

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
농식품 기술융합 창의인재양성 사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004201-01

한우에서의 OPU 유래 이식가능 수정란생산 전문 인력양성

2022.11.10.

주관연구기관 / (주)라트바이오

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

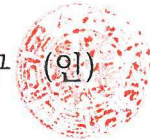
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “한우에서의 OPU 유래 이식가능 수정란생산 전문 인력양성”
(개발기간 : 2020. 1. 29 ~ 2022, 1. 28.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 11. 10.

주관연구기관명 : (주)라트바이오 (대표자) 장구 (인)



주관연구책임자 : 장구

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

사업명	농식품 기술융합 창의인재양성	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
내역사업명 (해당 시 작성)		연구개발과제번호		120011-02			
기술분류	국가과학기술 표준분류	농림/수의/임상수의	50%	농림/동물자원/동물유전자원	20%	농림/동물자원/번식발생	30%
	농림식품 과학기술분류						
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	한우에서의 OPU 유래 이식가능 수정란생산 전문 인력양성						
전체 연구개발기간	2020. 01. 29 - 2022. 01. 28 (24 개월)						
총 연구개발비	총 268,000천원 (정부지원연구개발비: 200,000천원, 기관부담연구개발비 : 68,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[○] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<p>1. 연구개발의 최종 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> - 한우에서 초음파를 이용한 직접 난자채취 (Ovum Pick Up, OPU) 인력 양성 - 회수 난자를 이용한 이식가능한 체외수정란 생산 (In Vitro Embryo Production, IVEP) 인력 양성 <p>2. 연구개발 목표의 구체성</p> <ul style="list-style-type: none"> - OPU 인력 양성 : 회수난자 수 증가 (난소 Mapping) 및 OPU 공란우 선별 - IVEP 인력 양성 : 체외배양 체계의 안정화 및 OPU 유래 동결란의 이용가능성 증대 					
	전체 내용	<p>1) 주관연구기관</p> <p>(1) 한우에서 초음파를 이용한 직접 난자채취 인력 양성</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ OPU 공란우에서 난소 mapping을 통한 난자회수율 증가 - 실습용 생식기 및 생체의 소에서 난소 grip을 통일화하고 초음파 탐촉자 위에서의 mapping 기술을 반복훈련 - 소 난소의 AFC (Antral follicle counting; 구상난포수) 측정 후 난자회수율과의 관계 분석 - 한우 공란우의 2주간격 FSH 처치 및 OPU를 반복수행하여 난자회수 및 이식가능수정란 생산효율 확인 ○ 난자회수율, 배반포형성을 및 수태율을 근거로 한 OPU 공란우 선발 - 공란우 대상 한우에서 채혈 후 AMH 측정하여 선발지표로의 가능성 확인 - AFC와 AMH 및 FSH 처치에 따른 OPU 결과 비교 - 지역사업 연계 수행을 통하여 OPU전문인력의 역량 강화 					

			<p>(2) 회수 난자를 이용한 이식가능수정란 생산 인력 양성</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 안정화된 체외배양 체계 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 도축난소 유래 난자를 이용하여 체외수정란 생산시스템을 점검 - 시판되는 다양한 배지의 비교를 통하여 OPU난자의 체외성숙 및 체외수정에 적합한 시스템을 선택 - 안정된 체외배양시스템을 이용한 OPU-IVEP의 반복 수행을 통하여 이식가능수정란 생산성 점검 ○ OPU유래 동결수정란의 이용가능성 증대 <ul style="list-style-type: none"> - 소 난자/수정란의 지방대사 효율증가 방안 모색을 위하여 체외배양 배지 내 첨가물 효과 확인 - OPU유래 수정란의 vitrification-용해 후 생존율을 점검하고 이식수태율을 확인함으로써, OPU수정란의 효율적인 동결방법 구축 및 현장적용성 검토 <p>2) 위탁연구기관</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ OPU 시설 및 공란우 등의 인프라 제공 <ul style="list-style-type: none"> - OPU 효율증가를 위한 FSH 처치법 실시 - FSH 처치 후 OPU 유래 동결수정란 성상 비교 분석 - FSH 처치 후 OPU 유래 동결수정란 농가이식 수태율 시험 - 구제역 백신 접종에 따른 배란 지연을 역이용한 배란동기화법 테스트를 통해 수란우 발정동기화를 향상 도모
	1단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	
	n단계 (해당 시 작성)	목표	
	내용		

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 직장을 통한 난소 grip과 mapping 훈련으로 OPU 기본 기술 숙지 완료 - AFC/AMH 선별지표의 추가적용을 통하여 효율적인 (생산능력과 번식능력을 모두 갖춘) 공란우 선별의 객관성 제고 - 공란우의 FSH 처치법 적용으로 회수난자 개수 증가 및 15.5개/두 난자회수 가능 - 개선된 발정동기화법 (J-synch와 2-FTET의 연계) 적용으로 수란우 효율 향상 (제공율 80% 이상) - 도축난소 유래 IVEP 시스템을 quality control로 활용하여 OPU-IVEP 이식가능수정란 생산성 향상 (2.5개/두 → 4.1개/두) - vitrification 적용한 OPU유래 수정란의 용해후 생존을 확인 통해 농가현장 적용 개시 (용해후 생존율 93% 및 수태율 45%)
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> - OPU 유래 체외수정란의 동결란 이용가능성 증대로, 전염성 질병 감염으로 인한 고능력 한우 유전자원의 소실 방지 및 중요한 유전자원 보존에 활용 가능 - 관련 기술력 향상을 위한 지속적 투자 및 생산규모 확대를 통해 양질의 한우 OPU수정란을 현장에 대량 공급 계획 - 유우 신제품 자원 (저지 등)에 본 기술을 적용하여 개체 수 증산을 통한 자국 내 안정적 토착화에 활용 - 수정란이식 산업의 기술력 향상을 위하여 OPU 관련 기술 보급을 위한 전문교육 시스템 활성화 기대 - 효율적인 공란우 선정과 수란우 제공을 향상을 통해, 한우 개량을 통한 농가 생산성 증대에 필수적인 기반기술력 강화에 기여

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	공개											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명		규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호		
	-	-		-	-	-	-	-	-	-		
국문핵심어 (5개 이내)	한우		직접난자채취		체외수정란생산		수정란이식		급속동결			
영문핵심어 (5개 이내)	Hanwoo		ovum pick up		in vitro embryo production		embryo transfer		vitrification			

최종보고서						보안등급 일반[], 보안[]				
중앙행정기관명				사업명						
전문기관명 (해당 시 작성)				내역사업명 (해당 시 작성)						
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
				연구개발과제번호						
기술분류	국가과학기술 표준분류	농림/수의/임상수의	50%	농림/동물자원/동물유전자원	20%	농림/동물자원/번식발생	30%			
	농림식품과학기술분류									
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문								
		영문								
연구개발과제명		국문	한우에서의 OPU 유래 이식가능 수정란생산 전문 인력양성							
		영문	Technical manpower training for production of OPU derived transferable Hanwoo embryos							
주관연구개발기관		기관명	(주)라트바이오		사업자등록번호	477-88-00533				
		주소	(우)06221 서울특별시 강남구 테헤란로 234 (심익라비돌 빌딩) 12층		법인등록번호	1110111-6202545				
연구책임자		성명	장구		직위	대표				
		연락처	직장전화			휴대전화				
			전자우편			국가연구자번호				
연구개발기간		전체	2020. 01. 29 - 2022. 01. 28 (24개월)							
		단계 (해당 시 작성)	1단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)						
			n단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)						
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()				연구개발 비외 지원금		
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		200,000	6,800	61,200			6,800	61,200	268,000	
1단계		1년차	100,000	3,400	30,600			3,400	30,600	134,000
		2년차	100,000	3,400	30,600			3,400	30,600	134,000
n단계		1년차								
		n년차								
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고 역할		기관유형	
공동연구개발기관										
위탁연구개발기관		경북축산 기술연구소	이준구	책임연구원			위탁	공립연		
연구개발기관 외 기관										
연구개발담당자 실무담당자		성명	박지현		직위	선임연구원				
		연락처	직장전화			휴대전화				
			전자우편			국가연구자번호				

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 8월 2일

연구책임자: 장구 (인)

주관연구개발기관의 장: 장구 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 남진희 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용	12
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	17
4. 목표 미달 시 원인분석	58
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	59
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	60
<별첨 자료> (참고 문헌 등)	61

1. 연구개발과제의 개요

1) 산업 전문인력 양성 목표의 명확성 및 구체성

(1) 연구개발의 목표

- 한우에서 초음파를 이용한 직접 난자채취 (Ovum Pick Up, **OPU**) 인력 양성
- 회수 난자를 이용한 이식가능한 체외수정란 생산 (In Vitro Embryo Production, **IVEP**) 인력 양성

(2) 연구개발 목표의 구체성 (그림 1)

- **OPU** 인력 양성 : 회수난자 수 증가 (난소 Mapping) & OPU 공란우 선별
- **IVEP** 인력 양성 : 체외배양 체계의 안정화 & OPU 유래 동결란의 이용가능성 증대



그림 2. 한우 OPU (왼쪽) / IVEP (가운데) / ET (수정란이식; 오른쪽) 시스템 모식도.

OPU : (위) 한우 공란우 생축에서 초음파를 이용한 난자채취, (아래) 초음파 화면 및 회수난자의 현미경 사진.
 IVEP : (위) 회수난자의 체외성숙 실험, (아래) 선별 정자와의 체외수정 및 체외배양 7일차 배반포의 현미경 사진.
 ET : (위) 7일차 배반포를 한우 수란우에 이식, (아래) 수정란이식을 통해 태어난 한우 송아지.

2) 소 수정란 연구개발의 필요성

(1) 소 수정란이식 산업계의 터닝 포인트 (OPU is New Trends of bovine Assisted Reproductive Technology)

- 소 수정란 생산 및 이식 (embryo transfer, ET)은 개량에 있어 가장 효과적인 방법으로 많은 선진국에서 이용되고 있으며, 국내에서도 수정란이식을 통한 개량 및 유전자원 보존에 대한 인식이 증가하고 있음
- 소 수정란이식 산업에서 이용되는 수정란의 종류와 장단점에 대한 설명은 표 1에 정리되어 있음

표 1. 수정란의 종류 및 장-단점

수정란의 종류	장점	단점
체내 수정란 (In Vivo Derived, IVD)	- 안정적이고 높은 임신율	- 과배란 처치에 대한 호르몬 비용 - 연간 약 4~5회 수정란 채취 가능 - 안정적 수정란 생산을 위한 높은 기술력 필요 - 회수되는 숫자가 불규칙적
OPU-체외수정란 (IVEP)	- 생산되는 수정란의 안정적임 - 연간 약 20회 이상 난자채취 가능	- 초음파 등 난자채취에 대한 기술 인력이 필요 - 효과적인 체외수정배양 및 동결 시스템이 필요함 - 체내 수정란 대비 상대적으로 낮은 임신율

- 지난 20~30여 년간, 소 수정란이식 산업을 견인하였던 것은 IVD 수정란이었으며, 거의 매년 큰 변동 없이 연간 60~70만 개 내외의 IVD 수정란이 생산되었고, 당해 생산분의 약 80%가 이식되었음
- 반면, IVEP는 지난 20여 년 전만 해도 소 수정란이식 산업계에 영향을 미치지 못하는 수준이었다가, 이후 서서히 그 세를 증가하여 산업계를 견인해오던 IVD 수정란 생산량을 앞지르기 시작하여 (2017년 기준), 최근 데이터인 2018년 기준으로 수정란 생산규모에서 IVD에 비해 약 2배 (IVEP 1,018,163개 vs. IVD 386,133개) 이상에 해당하는 실적을 보임 (그림 2)

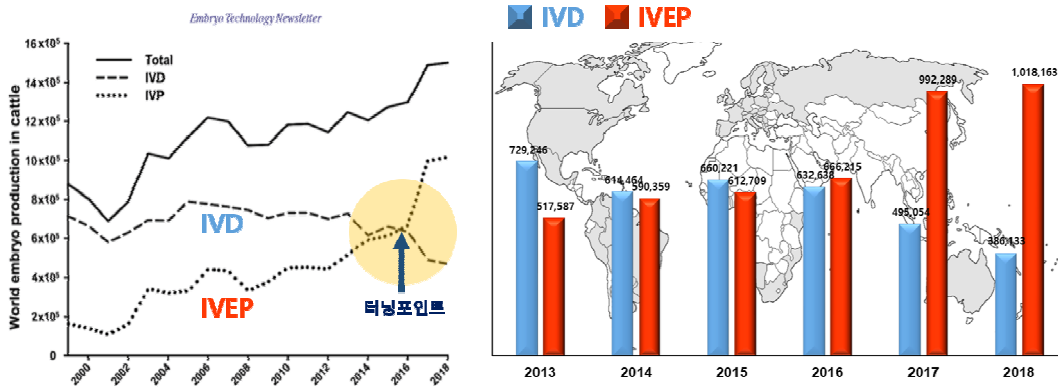


그림 3. IETS 발표자료_연간 총 소 수정란 생산량 (Embryo Technology Newsletter, Dec 2019). (왼쪽) 최근 20여 년간 소 수정란 생산방식에 따른 생산량의 추이와 총합, (오른쪽) 최근 6년간 소 체내 및 체외수정란 총생산량.

- 이와 같이 급변하는 소 수정란이식 산업의 변화에 맞추어, IVEP의 98% 이상을 차지하고 있는 OPU 관련 전문인력 양성이 필요한 상황으로 판단되며, 국내에서도 일부기관 및 업체에서 선도적으로 OPU 유래 체외수정란 생산을 진행하였으나, 기술 수준의 향상 및 규모의 확대가 필요한 시점이기때 추가적인 전문인력 양성의 필요성이 부각되고 있음

(2) 소 수정란이식 (ET) 산업이 IVD 수정란에서 IVEP로 방향전환이 가능했던 이유

- 수정란 산업의 주요 성패 판단기준은 최종적으로, 체내 이식을 통해 고능력 유전자원 결과물인 송아지의 생산 여부에 달려있는데, 우선 난자/수정란을 생산하는 기술이 필요하고, 그다음으로는 생산된 수정란을 이식하여 송아지를 생산하는 기술이 절대적으로 필요하며, 이때 이식 후의 수태율이 중요한 검증지표가 됨
- 그동안 IVEP가 산업적인 영향력을 갖지 못했던 가장 큰 이유가 바로 IVD 수정란에 비해 낮은 수태율을 보였기 때문이었음
- 최근의 방향전환이 일어난 가장 큰 이유는, 이 변화를 선도한 남미 및 북미 그룹이 그동안 꾸준하게 체외배양체계를 발전시켜 현재 체내수정란과 비슷한 수태율을 달성한 것으로 여겨지며, 본 산업계의 연간통계 수치가 이를 증명하고 있음 (그림 3)

Production of embryos <i>in vitro</i> with OPU-collected oocytes by region									
Region/ Country	Donors			Oocytes			Transferrable embryos		
	Dairy	Beef	Total	Dairy	Beef	Total	Dairy	Beef	Total
Africa	0	621	621	0	18,486	18,486	0	3,741	3,741
Asia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Europe	24,809	4,432	29,241	206,510	36,529	243,039	48,875	11,502	60,377
N America	91,366	27,044	118,410	1,402,896	601,595	2,004,491	311,056	186,455	497,511
Oceania	0	2,056	2,056	0	35,767	35,767	0	11,997	11,997
S America	43,062	35,460	78,522	563,151	693,405	1,256,556	209,286	235,251	444,537
Total	159,237	69,613	228,850	2,172,557	1,385,782	3,558,339	569,217	448,946	1,018,163

Transfer of bovine IVP embryos by region								
Region/ Country	Embryos transferred							
	Fresh	OPU		Total	Fresh	Abattoir		Total
		Frozen	Foreign			Frozen	Foreign	
Africa	1,611	337	0	1,948	0	0	0	0
Asia	0	0	0	0	0	0	0	0
Europe	22,343	18,599	1,555	42,497	61	285	0	346
N America	201,322	95,431	245	296,998	96	0	0	96
Oceania	10,046	680	0	10,726	0	0	0	0
S America	306,293	81,540	0	387,833	2,343	121	0	2,464
Total	541,615	196,587	1,800	740,002	2,500	406	0	2,906

그림 4. IETS 발표자료_(Embryo Technology Newsletter, Dec 2019). (위) 연간 OPU 유래 체외수정란 총생산량, (아래) 연간 IVEP 유래 총이식량.

- 이러한 수태율의 안정화는 체외배양체계를 통하여 생산되는 OPU 수정란의 질적 (Quality) 향상과 밀접한 관계가 있으며, 체외수정란의 배양기술 수준이 매우 중요하다는 것을 이해할 수 있음
- 체외배양체계의 중요성은 위의 연간 OPU 통계표를 통해서도 엿볼 수 있음 (그림 3, 위)
- 전 세계적으로 한 번의 OPU를 통해 평균 회당 15.5개 (3,558,339/228,850)의 난자 회수 및 4.4개 (1,018,163/228,850)의 이식가능 수정란이 생산되었는데, 이는 실험에 공여된 난자 개수를 기준으로 약 28.6% 내외의 수정란 생산율을 보인 실적임
- OPU 기술이 소 수정란이식 산업계의 새로운 추세로 부각된 가장 큰 이유가 여기에 있다고 판단되며, 임신율 (수태율)로 이어지는 질 (Quality) 좋은 이식가능 수정란을 생산해 내는 안정화된 체외배양체계 선결이 주요 요인이라 할 수 있음

3) 전문인력 양성의 필요성

(1) 국내외 기술현황 및 배경

- 국외현황 : OPU 및 IVEP 수정란에 대한 전문인력이 많이 양성되어 현장에서 활동하고 있고 체외배양 및 동결 시스템이 안정화되어 있어, 선진국들은 이미 IVD 수정란 방법을 줄여나가고 OPU-IVEP 수정란 생산 및 이식 방법을 확대하고 있음
- 국내현황 : OPU-IVEP 수정란에 대한 인식이 높아지고 있지만 관련된 전문 교육의 부족으로 인해 난자 채취 및 체외배양 시스템에 능숙한 전문인력의 수가 매우 낮은 실정이어서, 국내 수정란이식 기술 수준은 회수난자 및 이식가능수정란의 개수가 전 세계 평균치에 비하여 적고 체외수정란 유래 동결란의 이식 후 수태율이 낮으면서 그 변동 폭도 큰 상황임
- 이에 더해, 기후변화 등으로 인한 환경적인 요인으로 국내 한우의 번식효율이 많이 저하되었음과 더불어, 전염병 (예; 구제역)으로부터 안전한 우수 유전자원의 보존에 대한 필요성이 증가하는 등 국내 수정란이식 산업에서의 질적 향상이 필요한 시점임

(2) 국내외 기술력 차이

- 좀 더 세부적으로, 육우로 한정하여 OPU 기술을 선도하고 있는 북미/남미와의 수준 차이를 그림 3에 근거하여 비교해 보면 다음과 같음 (표 2)

표 2. 육우에서의 지역 간 OPU 회수난자 개수 및 이식가능수정란 생산 차이

지역 (Region)	공란우 (Donors)	Oocytes (Mean)	Transferable embryos (Mean)	Blastocyst production rate
북미 전체	27,044	601,595 (22.2)	186,455 (6.9)	31.0%
남미 전체	35,460	693,405 (19.6)	235,251 (6.6)	33.9%
한국 일부 (당사 pretest)	32	329 (10.3±5.7)	81 (2.5±2.6)	24.6%

- 표 2에는 표시되어 있지 않지만, 북미의 경우는 절반 이상의 팀에서 2주마다 한 번씩 FSH 처치를 통한 OPU를 실시하고 있으며, 남미의 경우는 대부분 1주에 한 번씩 FSH 처치를 하지 않고 반복적 OPU를 연속적으로 약 20여 회 이상 진행하고 있음
- 따라서 실제적인 기술 수준은 북미보다 남미가 더욱 높다고 판단되며, 이전의 IETS 기록들을 참조해 보면 10여 년간 남미가 대부분의 OPU 실적을 선도한 것을 알 수 있음
- 공란우 (Donor) 보유 두수가 적은 국내 환경의 경우 역시 대부분의 수정란생산 팀이 남미의 방식을 따르고 있음
- 국내에서 한우 OPU를 진행할 경우, 회수난자 수 및 이식가능수정란 생산이 각각 약 1.5~2배까지 많아질 수 있음을 상기 데이터를 통해 알 수 있고, 이를 위해서는 안정적인 체외배양체계 확립이 중요하며 IVEP 전문인력 양성이 절실함

4) 전문인력 양성 전략 수립 및 변경

(1) 해외 전문기관 파견을 통한 선두그룹의 기술 습득 (전략 수정 전, 그림 4)

- 국내에는 OPU 관련 소 수정란이식 전문 교육기관이 없는 실정이기에, 관련 학계/산업계에서 기존에 형성해 왔던 해외의 네트워크를 활용하여 동 산업계의 최신동향을 파악하고, 최고수준의 기술자들과 협업을 통해 기술수준 향상을 꾀하고자 계획하였음
- 1차년도에는, 연구원 해외파견 (약 3~4주간)을 통해 현지 시스템의 장점을 파악/습득 (상기에 언급한 인력양성 전략에 해당하는 내용에 대한 집중훈련 및 논의)하고, 국내 현장에 돌아와 우리 환경에서의 실험체계를 구축하고자 하였음
- 2차년도에는, 지속적으로 실험을 진행함과 동시에 전년도 방문기관의 해외전문가를 국내 현장으로 초청하여 본 연구팀의 시스템 효율성 검증 및 개선작업을 진행하여 현장에 적용하고자 하였음



그림 5. 연구계획 당시의 전문 인력양성 전략의 개요도.

