및 직접이식법의 개발로 양측 자궁각내 쌍자 이식시에 활용
- (3) 초자화 동결수정란의 융해 후 IFN과 공동봉입 후 이식에 활용
- (4) 기성 정액(수정란)과 단일구획 봉입 IFN의 공동주입 기술의 상용화에 의한 한우와 젓소의 번식기술에 활용
- (5) 생식세포와 IFN 및 기타 목적물질의 공동봉입, 단용봉입, 병용봉입 기술을 융복합한 야외시험, 번식기술, 수정란 육종, 품종개량에 활용
- (6) IFN과 동결 봉입 정액, 신선수정란, 동결수정란 이식의 기술평가에 활용

제 7절 임상적용시험 평가

가. 실험목적

일차적으로 IFN을 생식세포와 공동으로 활용한 각 세부 과제의 결과들을 종합하여 인공수정에 의한 번식 및 수정란이식에 의한 임신 및 유사산의 결과를 이해하고 출생한 자축의 건강성 및 기형성을 평가함으로써 본 연구 개발과제에서 적용한 인터페론의 자축에 대한 유해성을 최종적으로 검증하기 위해서 본 세부과제를 실시하였다.

또한, 신생 송아지의 경우 초유 급여를 통해 어미로부터 충분한 수동면역을 획득하지 못한 경우 장관계나 호흡기계 점막에서 1차적으로 방어가 가능한 면역그로부린 A가 충분하지 못하여 장관계 점막과 호흡기계 점막의 파괴가 발생하고, 송아지의 건강 상태는 심각하게 된다. 그러므로, 1차적인 점막 면역을 충분히 발휘할 수 있도록 하고, 면역그로부린 역시 어미의 초유를 통하여 충분히 섭취하여야 한다. 따라서 초유급여에 대한 자축의 질병과 폐사에 대한 영향성도 동시에 평가하기 위하여 본 세부과제를 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 임신 평가

① 인공수정 및 수정란 이식후 발정증상 없이 40~50일이 경과한 시험축을 대상으로 초음파기를 활용한 태아영상을 판정하거나 직장검사를 통하여 태막활, 임신황체, 자궁의 비대칭성을 종합적으로 검토하여 임신을 판정하였다.

(2) 유사산 평가

① 임신이 확인된 수란우가 재발정이 온 경우에는 직장검사를 실시하여 태아가 존재하지 않는 경우와 태아 또는 태반 배출이 확인된 경우에 각각 유사산으로 판정하였다.

(3) 자축 평가

① 임신기간의 산정은 인공수정 및 이식기록을 기초로 하여 각 농가 수란우의 발정일을 기준으로 자연분만일까지의 기간을 임신기간으로 산정하였다.

② 성별, 체중, 건강성, 기형성을 판정하였고, 신체검사시 임상적으로 현저한 기능장애나 기형적 특징이 있는 경우에 기형으로 판정하였다.

(4) 초유 관리

① 분만전후 어미축에 IBR, BVDV, PI3, BRSV의 혼합백신인 Cattle-master 4 및 대장균백신을 실시하였다. 분만 직후 태어난 자축에 초유를 급여하였다.

② 분만한 모축으로부터 직접 착유한 초유를 급여하거나 자체 개발한 분말형복합초유를 급여하였다.

다. 실험결과

(1) 임신우의 유사산 및 자축의 평가

이식후 유사산, 자축의 체중, 성별, 기형성의 평가 결과는 표 34와 같다. 총 403두를 이식하여 217두가 임신하였고 유사산은 13두였다. 이 중 96두가 분만하여 자축을 생산하였고 나머지 수란우는 임신중이다. 유사산 발생율은 대조군에서 8두(11.1%), IFN군에서 5두(3.4%)이었다. 태어난 자축의 체중은 대조군에서 25.8kg, IFN군에서 24.8kg이었으며, 자축의 성비는 대조군에서 1.2, IFN군에서 1.4이었다. 자축의 기형성은 대조군에서 3두(5.9%), IFN군에서 2두(4.4%)이었다.

표 34. 이식후 유산, 자축의 체중, 성비, 기형성

Group	No. of recipients				No. of calves		
	이식 (%)	임신 (%)	유산산 (%)	분만 (%)	체중 (kg)	성비 (암:수)	기형 (%)
대조군	152	72 ^b (47.4)	8 ^a (11.1)	51 (62)	25.8	1.2	3 (5.9)
IFN군	251	145 ^a (57.8)	5 ^b (3.4)	45 (31)	24.8	1.4	2 (4.4)

*이식우 중 미분만우는 현재 임신 중

**a,b Different superscripts in the same column are significantly different. χ^2 -test, P<0.05

본 연구의 결과에서 보는 바와 같이 한우 체외수정란을 IFN과 공동으로 이식하여 임신이 확립된 후에 발생한 유산율과 기형율은 대조군에 비하여 다소 감소하는 소견을 보였으며, 체중과 성비에 있어서도 비슷한 소견을 보였다. 따라서 수정란과 IFN을 공동으로 이식한 경우에 임신율의 증가는 물론 분만율과 자축의 건강성에도 유해한 영향을 미치지 않는 것이 확인되었다.

(2) 복합 초유 급여량이 자축의 질병율과 폐사율에 미치는 영향

분말형복합 초유의 급여량에 따른 자축의 질병율과 폐사율은 표 35와 같다. 복합초유의 급여량이 20g이하군과 이상군에서의 설사 발생율은 각각 16.0%, 6.0%이었으며, 복합초유의 급여량이 20g이하군과 이상군에서의 폐렴 발생율은 각각 25.0%, 11.8%이었으며, 복합초유의 급여량이 20g이하군과 이상군에서의 폐사 발생율은 각각 8.0%, 0.0%이었다.

표 35. 분말형복합 초유의 급여량에 따른 자축의 질병율과 폐사율

복합초유량(g)	질병발생율(%)		폐사발생율(%)
	설사(%)	폐렴(%)	
20이하 (N=25)	4 (16.0)	5 (25.0)	2 (8.0)
20이상 (N=34)	2 (6.0)	4 (11.8)	0 (0.0)

*복합초유 : 면역초유와 난황 글로부린의 복합분말

** χ^2 -test, P<0.05

본 연구에서 보는 바와 같이 신생축의 설사 및 폐렴과 관련된 특이항체가 풍부하게 포함된 초유를 출생후 충분히 급여함으로써 신생축의 질병 발생율과 폐사율을 낮출 수 있다. 또한, 초유내에 특이항체를 증가시키기 위해서는 분만전의 어미축에 설사 및 폐렴과 관련된 특이항원이 포함된 예방주사를 반드시 실시하여야 한다. 만일 초유가 부족하거나 품질이 미달된다고 판단되는 경우에는 신생자축 전용의 대용초유를 충분히 급여하여야 한다.

(3) 출생 후 복합 초유 급여시간에 따른 자축의 질병율과 폐사율

표 36. 출생 후 복합 초유 급여시간에 따른 자축의 질병율과 폐사율

초유급여 시간 (시험 자축수)	No. of calves diseased and died		
	설사(%)	폐렴(%)	폐사(%)
초유미급여군 (N=68)	15 (22.1)	7 (10.3)	15 (22.1)
출생 3 시간 (N=30)	2 (6.7)	1 (3.3)	0 (0.0)
출생 3-12 시간 (N=16)	1 (6.3)	3 (18.8)	0 (0.0)
출생 12-24 시간 (N=10)	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (10.0)

* χ^2 -test, P<0.05

출생한 자축의 초유 급여시간에 따른 자축의 질병율과 폐사율은 표 36과 같다. 초유 미급여군, 3시간군, 3~12시간군, 12~24시간군에서 설사 발생율은 각각 22.1%, 6.7%, 6.3%, 2.0%이었으며, 초유 미급여군, 3시간군, 3~12시간군, 12~24시간군에서 폐렴 발생율은 각각 10.3%, 3.3%, 18.8%, 2.0%이었으며, 초유 미급여군, 3시간군, 3~12시간군, 12~24시간군에서 폐사 발생율은 각각 22.1%, 0.0%, 0.0%, 10.0%이었다.

본 연구의 결과에서 보는 바와 같이 신생자축에 대한 초유 급여는 급여량의 중요성 뿐만 아니라 급여 시간 또한 자축의 질병과 폐사에 큰 영향을 미치므로 장관내에서 면역그로부린의 흡수가 용이한 시간내에 초유를 급여하여야 한다. 따라서, 초유의 급여시간은 출생후 적어도 3시간내에는 반드시 급여하여야 하며, 포유를 거부하는 송아지는 강제급여를 시키지 말고 면역글로부린이 충분히 포함된 소용량의 대용초유를 급여하는 것이 신생축의 혈중내 특이항체를 증가시킬 수 있는 방법이라고 사료된다.

제 8절 결론

동일한 스트로 내에 IFNs과 소 정액(수정란)을 동시에 봉입한 상태로 동결을 실시하여 이들을 동시에 용해 후 자궁내로 정액(수정란)을 주입(이식)하거나 신선 수정란을 이식함으로써 “시술시의 편리성”과 “임신율의 혁신성”을 도모하는 제반 기술과 제품을 개발하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

제 1세부과제의 ‘소 IFN-tau의 생산 기술 및 제품, 활용 농도, 기재 개발’에서 유전자 재조합법에 의하여 소 IFNs 단백질을 생산, 정제하여 소 IFN의 유전자 서열을 분석하였으며, 유전자

은행에 등록하여 배타적 지위를 확보하였으며, 생물학적 활성평가를 통하여 항바이러스능을 확인하였고, 보존 온도에 따른 반감기를 평가하여 보존방법도 동시에 확립하였으며, IFN의 공동주입 및 이식에 적합한 부형제도 동시에 개발하여 기초학문 개발 및 축산현장에서 실용화가 가능한 기틀을 마련하고 본 연구의 각 세부과제의 연구 개발 시험에 제공함으로써 기본적인 목표를 성공적으로 달성하였다.

제 2세부과제의 ‘스트로 내 IFN과 생식세포의 공동봉입형 동결기술 및 제품 개발’에서 정액 및 난자에 대한 IFN의 유해성과 활성을 평가하여 안전성을 확립함으로써 동일한 스트로우내에 정액 및 난자를 공동봉입한 상태에서 동결 및 용해후 활용할 수 있는 기술을 확립함과 동시에 이들 IFN과 신선수정란을 ‘공동봉입하는 기술’을 개발함으로써 암소의 자궁내에 이들 생식세포를 동시에 주입하거나 이식하는 기술을 개발하여 특허기술을 출원함으로써 이에 대한 선점적 지위를 확보하여 정액 및 수정란 생산업체, 번식현장에 적용할 수 있는 기반을 마련하였고, 연속적인 세부과제에 제공함으로써 소기의 목적을 성공적으로 달성하였다.

제 3세부과제의 ‘독립 스트로내 IFN의 단일봉입 및 보존 기술 개발’에서 기성생식세포와 본 연구에서 개발된 착상유도물질로써의 IFN을 동시에 자궁내로 주입할 수 있는 기술을 개발함으로써 관련업체에도 공급할 수 있음은 물론 축산업현장에서 일반 인공수정기구와 주입방법을 손쉽게 활용할 수 있는 기술과 특허를 확보하였고, 관련된 세부과제에 제공함으로써 소기의 목적을 성공적으로 달성하였다.