(2) 위탁기관 인프라 활용 및 국내 타기관과의 연계 (전략 수정 후)

- 예기치 못한 COVID-19 pandemic 상황 전개로 인하여 연구기간 전반에 걸쳐 연구원 국외파견 및 전문가 국내초청이 어려워졌기에 계획했던 전략의 방향전환이 불가피하였음

- 이에, 1차년도에는 위탁기관의 인프라를 적극 활용하여 OPU실험을 목표횟수 (연간 40회 이상)보다 더 많이 수행함으로써 반복 연습을 통한 난자회수 기술력 향상을 도모하였음
- 2차년도에도 상황이 호전되지 않아서 예정했던 국외기관과 연계하여 동영상교육 등으로 기술습득을 꾀하였으나 이 역시 현지 사정 (도축장 폐쇄 및 외국인 입국 불허 등)으로 성사되지 못하였고, 기술교류 대상을 국내 타기관 (충남 소재)으로 변경하여 상호방문 및 의견교환을 통해 기술력 향상방안을 마련하고자 노력하였음

(3) 주관연구기관의 인프라 투자 확충을 통한 기술력 향상 (추가 이행)

- 기존까지는 외부 지자체 OPU사업이나 위탁기관의 인프라 (공란우 및 시설)를 활용하여 OPU실험을 진행하였으나, 연구 2차년도에 주관연구기관인 참여기업이 충북 소재 한우 번식우 농장 (150두 규모) 구입 및 OPU 실험시설 확충을 통해 기술력 향상을 위한 기반을 마련하였음
- 이를 통해, 연구 1차년도 대비 2차년도에는 OPU 수행횟수를 2.6배 증회, 이식가능수정란 생산량은 2.5배 증량된 결과를 얻을 수 있었음

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 주관연구기관

(1) 한우에서 초음파를 이용한 직접 난자채취 인력 양성

가. OPU 공란우에서 난소 mapping을 통한 난자회수율 증가

가) 소 난소의 Mapping

- 본 과제의 OPU 인력양성을 위한 우선적 연구 개발내용은 회수난자 수를 증가시키는 것으로, 이를 위해서는 직장검사를 통해 소의 난소를 초음파의 탐촉자에 올려놓고 초음파 화상으로 흡입 가능한 난포를 잘 보이게 하는 기술이 중요함
- 난자채취 시 이용하는 초음파의 화상은 2D이며 실제 초음파 탐촉자 위의 난소는 3D 구조를 띠고 있으므로, 실제 난소에 존재하는 난포 (크기 약 3~8 mm 내외)는 난소를 정교하게 움직이고 제어해야만 화상에 잘 전달되는데, 이를 난소 mapping이라 함

나) 소 난소의 AFC (Antral follicle counting; 구상난포수 측정)

- 초음파 탐촉자의 정해진 방향대로 난소를 Up & Down 하여 이동하며 동시에 Lateral 방향으로의, 지도를 보는 것과 같은 일정한 형태의 난소 내 난포 preview 기술을 충분히 연마하는 것이, 난자회수율 증가를 위한 일차적 기술지표라 생각됨
- 이를 간과하고 초음파상에 보이는 난소의 일부 난포만을 무작정 흡입해보는 과정은 기술향상의 측면에서 볼 때 비효율적인 training 방법이 됨
- 균일한 테크닉을 통해 소 난소의 AFC를 측정하면 객관적인 지표가 될 수 있음

나. 난자회수율, 배반포형성을 및 수태율을 근거로 한 OPU 공란우 선발

가) 한우에서의 AMH 측정

- OPU 인력양성을 위한 두 번째 개발내용은 어떤 공란우를 이용할 것인가에 관한 선택과 관련됨
- 실제 농장 현장에서 공란우/수란우 (Donor/Recipient)의 선발 및 유지관리에 대한 현장 경험이 최종결과에 중요한 성패요인으로 작용함
- 일례로 자국 내 소 보유 두수가 많은 브라질의 경우, OPU 공란우 1두를 선발하기 위해 평균 50여 두의 후보 소에서 난소검진을 통한 AFC를 통해 최종 공란우를 선발 (personal communication) 하기도 함
- 국내 축산환경을 돌아볼 때, 이러한 물리적 환경의 차이는 극복할 수 없기에 조금 더 세부적이고 학문적인 분석지표를 동원하면 제한된 공란우 선발이 가능해지는데, 이를 위해서는 소의 번식생리 기전에 관한 이해 및 제어가 필요함
- 난자를 공여하는 OPU 공란우의 경우, 우선 초음파를 이용한 AFC 및 혈액검사를 통한 안티물러리안 호르몬 (Anti Mullerian Hormone; AMH) 측정을 OPU 개시 전에 검토할 수 있으며, 또한 과배란처치를 통한 공란우의 체내수정란 회수과정을 점검해 봄으로써 OPU 유래 이식가능한 수정란의 개수를 미리 파악해 볼 수 있음
- 또한 pre-OPU를 통한 체외배양 과정 후 수정란의 mRNA 검사를 통하여 수태율과 연관된 것으로 알려진 단백질/유전자의 보유 여부 확인을 통해 선발기준을 강화해 볼 수도 있음
- 이와 같은 다각적이고 객관적인 공란우 선발지표 적용이 회수난자 개수 증가에 긍정적인 효과를 미칠 것으로 판단함

나) AMH 및 FSH stimulation 처치에 따른 OPU 결과 비교

- 본 연구과제의 당해 연도 주요목표인 OPU 유래 이식가능 수정란 생산 개수를 높이기 위해, 공란우 선발지표로서 상기에 언급한 AMH 측정 및 AFC 평가를 선행한 후, OPU를 반복 진행하였으며, 이들 지표와의 상관성을 검토함
- AMH 측정을 위한 채혈은 FSH stimulation 처치가 시작되기 전, 발정주기 중 random stage에 실시하였고, 혈장분리 후 ELISA kit를 사용하여 분석하였음
- AFC 평가 또한 발정주기 중 random stage에 초음파를 이용한 직장검사를 통해, 난소 내 판별 가능한 직경 3 mm 이상의 난포 개수를 좌우측 난소의 합으로 산정함
- FSH stimulation 처치는 progesterone, estrogen, FSH 호르몬제를 아래와 같은 방법으로 처치하였음
Day0 : CIDR (progesterone 제제) 주입 및 estrogen 제제 근육주사
Day4~5 : FSH 160 mg, 12시간 간격으로 4회, 감량법으로 근육주사
Day7 : CIDR 제거 및 OPU 실시
- 마지막 FSH 주사로부터 OPU 실시까지의 시간을 coasting period라 표현하며, 약 40시간의 간격을 두고 진행하였음 (Coasting period를 통해, 다수의 균질한 난포 발육 및 난자의 발육능 획득이 이루어질 것으로 기대하였음)

다. OPU 전문인력 양성을 위한 지자체사업 연계

가) 2020년도 지역 (사업화) 별 OPU 실시

- 지자체와 연계하거나 개인 농가를 대상으로 지역별로 OPU사업을 수행하면서, 2주 혹은 3주 간격으로 FSH 처치를 통한 반복 OPU 실시하여 본 데이터를 확보하였음
- 각 지역별로 당대 및 후대검정을 통해 경제적 형질의 phenotype이 뛰어난 한우를 OPU 공란우로 선발하였고 (A 지역은 4두, B 지역은 6두, C 지역은 4두), 반복회수는 공란우별로 2~6회까지의 서로 다른 실험을 수행하여 이식가능수정란을 생산하고 이를 지역별 농가에서 준비한 수란우에 이식을 진행하였음

나) 2021년도 OPU사업 실시

- 2020년도와 동일한 지자체 연계사업을 수행함과 동시에, 개인 농가 대상의 소형 OPU사업을 추가로 더 확장 수행하였음 (지자체 연계사업 1건, 개인 농가 사업 5건)
- 이와 더불어, 본 연구팀 소속 기업이 자금을 투자하여 한우농장을 구입하면서부터 자체 인력으로 농장을 직접 관리하게 되었고, 본격적으로 OPU사업에 매진하기 전 시스템 정립을 위한 점검과정의 일환으로 OPU실험 및 수정란이식을 반복 수행하였음

(2) 회수 난자를 이용한 이식가능 체외수정란 생산 인력 양성

가. 안정화된 체외배양 체계 설정

가) 도축난소 유래 체외수정란 생산

- 한우 도축난소에서 3~5 mm 크기의 난포로부터 난자를 회수하여 난구세포가 치밀하고 세포질이 균질한 난자를 선별하여 세정한 후 체외성숙용 배지에 옮겨 5% CO₂, 38.5℃ 조건으로 체외성숙 배양을 22시간 진행하였음
- 체외수정은, 동결정액 스트로우로부터 준비된 한우 정자와 체외성숙 완료된 난자를 heparin 및 PHE (penicillanine-hypotaurine-epinephrine) 등이 첨가된 체외수정용 배지에 18~20시간 정치하여 (5% CO₂, 38.5℃ 조건) 진행하였음 (정자의 최종농도 1.5*10⁶/ml)

- 체외배양은, 체외수정 완료된 수정란의 난구세포를 제거하고 체외배양용 배지에 옮겨 5% CO₂, 5% O₂ 및 38.5℃ 조건으로 진행했는데, 2일차 분할율을 확인한 후 5일차 배지를 교환하면서 발육단계를 점검하고 7일차 배반포 형성을 및 수정란의 등급을 확인하였음
- 이후 수정란은 실험목적에 따라 배반포 세포 수를 확인하거나 (Hoechst 33342로 염색 후 형광현미경으로 확인; 그림 5) RNA를 추출하여 quantitative RT-PCR로 유전자 발현을 분석하였음

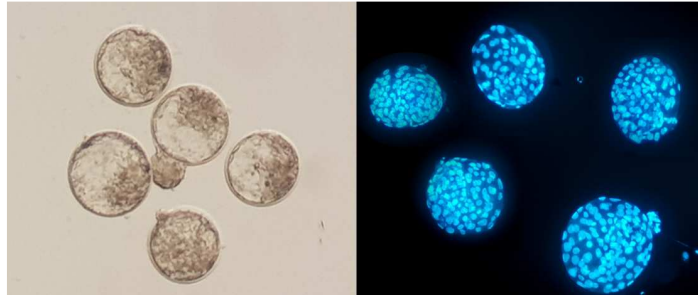


그림 6. (왼쪽) 체외배양 7일차의 Good Quality를 지닌 한우 이식가능수정란, (오른쪽) 이식가능란의 세포수 산정을 위한 형광염색 사진.

나) OPU난자 유래 수정란 생산

- OPU유래 한우 이식가능수정란의 생산은, 도축난소 유래 체외수정란 생산 방법에 준하되 약간의 변화를 주고 진행하였음
- 즉, 공란우가 위치하는 현장에서 OPU를 진행하고 회수된 난자를 실체현미경 하에서 이상 여부를 확인한 후 이동용 인큐베이터를 이용하여 실험실로 운반, 체외성숙 배양을 22시간 진행하였음
- 공란우 개체별로 체외성숙이 완료된 난자는 KPN 동결정액을 이용하여 준비된 한우 정자 (최종농도 1.5×10⁶/ml)와 함께 20시간 정치하여 체외수정을 유도한 후 난구세포를 제거하고 체외배양하였음
- 체외수정 기준으로 2일차 분할 여부를, 5일차 배지교환, 6일차 및 7일차 배반포 형성을 확인하였는데, 필요한 경우에는 6일차 수정란 중 일부를 동결하여 보관하였음
- 7일차 수정란은 발육단계를 확인하여 기록한 후 운반용 배지와 함께 0.25 ml 스트로에 장착하고 37℃로 보온유지하여 농가 및 자체농장에 공급, 한우 처녀우 및 초산 경산우를 대상으로 체내 이식하였음

다) OPU에 최적화된 배지 선정

- 기본적으로 소 수정란을 체외배양 시 과거에는 각 실험실에서 제조하는 배지를 주로 이용하였으나, 최근 동 분야의 산업발전과 더불어 이용가능한 상업화 배지가 선호되고 있음
- 이에 따라 ART Lab Solution (호주), IVF Bioscience (영국), IFP (일본) 및 Vitrogen (브라질)사에서 제조된 소 수정란 체외배양 배지들을 이용하여 각각의 장단점을 비교 분석하고, 국내/실험실 환경에 최적화될 수 있는 시스템을 선별하였음

라) 체외배양체계 안정화

- 체외수정 (In Vitro Fertilization) 시간 조절 및 배아 초기분할에 따른 수정란 선별 등을 통해 체내이식이 가능한 수정란인 배반포 생산율을 평균 30% 이상으로 유지함
- 체외배양을 통해 생산된 소 수정란의 QC (Quality Control)를 위해 체외배양 Day 7에서의 세포수 측정 및 동결융해 후 생존율 등을 정기적으로 확인하였음

나. OPU 유래 동결란의 이용가능성 증대

가) 소 난자/수정란의 지방대사 효율증가 방안 검토

- 도축난소 유래 체외난자는 발육단계가 다양한 난포로부터 채취하기 때문에 회수된 난자의 세포질 상태도 균일하지 않지만, OPU유래 난자는 FSH 처치를 통해 동기화 작업을 거치므로 회수 당시의 난자들은 거의 동일한 발육상태를 띠고 있음
- 난자의 세포질 성숙도는 난포의 발육단계에 영향을 받을 수밖에 없고 FSH 처치 후 어느 시기에 회수하느냐에 따라 난자 세포질의 성숙도가 달라지고 세포소기관 및 물질대사에 차이가 발생함
- 특히 난자 세포질에 존재하는 지방소적 (lipid droplet) 함량은 추후 수정란의 발육능 및 동결융해 후 생존율에 영향을 주기 때문에, 본 과제에서는 난자 및 수정란의 지방대사 촉진물질을 사용하여 OPU유래 수정란의 발육 향상을 높일 수 있는지 검토하였음

나) OPU 유래 수정란의 동결방법 구축

- 체외수정란의 완만동결 (slow freezing) 방법은 융해 후 생존율을 안정적으로 유지할 수 있는 장점이 있으나 동결과정에 시간이 소요되고 전문장비를 갖추어야 하는 단점이 있음
- 급속동결 (vitrification) 방법은 프로그래밍화 장치의 도움 없이 동결과정을 신속히 진행할 수 있지만, 융해 (warming) 과정에서 단계적 배지를 준비해야 하는 번거로움이 존재함
- OPU유래 체외생산 수정란의 시장 점유율이 체내회수 수정란의 점유율을 능가하게 된 이후 vitrification 방법의 효율이 향상되고 있으며 국외에서는 많은 전문가가 현장에 적용하고 있음
- 이에 본 과제에서는, 체외수정란을 대상으로 먼저 두 가지 동결방법을 비교, 보완해서 OPU유래 수정란의 현장에서의 적용가능성 확대를 계획하였음

2) 위탁연구기관

(1) OPU 시설 및 공란우 등의 인프라 제공

- 본 연구에 사용된 한우는 경상북도축산기술연구소 소재 실험동물윤리위원회의 승인을 얻어 실시하였음

가. OPU효율 증가를 위한 FSH stimulation test 실시

- 기존의 OPU방법에 더해, 공시축에 FSH를 투여하여 기존방법 대비 질 좋은 난자의 생산을 도모하였으며 2주 간격으로 실험을 진행하였음 (그림 6)

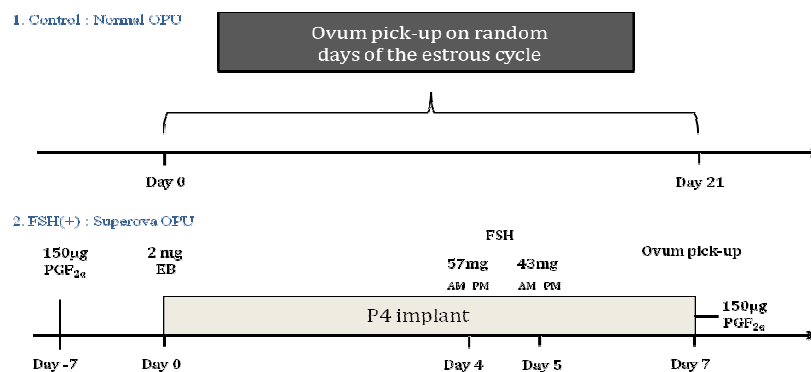


그림 7. 일반 OPU 및 Superova OPU 비교.

나. FSH stimulation 유래 동결 수정란 성상 비교 분석

- FSH 처치군 및 미처치군 사이에 생산된 수정란을 vitrification 후에 수정란의 재확장 및 부화율을 비교하였음

- 직경이 170 μm 이상인 배반포를 사용하여 Hoechst 33342 염료 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도)에 5분 동안 노출시켜 총 세포 수를 평가했는데, 358/461 nm의 파장을 갖는 형광 실체현미경을 이용하였고 세포핵은 현미경 이미징 소프트웨어 (LAS X, Lecia, Wetzlar, Germany)를 사용하여 계산하였음

다. FSH stimulation 유래 동결 수정란 농가이식 수태율 시험

- FSH 처치군에서 생산된 동결 수정란을 대리모에 이식하여 수태율을 확인하고자 총 155두 대상으로 동결수정란을 지역 농가에 이식하였음

라. 구제역 백신 접종에 따른 배란지연을 역이용한 배란동기화법 시험

- 구제역 백신 접종에 따라 조기배아사멸, 정자수정능 저하, 급성 면역반응 증가, 유생산량 저하 등의 부작용에 관련된 국외 연구결과도 많고, 국내에서는 한우 암소에서 구제역 백신 접종 후 반추위 내 체온 증가, 급성면역반응 증가, 백혈구 및 호중구 증가, 배란지연 증가, 수태율 저하 등을 확인한 바 있음
- 이에, GnRH-PGF2a-GnRH 기반의 배란동기화 방법에서 첫 번째 GnRH의 함량을 조절하여 구제역 백신접종에 따른 배란지연을 해소하고 수태율 저하를 개선할 수 있는지 실험하였음
- 한우 임신우에서 구제역 백신접종 6일 후 GnRH 500 μg 을 주사하였고, 구제역 백신 접종 13일 후 PGF2a analogue 25 mg을 근육 주사하였으며, 15일 후 다시 GnRH 250 μg 을 근육 주사한 후 16일째 인공수정하였음

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 산업연구인력 양성 목표 및 결과

(1) 산업연구인력 양성 목표

- ▲ 인력양성 목표 : 한우에서 초음파를 이용한 OPU 및 체외수정란생산 인력 양성
 - 난소 mapping 기술 습득을 통한 회수난자 수 증가
 - 체외배양 체계의 안정화 및 OPU유래 동결수정란의 이용가능성 증대
- ▲ 목표인원 : 2 명
- ▲ 인력양성 계획 :
 - 외부 전문기관의 전문가 활용을 통해 관련 노하우 도입
 - 반복 수행을 통한 기술력 향상
 - 관련 학술자료 검토를 통한 지식습득

표 3. 전문인력 양성 세부계획

구 분	OPU_박지현	IVEP_송길영
대 상	1차년도 전문 인력양성 해당	2차년도 전문 인력양성 해당
주요 연구 내용	OPU 난자회수율 증가 OPU 공란우 선발기준 정립	체외수정란 배양체계 효율증가 OPU 유래 동결란 이용성 증대
1/2차년도 연구 수행량	당사+경북축기연 인프라 활용 연간 40회 이상의 OPU 수행 (회당 공란우 3두 내외)	당사+경북축기연 인프라 활용 연간 40회 이상의 IVEP 수행
연구인력 지원	현장_이원유 및 신규예정직 1인 (라트바이오) 현장_경북축기연 2인	Lab._한세라 및 신규예정직 1인 (라트바이오) Lab._경북축기연 1인
연구원 해외파견	WTA Texas 미국지사 등 (4~6주 파견 예정)	Trans Ova 미국 본사 등 (4~6주 파견 예정)
해외전문가 초청	Dr. Andre Dayan 등	Dr. Wei Hong 등

(2) 산업연구인력 양성 결과

- ▲ 양성인원 : 2 명 (1차년도; 박지현, 2차년도; 송길영)
- ▲ 양성과정
 - 체계화된 OPU-IVEP-ET 시스템 구축
 - 지역사업 수행 및 자체농장 확보를 통한 실험기회 증대
 - 관련 기술의 최신정보 습득 및 적용을 위한 지속적 journal researching

표 4. 전문인력 양성을 위한 수행 내역

1차년도 (2020년)	2차년도 (2021년)
<ul style="list-style-type: none"> - 난소 mapping 기술의 집중훈련 (2~3월) - AFC 평가법의 공란우선발지표 활용성 검토 (3~5월) - AMH 측정치의 공란우선발지표 활용성 검토 (3~5월) - 지역사업 OPU 반복수행으로 난자 채취기술력 향상 (5~11월) - OPU 회수난자의 체외발육률 향상을 위한 IVEP 반복수행 (2~12월) 	<ul style="list-style-type: none"> - FSH 처치 투여량 비교 OPU 테스트 (2~3월) - 체외성숙 배양조건 개선 목적으로 국내 유관기관 방문 및 기술 상호공유 (6~7월) - 지역사업 OPU 수행으로 채취기술력 향상 (4~12월) - OPU유래 수정란의 vitrification-warming 후 생존율 확인 (1~4월) - OPU 동결수정란의 체내이식 (7~12월) - OPU 회수난자의 체외발육률 향상을 위한 IVEP 반복수행 (1~12월) - 국내 유관기관과 OPU/IVP 기술 상호교류 (21.11~22.1월)

- 전문인력 양성을 위한 투입비용 및 시설

표 5. 전문인력양성을 위한 비용지출 실적

(단위: 천원)

구분	1차년도 (2020년)	2차년도 (2021년)	합계	비고
OPU-IVEP 실험 ¹⁾	74,684	113,104	187,788	1차년도 지역사업 49회, 2차년도 지역사업 131회
도축난소 유래 IVEP 실험 ²⁾	47,479	50,229	97,708	1차년도 47회, 2차년도 38회
소계	122,163	163,333	285,496	
연구과제_재료비 집행	83,140	51,791	134,931	
주관연구기관_예산 추가집행 ³⁾	39,023	111,542	150,565	1차년도 실험비의 32%, 2차년도 실험비의 68%
전문가활용 ⁴⁾	-	4,500	4,500	100% 연구비 집행
특허성 검토 ⁵⁾	-	8,800	8,800	100% 연구비 집행
합계	122,163	176,633	298,796	

세부 사항

- 1) FSH 처치를 통한 OPU 난자회수 및 IVEP 후 수정란이식 관련
- 2) 도축난소 유래 난자의 IVEP 및 QC 관련
- 3) 참여기업의 적극적 투자: 예산 추가 집행을 통하여 실험횟수를 증가시켰고, 자본투자를 통하여 한우 번식우 농장 구입 및 연구시설 확보 (그림 7)
- 4) 전문가 초청 (2회) 및 국내 유관기관 방문 (4회)을 통한 OPU공동 수행 및 기술 교류
- 5) 발정동기화 개선법 (J-synch 및 2-FTET의 연계)의 IP 분석 및 전략 수립



그림 8. 전문인력 양성을 위하여 주관연구기관이 투자 확보한 한우 번식우 농장 (A) 및 연구시설 (B).

▲ 수행연구과제와의 양성인력의 역량 강화 연계성

- OPU 전문인력의 역량은 난자회수기술과 공란우 선발 능력으로 대표할 수 있음
: 수행연구과제 내용 중, 난소 grip법 습득 및 mapping 훈련 과정은 난자회수율 향상을 가능하게 하는 가장 핵심기술에 해당함
: 또한, 단순히 유전적 능력만 좋은 것이 아니라 수정란 생산에도 적합한 공란우를 선별하는 것이 OPU 생산성을 좌우하기 때문에, 수행연구과제의 연구방법에 포함되어 있는 AFC 및 AMH 확인법은 OPU전문인력의 역량을 높일 수 있는 기술에 해당함
- OPU유래 IVEP 전문인력은, 최적의 체외배양체계 유지를 통해 이식가능수정란을 안정적으로 생산하고 이를 현장에 지속적으로 공급할 수 있는 동결기술을 보유하여야 함
: 연구내용 중에 포함되어 있는 도축난소 유래 난자를 이용한 IVEP 반복실험은 OPU유래 난자의 IVEP를 정상적으로 수행할 수 있게 하는 quality control의 역할을 함
: vitrification을 통한 OPU 수정란의 동결법은 국내 현장에 아직 보편적으로 보급되어 있지 않은 기술에 해당하기에, 수행과제의 연구내용인 vitrification-warming 수정란의 생존율 및 이식후 수태율 평가는 OPU-IVEP 전문인력의 역량 제고에 필요한 부분임

▲ 소속기업 종사자로 연구역량 제고 성과

표 6. 세부항목별 연구역량 달성 수준

세부항목	연구개시 수준	정량목표	종료시점 수준
난소 mapping을 통한 난자회수율 증가	10개/두	15개/두	총 2,033개 난자 회수, 평균 15.5개/두
OPU 공란우 선발지표 도출 및 OPU 수행횟수 증가	선발지표 부재	연간 30회 이상 OPU 수행	AFC/AMH 기준선정 완료, 연간 131회 수행 실적
회수난자 대비 평균 배반포율 생산체계 안정화	이식가능수정란 2.5개/두	이식가능수정란 5개/두	이식가능수정란 532개 생산, 평균 4.1개/두
OPU 유래 체외수정란의 동결 이용가능성 증대	vitrification 현장적용 실적 없음	융해후 생존율 80% 내외	융해후 생존율 88.6%, 수태율 45.0%

표 7. OPU관련 기술력 비교

세부항목	쥘라트바이오 ^A	유럽 (5개기관) ^B	미국 (17개기관) ^C
OPU횟수	131두	438두	33,829두
회수난자	2,033개 (15.5개/두)	6,052개 (13.8개/두)	857,436개 (25.3개/두)
이식가능수정란	532개 (4.1개/두)	1,723개 (3.9개/두)	223,811 (6.6개/두)

A: 2차년도 최종 성적 (한우 기준)

B: Commercial embryo transfer activity in Europe 2020 (Association of Embryo Technology in Europe(AETE) 제공, Beef cattle 기준, <https://www.aete.eu/publications/statistics/>)

C: 2021 Statistical information committee report (2020 DATA) (American Embryo Transfer Association (AETA) 제공, Beef cattle 기준, https://www.aeta.org/docs/2020_Stats.pdf)

▲ 기대 효과 및 향후 인력활용 계획

- 기대 효과

: 늘어나고 있는 소 수정란이식 분야에서의 OPU needs에 비해 기술수행력을 보유한 국내 기관은 적은 상황에서, 본 연구과제로 양성된 전문가는 현장의 수요에 대처할 수 있는 기술 다양성을 제공할 수 있음

- 인력활용 계획

: 주관연구기관인 참여기업은 수행연구과제를 통해 양성된 전문인력을 활용하여, 향후 한우 OPU-IVEP유래 이식가능수정란을 안정적으로 생산보급하는 체계를 갖출 계획임 (2022년 1,000개 이상, 2025년 3,000개 이상 목표)

: 또한, 수행과제로 기술력이 제고된 전문인력은 한우 산업에만 한정하지 않고, 국내 도입초기 단계에 있는 유우 품종 (저지)의 OPU-IVEP-ET를 수행함으로써 이의 안정적 정착을 위한 개체 수 증산에 기여할 수 있음

: 급속동결법의 현장적용을 실현하기 위하여 융해후 직접이식법에 대한 추가연구를 계획하고 있으며 (해외전문가 연구실 방문 및 실습 신청검토 중), COVID19로 중단되었던 해외 전문기관과의 교류 재개를 위해 연락시스템을 점검하고 있음

: 현장에서 종사하는 인력들의 OPU유래 체외수정란에 대한 이해를 돕고 객관적 지표 마련을 통해 교육자료로 활용하고자, 소 체외수정란의 발육단계 및 등급에 대한 인공지능 프로그램 개발사업에 참여하여 다양한 사진 자료를 수집하고 있음

2) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

가. 한우에서 초음파를 이용한 직접 난자채취 인력 양성 (주관연구기관)

가) OPU 공란우에서 난소 mapping을 통한 난자회수를 증가

(가) 소 난소의 Mapping

○ Mapping을 통한 소 난소의 초음파 화상 reading

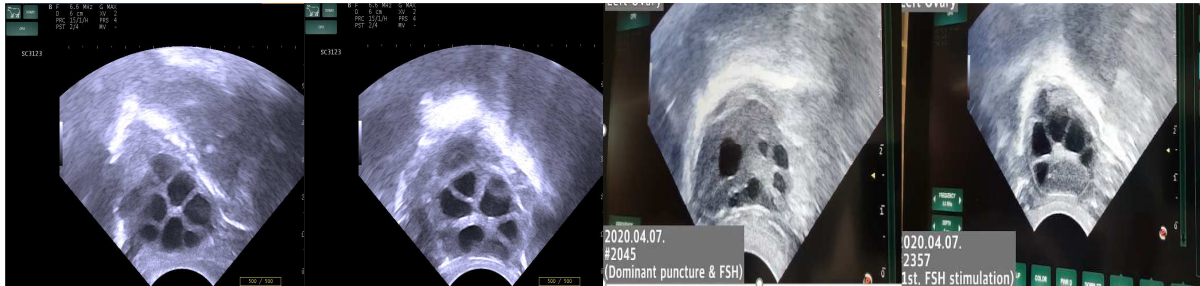


그림 9. 서로 다른 한우 공란우 개체의 난소 내 존재하는 난포 및 황체의 초음파 화상.

- 초음파 화상에 보이는 직경 5~10 mm의 난포들은 사이즈가 균일하고, OPU를 통한 난자회수에 가장 적합한 크기를 보이고 있으며, 이는 실험 전 호르몬 처치 (FSH stimulation)를 통해 유도될 수 있었음 (그림 8)
- 초음파 탐촉자 위에서의 난소 mapping에 따라 난포의 개수 및 형태는 다르게 보일 수 있음
- 그림 5의 사진들은 한우 공란우에 FSH 처치 후 구상난포 (antral follicle)가 선명한 것들을 선별한 것으로, FSH 처치를 하지 않은 일반 대다수의 한우 공란우 난소에는 크기가 5 mm 이하로 작거나 10 mm 이상의 큰 난포들이 서로 혼재되어 있는 것을 확인하였음
- 한편, 난소조직 내에 우세난포 (Graffian follicle) 및 배란 후 큰 황체가 존재할 경우 회수되는 총 난포 개수는 적어지는 경향을 보였음

(나) 소 난소의 AFC (Antral follicle counting; 구상난포 수 측정)

○ 한우 생식기 및 생체에서의 mapping training

- 도축장에서 수급한 한우 생식기를 이용하여 난소의 grip에 따라 달라지는 난소 및 난포의 초음파 화상을 비교하였는데, 이 과정을 통하여 실험자별로 상이했던 난소 grip 형태를 통일화할 수 있었으며, 초음파 탐촉자 위에서 난소를 움직이는 (Up and Down 및 Lateral) 방향 및 순서 등의 기본 기술 숙지가 가능하였음 (그림 9)



그림 10. 도축된 한우 생식기 난소의 mapping 훈련 과정.



그림 11. 한우 생체에서의 난소 mapping 훈련.

- 생식기 실습 후, 실제 생체에서의 직장검사를 통한 난소 mapping을 훈련하며 이후 OPU 진행에 따른 난자 회수율 향상을 도모하였고, 한우 공란우 개체별 및 연구원별 난소 mapping에 따른 구상난포 개수 측정 결과를 비교하였음 (그림 10)

○ 연구원별 난소 mapping에 따른 AFC 결과

- 같은 조건 (대상우, 초음파 장비, 소 난소 grip 방법, mapping 순서 등)에서도 실험을 진행하는 연구원에 따라 AFC의 측정 결과가 달랐음 (표 7)

표 7. 연구원별 AFC 측정 결과

구분	연구원1 (Lt/Rt)	연구원2 (Lt/Rt)	연구원3 (Lt/Rt)	Mean±SE
1061 44** 2	15 (8/7)	11 (5/6)	13 (5/8)	13.0±1.2
0401 15** 4	36 (15/21)	17 (5/12)	20 (10/10)	24.3±5.9
1072 59** 6	28 (16/12)	25 (15/10)	23 (11/12)	25.3±1.5
0937 44** 6	19 (13/6)	16 (10/6)	20 (12/8)	18.3±1.2

- 즉, 서로 다른 OPU 공란우 (4두)에서 연구원별 AFC 개수는 최저 11개부터 최고 36개를 보였음
- 또한, 같은 공란우에서 연구원별 AFC 편차는 최저 1.2에서 최고 5.9개의 차이가 있었으며, 이는 연구원의 난소 mapping 기술에 따라 회수될 난자의 개수에 차이가 있을 수 있음을 의미함
- OPU 기술자의 mapping condition을 최대한 끌어올려 난소의 상처를 줄이고 (안정된 mapping을 통하여 이후 난자회수를 위한 needle 삽입 시, 한번 천공한 곳을 반복해서 찌르는 것을 줄일 수 있음), 결과적으로 난자 회수율을 증가시킬 수 있을 것으로 예상하였음

○ 동일한 소의 random ovarian cycle (Day0/ Day2)에서의 AFC 결과

- 서로 다른 소에서는 AFC가 다양한 값을 나타내지만, 같은 개체의 소에서의 AFC는 비교적 반복적인 경향을 보였다는 문헌이 있는 반면 (Morotti et al., 2017), 같은 개체를 1년 주기로 AFC를 측정했을 때 반복 개수가 불분명하였다는 서로 다른 문헌도 존재함 (Koyama et al., 2018)
- 이에 관한 내용을 국내 상황에서 확인해 보기 위하여 동일한 개체의 한우 공란우 4두에서 3일 간격으로 반복 AFC를 수행한 결과, 예상보다 큰 차이를 나타내었음 (표 8)

표 8. Random ovarian cycle에서의 AFC

구분	연구원1 AFC (Lt/Rt)		연구원2 AFC (Lt/Rt)	
	Day0	Day2	Day0	Day2
1061 44** 2	15 (8/7)	33 (14/19)	11 (5/6)	23 (11/12)
0401 15** 4	36 (15/21)	27 (19/8)	17 (5/12)	29 (13/16)
1072 59** 6	28 (16/12)	35 (17/18)	25 (15/10)	22 (12/10)
0937 44** 6	19 (13/6)	22 (17/5)	16 (10/6)	25 (13/12)

- 표 7에서의 차이는 발정주기에 따른 난소 내 난포의 발육 정도에 기인한 차이로 생각되며, 더 많은 개체 수에서의 AFC 측정 및 발정주기 random cycle에서의 추가 측정을 통해, 상기 문헌에서처럼 더욱 좁혀질 수 있을 것으로 판단됨
- 한편, 전체적인 AFC data의 변이가 넓은 것은, 반복적인 mapping training을 통해 작업자별 편차를 줄여야 할 필요성이 있음을 의미함

나) 난자회수율, 배반포형성을 및 수태율을 근거로 한 OPU 공란우 선발

(가) 한우에서의 AMH 측정

- Anti-Mullerian Hormone (AMH) 관련 review article 요약 (Alward and Bohlen, 2019)
 - Ovarian reserve (난소 예비능)을 반영하는 지표로서, 다른 혈액학적 지표 (FSH, E2, Inhibin) 및 AFC 등의 검사에 비해 객관적인 평가가 가능하며 앞으로 배란될 난포의 수를 평가할 수 있음
 - 난포의 과립막 세포에서 생성되는 호르몬으로 연령이 증가함에 따라 난포의 수가 적어지면 그 수치도 감소되는 것으로 알려져 있음
 - AMH 수치는 생리 (번식) 주기와 무관하게 일정해서 언제나 측정 가능한데, AMH는 난자의 양 (quantity)에 대한 척도가 될 수 있으나 난자의 질 (quality)에 대한 척도는 아님
 - 하지만, 사람과 달리 소의 사양 환경에 따라 AMH 결과 대비 난소의 건강상태 및 난포 형성에 변이가 많을 것으로 예상함

○ 다수의 한우 공란우에서의 개체별 AMH 측정

- 2020~2021년 지역OPU사업으로 진행한 한우 공란우를 대상으로 AMH를 측정한 결과 (총 54두), 최저 111.8 pg/ml부터 최고 2615.0 pg/ml까지 개체별 차이가 있었고 평균 772.2 pg/ml로 나타났음 (표 9)

표 9. 한우 공란우의 개체별 AMH 측정 결과

연번	공란우	AMH (pg/ml)	연번	공란우	AMH (pg/ml)
1	3098 55** 6	2615.0	28	0960 45** 1	592.6
2	3090 25** 7	1875.5	29	0921 36** 8	573.3
3	0097 53** 6	1749.5	30	0765 33** 4	570.0
4	0674 41** 8	1646.0	31	1246 21** 3	546.9
5	0774 18** 2	1490.0	32	1246 21** 4	529.5
6	0574 45** 3	1471.0	33	0996 76** 3	519.0
7	0969 00** 4	1405.5	34	3082 52** 3	518.2
8	0720 71** 6	1331.0	35	1161 78** 7	517.3
9	0878 21** 2	1299.0	36	0627 97** 3	496.6
10	1078 20** 6	1289.5	37	0799 91** 6	496.2
11	0436 29** 7	1286.0	38	0777 30** 7	440.8
12	0846 55** 6	1283.0	39	0857 71** 1	440.4
13	1777 44** 5	1050.5	40	3025 90** 0	430.8
14	0799 91** 6	1050.0	41	0960 44** 3	408.6
15	0506 68** 1	1017.4	42	0646 24** 3	408.3
16	3002 56** 8	985.2	43	3080 88** 5	407.4
17	3078 60** 2	824.1	44	3050 04** 8	406.1
18	2009 20** 9	812.8	45	0870 20** 6	400.0
19	0270 49** 9	784.1	46	0804 02** 2	398.0
20	3085 03** 3	777.6	47	0995 07** 1	377.4
21	0774 18** 2	749.0	48	0780 38** 8	366.7
22	0822 22** 8	747.0	49	3019 79** 6	217.3
23	0822 41** 7	746.6	50	0551 54** 8	196.6
24	3025 86** 4	696.0	51	1228 25** 4	180.0
25	0861 86** 0	636.2	52	0903 50** 7	176.0
26	0728 40** 9	611.1	53	1243 59** 5	137.0
27	0788 72** 9	608.8	54	0107 37** 1	111.8
Mean±SE : 772.2±69.1					

- 향후 더 많은 개체의 AMH 값을 축적하여 한우 품종에서의 연령대별 평균치를 찾아볼 수 있을 것으로 사료됨

- 참고문헌에서도 소의 품종, 연령 및 개체에 따라 AMH 값이 다양하게 나타나는 것으로 보고되어 있으며 (그림 11, Ribeiro et al., 2014; Alward and Bohlen, 2019), 한우 또한 같은 경향을 보일 것으로 생각함

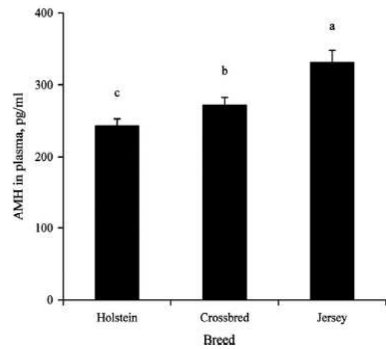


FIGURE Anti-Müllerian hormone levels by breed. Bars with different letters are different ($p < .05$) (Ribeiro et al., 2014)

그림 12. 소의 품종에 따른 AMH 값의 비교. Holstein 품종의 AMH에 비하여 Jersey 품종의 AMH가 유의적으로 더 높음.

다) 지역(사업화) 별 OPU 실시

- OPU 공란우 선발을 위한 객관적 지표로서의 AMH 측정치 이용가능성을 검토하기 위해, 공란우에서 혈액검사를 진행한 후 반복하여 OPU를 실시하였음

(가) 2020년 한우 OPU 결과

- 한우 공란우 14두를 대상으로 총 49회 (각 개체별 반복회수 2~6회) OPU를 진행한 결과, 공란우 두당/회당 회수난자 개수는 평균 $12.8(\pm 1.3)$ 개이었고 이로부터 생산된 이식가능수정란 개수는 평균 $4.1(\pm 0.7)$ 개이었음 (표 10)

표 10. 공란우별 OPU 결과 (2020년도 지역사업 전체 공란우)

공란우	반복회수	회수난자 (평균)	이식가능수정란 (평균)	이식가능 수정란 비율
0574 45** 3	3	43 (14.3)	25 (8.3)	58.1 %
0720 71** 6	4	76 (19.0)	22 (5.5)	28.9 %
0822 22** 8	4	50 (12.5)	27 (6.8)	54.0 %
0774 18** 2	4	40 (10.5)	21 (5.3)	52.5 %
3025 86** 4	4	30 (7.5)	3 (0.8)	10.0 %
0822 41** 7	6	90 (15.0)	21 (3.5)	23.3 %
0996 76** 3	4	31 (7.8)	13 (3.3)	41.9 %
0903 50** 7	3	31 (10.3)	5 (1.7)	16.1 %
0870 20** 6	4	28 (7.0)	10 (2.5)	35.7 %
3098 55** 6	5	98 (19.6)	36 (7.2)	36.7 %
0969 00** 4	2	36 (18.0)	3 (1.5)	8.3 %
0878 21** 2	2	13 (6.5)	1 (0.5)	7.7 %
3002 56** 8	2	37 (18.5)	17 (8.5)	45.9 %
0765 33** 4	2	25 (12.5)	5 (2.5)	20.0 %
합계 및 Mean±SE	49	628 (12.8±1.3)	209 (4.1±0.7)	-

- 상기 데이터는 서로 다른 세 지역의 공란우에서 2020년 상반기에 실험을 진행한 결과로, 공란우 두당 OPU 회당 생산한 이식가능수정란 개수는 최저 0.5개부터 최고 8.5개까지 편차가 컸음 (이식가능수정란 개수가 많은 개체들 (하늘색 음영) 및 적은 개체들 (노란색 음영) 구별 표시)

○ 지역별 OPU유래 수정란 생산성 비교

- International Embryo Technology Society (IETS)에서 매년 발표하는 자료에 따르면 (그림 12), 최근 전 세계의 OPU 유래 회수난자 개수는 평균 16.5개, 이식가능수정란 개수는 평균 4.3개이었음. 이는 약 22만여 두의 OPU 공란우를 사용한 결과이며, 연간 OPU 유래 체외수정란의 개수가 약 1백만 개에 육박하였음을 보여주고 있음 (체외수정란 시장의 급격한 성장세)

Table 6. Production of embryos *in vitro* with OPU-collected oocytes by region

Region/ Country	Donors			Oocytes			Transferrable embryos		
	Dairy	Beef	Total	Dairy	Beef	Total	Dairy	Beef	Total
Africa	827	1,633	2,460	2,099	20,801	22,900	687	4,693	5,380
Asia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Europe	13,997	4,687	18,684	147,148	63,949	211,097	28,152	23,819	51,971
N America	91,303	26,163	117,466	1,444,214	586,858	2,031,072	311,867	156,361	468,228
Oceania	0	833	833	0	18,003	18,003	0	4,332	4,332
S America	42,031	44,452	86,483	763,440	685,213	1,448,653	210,144	240,469	450,613
Total	148,158	77,768	225,926	2,356,901	1,374,824	3,731,725	550,850	429,674	980,524

그림 13. 전세계 지역별 OPU유래 수정란 생산량 (IETS Newsletter; 2019).