제 4세부과제의 ‘정액과 IFN의 동시 주입용 기구 개발’에서 기성 정액 및 수정란을 1회의 시술로써 공동주입 또는 공동이식할 수 있는 ‘2단형 인공수정기’와 ‘스트로우 연결관’을 발명하여 시술의 편리함과 경비절감 효과를 동시에 달성하고 상표출원 및 이를 활용한 인공수정방법을 특허출원함으로써 이에 대한 독점적 지위를 확보하여 제품의 생산 및 판매가 가능하므로 정액 및 수정란 생산업체, 번식현장에 적용할 수 있는 기반을 마련하였고, 연속적인 세부과제에 제공함으로써 소기의 목적을 성공적으로 달성하였다.

제 5세부과제의 ‘최적의 수란우 관리 기술 개발’에서 본 연구의 세부과제에서 개발된 IFN과 수정란을 공동으로 이식하는 방법에 의한 최대의 임신증진 효과를 거두기 위한 수란우 관리기술이 임신에 미치는 영향에 대한 평가 방법을 마련하여 수정란과 IFN의 공동이식법을 적용하여 시술을 함으로써 IFN-tau군의 임신율은 대조군과 비슷하거나 다소 높은 경향이었으나 IFN-gamma의 임신율은 기존 방법에 비하여 유의적으로 높은 임신율을 확립함으로써 소기의 목적을 충분히 달성하였고, 수란우의 각 변인에 미치는 영향성을 다각적으로 평가하여 수정란 이식시의 수란우의 관리기술과 IFN의 활용 농도를 도출하는데 성공하였으며, IFN-타우를 활용한 추가적인 연구가 필요하다.

제 6세부과제의 ‘생식기내 IFN의 최적 이식 기술 개발’에서 본 연구의 세부과제에서 개발된 IFN과 수정란을 공동으로 이식하는 방법에 의한 최대의 임신증진 효과를 거두기 위한 이식기술이 임신에 미치는 영향에 대한 평가 방법을 마련하여 수정란과 IFN의 공동이식법을 적용하여 시술함으로써 IFN-tau의 임신율은 기존 방법과 유사하거나 다소 높은 경향으로 예상에는 다소 못 미쳤지만 IFN-gamma의 임신율은 기존 방법에 비하여 유의적으로 높은 임신율을 확립함으로써 소기의 목적을 충분히 달성하였고, 이식 기술이 각 변인에 미치는 영향성을 다각도로 평가하여 수정란 이식시의 시술자의 기술과 IFN의 활용 농도를 도출하는데 성공하였으며 IFN-타우를 활용한 추가적인 연구가 필요하다.

제 7세부과제의 ‘임상적용시험 평가’에서 IFN을 생식세포와 공동으로 활용한 각 세부 과제의 결과들을 종합하여 인공수정에 의한 번식 및 수정란이식 후의 유산율과 기형성은 다소 감소하였고, 출생한 자축은 대조군에 비하여 비슷한 체중과 성비를 보였으며 건강성도 양호하므로 IFN과 생식세포를 공동으로 이식한 후의 후대축의 안정성을 확립하였으며, 또한 신생자축의 초유급여 방법을 확립하여 질병율과 폐사율을 감소시키는 기술을 성공적으로 확립하였다.

총괄적 결론으로써 IFN과 생식세포를 공동으로 활용할 수 있는 편리하고 임신율이 유의적으로 높은 기술을 확립 또는 개발함으로써 축산업 발전 및 번식기술 개발에 이바지할 수 있을 것으로 사료된다.

제 4 장 연구개발 목표의 달성도 및 기술발전 기여도

1. 공동연구진은 소의 인터페론 타우 중에서도 한우가 특이적으로 가지는 유전자를 개발하고 이에 대한 재조합 단백질을 발현, 정제하는 기술을 확보하였다. 한우에 특이적인 인터페론 타우를 생산함으로써 기존에 알려진 holstein의 단백질과 달리 국내의 한우들에게 면역반응을 유발하지 않으면서도 그 기능성은 확대가 된 제품을 생산할 수 있는 기반을 마련한 것이다. 이러한 유전자 정보는 GenBank에 등록(Accession No. HQ235019)함으로써 본 연구진이 이 유전자에 대한 배타적 입지를 확보하였다.

2. 제 1세부과제에서 생산된 재조합 IFN-tau와 IFN-gamma를 생식세포와 공동으로 주입하기 위한 straw내 봉입법, 연결방법, 연결관을 개발하여 특허를 출원하였다.

3. 암소의 자궁내에 생식세포와 IFN을 동시동작으로 주입하기 위한 2단형 인공수정기를 개발하여 특허를 출원하였으며, 시작품을 제작하여 실용화를 목전에 두고 있다.

4. IFN과 생식세포를 동시에 봉입하여 수란우에 주입(이식)할 수 있으며 임상적으로 활용 가능한 최적의 수정란 이식기술과 수란우 관리기술을 확립함으로써, 임신율은 유의적으로 증가하였고 수란우의 유산율은 낮았다.

5. 재합성 단백질을 활용하여 생산된 자축은 신체 검사상 대부분 건강하였고 정상적인 신체 기능과 기관을 가졌으며, 기형율은 일반적인 인공수정법 및 IVF-ET에 비하여 낮았다.

6. 출생한 자축에 대한 초유 급여법을 개선하여 질병 발생율과 폐사율을 줄일 수 있었다.

따라서, 본 연구 개발 결과를 실용화하면 번식성적을 증가시키고 자축의 건강성을 개선하여 농가의 소득 향상에 크게 기여할 것으로 사료된다.