- 이들 성적에 근거하여 비교하여 볼 때, 본 연구진이 연구진행 1차년도에 수행한 한우 OPU 유래 회수난자 및 이식가능수정란 개수는 전 세계 평균에 다소 미치지 못하는 못하나, 비슷한 수준을 나타내고 있음 (16.5 vs. 12.8개 및 4.3 vs. 4.1개)
- 본 연구팀의 OPU 유래 평균 회수난자 및 이식가능수정란 개수 성적이 전 세계의 성적에 미치지 못하는 이유는 우선적으로 소의 품종, 유전적인 개체차이 및 다양한 사양 환경에 따른 것으로 추정되며, 또한 연구 개시 시점 및 규모에 따른 기술 수준의 차이가 존재하는 것으로 판단함
- 따라서 국내 지역별, 개체별 및 사양환경에 따른 OPU 성적의 차이를 검토하고자, 상기에 언급한 국내에서 수행한 1차년도 연구결과를 다시 세 지역의 공란우별로 나누어 성적을 비교 검토해 보았음
- A 지역 4두의 공란우를 대상으로 3주 간격으로 약 4회 반복하여 OPU를 진행한 결과, 회수난자 개수는 평균 14.0개, 이식가능수정란 개수는 평균 6.5개를 생산하였음 (표 11)

표 11. A 지역 OPU 결과 (2020년 상반기 data)

공란우	반복횟수	회수난자 (평균)	이식가능 수정란 (평균)	이식가능 수정란 비율
0574 45** 3	3	43 (14.3)	25 (8.3)	58.1 %
0720 71** 6	4	76 (19.0)	22 (5.5)	28.9 %
0822 22** 8	4	50 (12.5)	27 (6.8)	54.0 %
0774 18** 2	4	40 (10.5)	21 (5.3)	52.5 %
Mean±SE		14.0±1.9	6.5±0.7	-

- 이식가능수정란을 가장 많이 준 개체는 평균 8.3개, 가장 적게 준 개체는 평균 5.3개로 개체별 편차가 있었는데, 이는 IETS 통계의 OPU 연간 누적 데이터 대비 회수난자 개수는 적고 이식가능수정란 개수는 다소 높은 경향을 나타내었음
- B 지역 공란우 6두에서 2주 간격으로 3~6회씩 반복하여 OPU를 진행한 결과, 회수난자 개수는 평균 11.2개, 이식가능수정란 개수는 평균 3.1개를 생산하였음 (표 12)

표 12. B 지역 OPU 결과 (2020년 상반기 data)

공란우	반복횟수	회수난자 (평균)	이식가능 수정란 (평균)	이식가능 수정란 비율
3025 86** 4	4	30 (7.5)	3 (0.8)	10.0 %
0822 41** 7	6	90 (15.0)	21 (3.5)	23.3 %
0996 76** 3	4	31 (7.8)	13 (3.3)	41.9 %
0903 50** 7	3	31 (10.3)	5 (1.7)	16.1 %
0870 20** 6	4	28 (7.0)	10 (2.5)	35.7 %
3098 55** 6	5	98 (19.6)	36 (7.2)	36.7 %
Mean±SE		11.2±2.1	3.1±0.9	-

- 이식가능수정란이 가장 많은 평균 7.2개, 가장 적은 개체는 평균 0.8개로, 공란우 개체별로 편차 범위가 A 지역에서보다 컸음

표 13. C 지역 OPU 결과 (2020년 상반기 data)

공란우	반복횟수	회수난자 (평균)	이식가능수정란 (평균)	이식가능수정란 비율
0969 00** 4	2	36 (18.0)	3 (1.5)	8.3 %
0878 21** 2	2	13 (6.5)	1 (0.5)	7.7 %
3002 56** 8	2	37 (18.5)	17 (8.5)	45.9 %
0765 33** 4	2	25 (12.5)	5 (2.5)	20.0 %
Mean±SE		13.9±2.8	3.3±1.8	-

- C 지역 공란우 4두에서 2주 간격 2회 반복하여 OPU를 진행한 결과, 회수난자 개수는 평균 13.9개, 이식가능수정란 개수는 평균 3.3개를 생산하였음 (표 13)
- 이식가능수정란이 가장 많은 개체는 평균 8.5개, 가장 적은 개체는 평균 0.5개로, 공란우 개체별 편차 범위가 세 지역 중에서 가장 넓었음
- B 및 C 지역의 공란우 유래 OPU 성적은 전 세계 평균 대비 회수난자 및 이식가능수정란 개수 모두에 있어서 낮은 경향을 나타내었으며, 본 연구에서의 전문인력양성 과정 수행을 통해 효율향상의 필요가 있음을 보여주고 있음

(나) 2021년 한우 OPU 결과

○ 지역별 OPU유래 수정란 생산

- 2021년도에는 6개 지역의 지자체 및 개인농가를 대상으로 사업을 진행함과 동시에 자체보유 농장에서도 OPU를 실시하였음 (표 14)
- 한우 공란우 47두를 대상으로, 개체별 반복회수 2~9회로 총 131회 OPU를 진행한 결과, 총 2,033개의 난자를 회수하였고 (회당 평균 15.5개) 이로부터 이식가능수정란을 총 532개 생산하여 (두당 평균 4.1개, 평균 26.2%) 준비된 수란우에 체내 이식하거나 동결 보존하였음

표 14. FSH 처치 후 OPU 결과 (2021년 한우 공란우 대상)

공란우 지역	공란우 두수	반복회차	OPU 총회수	회수난자 (회당 평균)	두당 이식가능수정란 (회당 평균)
가 지역	13	9	43	754 (17.5±1.4)	186 (4.3±0.5)
나 지역	6	5	24	289 (12.0±0.9)	103 (4.3±0.6)
다 지역	6	2	8	103 (12.9±2.2)	23 (2.9±1.0)
라 지역	1	4	4	33 (8.3±2.3)	9 (2.3±0.6)
마 지역	3	3	8	119 (14.9±0.9)	31 (3.9±1.1)
바 지역	3	8	15	235 (15.7±1.6)	51 (3.4±0.6)
자체보유 농장	15	8	29	500 (17.2±1.3)	129 (4.4±0.5)
전체 합계 (mean±SE)	47	-	131	2,033 (15.5±0.6)	532 (4.1±0.3)

- 상기 데이터는 연구 1차년도 대비 OPU 수행횟수는 2.6배 증회 및 이식가능수정란 생산량은 2.5배 증량된 결과이며, 본 과제의 주요 실행 목표였던 해외기술교류가 COVID-19의 pandemic 상황으로 인해 연구 1차년도는 물론 2차년도 종료시점까지도 정상적으로 진행될 수 없어서 총 OPU-IVEP 실험 횟수를 증대 적용하여 과제의 목표수행을 달성하고자 한 결과에 해당함 (연구관리기관과 협의를 거쳐 연구활동비를 연구재료비로 전환 후 진행하였음)

○ 자체보유 농장 공란우의 OPU실험

- 연구 2차년도 (21년 3월)에 한우 번식우 농장 (충북 소재, 성우 기준 120두 규모)을 매입, 자체 인력을 투입하여 우군 사육 및 OPU-IVEP-ET 시스템 구축을 진행하였음
- 농장 인수 초기 우군 운영에서의 문제점이 다소 발생하였음에도 불구하고, 연구 1차년도에 얻었던 결과와 거의 유사한 성적을 얻었으며, 이는 본 연구팀의 기술력이 안정적으로 정착되고 있음을 나타내는 지표라 판단함

표 15. 자체보유 농장의 한우 공란우 (15두)의 FSH 처치 후 개체별 OPU 결과

공란우	OPU 횟수	회수난자 (평균)	이식가능수정란 (평균)	이식가능수정란 비율
0659 42** 1	1	22 (22.0)	8 (8.0)	36.4 %
1336 66** 2	2	29 (14.5±1.5)	10 (5.0±1.0)	34.5 %
0982 79** 6	2	50 (25.0±7.0)	12 (6.0±2.0)	24.0 %
1081 07** 1	3	56 (18.7±6.1)	17 (5.7±2.4)	30.4 %
1372 40** 2	1	26 (26.0)	5 (5.0)	19.2 %
3118 38** 0	3	56 (18.7±4.9)	11 (3.7±1.7)	19.6 %
3118 38** 1	1	8 (8.0)	0	0 %
1159 12** 8	1	15 (15.0)	3 (3.0)	20.0 %
1407 41** 0	1	1 (1.0)	1 (1.0)	100 %
1293 56** 8	2	36 (18.0±2.0)	8 (4.0±1.0)	22.2 %
0374 18** 5	5	91 (18.2±1.5)	23 (4.6±0.9)	25.3 %
0822 41** 7	2	44 (22.0±4.0)	13 (6.5±1.5)	29.5 %
0827 69** 1	2	28 (14.0±0.0)	6 (3.0±3.0)	21.4 %
1141 32** 4	2	28 (14.0±5.0)	8 (4.0±2.0)	28.6 %
0627 97** 3	1	10 (10.0)	4 (4.0)	40.0 %
Mean±STD		17.2±7.0	4.4±2.6	-

(다) AMH 수치와 OPU 결과의 관계 확인

○ AMH 수치에 따른 OPU 결과

- 1차년도에 공란우 14두를 대상으로, AMH 수치와 OPU 결과 사이의 관계를 분석하였음 (표 16)

표 16. AMH 수치에 따른 OPU유래 수정란 생산 결과 (1차년도 공란우 대상)

공란우	AMH (pg/ml)	AFC (개)	회수난자	이식가능 수정란	이식가능 수정란 비율
3098 55** 6	2615.0	25	19.6	7.2	36.7 %
0574 45** 3	1471.0	27	14.3	8.3	58.0 %
0969 00** 4	1405.5	-	18	1.5	8.3 %
0720 71** 6	1331.0	15	19	5.5	28.9 %
0878 21** 2	1299.0	-	6.5	0.5	7.7 %
3002 56** 8	985.2	-	18.5	8.5	45.9 %
0774 18** 2	749.0	15	10	5.3	52.5 %
0822 22** 8	747.0	27	12.5	6.8	54.0 %
0822 41** 7	746.6	27	15	3.5	23.3 %
3025 86** 4	696.0	20	7.5	0.8	10.0 %
0765 33** 4	570.0	-	12.5	2.5	20.0 %
0996 76** 3	519.0	10	7.75	3.3	41.9 %
0870 20** 6	400.0	23	7	2.5	35.7 %
0903 50** 7	176.0	27	10.3	1.7	16.2 %

- AMH와 회수난자 개수 사이에는, AMH 수치가 높은 개체일수록 회수난자의 개수가 많아지는 강한 양의 상관관계를 보였으며 유의성을 확인할 수 있었음 ($r=0.6269$, $p<0.05$; 그림 13의 빨간색)

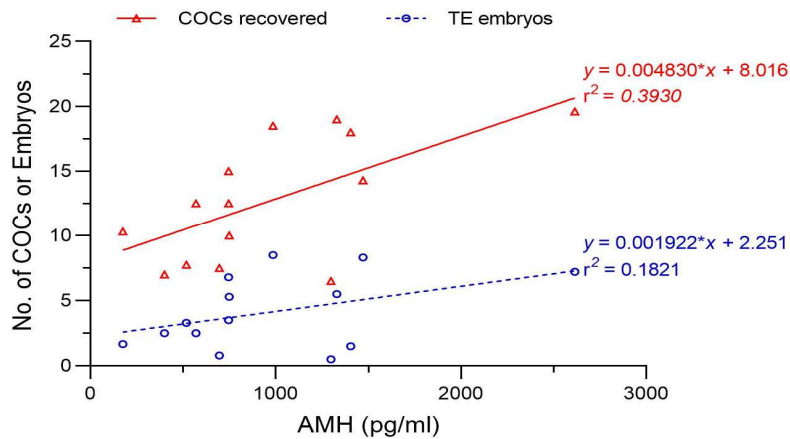


그림 14. AMH 수치와 회수난자 개수 (△) 및 이식가능수정란 개수 (○) 사이의 상관관계.

- 반면, AMH와 이식가능수정란 개수 사이에는, AMH 수치가 높은 개체에서 이식가능수정란 개수가 많아지는 경향은 있지만 (약한 양의 상관관계) 유의성이 확인되지는 않았음 ($r=0.4267$, $p=0.1281$; 그림 13의 파란색)

- 이 결과는, 공란우 개체의 AMH 수치는 난포 발생에 직접 영향을 끼칠 수 있어서 OPU난자의 회수개수와 깊은 관계가 있지만, 이후 수정란의 발육은 다른 변수들, 즉 개체의 연령, 산차 및

영양상태 또는 회수난자의 발육단계 등과 같은 생물학적 요인이나 계절과 실험방법 차이 등의 외부환경적 요인에 의해 달라질 수 있음을 의미함

○ AMH 수치에 따른 채란 (In Vivo Flushing) 결과

- 본 연구내용과의 간접적 상관성을 평가하고자, AMH 측정된 한우 공란우에서 FSH 과배란처치 후 수정란회수 (채란; Flushing)를 실시하여 이에 대한 성적을 평가해 보았음 (표 17)

표 17. AMH 수치에 따른 체내수정란 회수 결과

공란우	AMH (pg/ml)	AFC (개)	회수난자 (개)	이식가능수정란 (개)	이식가능수정란 비율
3090 2592 7	1875.5	20	43	2	4.65 %
0674 41** 8	1646.0	13	10	0	0 %
0774 18** 2	1490.0	20	6	6	100 %
1777 44** 5	1050.5	15	4	2	50.00 %
0506 68** 1	1017.4	13	23	6	26.09 %
3078 60** 2	824.1	10	12	4	33.33 %
2009 20** 9	812.8	11	9	2	22.22 %
3085 0323 3	777.6	14	2	2	100 %
0861 86** 0	636.2	15	9	2	22.22 %
0799 91** 6	496.2	14	9	0	0 %
0777 30** 7	440.8	7	0	0	0 %
0646 24** 3	408.3	14	9	6	66.67 %
3050 04** 8	406.1	20	14	1	7.14 %
0804 02** 2	398.0	7	11	9	81.82 %
0995 07** 1	377.4	10	9	5	55.56 %
0780 38** 8	366.7	10	2	0	0 %
3019 79** 6	217.3	15	15	8	53.33 %
0551 54** 8	196.6	10	13	4	30.77 %
0107 37** 1	111.8	14	14	1	7.14 %

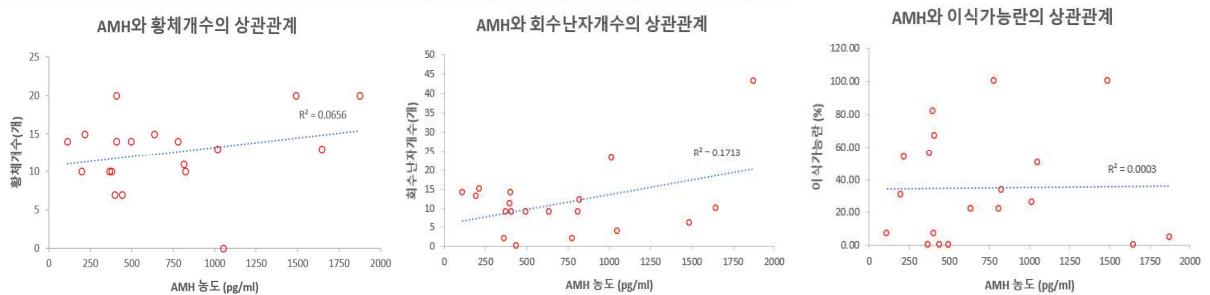


그림 15. AMH와 체내수정란 회수 간의 연관성. 약한 양의 상관관계를 보임.

- AMH와 황체 개수 및 회수수정란 개수 사이에는 약한 양의 상관관계가 있었으나 유의성을 띠지 않았고, AMH와 이식가능란 개수 사이에는 상관관계가 보이지 않았음 (그림 14)
- 따라서, AMH는 수정란회수에 대한 간접적인 하나의 번식지표로 적용할 수 있음이 확인되었고, 공란우의 사양환경 및 건강상태 등에 따라 배란시기, 배란된 수정란의 위치 및 수정란발육이 좌우될 수 있기에 채란 성적을 예측하기 위해서는 다양한 환경적 요인들과의 상관성 분석이 필요하다고 생각됨

○ 공란우 선발지표 선정

- 일반적으로 보유 유전능력이 뛰어난 암소를 OPU 공란우로 선별하는 경향이 있으나, 그 기준만을 선별지표로 적용하였을 경우 수정란생산 결과가 유전능력 보유와는 별개로 나타나기도 함
- 따라서, 유전능력이 뛰어나며 동시에 수정란생산 능력이 좋은 개체를 최종선발하는 것이, 산업적 측면에서 수정란이식 체계의 현장적용 시 성공가능성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단됨
- 본 연구팀은 OPU 유래 이식가능 수정란의 생산효율을 증가시키기 위해 OPU 대상 공란우 선별을 위한 필수 검사자료로 AMH 측정 및 AFC 측정한 후, 이 두 가지 요인의 정량적 수치를 같은 비율로 합산한 총합을 산정하여 순위를 정하고 상위 50%에 해당하는 개체를 최종 공란우로 선정하는 체계를 적용하기로 하였음 (예시; 표 18)

표 18. AFC/AMH 검사 결과에 따른 공란우 선발 예 (2차년도 나 지역)

공란우 후보	AFP (개)	AMH (pg/ml)	AFP score ^a	AMH score ^b	총 score ^c	선발 등수
0674 48** 2	28	1150	47	50	97	2
0960 45** 1	20	592.6	33	30	63	6
0921 41** 0	0	380.9	0	19	19	10
0097 53** 6	30	1749.5	50	50	100	1
3085 03** 3	0	581.9	0	29	29	9
0800 03** 7	24	311.2	40	16	56	7
0846 73** 5	28	798.9	47	40	87	3
3025 90** 0	20	430.8	33	22	55	8
0627 97** 3	25	448.4	42	22	64	5
0270 46** 9	0	107.2	0	5	5	11
0506 68** 1	27	732.3	45	37	82	4

^aAFP score : 30개 이상=50점, 30개 이하=50*AFP/30

^bAMH score : 1000 pg/ml 이상=50점, 1000 pg/ml 이하=50*AMH/1000

^c총 Score : AFP score + AMH score

- 표 18에서와 같이, 능력이 뛰어나 선발된 11두 모두를 수정란생산 실험에 공유하는 것보다는, 이들 중 50%에 해당하는 1~5등 순위의 공란우 선별이 필요함 (공란우 후보를 약 2배수 내외 준비)
- 전체 우군의 규모가 외국 대비 적은 국내 한우 산업의 경우 상기 방법을 필수로 적용하기는 현실적인 어려움이 존재하나, 본 연구팀은 수정란이식사업의 경쟁력 향상을 위한 rule로 설정하여 공란우 선발기준을 강화하여 적용하기로 하였음

(라) FSH 처치에 따른 OPU 결과 비교

○ None stimulation vs. FSH stimulation 유래 OPU 결과

- OPU 후 난자의 발육능은 난포 발육단계에 의해 영향을 받으며 (Sirard, 2012), 난자의 발육능 획득은 난포의 발육과 연관된 것으로 알려져 있음 (Caixeta et al., 2009)
- 실제로 소의 품종 및 개체에 따라 난소에 생성되는 난포의 개수가 다르고, 이식가능한 배반포까지의 발달률에 차이가 있음
- 따라서, OPU 공란우에 대한 FSH 처치가 난포 및 난자의 발육 그리고 이식가능수정란의 개수를 증가시킬 것으로 판단하여 두 군으로 나누어 실험을 진행하였음
- FSH 처치군의 공란우 14두를 대상으로 OPU를 총 49회 진행한 결과, 628개의 난자를 회수할 수 있었으며 (평균 12.7개/두) 이들로부터 이식가능수정란을 209개 생산하여 (평균 4.1개/두) 33.3%의 생산효율을 얻었음 (표 19)

표 19. FSH 처치군의 OPU 결과

공란우	반복횟수	회수난자 (평균)	이식가능 수정란 (평균)	이식가능 수정란 비율
0574 45** 3	3	43 (14.3)	25 (8.3)	58.1 %
0720 71** 6	4	76 (19.0)	22 (5.5)	28.9 %
0822 22** 8	4	50 (12.5)	27 (6.8)	54.0 %
0774 18** 2	4	40 (10.5)	21 (5.3)	52.5 %
3025 86** 4	4	30 (7.5)	3 (0.8)	10.0 %
0822 41** 7	6	90 (15.0)	21 (3.5)	23.3 %
0996 76** 3	4	31 (7.8)	13 (3.3)	41.9 %
0903 50** 7	3	31 (10.3)	5 (1.7)	16.1 %
0870 20** 6	4	28 (7.0)	10 (2.5)	35.7 %
3098 55** 6	5	98 (19.6)	36 (7.2)	36.7 %
0969 00** 4	2	36 (18.0)	3 (1.5)	8.3 %
0878 21** 2	2	13 (6.5)	1 (0.5)	7.7 %
3002 56** 8	2	37 (18.5)	17 (8.5)	45.9 %
0765 33** 4	2	25 (12.5)	5 (2.5)	20.0 %
Mean±SE		12.7±1.3	4.1±0.7	-

- 반면, FSH 비처치 군에서는, 총 32회의 OPU를 진행하여 회수난자 275개 (평균 8.5개) 중 29.7%의 비율로 이식가능수정란을 생산하였음 (총 80개, 평균 1.8개/두; 표 20)

표 20. FSH 비처치군의 OPU 결과

공란우	반복횟수	회수난자 (평균)	이식가능수정란 (평균)	이식가능수정란 비율
0846 55** 6	12	142 (11.8)	52 (4.8)	36.6 %
0799 91** 6	8	26 (3.3)	14 (1.8)	53.8 %
0506 68** 1	3	26 (8.7)	8 (2.7)	30.8 %
0646 24** 3	3	32 (10.7)	2 (0.7)	6.3 %
0707 49** 2	3	23 (7.7)	2 (0.7)	8.7 %
3085 03** 3	3	26 (8.7)	2 (0.7)	7.7 %
Mean±SE		8.5±1.2	1.8±0.6	-

- 연구 1차년도에 공란우를 대상으로 FSH 비처치군과 FSH 처치군에서의 회수난자 개수를 서로 비교한 결과, FSH 처치군에서의 회수난자 개수 (평균 12.7±1.3개/두)가 FSH 비처치군에서의 회수난자 개수 (평균 8.5±1.2개/두)에 비해 많았으며 두 군 사이에는 통계적인 유의성이 있었음 ($p < 0.05$, 그림 15)

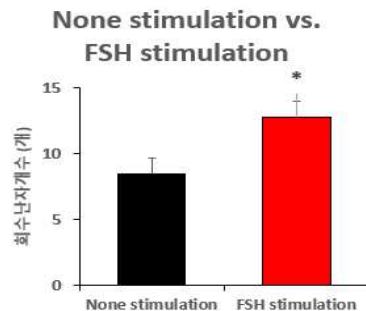


그림 16. FSH 처치 여부에 따른 회수난자 수. $p=0.027$.

- 참고문헌에서도 FSH 처치 후 OPU 진행하는 방법이 회수가능성이 높은 medium size follicle (6~10 mm)의 숫자를 높이는 것으로 알려져 있으며 (da Silva et al., 2017), 회수난자 개수의 증가를 통해 OPU-IVEP의 efficacy를 높일 수 있을 것으로 여겨짐
- 회수난자의 발육능 (oocyte developmental potential) 증가는 follicular growth를 통해 이루어지며 (Vieira et al., 2014), FSH stimulation을 진행한 후, 마지막 FSH 처치로부터 OPU 개시까지의 coasting period (본 연구에서는 약 40시간 내외)에 긍정적인 효과가 발생하였을 것으로 판단됨

○ FSH stimulation 용량에 따른 OPU 결과 비교

- OPU에서 FSH stimulation이 필요한 이유는 많은 수의 난포가 발육하게 하는 것이 아니라, Graffian 난포가 다른 난포의 발육을 억제하지 못하게 해서 동일한 발육단계의 난포가 많이 발생하도록 하여 난자의 발육단계를 맞추는 것에 있음
- 국외에서 발표된 논문들은 주로 젖소에 맞춰 FSH 용량을 제시하였기 때문에 한우에 맞는 기준을 확인할 필요가 있기에 공란우 개체별로 FSH 용량을 6 ml와 8 ml를 번갈아 처치 후 회수난자 개수를 비교해 보았음 (표 21)

표 21. FSH 처치용량별 회수난자 개수

공란우	1차		2차		3차		4차		전체 평균		
	6 ml	8 ml	6 ml	8 ml	6 ml	8 ml	6 ml	8 ml	6 ml	8 ml	평균
A	23	-	-	36	19	-	-	14	21.0	25.0	23.0
B	-	7	16	-	-	15	28	-	22.0	11.0	16.5
C	-	16	12	-	-	7	5	-	8.5	11.5	10.0
D	6	-	-	6	12	-	-	8	9.0	7.0	8.0
평균	14.5	11.5	14.0	21.0	15.5	11.0	16.5	11	15.1	13.6	14.4

- 표 21에서와 같이, FSH 용량을 8 ml와 6 ml로 번갈아 투여했을 때 회수난자의 개수에 큰 차이가 없었고 4회 연속 FSH 투여하여도 난자 회수량에 개체별 차이가 크기 때문에, FSH 용량 및 투여횟수에 따라 회수난자의 수량에 차이가 발생한다고 볼 수 없음
- 이에 본 연구팀은, FSH 용량을 두당 8 ml로 정하고 (젖소 대상 참고문헌에서 제시된 양의 0.8배에 해당) 2주 간격으로 10회 반복 처치하는 방법을 선택하였음

○ FSH stimulation에서 coasting period 확인

- 공란우의 호르몬 처치에 따른 OPU 방법에서 FSH 최종투여 후 난자회수 시점까지의 시간 (coasting period; a period of FSH withdrawal/starvation)이 난자의 회수율 및 체외발육률에 영향을 미친다고 보고되어 있는데 (Blondin et al., 2002), 투여 후 44~68시간에 채취한 난자가 일찍 (투여 후 20시간) 채취한 난자보다 발육률이 더 좋고 coasting period가 오히려 더 길어지면 (92시간) 발육능이 감소한다고 하였음 (Nivert et al., 2012)
- 본 연구팀은 한우에서의 FSH 처치에 의한 OPU 방법을 정립하기 위하여 coasting period를 36시간 기준으로 2시간 간격 차이를 확인하고자 하였으나, 현장에서의 전처치 수행에 어려움이 발생하여 36~40시간으로 범위를 둔 채 진행할 수밖에 없었음
- 그 이유로는, FSH 처치방법은 12시간 간격으로 4회 FSH를 처치한 후 (예를 들어 오전 10시와 오후 10시) 마지막 처치 이후 36시간에 바로 OPU를 진행해야 하는데 공란우가 있는 지역 현장과 실험실이 거리상 떨어져 있어서 FSH 투여자와 OPU 작업자 모두의 편의를 맞추기가 어려웠음

- 이와 함께, 동일 작업하는 공란우가 많은 경우 (최대 16두까지 같은 날 진행) 한정된 수의 보정틀을 사용하여 준비하는 시간을 포함한 전체 작업 시간이 길어져 한 시점을 정해서 반복수행하는 것이 현실적으로 불가능하였음
- 이에, 지역사업을 주로 수행한 1차년도 (2020년)에는 농가현장에 직접 방문하여 OPU를 진행하였기 때문에 주로 coasting period를 40시간에 맞추었고, 자체 확보한 농장에서 주로 OPU작업을 수행한 2차년도 (2021년)에는 coasting period를 36시간에 맞추되 마지막 작업이 많이 늦어지지 않도록 (40시간 이내 완료) 주의하면서 진행하였음
- 36시간과 40시간을 단순히 비교하는 정확한 데이터를 얻을 수 없었으나, 16두 기준으로 처음 작업한 개체의 난포액에 비해 마지막 개체의 난포액에는 점액질이 더 많이 포함되어 있었고, coasting period가 길어지면 회수된 난자도 과립막세포 및 난구세포가 다소 확장된 상태인 경우도 일부 관찰되었음
- 또한, 36시간을 기준으로 FSH 처치된 공란우의 난소 내 난포 직경이, OPU에 최적이라 여겨지는 직경인 5~8 mm 사이의 난포의 크기보다 다소 큰 난포 (직경 10 mm 이상)들이 다수의 개체에서 보이는 것을 확인하였음
- 이는 한우의 품종 특성으로 추정되며, FSH 투여용량이 젖소에 비해 적은 것과 마찬가지로 원리로, coasting period 또한 참고문헌에서 제시된 40시간 및 본 연구팀이 수행하였던 36시간보다도 더 짧아질 수 있다는 가능성에 해당함
- 이에, 마지막 FSH 처치 후 24, 30 및 36시간 내외에 난소의 난포형성 상황을 초음파 화상으로 확인해 보았음 (그림 16)



그림 17. 한우에서 FSH처치 종료 후 시간대별 난소 내 난포의 초음파상. (A) 24시간 후, (B) 30시간 후, (C) 36시간 후. 초록격자는 1 cm를 표시함.

- 상기 사진은 자체보유 농장의 공란우인 “1141 32** 4” 개체 (회수난자 개수가 평균 14.0개, 이식가능수정란이 평균 4.0개/OPU 생산; 표 14)의 FSH 처치 후 난포를 초음파로 확인한 사진으로, 마지막 FSH 처치 후 24시간에도 직경 6~7 mm의 난포가 확인되었고 (A), 30시간에는 크기가 직경 7~8 mm (B), 36시간에는 직경 8~9 mm까지 자라있는 것이 확인되었음
- coasting period가 가지는 번식생리학적 의미는, 같은 시기에 발육이 개시된 난포 내 난자의 growth phase를 동일하게 유지시켜 이후의 수정란의 후기발육에 가장 적합한 난자의 발육능을 갖게 하는 것임
- 반면, OPU 공란우의 전처치 없이 발정주기의 임의시기에 난자를 회수하는 경우에는 서로 다른 growth phase를 보이는 다양한 시기의 난자가 회수되므로, IVEP를 통한 이식가능수정란의 생산효율이 과배란 전처치 후 회수한 난자에 비해 낮은 것으로 알려져 있음
- 따라서, 이식가능한 수정란의 생산을 높이기 위해서는, 한우에서 FSH 처치 후의 적정 coasting period를 결정하기 위한 추가 연구가 필요하다고 생각함

○ 동일 개체별 FSH stimulation 여부에 따른 OPU 수정란 생산성

- 공란우의 개체별로 연령, 산차 및 대사 상태가 같지 않아서 FSH에 대한 반응이 같을 수 없으므로, 개체별로 FSH 처치 여부에 따른 OPU 성적을 비교해 보았음 (표 22)

표 22. 동일 개체의 FSH 처치 여부에 따른 OPU 결과

공란우	FSH 처치			FSH 미처치		
	횟수	AFC (평균±SE)	TE (평균±SE)	횟수	AFC (평균±SE)	TE (평균±SE)
0374 18** 5	3	38.7±2.6	5.0±1.5	2	30.0±0.0	6.0±4.0
0822 41** 7	2	34.5±0.5	6.5±1.5	3	42.3±3.2	2.5±1.5
0827 69** 1	2	22.5±2.5	3.0±3.0	3	22.7±6.0	3.0±0.6
1141 32** 4	2	23.5±3.5	4.0±2.0	2	14.0±10.0	1.3±0.7
0777 30** 7	2	29.5±1.5	2.5±0.5	3	33.7±4.4	3.7±1.9
0804 02** 2	2	23.5±8.5	3.5±1.5	3	18.0±2.3	1.0±0.6
3080 88** 5	2	34.5±12.5	4.0±2.0	3	28.0±3.1	2.3±0.7
1065 86** 3	3	41.7±5.6	2.3±0.3	3	36.0±4.9	1.3±0.9
0720 71** 6	3	62.0±13.0	6.3±0.3	3	64.7±4.2	4.0±1.0
3077 15** 0	2	31.0±6.0	2.0±2.0	3	30.3±13.9	1.0±1.0
0996 35** 8	2	62.0±20.0	9.5±1.5	3	62.7±7.1	6.0±2.5
Mean±SE	-	38.0±3.5	4.4^a±0.6	-	35.6±3.3	2.8^b±0.5

- AFC 지표의 경우, FSH 처치하였을 때의 수치가 FSH 처치하지 않았을 때의 수치에 비해 높은 개체가 5두 (하늘색 음영)이었으나 그 외의 공란우는 FSH 처치하였을 때 오히려 낮거나 (3두, 노란색 음영) 거의 차이가 없었기에 (3두), 공란우의 FSH 처치가 AFC 자체를 높이거나 회수난자 수가 늘어나게 하는 효과가 있지는 않았음 (평균 38.0 vs. 35.6, $p=0.6209$)
- 반면 이식가능수정란 (TE) 지표의 경우, FSH 처치하지 않았을 때의 이식가능수정란 개수가 더 많았던 개체 2두 (주황색 음영)를 제외한 모든 개체에서 FSH 처치하였을 때 이식가능수정란 개수가 더 많아지는 결과를 보였음 (평균 4.4 vs. 2.8, $p<0.05$)
- 특히 '0822 41** 7' 개체의 경우, AFC 수치는 FSH 처치하지 않았을 때 더 높았음에도 이식가능수정란 개수는 오히려 FSH 처치 후 더 높은 결과를 보였음 (밑줄 표시)

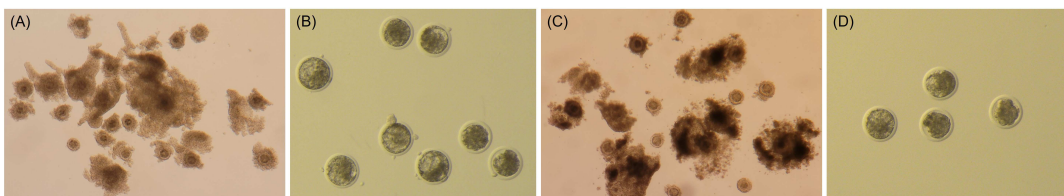


그림 18. 동일개체의 FSH 처치 여부에 따른 OPU 결과 (표 28에서의 1065 86** 3 개체). (A) FSH 처치 후 회수난자, (B) FSH 처치 후 7일차 수정란, (C) FSH 미처치 후 회수난자, (D) FSH 미처치 후 7일차 수정란.

- 한편 '1065 86** 3' 개체의 경우를 예로 보면, FSH 처치하였을 때에는 난구세포가 확장된 상태를 보이기는 해도 퇴행 중인 난자가 없었으나 FSH 처치하지 않은 상태에서는 회수난자 중 일부가 퇴행 중인 것으로 나타났고 (그림 17의 A와 C), 7일차 수정란의 발육단계로 보아서도 FSH 처치 후 OPU를 진행했을 때 배반포로 발육한 수정란의 개수가 FSH를 처치하지 않았을 때보다 더 많았음 (그림 17의 B와 D)
- 상기 결과로 보아, 한우에 있어서 공란우를 FSH 처치하여 2주 간격으로 OPU를 진행하는 것이 이식가능 수정란의 생산량을 높이는데 유효함을 확인할 수 있었음

○ OPU 수정란의 체내 이식을 위한 수란우 발정동기화

- 현재까지 알려진 젖소 및 비육우의 Fixed Time Artificial Insemination (FTAI, 정시 인공수정) 및 Fixed Time Embryo Transfer (FTET, 정시 수정란이식)에서의 발정동기화법 (Estrus Synchronization)은, 발정동기화에 사용하는 주 약제에 따라 GnRH-based 및 Estradiol-based synchronised protocol로 나누어짐 (BO et al., 2016)
- GnRH-based protocol은 각 약제의 처치 Day0, Day7 및 Day9에 GnRH, PG 및 GnRH의 약제별 1회 권장량을 근육주사하는 기법 (Ov-synch 법으로 명명)으로, 처치한 수란우군의 40~60% 내외가 Day 10일에 FTAI를 수행할 수 있는 상태로 동기화되는 방법임
- 주요 원리는, 첫 번째 GnRH를 주사하는 시점에 수란우 번식주기가 GnRH에 반응할 수 있는 직경 8 mm 이상의 난포가 존재하고, 이 난포 내벽에 LH receptor의 발현이 개시된 경우에만 동기화처치법이 유의미하며, 이 때문에 발정주기 21일 중 random stage에 있는 수란우군의 평균 GnRH에 대한 주사반응률은 60% 이하로, 최종 발정동기화율 (즉 제공률)은 40~60% 내외를 기대하는 방법임 (Day, 2015)
- 따라서, 이 방법은 수란우군의 규모가 수백 두 이상일 경우, 별도의 발정관찰 없이 정해진 시점에 약제 처치 후 인공수정을 진행하여 수태율 40~50% 내외를 얻으며 대상 우군의 Open day (공태기)를 줄이는 결과를 가져오므로, 결과적으로 효율적인 우군 번식관리 기법으로 인식되고 있으며 주로 해외에서는 FTAI에 주로 이용되고 있음
- 이에 반해, Estradiol-based protocol은 번식생리학적으로 다른 원리를 이용하여 대상 우군에서의 발정을 동기화하는 법에 해당함
- 주요 원리는, 대상 우군의 발정주기에 상관없이 특정 시점에 estradiol 제제 및 progesterone 제제를 동시에 근육주사할 경우 이로부터 평균 4.0~4.5일에 새로운 follicular wave (난포파동)의 출현이 개시된다는 생물학적 발견에 기인하며 (자연적인 상태에서 E2와 P4가 동시에 분비되어 혈중농도가 높게 유지되는 경우는 거의 없음), 새로운 follicular wave의 출현은 곧 배란과 같은 의미로 해석할 수 있으므로 수일 후 PG에 반응하는 황체세포 (luteal cell)가 형성될 수 있는 번식생리학적 상태를 유발할 수 있음
- Estradiol-based protocol은, Day0에 progesterone을 분비하는 P4 device를 수란우의 질 내에 삽입하고 동시에 estradiol benzoate를 근육주사하며, Day8에 P4 device를 제거하고 동시에 PG를 근육주사, 그리고 Day9에 estradiol benzoate를 근육주사하여 Day9에 인공수정 혹은 Day16에 수정란이식을 진행할 수 있도록 대상우군의 발정을 동기화시키는 법임 (Bo et al., 2013)
- 이 방법은 주사처치만을 진행하는 Ov-synch법에 비해 고비용 및 처치의 수고로움이 늘어나는 반면 최종 동기화효율 (제공률)이 평균 80% 내외를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 주로 해외에서는 FTET에 선호되고 있음
- 상기 동기화처치법의 국내 적용에 대해 신뢰도 있는 근거 데이터가 존재하지는 않으나, 외국보다 상대적으로 적은 우군의 규모, 발정동기화에 대한 원리 이해의 부족 및 현장 처치인력의 P4 device 이용제한 등의 이유로 국내의 경우는 Ov-synch법의 적용비율이 더 높은 것으로 판단됨
- 따라서 본 연구팀은 OPU-IVP 유래 체외수정란의 이식 후 수태율 향상을 위해 연구 1차년도에는 conventional estradiol based protocol을 주로 사용하여 수란우의 발정동기화를 진행해왔으며, 연구 2차년도에는 Bo 등 (2019)의 논문에 근거하여, 기존 동기화법의 업그레이드 버전이라 할 수 있는 J-synch 법 및 최종 우군의 수태율 향상을 위해 연속적인 동기화를 진행하여 수정란이식을 수행하는 2-FTET 방법을 국내에서는 처음으로 수정란이식 현장에 적용하였음 (표 23)

표 23. estradiol-based protocol 동기법에 따른 수란우 발정동기화법 비교

구분	동기화 두수	이식 두수	제공률	수태 두수 (%)	비고
Conventional	155	102	65.8%	52 (51.0)	1차년도
J-synch (A)	164	136	82.9%	57 (41.9)	2차년도
J-synch (B)	121	104	86.0%	57 (54.8)	2차년도

- J-synch 동기화법은 기존의 conventional estradiol-based protocol을 개선한 것으로서, 기존 방법과 대비하여 CIDR (P4 device)의 체내처치 기간을 8일에서 6일로 줄이고, CIDR 제거로부터 인공수정시점 시간을 2일에서 3일로 늘임으로써 전체적 동기화효율을 높인 처치방법임
- 표 23와 같이, 일반적으로 estradiol-based protocol을 이용한 제공률, 즉 동기화처치한 두수 대비 수정란이식에 공여한 두수의 평균 범위는 약 80% 내외를 보이며, 개선된 J-synch 처치가 기존 방법에 비해 다소 높은 제공효율을 보이는 것을 확인하였음
- 이는 수란우군 연간운영의 비용적 측면에서 우군의 공태기간을 최소화하므로, 수정란이식의 현장 적용 가능성을 높이고 생산성 향상에 긍정적 영향을 미치는 요소라 평가됨
- J-synch (A) 처치법에서 다소 수태율이 낮았던 이유는, 본 연구팀의 주관기업이 농장을 인수한 초기시점으로 수란우군의 사양관리가 안정화되지 못했던 영향으로 분석됨

표 24. 수란우 발정동기화를 위한 2FTET방법 수행 결과 (자체보유 농장 대상)

2-FTET	동기화 두수		이식 두수		수태 두수		공여두수 대비 수태율 (%)
	A	B	A	B	A	B	
1차	7	5	7	4	2	3	71.4
2차	6	4	5	3	1	1	33.3
3차	16	11	15	9	4	2	37.5
4차	6	4	6	4	2	3	83.3
5차	12	6	10	5	4	3	58.3
6차	23	9	18	7	9	1	43.5
합계	70	39	61	32	22	13	54.6±8.1