1. 연구개발 목표의 달성도

가. 특허 성과 목표 및 달성도

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명칭 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1					1		2	
	달성	1					1			
2차년도	목표	1	2					1	1	
	달성	4								
계	목표	2	2				1	1	3	
	달성	5					1			
출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우					
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호	
2010	참조	참조	국내	10-2010-0 011422						
2011	참조	참조	PCT	PCT/KR2 011/00080 0						
2011	참조	참조	국내	40-2011-0 008170						
2011	참조	참조	국내	40-2011-0 008171						
2011	참조	참조	국내	40-2011-0 008172						
2011	참조	참조	국내	40-2011-0 008173						

*

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1		1		
	달성	3		2		

나. 논문게재 성과

개재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011 (진행중)	소에서 interferon이 동결-융해 정자의 활력과 인공수정 임신율에 미치는 효과	김소섭	박용수	장종식	한국수정란 이식학회지	26(3)	국내	비SCI

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
	IFN 판매	농가					200만원	

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 종인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
		1		1	1	1			1

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- * 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- * 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등
- * 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- * 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등

본 연구진은 소의 인터페론 타우 유전자, 단백질 생산 및 세포 활성화 등에 대하여 얻은 정보를 취합하여 본연구가 종료되기 전에 SCI급 논문을 투고할 계획이다. 새로운 유전자와 단백질의 기능에 대하여 얻은 뚜렷한 결과와 정보가 있으므로 논문 출간에는 문제가 없을 것으로 사료된다.

1. 본 연구과제를 통해서 획득한 한우 인터페론 타우 유전자를 활용해서 생산한 재조합 단백질을 활용해서 현재 항체를 제작하고 있음.
2. 제작된 항체는 소 인터페론 타우 ELISA kit을 제작해서 인터페론 타우와 관련된 임신 및 그 밖의 바이러스 감염에 관련된 연구에 활용할 계획임.
3. 인터페론 타우 재조합 단백질을 시약용 제품으로 출시하여 세계 여러 축산관련 연구자들에게 보급함으로써 지금까지 밝혀진 인터페론 타우 기능 이외 새로운 기능연구에 활용가치가 있을 것으로 고려됨.
4. 연결용 AIconnector, IFN 봉입 스트로우 및 2단형 인공 수정기를 생산하여 농가에 보급할 예정임.
5. 농가에 대한 기회교육 및 현장지도를 통한 인공수정 및 수정란 이식기술을 발전시킬 계획임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 연구 관련 문헌 탐색

(1) Granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor increases interferon-tau protein secretion in bovine trophectoderm cells.

Michael DD, Wagner SK, Ocón OM, Talbot NC, Rooke JA, Ealy AD.
Am J Reprod Immunol. 2006 Jul;56(1):63-7.

Abstract

PROBLEM: Uterine-derived factors are required for optimal conceptus development and secretion of the maternal recognition of pregnancy factor, interferon-tau (IFN-tau). Identifying these factors may lead to the development of schemes for increasing pregnancy success in cattle.

METHOD OF STUDY: The objectives were to examine the effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor (GM-CSF) on trophectoderm proliferation rates and IFN-tau production, and verify the appropriateness of using an in vitro model of bovine trophectoderm (CT-1 cell).

RESULTS: Rate of [(3)H]-thymidine incorporation into DNA was increased by supplementation of CT-1 medium with 10 or 100 ng/mL porcine (po) GM-CSF. GM-CSF supplementation to CT-1 medium also increased IFN-tau secretion. When results were normalized to account for number of CT-1 cells, 10 and 100 ng/mL poGM-CSF increased antiviral activity and IFN-tau concentrations (using an IFN-tau-specific enzyme-linked immunosorbent assay) in CT-1 conditioned medium compared with controls.

CONCLUSIONS: These findings indicate that GM-CSF increases proliferation and IFN-tau production in bovine trophectoderm.

(2) Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants.

Ealy AD, Yang QE.

Am J Reprod Immunol. 2009 Feb;61(2):95-106. Review.

Abstract

PROBLEM: A type I interferon (IFN), termed IFN-tau (tau), is responsible for the establishment and maintenance of early pregnancy in cattle and sheep. The control of IFNtau gene (IFNT) expression is not completely understood.

METHOD OF STUDY: This article will provide an overview of recent progress made in understanding the dynamic expression pattern of IFNT during pre- and peri-attachment conceptus development.

RESULTS: Several ubiquitous transcriptional regulators (Ets2 and AP1) and at least two trophoblast factors (Cdx2 and Dlx3) control IFNT transcription during early pregnancy. Co-activators (CBP/p300) are also involved in this process. At least two uterine-derived factors (GM-CSF and FGF2) stimulate IFN-tau production in bovine trophoblast, and multiple signaling pathways are functionally linked with IFNT expression.

CONCLUSION: Although understanding the regulation of IFNT expression is far from complete, considerable progress has been made in uncovering how uterine-derived factors and key placental-specific transcriptional regulators control IFNT expression.

(3) Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy.

Martal J, Chêne N, Camous S, Huynh L, Lantier F, Hermier P, L'Haridon R, Charpigny G, Charlier M, Chaouat G.

Reprod Fertil Dev. 1997;9(3):355-80. Review.

Abstract

This review considers the potential reduction of embryo mortality in vitro and in vivo in ruminants. Data on cytokines provided by different fields of reproductive immunology and biology were collated. Because of the crucial importance of the local interactions between the embryo and its dam, the expression of growth-factor and cytokine genes was analysed in the embryo proper, trophoblast, oviduct and endometrium by reverse transcriptase polymerase chain reaction in sheep and in cattle during the pre- and periimplantation periods.

Many deleterious cytokines, such as tumour necrosis factor-alpha, interferon-gamma (IFN-gamma), interleukin-2 (IL-2), and beneficial cytokines, such as transforming growth factor-beta, leukaemia inhibiting factor, colony-stimulating factor-1 (CSF-1), granulocyte-macrophage CSF, IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 and IFN-tau appeared to be involved in embryo survival in ruminants and other species.

Their administration is efficient in a murine experimental model (CBA/J x DBA/2) of embryonic and fetal mortality. For instance, recombinant ovine IFN-tau (roIFN-tau) injected at the moment of implantation drastically reduces embryonic mortality in this model. In ruminants, roIFN-tau and recombinant bovine IFN-tau are very efficient in maintaining progesterone luteal secretion in cyclic animals. The involvement of IFN-tau in the mechanisms of maternal pregnancy recognition are particularly detailed in relation to inhibition of 13,14 dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha (PGFM) pulses and oxytocin uterine receptivity. A synthetic model of the anti-luteolytic effects of IFN-tau on the

endometrial cell is proposed.