- 2-FTET 법의 기본적 개념은, 한 번의 동기화처치-수정란이식을 통해 인공수정 기준 30일 내외에 초음파를 이용한 임신감정을 진행하고 이때 수태가 확인된 개체를 제외한 미수태우를 가장 짧은 기간 내 재이용할 수 있도록 (임신감정 기준 10일 후 재이식 공여), 임신감정 6일 전에 J-synch 처치를 다시 준비함으로써 수란우 이용효율을 극대화할 수 있는 산업적 이식전략이라 할 수 있음
- 이는 수정란이식의 적용 시, 어려운 문제로 여겨지는 수란우군의 공태기 연장에 따른 부담을 감소시켜 발정동기화 처치법의 제공률 향상과 동일한 효과를 만들어냄
- 실제로 국내 수정란이식의 현장상황은 공여된 수란우의 공태기간 연장으로 인한 농가의 생산성 감소가 수정란이식 산업의 확장적용에 중요한 걸림돌로 작용하고 있음
- 1A와 1B는 공여된 수란우의 일정 두수를 연속적으로 1차와 2차에 걸쳐서 수정란이식을 진행한 것을 의미하며, B 군에 해당하는 결과치에서 알 수 있듯이 동기화 효율이나 수태율이 A 군에 대비하여 감소하지 않은 것을 확인하였음 (표 24)
- 결과적으로, 2-FTET 법은 OPU유래 체외수정란 이식의 현장적용 가능성을 높이는 중요한 동기화처치법이 될 수 있을 것으로 생각됨

라) 정기적인 수정란이식 교육

○ 위탁연구기관의 인프라를 활용한 수정란이식 교육

- 회사의 인력뿐 아니라 국내의 수정란이식 전문가 (수정사/수의사) 양성을 위하여 정기적인 수정란이식 교육을 실시하였음 (그림 18, 19 및 20)



그림 19. 수정란이식 전문가 (경북 소재 수정사 대상) 기술교육 실습 및 이론 특강 (2020.6.4~5)



그림 20. 경상북도 농민사관학교 수정란생산기술 특강 (2020.11.5)



그림 21. 수정란이식 전문가 (경북 소재 수정사 대상) 기술교육 실습 및 이론 특강 (2020.12.4)

나. 회수 난자를 이용한 이식가능 체외수정란 생산 인력 양성 (주관연구기관)

가) 안정화된 체외배양 체계 설정

(가) 체외수정 방법에 따른 한우 수정란의 발육능 및 성비 확인

○ 체외수정 배지 종류에 따른 수정란의 발육능 비교

- 소 수정란이식 분야의 산업발전과 더불어 이용 가능한 상업화 배지가 다양하게 시판되고 있음
- 체외수정 작업에 있어 정자의 수정능획득 (sperm capacitation) 및 활력 증강의 목적으로 heparin을 배지에 첨가하는데 (Parrish et al., 1988), caffeine (Niwa and Ohgoda, 1988)이나 theophylline (Takahashi and First, 1993)과 같은 methylxanthines도 정자 운동성을 자극하고 유지하는 것으로 알려져 있음
- 체외수정용 배지를 체외수정 방법에 따라 나누면 heparin 첨가 배지 사용법과 caffeine 첨가 배지 사용법으로 구별할 수 있으며, 전자는 정자의 최종농도를 $1\sim 2 \times 10^6$ 개/ml로 하여 난자와 18~20시간 정치하는 것이고, 후자는 정자 농도를 높여 ($3\sim 5 \times 10^6$ 개/ml) 단시간 (6~8시간) 처리하는 방법임
- 본 연구팀은 시판 배지를 사용하여 heparin 첨가법 (호주 ART Lab Solution사 제품; ART20 군)과 caffeine 첨가법 (일본 IFP사 제품; IFP6 군)에 따른 수정란의 발육능을 비교해 보았음 (그림 21)

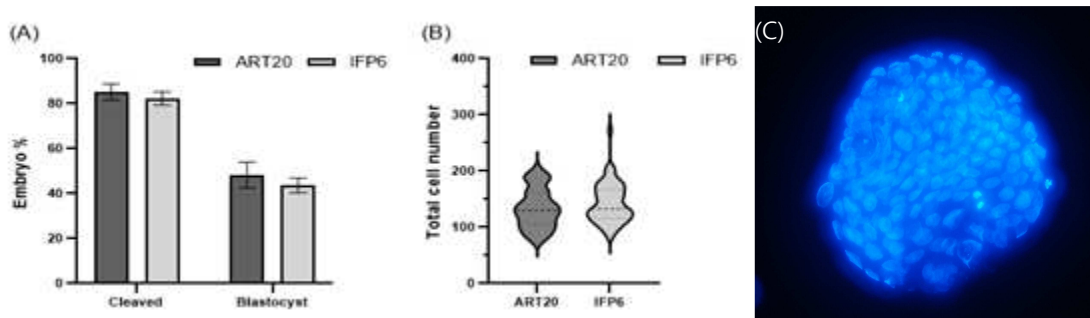


그림 22. 배지의 종류에 따른 소 수정란의 발육능 비교. (A) 분할율 및 배반포형성률 (6반복), (B) 7일차 배반포의 총 세포 수 (5반복), (C) 7일차 배반포의 형광염색 사진.

- 2일차 분할율은 ART20 군에서 85.3%, IFP6 군에서 82.3%로 나타나 서로 유의적인 차이가 없었고, 7일차 배반포 형성률은 ART20 군이 48.3%, IFP6 군이 43.7%이었으며 (그림 21의 A), 배반포의 세포 수는 ART20 군이 133.9 ± 4.43 , IFP6 군이 143.4 ± 4.99 로 (그림 21의 B와 C), 모든 지표에서 유의적인 차이가 발생하지 않았음
- 따라서, heparin 처리법과 caffeine 처리법은 소 수정란의 발육능에 있어서는 서로 간의 차이 없이 동등한 효과를 보이므로 실험자의 작업 환경에 맞는 방법을 선택할 수 있다고 생각됨

○ 체외수정 배지 종류에 따른 소 수정란의 성비 비교

- 연구목적의 대학 연구실이 아닌 일반 현장에서는 체외배양용 배지를 직접 제작하기 어려우므로 상업용 배지를 사용하는 경우가 많은데, 작업자의 편리를 위하여 caffeine 첨가된 체외수정용 배지를 사용하는 경우가 많음 (예를 들어, 적은 인원으로 OPU 일정을 다회 반복수행하는 경우)
- 본 연구팀은 heparin 첨가 배지 (ART20 군)와 caffeine 첨가 배지 (IFP6 군)를 사용하여 생산한 체외수정란에서 수컷의 성비 (sex ratio; 암컷 수정란 대비 수컷 수정란의 비율)를 확인하였음

표 25. 체외수정용 배지에 따른 배반포 수정란의 성비 확인

	No. of embryos	No. of male embryos	No. of female embryos	Sex ratio (M/F, mean±SE)
ART20 (heparin)	162	85	77	1.1 ^a ±0.12
IFP6 (caffeine)	116	72	44	1.6 ^b ±0.18

*4 replicates.

^{a,b} Values with different superscript were denoted significantly different ($p < 0.05$).

- 표 25의 데이터와 같이, IFP6 군의 배반포 수정란은 ART20 군의 배반포에서보다 암컷 대비 수컷의 비율이 유의적으로 높았음 (평균 성비 1.64 vs. 1.05, $p < 0.05$)
- 이는 caffeine-처리 후 생산된 수정란을 임의로 선택하여 체내 이식할 경우 수컷 산자가 태어날 확률이 높음을 의미하는데, 암소 생산을 목적으로 하는 사업일 경우 (고능력 한우 번식우 생산 또는 유우사업) 원하는 산자를 얻을 확률이 낮아 현장 농가에서 기피하는 현상이 발생할 수 있음
- 따라서, 본 연구팀에서는 분만 산자의 성비에 차이가 발생하지 않게 하는 목적으로 heparin-처리 방법을 선택하여 OPU유래 체외수정란 생산시스템을 확정하였음

(나) OPU 회수난자의 체외성숙에 적합한 배지 선정

○ 가스평형하는 배지와 가스평형하지 않는 배지에서의 체외성숙 효과

- 도축난소 유래 난자를 이용한 수정란실험의 경우 실험실에서 전 과정을 수행하기 때문에 COCs (cumulus oocyte complex; 난구세포-난자 복합체)를 회수한 후 바로 체외성숙 과정을 진행할 수 있는데, 공란우 보유 농가/현장과 실험실이 거리상으로 분리되어있는 본 연구팀의 경우 OPU작업 후 체외성숙을 개시할 실험실까지 OPU난자를 이동해야 하는 과정이 요구됨
- OPU난자를 이동하는 경우 온도 및 pH 변화를 최소화하기 위해 이동용 인큐베이터를 사용하기 때문에, 배지의 종류에 따라 수정란의 배반포 발육이 영향을 받는지 확인해 보았음 (표 26)
- 도축난소로부터 COCs를 회수한 후, CO₂ 인큐베이터에서 온도 (38.5℃)와 가스분압 (5% CO₂)을 유지하면서 22시간 동안 체외성숙 배양하거나 (TCM199 사용; 대조군), 이동용 인큐베이터에서 온도만 유지한 채 체외성숙 배양하여 (Zwitterionic buffered IVM media 사용; MOPS-IVM 군) 이후의 체외수정/체외배양을 동일하게 진행하였음
- 그 결과, MOPS-IVM 군의 분할율이 대조군에 비해 다소 낮았으나 유의적인 차이는 발견할 수 없었고 (71.6% vs. 81.1%, $p=0.176$), 배반포발육률도 MOPS-IVM 군에서 저하되는 경향을 보였지만 유의성은 없었음 (21.7% vs. 33.1%, $p=0.087$)

표 26. 가스평형하지 않는 배지에서 체외성숙한 도축난소 유래 수정란의 체외발육률

	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved at D2 (% , mean±SE)	No. of Blastocysts at D7 (% , mean±SE)
Control TCM199	134	109 (81.1±2.6)	45 (33.1±4.3)
MOPS-IVM	143	102 (71.6±5.6)	31 (21.7±3.6)

*4 replicates.

○ 가스평형하지 않는 배지의 OPU 적용 가능성 확인

- 표 26의 결과를 바탕으로 실제 OPU 현장에서의 적용성을 고려해 방법을 수정 진행해 보았음
- 즉, 난자를 가스평형을 하는 배지 (TCM199-4h 군) 또는 가스평형을 하지 않는 배지 (MOPS-4h 군)에서 4시간 (농장-실험실 간의 이동에 소요되는 시간; 이동용 인큐베이터 사용) 정치하여 체외성숙을 일부 진행한 후 다시 TCM199 배지에 옮겨 나머지 시간을 대조군 (TCM199 군)과 동일한 방법으로 CO₂ 인큐베이터에서 체외성숙 배양하였음
- 그 결과, 이동형 인큐베이터에 정치했다가 CO₂ 인큐베이터에 옮긴 체외성숙을 완료한 두 군 모두 수정란의 분할율 및 배반포발육률이 대조군에 비해 낮았으나 유의적인 차이는 없었고, 각 군에서 발생한 7일차 배반포의 세포 수 또한 모든 군에서 유의적 차이는 발견할 수 없었음 (표 27)

표 27. 가스평형을 하지 않는 배지에서 체외성숙한 도축난소 유래 수정란의 체외발육률

	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved at D2 (% , mean±SE)	No. of blastocysts at D7 (% , mean±SE)	Total cell number of blastocysts (mean±SE)
Control TCM199	89	68 (77.0±3.4)	30 (34.1±4.9)	126.1±7.7
TCM199-4h	87	62 (70.4±5.4)	18 (20.9±5.2)	127.4±10.8
MOPS-IVM-4h	89	63 (74.2±8.0)	24 (30.8±8.8)	131.4±20.2

*5 replicates.

- 다만, TCM199-4h 군에서 배반포발육률이 가장 낮았는데, 이는 이동형 인큐베이터에 정치하는 동안 가스공급이 원활하지 못했음에 기인한다고 봄 (즉, 이동형 인큐베이터의 가스충전 간격이 2시간으로 설정되어 있어 CO₂ 가스를 통한 pH조절이 충분하지 못했거나, 배지 표면에 이슬을 덮는 vial 구조에서 뚜껑에 있는 구멍이 너무 좁아 가스평형이 빠르지 못했던 것도 원인으로 추정)
- 따라서, 농장 현장에서 OPU를 진행한 후 난자를 이동해야 하는 경우, 적정온도 및 pH를 원하는 조건으로 유지할 수 있는 배지를 선택하는 것이 수정란의 발육능 유지에 필요함을 알 수 있었음

(다) 체외수정란의 분할시기와 수정란 발육능 사이의 관계

○ 수정란의 첫 분할시간에 따른 발육률의 차이 확인

- 체외수정이 끝난 후 첫 번째 분할시기에 따라 수정란의 발육능에 차이가 있는지 알아보기 위하여, 체외수정 후 24시간 및 27시간에 분할된 수정란을 나누어 배양한 후 7일차 배반포발육률을 확인하였음 (그림 22)

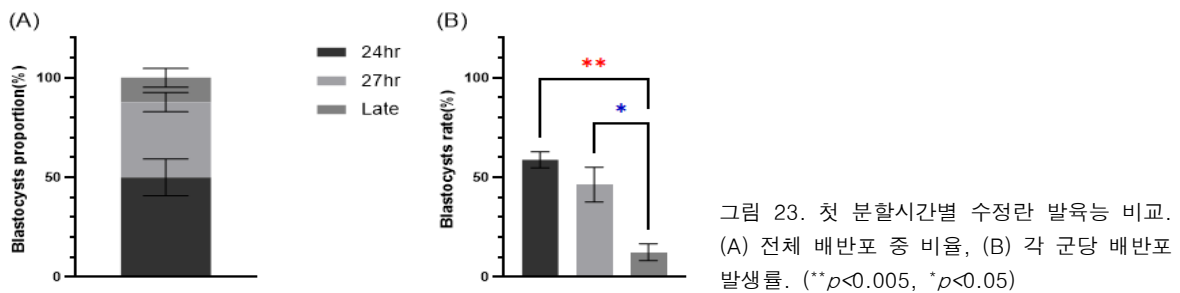


그림 23. 첫 분할시간별 수정란 발육능 비교. (A) 전체 배반포 중 비율, (B) 각 군당 배반포 발생률. (** $p < 0.005$, * $p < 0.05$)

- 도축난소 유래 난자를 대상으로 6회 반복실험하였으며, 전체 607개의 수정란을 배양하여 생산된 247개의 배반포 중에서, 24시간 이전에 분할된 수정란이 50.1%, 24시간 이후 27시간 이전에 분할된 수정란이 37.7%, 27시간 이후에 분할된 수정란이 12.2%를 차지하였음
- 각 군의 배반포발육률은, 24시간 이전에 분할된 수정란 군에서 58.9%, 24~27시간에 분할된 수정란 군에서 46.4%, 27시간 이후 분할된 수정란 군에서 12.5%이었으며, 각각의 유의적인 차이는 그림 22에서와 같았음

○ 수정란의 첫 분할시간에 따른 성비의 차이 확인

- 또한, 일찍 분할된 수정란일수록 수컷일 확률이 높다는 문헌을 참고로 하여 각 군에서의 성비 (암컷 대비 수컷 비율, M/F)를 확인하였음 (그림 23)
- 24시간 이전 분할된 수정란 군 (평균성비 1.15)과 24~27시간 분할된 수정란 군 (평균성비 1.24)의 성비가 늦게 분할된 수정란 군 (평균성비 0.75)의 성비에 비해 높았으나 유의성은 없었음

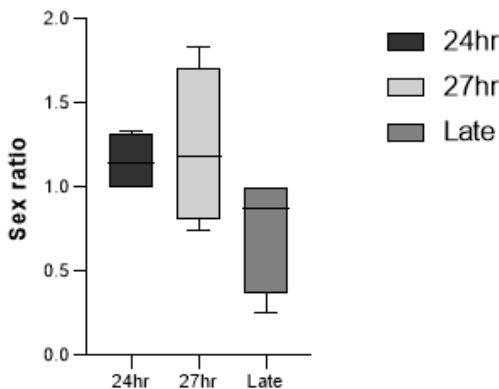


그림 24. 첫 번째 분할시간별 수정란의 성비 비교. 4반복 진행, 전체 221개 수정란 사용.

- 참고문헌에서 수컷 비율이 높았던 것은, 첫 번째 분할을 관찰한 시간 기준으로 확인하지 않고 7일차 배반포의 발육단계별로 성비를 확인했기 때문에 차이가 발생한 것으로 추정함
- 즉, 첫 번째 분할이 빠르지 않아도 (24~27시간 또는 27시간 이후) 7일차 발육단계가 팽창배반포 (expanded blastocyst; stage 7) 또는 부화배반포 (hatching or hatched blastocyst; stage 8)인 경우도 있고, 첫 번째 분할이 빨라도 (24시간 이내) 7일차에 stage 6인 배반포가 발생할 수 있으므로, 배반포의 발육단계로 분할 시기를 추정한 데이터는 명확하지 않다고 할 수 있음
- 본 연구에서도, 빨리 발육한 배반포 (그림 24의 a, b, l, m)에서 수컷과 암컷의 비율이 같고, 늦게 발육한 배반포 (그림 24의 f~k)에서 수컷이 암컷보다 많았던 (수컷 4, 암컷 2) 경우가 있었음

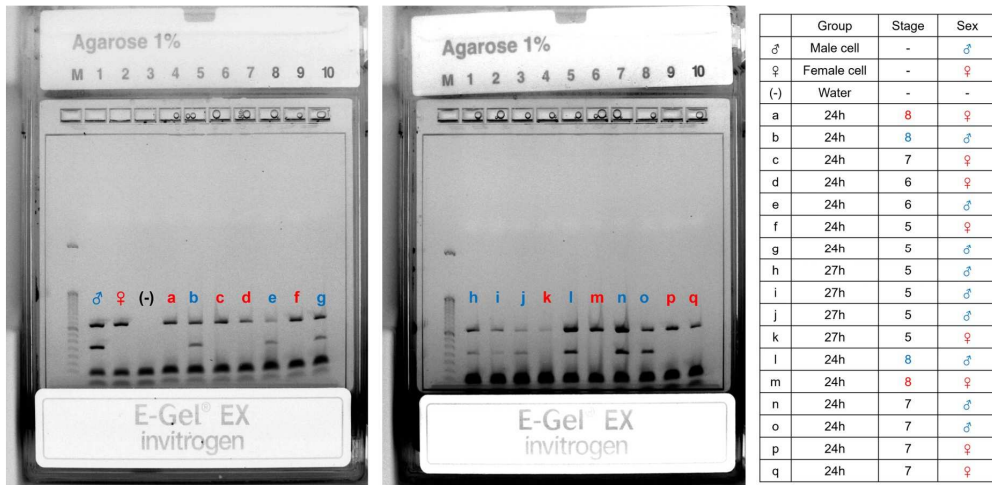


그림 25. 7일차 수정란의 성별 확인용 PCR 결과.

- 이러한 결과를 바탕으로, 본 연구팀은 OPU유래 수정란을 농가현장에 보급하거나 자체보유 농장에 이식할 경우, 7일차 수정란의 발육단계에만 의존하여 빨리 자란 수정란만을 선별하는 것이 아니라 발육단계가 다소 어려도 수정란의 형태학적 기준도 고려해서 이식가능수정란을 선별하였음

(라) 미성숙난자의 세포질 형태가 수정란 발육능에 미치는 영향 확인

○ 과립화난자 유래 수정란의 배반포발육률 확인

- 체외수정란 실험에 있어 좋은 난자란 난구세포층이 3겹 이상 치밀하게 둘러싸고 있고 세포질이 균질한 (homogenous) 난자 (균질난자; 그림 25의 A와 B)를 의미하고, 이러한 기준에 못 미치는, 즉 난구세포층에 잘 둘러싸여 있으나 세포질이 균질하지 않고 (heterogenous) 부분적 과립형태가 보이는 (granulated) 난자 (과립화난자; 그림 25의 C와 D)는 퇴행 (atresia) 중인 난자로 분류됨

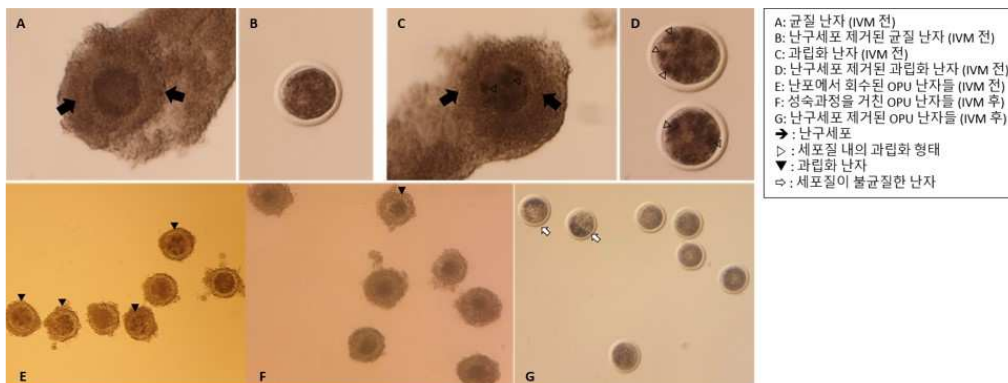


그림 26. 도축난소 유래 체외난자 (A~D)와 OPU 유래 체내난자 (E~G)의 세포질 과립화 모습.

- 본 연구팀이 국내 한우를 대상으로 진행한 경험으로 보면, 일부 공란우에서는 회수난자 중 대부분의 난자가 세포질 내에 과립형태를 취하고 있었는데 (그림 25의 E), 이러한 난자들은 체외성숙 및 체외수정을 거쳐 정상적인 체외성숙률과 발육률을 보였기에 퇴행 단계의 난자는 모두 발육능이 부족한 난자라고 단정하기 어려움
- 또한, 도축난소 유래 과립화난자 군에서의 제1극체 (polar body) 발출율 (체외성숙이 완료되었음을 의미), 정상 체외수정률 (polyspermy를 제외한 비율) 및 분할율이 균질난자 군에서와 차이가 없었다는 참고문헌 (Nagano, 2019)도 있었음
- 이에, 도축난소 유래 과립화난자를 선별하여 체외성숙/체외수정/체외배양을 거쳐 수정란을 생산한 후 체외발육률을 확인해 보았음 (그림 26과 표 27)

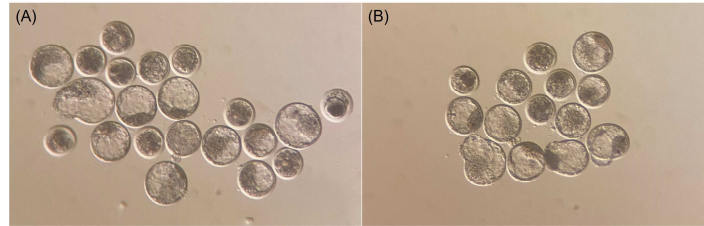


그림 27. 7일차 소 체외수정란 모습. (A) 균질난자 유래 수정란, (B) 과립화난자 유래 수정란.

- 표 28과 같이, 과립화난자 유래 체외수정란은 균질난자 유래 수정란 (대조군)에 비해 2일차 분할율은 차이가 없었지만 (94.9% vs. 92.5%) 7일차 배반포 비율이 유의적으로 높았고 (59.5% vs. 46.8%, $p < 0.05$), 배반포의 세포 수는 과립화난자 유래 수정란이 더 많았으나 유의적인 차이를 보이지는 못했음 (평균 124.5 vs. 105.2, $p = 0.0833$)

표 28. 과립화난자 유래 수정란의 체외발육능

	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved at D2 (% , mean±SE)	No. of blastocysts at D7 (% , mean±SE)	Total cell number of blastocysts (mean±SE)
Control	436	404 (92.5±1.4)	206 (46.8 ^a ±2.2)	105.2±7.6
Granulated oocytes	348	331 (94.9±1.2)	205 (59.5 ^b ±4.5)	124.5±7.8

*9 replicates.

^{a,b}Values with different superscript were denoted significantly different ($p < 0.05$).

○ 과립화난자 유래 수정란의 분할시간별 발육능

- 과립화난자 유래 수정란을 첫 분할시간에 따라 분류하여 체외발육능을 비교해 보았음 (그림 27)

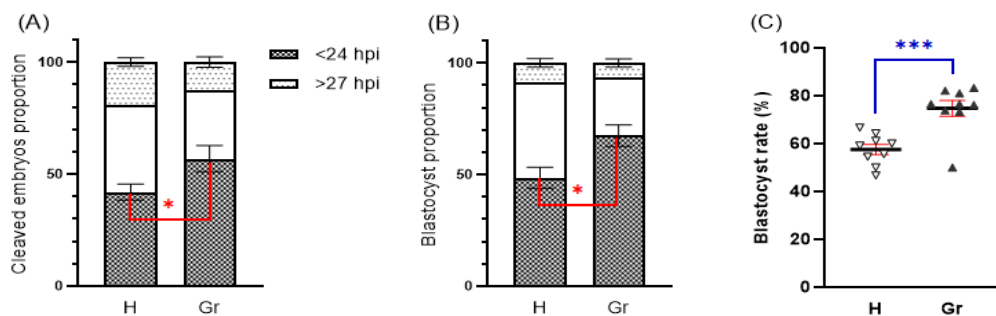


그림 28. 첫 분할시간에 따른 과립화난자 유래 수정란의 체외발육능. (A) 일찍 분할된 수정란의 비율, (B) 일찍 분할된 수정란 유래 배반포의 비율, (C) 일찍 분할된 수정란의 배반포발육률.

- 체외수정 후 24시간 이내 분할된 수정란의 비율은 과립화난자 유래 수정란 군이 대조군에 비해 유의적으로 더 높았고 (56.9% vs. 42.0%, $p < 0.05$), 27시간 이후에 분할된 수정란의 비율은 유의적으로 더 낮았음 (12.6% vs. 19.2%, $p < 0.05$)
- 또한, 전체 배반포 중에서 빨리 분할된 수정란이 차지하는 비율도 과립화난자 유래 수정란 군 (143/205=67.4%)이 대조군 (100/206=48.6%)에 비해 유의적으로 높았으며 ($p < 0.05$), 과립화난자 유래 수정란 군에서 일찍 분할된 수정란의 배반포발육률은 균질난자 유래 수정란 군에서 일찍 분할된 수정란의 배반포발육률보다 유의적으로 높았음 (74.8% vs. 57.6%, $p < 0.0005$)

○ 과립화난자 유래 수정란의 수태능 간접 확인

- 과립화난자 유래 수정란의 체외발육능이 높다는 실험결과를 얻은 후, 이식후의 수태능이 어떠한지 확인하기 위하여 8일차 배반포에서 수태관련 유전자의 발현양상을 비교하였는데, interferon-tau (IFN-t)의 mRNA를 real-time PCR로 분석한 결과 균질난자 유래 수정란과 과립화난자 유래 수정란 사이의 유의적인 차이를 발견할 수 없었음 (그림 28)

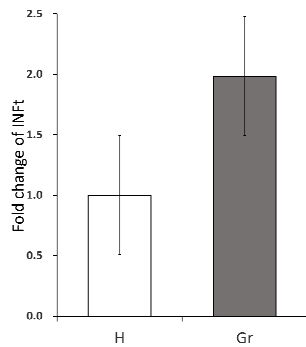


그림 29. 과립화난자 유래 수정란의 IFN-t 발현. 3반복 진행결과.

- 상기 실험결과를 통해 과립화난자 유래 수정란이 체외발육률도 높고 수태능을 유지할 수 있을 것으로 확인되었기에, 본 연구팀은 OPU난자 중 세포질이 과립화 형태를 취하고 있는 난자도 난구세포의 이상 여부가 발견되지 않는 한 수정란 생산에 공여하기로 결정하였음

○ OPU유래 과립화난자의 체외발육능 확인

- 한우 공란우의 OPU에서도 다수의 난자가 세포질 내 과립화 형태를 띤 상태로 회수되는 바, 이러한 난자의 폐기 여부를 확정하기 어려웠기에 OPU 회수난자 중 과립화난자의 비율과 이식가능 수정란의 생산성 사이의 상관관계를 검토해 보았음 (그림 29)

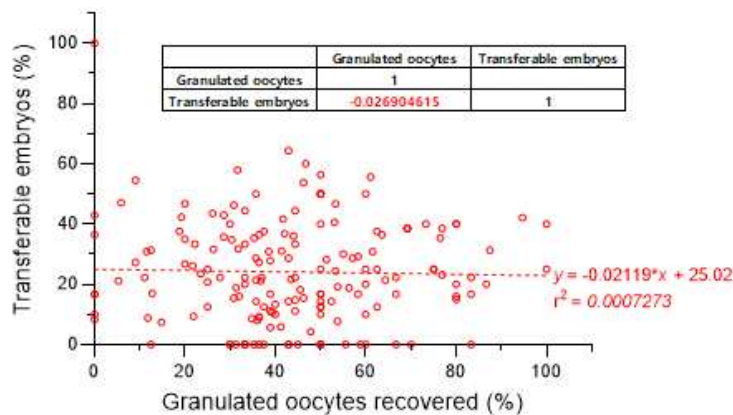


그림 30. OPU유래 과립화난자와 이식가능 수정란 사이의 연관성. 단순 회귀분석 결과 $r = -0.0269$.

- 연구 2차년도에 실시한 OPU 169회 기준으로 정리하면, 회수난자 2,602개 중 과립화난자는 1,098개로 평균 43.7%의 비율로 관찰되었으며, 전체 회수난자로부터 생산된 이식가능수정란은 627개 (평균 24.1%)이었고 과립화난자의 비율과 이식가능수정란의 비율 사이에는 미약한 음의 상관관계가 보였으나 유의성은 없었음

○ OPU유래 과립화난자 비율과 이식가능수정란의 수태율 사이의 연관성 확인

- OPU로 생산한 이식가능수정란은 수란우가 준비된 경우 신선란 상태로 체내 이식하고 여분의 수정란은 동결란의 형태로 보관하는데, 과립화난자 유래 OPU수정란을 농가현장에 안정적으로 공급하기 위해서는 이러한 수정란이 체내 이식 후에도 수태능을 지니는지 확인할 필요가 있음
- 이에, OPU 과립화난자 비율이 이식가능수정란의 비율 및 수태율에 영향을 주는지 확인하기 위하여 체내 이식한 수정란만을 대상으로 상관분석을 실시한 결과, 두 가지 모두 유의성이 발견되지 않았음 (표 29 및 그림 30)

표 29. OPU유래 과립화난자 비율과 이식가능 배반포 생산율 및 수태율 사이의 상관분석

	과립화난자 비율	이식가능수정란 생산율	체내 이식 후 수태율
과립화난자 비율	1	0.004297	-0.04208

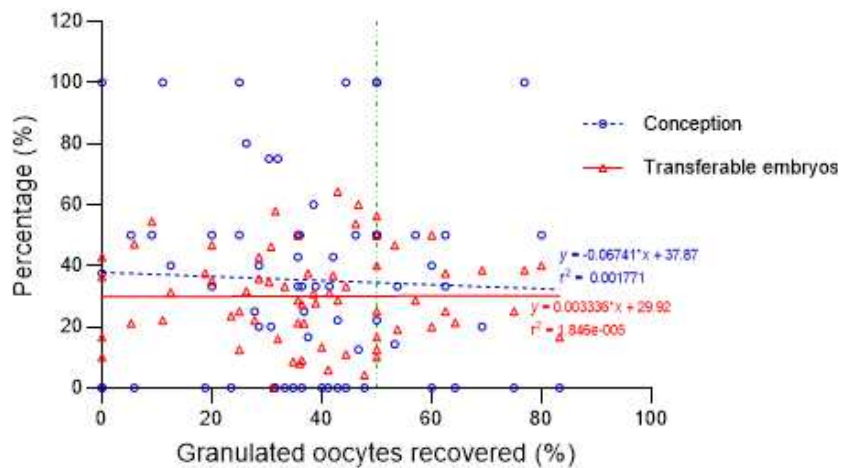


그림 31. OPU유래 과립화난자 비율과 이식가능 배반포 생산율 (△) 및 수태율 (○) 사이의 연관성. OPU 67회 기준, 각각의 그래프는 단순 회귀분석 결과.

- 따라서, OPU로 회수 당시 세포질에 과립형태가 보이는 난자는 발육능이 저하된 상태를 의미하지 않는다고 볼 수 있으며, 이러한 형태를 띠는 정확한 원인과 이로부터 생기는 난자 및 수정란 내부의 미세변화 등에 관한 추가연구가 필요하다고 생각함

나) OPU 유래 동결란의 이용가능성 증대

(가) 지방대사 관련 물질의 첨가가 수정란 발육에 미치는 효과 확인

○ 체외성숙용 배지에 첨가된 lipoic acid의 영향

- 난자 세포질 내 지방대사를 촉진함으로써 수정란의 동결융해 후 생존능을 향상시킬 수 있는지 알아보기 위해, lipoic acid (alpha-lipoic acid; ALA)가 첨가된 배지 (TCM199)에서 체외성숙 배양한 도축난소 유래 난자를 체외수정 및 체외배양하여 배반포발육률을 확인하였음 (표 30)

표 30. lipoic acid가 첨가된 배지에서 체외성숙한 난자의 체외발육률

	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved at D2 (% , mean±SE)	No. of Blastocysts at D7 (% , mean±SE)
Control IVM	79	62 (77.0±5.2)	24 (33.4±7.6)
ALA 5uM in IVM	83	56 (69.7±4.3)	15 (22.4±7.3)

*4 replicates.

- 2일차 분할율은 ALA 첨가군이 대조군에 비해 낮은 경향이 있었으나 유의적 차이는 없었고 ($p=0.32$), 7일차 배반포발육률도 ALA 첨가군이 대조군에서보다 낮았으나 유의적 차이는 발견할 수 없었음 ($p=0.34$)
- ALA는 중성지방을 분해하는 대사에 관여할 뿐만 아니라 항산화 효과가 있어서 사람 및 마우스의 IVEP 배지 내 첨가되고 있는 물질인데 (Truong and Gardner, 2017), 소에서 효과를 발표한 경우는 많지 않으며 (Hassan et al., 2017) 본 실험에서도 긍정적 결과를 보이지 않았음
- 이러한 결과의 원인을 짐작해 보면, ALA는 지용성 물질이어서 수용성 배지인 TCM199에 직접 첨가할 수 없었고 유기용매인 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 고농도 (1,000x) stock을 만든 후 이를 TCM199에 희석 첨가하는 방법을 이용하였는데, 함께 첨가된 DMSO로 인해 난자 및 수정란의 발육능이 영향받았을 것으로 생각함
- 또한, 시판 배지에 ALA를 임의 농도로 추가하면 소 수정란의 배반포발육이 저하된다는 의견이 있는 것으로 보아 (국내 타기관의 연구원 결과, 개인적 교류), ALA의 적정농도 및 첨가방식에 대하여 추가적인 실험이 필요함

(나) 한우 수정란의 급속동결-융해

○ 과립화난자 유래 수정란의 급속동결 후 생존을 확인

- 소 수정란의 동결보존에 있어 보편적으로 이용되는 방법은 완만동결법 (slow freezing)이었으며 전 세계적으로 많은 종류의 시판제품이 현재까지도 사용되고 있는 반면, OPU유래 체외생산 수정란의 시장 점유율이 체내회수 수정란의 점유율을 능가하게 된 시점 이후 급속동결법 (vitrification)의 효율이 향상되고 있으며 국외에서는 많은 전문가가 vitrification을 현장에 적용하고 있음
- 본 연구팀도 vitrification을 국내 수정란이식 산업에 안정적으로 적용하기 위하여 과립화난자 유래 수정란 (6일차 stage 6~7)을 이용하여 vitrification-warming 후 시간별 (6시간, 24시간 및 48시간 후) 생존율을 확인하였음 (그림 31)

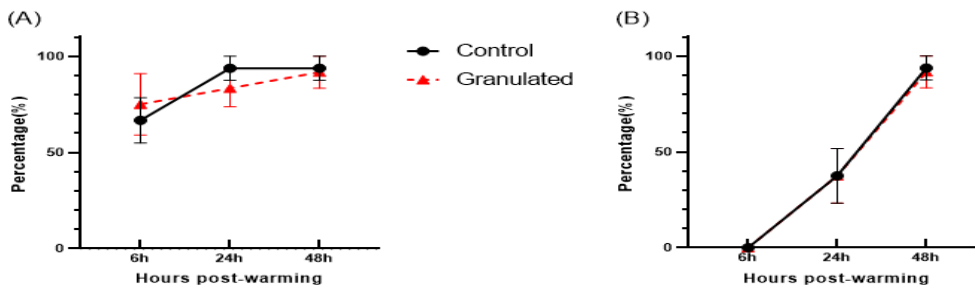


그림 32. 과립화난자 유래 수정란의 vitrification-warming 후 생존율. (A) 배반포강 재팽창 비율, (B) 배반포 부화 비율.

- Warming 후 시간별 재팽창 비율은 균질난자 유래 수정란 군 (Control)에서 각각 66.7, 93.8 및 93.8%이었고 과립화난자 유래 수정란 군 (Granulated)에서 각각 75.0, 83.4 및 91.7%이었으며 두 군 간에는 유의적인 차이가 없었음 ($p=0.9296$)

- 또한, 두 군 모두에서 시간이 지날수록 재팽창율이 증가하는 경향을 보였지만 유의적인 차이를 발견하지는 못했음 ($p=0.0724$)
- 재확장 배반포의 시간별 부화율을 확인한 결과, 균질난자 유래 수정란 군에서 각각 0, 37.5 및 93.8%이었고 과립화난자 유래 수정란에서 각각 0, 37.5 및 91.7%이었기에, 두 군 간에는 부화율의 유의적인 차이가 발견되지 않았으나 ($p=0.9329$) 두 군 모두 각 시간별 부화율은 유의성이 있었음 ($p<0.0001$)
- 이로써, 과립화난자 유래 수정란은 체외발육능도 높을 뿐만 아니라 vitrification-warming 후에도 생존능이 유지됨을 알 수 있었고, vitrification이 소 수정란의 동결에 유효함을 확인할 수 있었음

○ OPU유래 수정란의 vitrification-warming 후 수태율 확인

- 도축난소 유래 체외수정란으로 vitrification-warming법의 유효성을 확인한 결과 (그림 31)를 바탕으로, OPU유래 수정란을 vitrification 후 warming하여 체내이식하고 수태율을 확인하였음
- 분만 후 2개월이 지난 경산우를 대상으로 발정동기화 처치를 한 후 발정일 기준 7일차에 수정란을 이식하였는데 이식 전에 미리 초음파로 난소의 상태를 확인하고 이식 여부를 결정하였음
- 2021년 7~8월 2개월 동안 총 46두에 OPU유래 수정란을 이식한 결과 20두가 수태되었으며 (43.5%), 이중 신선란의 수태율은 42.3%이었고 동결융해란의 수태율은 45.0%이었음 (표 31)

표 31. OPU유래 vitrification-warming 수정란의 체내 이식 후 수태율

Group	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant at D33	No. of recipients pregnant at D120
Fresh embryos	26	11 (42.3%)	9 (34.6%)
Vitrified embryos	20	9 (45.0%)	8 (40.0%)

- 현장에서 암소의 사양관리 방법이 농장마다 동일하지 않고 수란우의 선발조건 및 발정동기화 방법은 작업자의 경험에 따라 달라질 수 있으므로, 동결융해과정이 수정란의 수태율에 미치는 영향 이외의 변수를 최대한 제거하기 위해 자체보유 농장 내의 암소만을 대상으로 일정 기간에만 실험을 진행하느라 검정 두수가 많지 못한 실정이었음
- 상기 데이터만으로 판단하기에는 다소 부족하지만, 소규모 현장검증에서 vitrification-warming한 OPU유래 수정란은 신선란 상태로 이식된 수정란에 비해 수태능이 저하되지 않는 것으로 보이며, 이후 분만 산자의 생존율 및 이상 여부 확인과정이 남아있는데 이를 통해 vitrification법의 현장 적용성을 검토할 필요가 있음

다. OPU 시설 및 공란우 등의 인프라 제공 (위탁연구기관)

가) OPU효율 증가를 위한 FSH stimulation test

○ FSH 처치군 (stimulation group)과 미처치군 (non-stimulation group)에서 회수난자의 등급

- FSH 처치군과 미처치군의 회수난자를, 유럽수정란이식학회에서 제시한 기준 (그림 32; AETE Newsletter, 1999)에 따라 등급을 나누고 서로 비교해 보았음 (표 32)

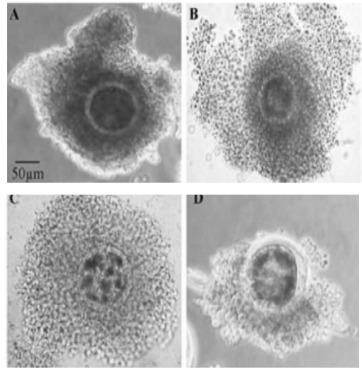


Table 1
Characteristics of the four morphological categories of cumulus oocyte complexes

No.	Category	Characteristics of COCs
1	Very good	Complete and compact CC multilayer with homogenous cytoplasm
2	Good	Complete and compact CC multilayer with nonhomogenous cytoplasm ^a , incomplete (>5 layers) but compact CC with homogenous or nonhomogenous cytoplasm
3	Fair	Incomplete (>3 layers) but compact CC with homogenous or nonhomogenous cytoplasm, partly denuded but compact CC with homogenous or nonhomogenous cytoplasm
4	Poor	Partly or completely denuded CC with strongly nonhomogenous cytoplasm, expanded CC with strongly nonhomogenous cytoplasm

CC: cumulus cell; COC: cumulus oocyte complex (i.e. CCs and oocyte cytoplasm).

^a Nonhomogenous cytoplasm = oocyte cytoplasm which shows pigmentation in some areas.

그림 33. 난자의 등급 평가 (Marqant-LeGuienne B. Atlas of the bovine oocyte. AETE Newsletter 1999).

표 32. FSH 처치 여부에 따른 회수난자의 등급

	No. of session	Grade A	Grade B	Oocyte grade (A+B)%	Grade C	Grade D	Oocyte grade (C+D)%
Control	1026	323 (31.4 ^a ±4.4)	193 (18.8 ^a ±4.4)	516 (50.2 ^a ±4.6)	332 (32.3 ^a ±3.4)	178 (17.3 ^a ±4.3)	510 (49.7 ^a ±4.6)
FSH (+)	341	213 (62.4 ^b ±5.4)	98 (28.7 ^b ±5.1)	301 (88.2 ^b ±5.1)	31 (9.0 ^b ±1.2)	9 (2.6 ^b ±1.4)	40 (11.7 ^b ±2.1)

^{a,b} Values with different superscript were denoted significantly different ($p < 0.05$).