Finally, the particular potential of serum pregnancy-specific proteins (PSPs: PSPB, PSP60, pregnancy-associated glycoprotein) for monitoring embryo survival, with examples given for cattle and sheep is underlined.

Intrauterine Administration of Peripheral Blood Mononuclear
Cells Enhances Early Development of the Pre-Implantation
Bovine Embryo

Mol. Reprod. Dev. 77: 954 - -962, 2010. 2010 Wiley-Liss, Inc.

ATSUSHI IDETA,^{1*} KOH HAYAMA,¹ YUUKI NAKAMURA,¹ TOSHIHIRO SAKURAI,²
KANAMI TSUCHIYA,¹ SACHI TANAKA,³
TAKAHIRO YAMAGUCHI,³ HIROSHI FUJIWARA,⁴ KAZUHIKO IMAKAWA,²
AND YOSHITO AOYAGI¹

SUMMARY

Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) prior to bovine embryo transfer (ET) was previously shown to improve the pregnancy rate. To better understand how PBMCs improve the pregnancy rate, we examined gene expression in the cells from uterine lumen and evaluated the morphology of bovine pre-attachment embryos in utero following intrauterine administration of PBMCs. On day 3 of the estrous cycle (day 0½estrous), bovine PBMCs were isolated and suspended in RPMI 1640, and were incubated for 24 hr. The cultured PBMCs were administered non-surgically to the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum on day 4 of the estrous cycle (PBMC group). On day 9, endometrial - luminal lymphoid cells from uterine lumen ipsilateral to the corpus luteum were collected by uterine flushing. Transcripts for macrophage-colony stimulating factor in the lymphoid cells were more abundant in the PBMC group than in the control group ($P < 0.05$). On day 7 (of the separate experiments), five blastocysts were each transferred to the luminal area, to which PBMCs had been administered on day 4. These embryos were allowed to develop in utero until day 15 of gestation, when embryos were non-surgically retrieved from the uterus. The average length of trophoblasts recovered from the PBMC group was significantly longer than that of the control group (51.67.8 vs. 27.46.0 mm, $P < 0.05$). Our results strongly suggest that intrauterine administration of PBMCs improves endometrial environment, which promotes early development of pre-attachment conceptuses.

제 7 장 참고문헌

1. ATSUSHI IDETA, KOH HAYAMA, YUUKI NAKAMURA, TOSHIHIRO SAKURAI, KANAMI TSUCHIYA, SACHI TANAKA, TAKAHIRO YAMAGUCHI, HIROSHI FUJIWARA, KAZUHIKO IMAKAWA, AND YOSHITO AOYAGI. Intrauterine Administration of Peripheral Blood Mononuclear Cells Enhances Early Development of the Pre-Implantation Bovine Embryo. *Molecular Reproduction & Development* 77:954 - 962 (2010)
2. Baka S, Zourla K, Malamitsi-Puchner A, Makrakis E, Kaparos G, Demeridou S, Moustakarias T, Tzanakaki D, Hassiakos D, Kouskouni E. Intrafollicular levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 in patients with polycystic ovaries are not associated with pregnancy rate during IVF cycle. *In Vivo*. 2009 Jan-Feb;23(1):89-92.
3. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA. Interferons and uterine receptivity. *Semin Reprod Med*. 2009 Jan;27(1):90-102. Epub 2009 Feb 5.
4. Bazer, F. W, Spencer, T. E. and Ott, T. L., Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 1997. 37: 412-420.
5. Beekhuizen H, van de Gevel JS. Gamma interferon confers resistance to infection with *Staphylococcus aureus* in human vascular endothelial cells by cooperative proinflammatory and enhanced intrinsic antibacterial activities. *Infect Immun*. 2007 Dec;75(12):5615-26. Epub 2007 Sep 24.
6. Binelli, M., Subramaniam, P., Diaz, T., Johnson, G. A., Hansen, T. R., Badinga, L. and Thatcher, W. W., Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Biol Reprod* 2001. 64: 654-665.
7. Bolin SR. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1995 Nov;11(3):615-25.
8. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, Lentjes EG, Fauser BC, Heijnen CJ,

- Macklon NS. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod.* 2009 Jun;24(6):1427-35. Epub 2009 Feb 19.
9. Bott RC, Ashley RL, Henkes LE, Antoniazzi AQ, Bruemmer JE, Niswender GD, Bazer FW, Spencer TE, Smirnova NP, Anthony RV, Hansen TR. Uterine vein infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biol Reprod.* 2010 Apr;82(4):725-35.
10. Boysen P, Storset AK. Bovine natural killer cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Aug 15;130(3-4):163-77. Epub 2009 Mar 5.
11. Bridges PJ, Wright DJ, Buford WI, Ahmad N, Hernandez-Fonseca H, McCormick ML, Schrick FN, Dailey RA, Lewis PE, Inskeep EK. Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *J Anim Sci.* 2000 Nov;78(11):2942-9.
12. Cha SB, Rayamajhi N, Kang ML, Lee WJ, Shin MK, Yoo HS. Comparative Study of Gamma Interferon Production in Mice Immunized with Outer Membrane Proteins and Whole Bacteria of *Brucella abortus*. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Jan;63(1):49-51.
13. Chagas ESJ, Cidadao MR, Lopes DCL. Effect of parity and type of estrus of recipient on pregnancy rate following embryo transfer in dairy cattle (abstract). *Proc. of the 15th Scientific Meeting of the AETE.* Lyon, France, 1999; 132
14. Chen Q, Ng V, Mei J, Chia SE. Comparison of seminal vitamin B12, folate, reactive oxygen species and various sperm parameters between fertile and infertile males. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2001 Mar;30(2):80-2.
15. Chen, Y., Green, J. A., Antoniou, E., Ealy, A. D., Mathialagan, N., Walker, A. M., Avalle, M. P., Rosenfeld, C. S., Hearne, L. B. and Roberts, R. M., Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology* 2006. 147: 2127-2137.
16. Del Campo MR, Rowe RF, Chaichareon D, Ginther OJ. Effect of the relative locations of embryo and corpus luteum on embryo survival in cattle. *Reprod Nutr Dev.* 1983;23(2a):303-8.

17. Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshihara N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohara S. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 1998; 49: 1051-1058
18. Dunn TG. Relationship of nutrition to successful embryo transplantation. *Theriogenology* 1980; 13: 27-39
19. Ealy AD, Larson SF, Liu L, Alexenko AP, Winkelman GL, Kubisch HM, Bixby JA, Roberts RM : Polymorphic forms of expressed bovine interferon-tau genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. *Endocrinology* 2001; 142:2906 - 2915.
20. Ealy AD, Yang QE. Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. *Am J Reprod Immunol.* 2009 Feb;61(2):95-106.
21. Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM: Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol Reprod* 1990; 43:210 - 218.
22. Farin PW, Farin CE. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: Survival and fetal development. *Biol Reprod* 1995; 52: 676-682
23. Feinberg B.B., Tan N.S., Walsh S.W., Brath P.C., and Gonik B.(1992). Progesterone and estradiol suppress human mononuclear cell cytotoxicity. *J. Reprod. Immunol.* 21: 139-142.
24. Gentilomi G, Lelli R, D'Angelo M, Langella V, Monaco F, Portanti O, Luciani M, Mirasoli M, Roda A, Zerbini M, Musiani M. Expression of bioactive recombinant bovine interferon-gamma using baculovirus. *New Microbiol.* 2006 Jan;29(1):19-24.
25. Ghafouri MTA, Ludwick TM, Rader ER, et al. Some effects of side of pregnancy on performance in dairy cattle implications on embryo transfer procedures. *Theriogenology* 1980; 13: 96.
26. Green MP, Spate LD, Bixby JA, Ealy AD, Roberts RM. A comparison of the

anti-luteolytic activities of recombinant ovine interferon- α and - τ in sheep. *Biol Reprod.* 2005 Dec;73(6):1087-93.

27. Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M., Green D.R., and Ferguson T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270:1189-1192.

28. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995; 43: 141-152

29. Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 1401-1415

30. Hasler JF. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22(1):119-25.

31. Henry Beekhuizen and Joke S. van de Gevel. Gamma Interferon Confers Resistance to Infection with *Staphylococcus aureus* in Human Vascular Endothelial Cells by Cooperative Proinflammatory and Enhanced Intrinsic Antibacterial Activities. *INFECTION AND IMMUNITY*, Dec. 2007, p. 5615 - 5626 Vol. 75, No. 12

32. Hernandez-Ledezma JJ, Sikes JD, Murphy CN, Watson AJ, Schultz GA, Roberts RM: Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod* 1992; 47:374 - 380.

33. Hughes HP, Campos M, van Drunen Littel-van den Hurk S, Zamb T, Sordillo LM, Godson D, Babiuk LA. Multiple administration with interleukin-2 potentiates antigen-specific responses to subunit vaccination with bovine herpesvirus-1 glycoprotein IV. *Vaccine.* 1992;10(4):226-30.

34. Hu JH, Tian WQ, Zhao XL, Zan LS, Xin YP, Li QW. The cryoprotective effects of vitamin B12 supplementation on bovine semen quality. *Reprod Domest Anim.* 2011 Feb;46(1):66-73.

35. Huang J., Roby K.F., Pace J.L., and Hunt J.S. (1995). Localization and hormonal

regulation of inducible nitric oxide synthase in cycling mouse uterus. *J. Leukocyte Biol.* 57: 27-35.

36. Hunt J.S., Chen H.-L., Hu X.-L., and Pollard J.W. (1993). Normal distribution of tumor necrosis factor- α messenger ribonucleic acid and protein in virgin and pregnant osteopetrotic (op/op) mice. *Biol. Reprod.* 49: 441-452.

37. Hunt JS, Miller L, Platt JS. Hormonal regulation of uterine macrophages. *Dev Immunol.* 1998;6(1-2):105-10. Review.

38. Hunt J.S., and Pollard J.W. (1992). Macrophages in the uterus and placenta. In *Current Topics in Microbiology and Immunology, Macrophages and Macrophage Activation*, Gordon S., and Russell S.W., Eds. (Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 39-63.

39. Hunt J.S., and Robertson S.A. (1996). Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. *J. Reprod. Immunol.* 32: 1-25.

40. Jansen RG, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Interferon- γ -loaded collagen scaffolds reduce myofibroblast numbers in rat palatal mucosa. *Eur J Orthod.* 2011 Feb;33(1):1-8. Epub 2010 Jan 27.

41. Jung YG, Sakata T, Lee ES, Fukui Y. Amino acid metabolism of tabolisblastocysts derived from parthenogenetically activated or in vitro fertilized oocyteslastocystFertil Dev. 1998;10(3):279-87.

42. Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biol Reprod.* 2001 Oct;65(4):1127-34.

43. Kajihara Y, Kometani N, Shiinaka Y, Saito S, Yamaguchi Y, Hiiiyama K, Endo H. Pregnancy rate and births after the direct transfers of frozen-thawed bovine IVF embryo (abstract). *Theriogenology* 1992; 37: 233.

44. Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM, Golueke P. In vitro culture of bovine IVM-IVF embryos: Cooperative interaction among embryos and the role of growth factors.

Theriogenology. 1994;41(6):1323-31.

45. Kovacs F, Magyar T, Rinehart C, Elbers K, Schlesinger K, Ohnesorge WC. The live attenuated bovine viral diarrhoea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection. *Vet Microbiol* 2003; 96: 117-131.

46. Lee DM, Lee TK, Song HB, Kim CH. The expression of matrix metalloproteinase-9 in human follicular fluid is associated with in vitro fertilisation pregnancy. *BJOG*. 2005 Jul;112(7):946-51.

47. Leung ST, Derecka K, Mann GE, Flint AP, Wathes DC. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. *J Reprod Fertil*. 2000 May;119(1):25-33.

48. Lindgren A, Pavlovic V, Flach CF, Sjöling A, Lundin S. Interferon-gamma secretion is induced in IL-12 stimulated human NK cells by recognition of *Helicobacter pylori* or TLR2 ligands. *Innate Immun*. 2010 Feb 3. [Epub ahead of print]

49. Ma CH, Yan LY, Qiao J, Sha W, Li L, Chen Y, Sun QY. Effects of tumor necrosis factor-alpha on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(3):920-6. Epub 2009 Mar 26.

50. Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*. 1999;54:317-28. Review.

51. Mapletoft RJ, Lindsell CE, Pawlyshyn V. Effects of clenbuterol, body condition and non-surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients. *Theriogenology* 1986; 25: 172.

52. Mcevoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA, Robertson IS. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Anim Reprod Sci* 1997; 47: 71-90.

53. Meyer R, Regis L, Vale V, Paule B, Carminati R, Bahia R, Moura-Costa L, Schaer R,

- Nascimento I, Freire S. In vitro IFN- γ production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005 Sep 15;107(3-4):249-54.
54. Moussa M, Marinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.* 2002 Apr 1;57(6):1695-706.
55. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod.* 2009 May;80(5):848-59. Epub 2009 Jan 21.
56. Neira JA, Tainturier D, Peña MA, Martal J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- β 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology.* 2010 Mar 15;73(5):595-604. Epub 2009 Dec 24.
57. Nettleton PF, Entrican G. Ruminant pestiviruses. *Br Vet J* 1995; 151: 615-642
58. Newcomb R, Rowson LEA. Conception rate after uterine transfer of cow eggs, in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *J Reprod Fert* 1975; 43: 539-541.
59. Niemann H, Tenhumberg H, Sacher B and Kruff B. Pregnancy rates after nonsurgical transfer of cattle embryos frozen and thawed by a field method (abstract) *Anim Breed* 1985; 53: 206-207.
60. Nyachio A, Spiessens C, Chai DC, Kiulia NM, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Separate and combined effects of caffeine and dbcAMP on olive baboon (*Papio anubis*) sperm. *J Med Primatol.* 2010 Jun;39(3):137-42. Epub 2010 Jan 25.
61. Odhiambo JF, Poole DH, Hughes L, Dejarnette JM, Inskeep EK, Dailey RA. Pregnancy outcome in dairy and beef cattle after artificial insemination and treatment with seminal plasma or transforming growth factor beta-1. *Theriogenology.* 2009 Sep 1;72(4):566-71. Epub 2009 Jun 5.
62. Peláez J, Breininger E, Alegre B, Peña FJ, Domínguez JC. In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. *Reprod Domest*

Anim. 2006 Apr;41(2):153-61.

63. Pope WF, Maurer RR, Stormshak F. Distribution of progesterone in the uterus, broad ligament and uterine arteries of beef cows. *Anat Rec* 1982; 245-250

64. Pospisil Z, Krejei J, Jinek P, Lany P, Zendulkova D, Cihal P. Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Microbiol* 1996; 53: 199-206.

65. Purdy PH, Graham JK. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod.* 2004 Aug;71(2):522-7. Epub 2004 Apr 7.

66. Putney DJ, Thatcher WW, Drost M, Wright JM, DeLorenzo, MA. Influence of environmental temperature on reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the southwest region of the United States. *Theriogenology* 1988; 30: 905-922.

67. Rebecca C. Bott, Ryan L. Ashley, Luiz E. Henkes, Alfredo Q. Antoniazzi, Jason E. Bruemmer, Gordon D. Niswender, Fuller W. Bazer, Thomas E. Spencer, Natalia P. Smirnova, Russell V. Anthony, Thomas R. Ha V.n. Uterine Vein Infusion of Interferon Tau (IFNT) Extends Luteal Life Span in Ewes. *BIOLOGYnkF REPRkDUCTION* 82, 725 - 735 (2010)

68. Reber AJ, Tanner M, Okinaga T, Woolums AR, Williams S, Ensley DT, Hurley DJ. Evaluation of multiple immune parameters after vaccination with modified live or killed bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2006 Jan;29(1):61-77.

69. Revel A, Helman A, Koler M, Shushan A, Goldshmidt O, Zcharia E, Aingorn H, Vlodaysky I. Heparanase improves mouse embryo implantation. *Fertil Steril.* 2005 Mar;83(3):580-6.

70. Roberts, R. M., Liu, L. and Alexenko, A., New and atypical families of type I interferons in mammals: comparative functions, structures, and evolutionary relationships. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1997. 56: 287-325.

71. Robinson RS, Hammond AJ, Wathes DC, Hunter MG, Mann GE. Corpus luteum–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. *Reprod Domest Anim.* 2008 Jul;43 Suppl 2:104–12. Review.
72. Robinson, R. S., Mann, G. E., Lamming, G. E. and Wathes, D. C., The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *J Endocrinol* 1999. 160: 21–33.
73. Rogez, C., Martin, M., Dereuddre–Bosquet, N., Martal, J., Dormont, D. and Clayette, P., Anti–human immunodeficiency virus activity of tau interferon in human macrophages: involvement of cellular factors and beta–chemokines. *J Virol* 2003. 77: 12914–12920.
74. Romanato M, Cameo MS, Bertolesi G, Baldini C, Calvo JC, Calvo L. Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Hum Reprod.* 2003 Sep;18(9):1868–73.
75. Schneider HJ, Castleberry RS, Griffi JL. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* 1980; 13: 73–85.
76. Serrano–Martínez E, Ferre I, Martínez A, Osoro K, Mateos–Sanz A, Del–Pozo I, Aduriz G, Tamargo C, Hidalgo CO, Ortega–Mora LM. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon–gamma responses. *Theriogenology.* 2007 Apr 1;67(6):1175–84. Epub 2007 Feb 21.
77. Shabankareh HK, Zandi M. Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin–like growth factor I, and cysteamine. *Fertil Steril.* 2010 Jun;94(1):335–40. Epub 2009 Mar 26.
78. Shamsuddin M. Effect of growth factors on bovine blastocyst development in a serum–free medium. *Acta Vet Scand.* 1994;35(2):141–7.
79. Sinclair KD, Lunn LA, Kwong WY, Wonnacott K, Linforth RS, Craigon J. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in–vitro embryo development. *Reprod Biomed Online.* 2008 Jun;16(6):859–68.

80. Silvia, W. J., et al. 1984. Cellular and molecular mechanisms involved in luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 7:57
81. Soos, J. M. and Johnson, H. M., Interferon-tau: prospects for clinical use in autoimmune disorders. *BioDrugs* 1999. 11: 125-135.
82. Soos, J. M., Subramaniam, P. S., Hobeika, A. C., Schiffenbauer, J. and Johnson, H. M., The IFN pregnancy recognition hormone IFN-tau blocks both development and superantigen reactivation of experimental allergic encephalomyelitis without associated toxicity. *J Immunol* 1995. 155: 2747-2753.
83. Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW: Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 2004; 82 - 83:537 - 550.
84. Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. *Biol Reprod.* Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. 2004 Jul;71(1):2-10. Epub 2004 Feb 18. Review.
85. Stewart DM, Johnson GA, Vyhldal CA, Burghardt RC, Safe SH, Yu-Lee LY, Bazer FW, Spencer TE. Interferon-tau activates multiple signal transducer and activator of transcription proteins and has complex effects on interferon-responsive gene transcription in ovine endometrial epithelial cells. *Endocrinology.* 2001 Jan;142(1):98-107.
86. S. T. Leung, K. Derecka, G. E. Mann², A. P. F. Flint² and D. C. Wathes. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* (2000) 119, 25-33
87. Stojkovic M, Wolf E, Büttner M, Berg U, Charpigny G, Schmitt A, Brem G. Secretion of biologically active interferon tau by in vitro-derived bovine trophoblastic tissue. *Biol Reprod.* 1995 Dec;53(6):1500-7.
88. Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Leese HJ, Lonergan P. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *Mol Reprod Dev.* 2010 Mar;77(3):285-96.

89. Suzuki T, Yamamoto M, Coe M, Nishikata Y, Okamoto K, Tsukihara T. Effect of media on fertilization and development rates of in vitro fertilized embryos, and of age and freezing of embryos on pregnancy rates (abstract). *Theriogenology* 1991; 35: 278.
90. Talbot NC, Powell AM, Ocón OM, Caperna TJ, Camp M, Garrett WM, Ealy AD; Comparison of the interferon-tau expression from primary trophoctoderm outgrowths derived from IVP, NT, and parthenogenote bovine blastocysts. *U.S. Mol Reprod Dev.* 2008 Feb;75(2):299-308.
91. Taponen J. Fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Acta Vet Scand.* 2009 Nov 30;51:48.
92. Thatcher, W. W. and M.D. Meyer. 1995. The twin capacity of the uterus in heifers and cows. *Deusche Tierarztliche Wochenschrift.* 86:470
93. Thérien I, Bergeron A, Bousquet D, Manjunath P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev.* 2005 May;71(1):97-106.
94. Tucker HA. Seasonality in cattle. *Theriogenology* 1982; 17: 53-59.
95. Vilcek J, Sen GC (1996) Interferons and other cytokines. In *Fields Virology*, Fields BN, Knipe DM and Howley PM, eds. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 375-399.
96. van Oirschot JT, Brusckhe CJ, van Rijn PA. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol.* 1999 Jan;64(2-3):169-83.
97. Watanabe T, Ebara S, Kimura S, Maeda K, Watanabe Y, Watanabe H, Kasai S, Nakano Y. Maternal vitamin B12 deficiency affects spermatogenesis at the embryonic and immature stages in rats. *Congenit Anom (Kyoto).* 2007 Mar;47(1):9-15.
98. Weems CW, Lee CN, Weems YS, Vincent DL. Distribution of progesterone to the uterus and associated vasculature of cattle. *Endocrinol Jpn* 1988; 35: 625-630.
99. Yao N, Wan PC, Hao ZD, Gao FF, Yang L, Cui MS, Wu Y, Liu JH, Liu S, Chen H,

Zeng SM. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. *Reprod Domest Anim.* 2009 Feb;44(1):132-9.

100. Yu XL, Deng W, Liu FJ, Li YH, Li XX, Zhang YL, Zan LS., Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo-produced bovine embryos. *Theriogenology.* 2010 Mar 1;73(4):474-9. Epub 2009 Dec 3.

101. 석호봉, 이광원, 신용식, 김호승, 조윤형, 지석하, 오대균, 임경순, 알피엘스텐. 소의 동결 수정란이 수태에 미치는 영향. *한국축산학회지* 1983; 25(4): 369-374.

102. 이정호, 박항균, 신상태. 소 수정란이식에 있어서 수란우와 수정란의 조건이 수태율에 미치는 영향. *대한수의학회지* 1989; 29(1): 61-68.

103. 황환섭, 장현용, 김성곤, 김종택, 박춘근, 정희태, 김정익, 양부근. 한우 체외성숙, 체외수정란의 수정란이식에 관한 연구. *한국수정란이식학회지* 2004; 19(1): 1-10.