- FSH 처치군에서 A등급과 B등급이 증가된 유의차를 나타내었고 C등급과 D등급의 난자는 감소된 유의차를 나타내었으며, 이 결과로 FSH 처치군에서 양질의 수정란을 확보할 수 있었음

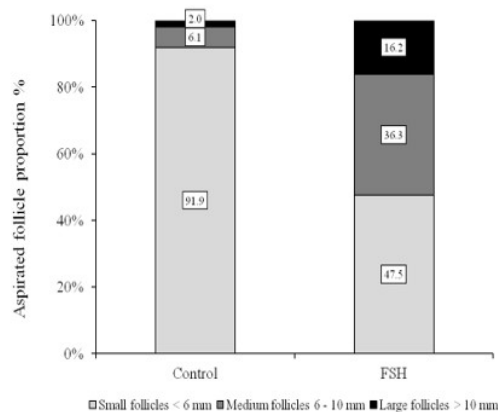


그림 34. FSH 처치 여부에 따른 난포 크기.

○ FSH 처치군과 미처치군 간의 각 회수된 난포란 유래 수정란의 생산효율 비교

- FSH 처치군과 미처치군 간에서 각 회수된 난자를 체외수정한 이후에 분할율과 배반포 발생률을 비교하였음 (표 33)

표 33. FSH 처치군과 미처치군 간의 각 회수된 난포란 유래 수정란의 생산 효율 비교

	No. of IVM used oocytes (No. of session)	Cleaved embryos (%)	No. of embryos cleaved (mean±SD)	8-cell stage (%)	Blastocysts (%)	No. of transferable embryos (mean±SD)
Control	1462 (142)	70.3 ^a ±4.6	3.0 ^a ±0.4	59.6 ^a ±5.6	38.4 ^a ±5.1	1.7 ^a ±0.3
FSH (+)	562 (42)	82.3 ^b ±5.4	5.4 ^b ±0.9	74.2 ^b ±7.2	68.3 ^b ±6.4	3.2 ^b ±0.6

^{a,b} Values with different superscript were denoted significantly different ($p < 0.05$)

- FSH를 처치하여 OPU를 실시하면 FSH를 처치하지 않는 것에 비하여 분할률과 8-cell 단계 및 배반포 발생률이 유의차 있게 증가하였음

나) FSH stimulation 유래 동결 수정란의 이용가능성 확인

○ FSH stimulation 유래 동결 수정란 성상 비교 분석

- OPU 대상축으로 한우 21마리를 선정하여 실험을 공시하였고 평균 3.5±0.3(년), body condition score(BCS) 3.0±0.2 개체를 사용하여 경상북도축산기술연구소에서 정한 표준사양법에 따라 사육하였음

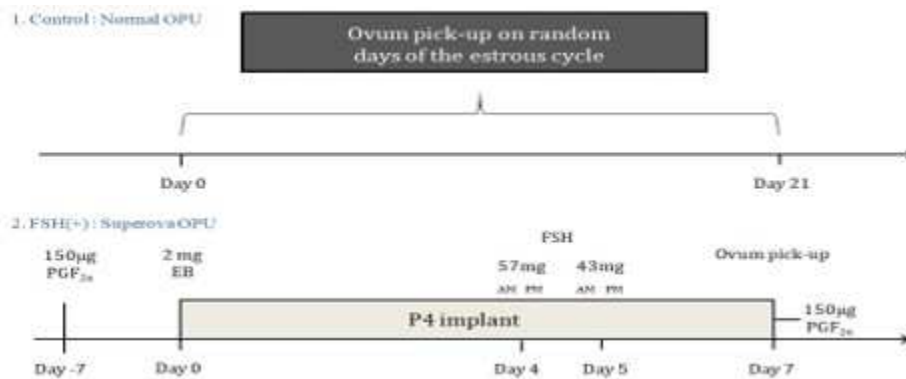


그림 35. Diagram of the hormonal protocol used in Hanwoo donors for the synchronization of follicular wave emergence prior to ovum pick up. E2, estradiol benzoate 1.0 mg; PGF_{2α}, D-tromethamine 5.0 mg; P4, progesterone 1.56 g; and FSH, follicle stimulate hormone 44, 44, 36 and 36 mg.

- 공란우의 과배란 처치는 발정주기와 상관없이 CIDR (Progesterone; 1.56g; Cue-Mate, Vetoquinol Australia) 삽입과 동시에 2.0 mg Estradiol Benzoate (Esron, Samyang-Anipharm South Korea), 5.0 mg PGF_{2α} (Lutalyse, Zoetis Belgium SA)을 처리하였음
- 4.5일 후, 10AU FSH (Antorin-R10, Kawasaki Pharm, Japan)를 감량법 (44, 44, 36, 36 mg 12시간 간격)으로 4회 주사 처치하였고, CIDR는 OPU 실시 당일 제거하였으며, FSH 처치 실험군은 2주 간격으로 마리당 6회 OPU를 실시하였음 (그림 34)
- 동결수정란의 성상 비교를 위해 FSH 처치군 및 대조군 유래의 수정란 사용하였으며 동결 유리화를 위해 배반포를 vitrification하여 보존하였음
- Warming 후 배반포를 세정하고 체외배양 배지에서 배양하였으며 배양 후 생존율을 형태학적 기준에 따라 배반포의 세포막과 투명대의 완전성 및 재팽창에 기초하여 평가하였음
- 또한, 배양 후 발육을 재개하여 발육단계가 더 진행한 수정란 비율 및 부화율을 기록하였음
- 그 결과로 대조군과 FSH처치군 간에 생산된 수정란을 vitrification 후 warming하여 수정란의 재팽창 및 부화율을 비교하였음 (표 34)

표 34. Survival of IVP blastocysts from the control group and FSH group after vitrification

Quality Grade	Group	No. Embryos Cultured	No. (%) Embryos Developing		
			In Culture	Re Expansion	to Hatched Blastocyst
1	Control	90	82 (91.1)	68 (75.6)	53 (58.9) ^b
	FSH (+)	84	82 (97.6)	73 (86.9)	64 (76.2) ^a
2-3	Control	90	68 (75.6)	35 (38.9)	24 (26.7) ^a
	FSH (+)	52	43 (82.7)	33 (57.9)	28 (53.8) ^a

- FSH를 처치하여 생산한 수정란은 vitrification 후 대조군에 비하여 배반포의 재팽창 [(FSH 처치군, grade 1; 86.9% and grade 2-3; 57.9%) vs. (대조군, grade 1; 75.6% and grade 2-3; 38.9%); $p < 0.01$] 및 부화율 [(FSH 처치군, grade 1; 76.2% and grade 2-3; 53.8%) vs. (대조군, grade 1; 58.9% and grade 2-3; 26.7%); $p < 0.05$] 모두 유의차 있게 증가하였음
- 그 결과로, 대조군과 (before: 160.1 ± 28.2 , after: 131.4 ± 26.7) FSH 처치군 (before: 193.2 ± 43.6 , after: 167.1 ± 39.1)이 vitrification 전의 총 세포 수는 더 높았으며 warming 후에는 유의하게 더 적은 수를 보인 반면 ($p < 0.05$), warming 후 총 세포 수 감소 현상은 두 군에서 유사한 수준으로 발생하였음 (표 35)

표 35. Total cell number of blastocysts before and after vitrification and warming

Group	Blastocysts Diameter μm (\pm SD)	Time	No. Blastocysts	Total Cell Number mean (\pm SD)
Control	$186 (\pm 34.8)^a$	Before Vitrification	54	$160.1 (\pm 28.2)^b$
		After Warming	46*	$131.4 (\pm 26.7)^a$
FSH (+)	$194 (\pm 32.2)^a$	Before Vitrification	69	$193.2 (\pm 43.6)^a$
		After Warming	63*	$167.1 (\pm 39.1)^a$

○ FSH stimulation 유래 동결 수정란 농가이식 수태율 조사

- 앞서 FSH 처치 시험을 통해 생산된 신선수정란과 동결수정란을 사용하여 경북지역 내 한우 사육 농가에 공급하여 수태율을 확인해 보았음 (표 36)
- OPU유래 수정란이식은 수란우 관리 및 농가 선정기준에 따라 대상 농가를 선정하였고, 또한 수태율 향상을 위해 이식 전 2~3개월부터 수란우의 위 내 삽입형 미네랄 비타민제를 투여하였음
- 발정동기화는 progesterone 제제의 CIDR, PGF2 α 제제의 루테라이즈, estradiol benzoate 제제의 에스론을 사용하여 수란우의 발정을 유도하였고, 이식 이전에 수란우 생식기관의 기능 상태를 점검하여 수정란을 이식을 계획하였음
- 농가마다 대리모의 사양관리와 사육 환경에 따라서 수태율이 변동성을 다소 보이기는 하지만 이러한 요인을 최소화하기 위해 31개 농가를 선발하였으며 각 농가별 신선란 5개, 동결란 5개씩 이식하였음
- 수태율 조사를 위한 임신감정은 이식 후 90일경 실시하였으며 임신감정은 수정란이식을 담당한 시술자가 직접 실시하였음

표 36. Summary of embryo transfer and pregnancy

Group	No. of farms	Blastocysts	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant (%)
Control	45	fresh blastocysts	412	186 (45.1)
		post-thaw blastocysts	102	37 (36.2)
FSH (+)	31	fresh blastocysts	155	94 (60.6)
		post-thaw blastocysts	155	79 (50.9)

- 그 결과 총 155개의 FSH 처치군 동결수정란을 지역농가에 이식하였으며 수태율은 약 50.9% (79두)로 확인되었으며 신선수정란의 수태율은 60.6% (94두)로 확인되었음
- 그에 반해 대조군 수태율은 약 36.2% (37두)로 확인되었으며 신선수정란의 수태율은 45.1% (186두)로 확인되었음
- 이러한 결과를 볼 때, FSH 처치군의 수정란은 대조군에 비해 양호한 수태율의 결과를 보였음

다) 구제역 백신 접종에 따른 배란지연을 역이용한 배란동기화법 확인

- 난소 초음파를 통해 확인한 결과, 구제역 백신 접종일에 모든 시험축에서 10 mm 이상의 난포가 1개 이상 존재하였음
- 구제역 백신 접종 6일 후 처치군의 난소초음파 검사를 통해 24두 중 18두 (75.0%)가 배란이 지연 (13 mm 이상 난포 존재)되었고, 구제역 백신 접종 9일 (500 ug GnRH 주사 3일 후) 재검사한 결과 배란지연된 18두 중에서 13두 (72.2%)가 배란된 것을 확인하였음
- 인공수정 40일 이후 직장초음파 검사를 통해 수태율을 확인한 결과, 처치군은 24두 중 17두가 수태 (70.8%)되었고, 대조군은 23두 중 13두가 수태 (56.5%)되었음
- 따라서, GnRH-PGF2a-GnRH 기반의 배란동기화 방법을 변형하여 적용함으로써 수태율이 향상되는 효과가 있었음

(2) 정량적 연구개발성과

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1단계 (2020~2022)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표	특허출원	목표(단계별)	1		1	10
		실적(누적)	1		2	10
	논문 (비SCI)	목표(단계별)	1		1	-
		실적(누적)	1		1	-
	학술발표	목표(단계별)	1		1	5
		실적(누적)	2		2	5
연구개발과제 특성 반영 지표	매출액	목표(단계별)	300,000		300,000	30
		실적(누적)	227,624		227,624	22.8
	기술실시 (기술료)	목표(단계별)	-		-	-
		실적(누적)	2,800		2,800	-
	고용창출	목표(단계별)	2		2	30
		실적(누적)	3		3	30
	교육지도	목표(단계별)	2		2	15
		실적(누적)	5		5	15
	인력양성	목표(단계별)	2		2	10
		실적(누적)	2		3	10
계	목표				100	
	실적				92.8	

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Effect of Foot-and-Mouth Disease Vaccination on Acute Phase Immune Response and Anovulation in Hanwoo (Bos taurus coreanae)	Vaccines	Daehyun Kim	9(5)	Switzerland	MDPI	SCIE	2021.4.22.	2076-393X	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021년 한국동물생명공학회 정기 학술대회	김대현	2021.6.18	대구광역시, 대구컨벤션뷰로	대한민국
2	IETS 48 th Annual Conference	송길영	2022.1.13	Savannah, Hyatt Regency Savannah	미국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	세포보관 용기	대한민국	이준구, 김대현, 하재정, 정대진, 김병기, 경상북도	2020. 9.9.	30-2020- 0042920		이준구, 김대현, 하재정, 정대진, 김병기, 경상북도	2021. 8.26.	30- 1125659	100	
2	세포의 동결 및 해동용 플레이트	대한민국	이준구, 김대현, 하재정, 정대진, 김병기, 경상북도	2020. 11.3.	10-2020- 0145225					100	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1										
2										

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	노하우	OPU 유래 이식가능 수정란 생산기술	자기실시	2022.2.14	2,800,000원	2,800,000원

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
홍천군 슈퍼퀵 생산사업 관련 소 수정란이식 사업	2020	74,254	-	74,254	세금계산서 기준
기타 수정란이식 사업	2020	22,430	-	2,430	세금계산서 기준
홍천군 슈퍼퀵 생산사업 관련 소 수정란이식 사업	2021	74,700	-	74,700	세금계산서 기준
기타 수정란이식 사업	2021	56,240	-	56,240	세금계산서 기준
합계		227,624	-	227,624	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내 국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	OPU 유래 이식가능 수정란 생산 사업	㈜라트바이오	2	1	3
2					
3					
합계			2	1	3

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	3
		생산인력	-
	개발 후	연구인력	6
		생산인력	2

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원
1	2020년 상반기 수정란이식 전문가 기술교육 실습 및 이론 특강	2020.6.4.~ 2020.6.5.	경북 소재 수정사	경북축산기술연구소	15명
2	경상북도 농민사관학교 수정란생산기술 특강	2020.11.5.	경북 소재 농가	경북축산기술연구소	20명
3	2020년 하반기 수정란이식 전문가 기술교육 실습 및 이론 특강	2020.12.4.	경북 소재 수정사	경북축산기술연구소	15명
4	2021년 상반기 한우 수정란이식 전문가 양성 교육	2021.7.2.	경북 소재 수정사	경북축산기술연구소	15명
5	2021년 하반기 한우 수정란이식 전문가 양성 교육	2021.10.14.~ 2021.10.15.	경북 소재 수정사	경북축산기술연구소	15명

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학위취득	2021			1			1	1				
2	산업연구 인력	2021				1		1	1				
3	산업연구 인력	2022				1		1	1				

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과]

- 해당없음

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

- 해당없음

3) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ OPU 전문인력 양성	<ul style="list-style-type: none"> - 난소 mapping 기술 향상을 통한 OPU 회수난자 수 증가 달성 (목표 15개/두 이상 → 결과 15.5개/두) - AMH 측정치를 공란우 선별 지표로 적용할 수 있는 가능성 확인 	100%
○ IVEP 전문인력 양성	<ul style="list-style-type: none"> - OPU난자에 적합한 배지 및 체외수정법 선택을 통해 배양체계 안정화 달성했으나, 이식가능수정란 생산 결과는 다소 미흡 (목표 5.0개/두 → 결과 4.1개/두) - OPU유래 수정란의 vitrification-warming 후 이식 데이터 확보를 통한 현장적용성 검증 완료 (결과 생존율 90%이상, 수태율 45%) 	95%

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 본 과제의 특성상 전문인력 양성을 위한 관련 외국기관으로의 기술습득을 위한 연구활동이 필수적이었음
 - 그러나, COVID-19 pandemic으로 인해 국가 간의 이동제한이 1차년도 개시 이후 2차년도 종료 시점까지 지속되어 국내연구원의 해외파견 및 해외전문가의 국내초청 일정이 모두 진행되지 못했음
 - 일부 지역사업에서 낮은 번식능력의 공란우가 포함될 수밖에 없는 사정으로 전체 공란우의 평균 이식가능수정란 생산성이 저하되었음
-

2) 자체 보완활동

- 외국 전문기관과의 co-work을 통한 기술력 향상을 전략으로 삼았으나 진행이 현실적으로 불가해서 그 대안으로, 국내에서 수행 가능한 연구인프라 조성 및 실험 횟수 증가 등을 통해 연구목표 달성을 위한 노력을 수행하였음
 - 국외 전문기관에의 견학방문이 어려운 상황이라, 본 계획서에 예정했던 호주 ART Lab Solution사 및 브라질 WTA사에 관련 기술의 교육용 동영상 제작을 요청하였으나 현지여건이 좋지 않아 (호주 도축장 폐쇄 및 WTA사의 텍사스지사 내 농가의 외국인 방문 제한 등) 시간이 지연되었고 내용 대비 부담비용이 과다하게 책정되어 추진을 중단할 수밖에 없었음
 - 이에, 계획서에서 언급했던 국외 전문가 초청 활동 대신으로 국내의 타 기관 (농협 한우개량사업소 암소개량센터)의 전문가를 활용하여 OPU 진행방법 및 체외수정란 생산시스템을 서로 비교하며 개선점에 대한 상호의견을 교환하였음
 - 한편, 국외 전문학회 (IETS)에서 개최한 ‘OPU관련 워크샵’ (IETS 48th Annual Conference, 2022년 미국 서베너)에 on-line으로 참가하여 OPU-IVF 관련 동영상을 반복 학습하며 국외 전문가들의 기술력을 간접적으로 경험하고 개선점을 찾고자 노력하였음
 - 고능력 유전형질이 검증된 한우 암소를 대상으로 OPU를 실시하였기 때문에 공란우의 고령화로 인해 회수되는 난자의 발육능이 다소 낮아 목표달성이 어려웠기에, 공란우의 번식능 향상을 위한 사양관리 개선방안을 모색 중이고 노화난자의 발육능 향상을 위한 체외성숙배양 실험을 추가로 진행하고 있음
-

3) 연구개발 과정의 성실성

- 실험계획에 따른 대상우 관리 및 주사 처치를 일정에 맞게 정확히 수행하고 이를 바탕으로 도출된 실험 데이터를 명확하게 기록하는 등 오류 발생을 방지하기 위해 성실히 임하였음
 - 달라진 외부여건에 맞춰 인프라 추가 확보로 연구실험을 증량하는 등 연구목표 달성을 위해 노력을 아끼지 않았음
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 생산능력 (경제형질)의 후대검정성적만을 통한 공란우 선발은 낮은 번식능에 기인한 수정란 생산효율 저하를 유발할 수 있으나, 수행과제의 연구결과인 AFC/AMH 선발지표의 추가적용은 효율적인 (생산능력과 번식능력을 모두 갖춘) 공란우 선발의 객관성을 높였음
 - 국내 소 수정란이식 분야에서 주를 이루고 있는 slow freezing과 비교하여 vitrification은 원리적 특성에 근거하여 동결수정란의 이식후 수태율 향상을 도모할 수 있는데, 본 연구팀은 수행연구과제를 통해 vitrification의 효율을 확인함으로써 이의 국내 현장적용 가능성을 제시하였음
 - 최종적으로, 한우 개량을 통한 농가 생산성 증대에 필수적인 ET기반 기술력 강화에 기여하였음
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE		
	계	1	
국내논문	SCIE		
	비SCIE	1	
	계	1	
특허출원	국내	1	
	국외		
	계	1	
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사	1	
	박사		
	계	1	
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

- OPU 유래 체외수정란의 동결란 이용가능성 증대는, 구제역과 같은 전염성 질병 감염으로 인한 국내 고능력 한우 유전자원의 소실 방지 및 중요한 유전자원 보존에 활용 가능함
- 관련 기술력 향상을 위한 지속적 투자 및 생산규모 확대를 통해 양질의 한우 OPU수정란을 현장에 대량 공급할 계획임
- 또한, 유우 신품종 자원 (저지 등)의 OPU-IVEP-ET에 본 기술을 적용하여 개체 수 확충을 통한 자국내 안정적 토착화에 기여할 수 있음
- 한편, OPU 관련 기술 보급을 위한 전문교육 시스템 활성화를 통해 수정란이식 산업의 기술력 향상을 도모할 수 있음
- 현장에서 종사하는 인력들의 OPU유래 체외수정란에 대한 이해를 돕고 객관적 지표 마련을 통해 교육자료로 활용하고자, 소 체외수정란의 발육단계 및 등급에 대한 인공지능 프로그램 개발사업에 참여하여 다양한 사진 자료를 수집 제공하고 있음

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 정성적 연구개발성과 참고자료	1) 참고문헌
2. 세부 정량적 연구개발성과 증빙자료	2) 전문학술지 논문 1건
	3) 학술회의 발표자료 2건
	4) 지식재산권 3건
	5) 기술료 입금 내역서 2건
	6) 매출액 증빙서류 2건

참고문헌

- Morotti F, Santos GMG, Junior CK, Silva-Santos KC, Roso VM and Seneda MM. 2017. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology* 91, 21–26.
- Koyama K, Koyama T and Sugimoto M. 2018. Repeatability of antral follicle count according parity in dairy cows. *J Reprod Dev* 64, 535–539.
- Alward KJ and Bohlen JF, 2019. Overview of Anti-Mullerian hormone (AMH) and association with fertility in female cattle. *Reprod Domest Anim* 55, 3–10.
- Ribeiro ES, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A, Kumar A, Thatcher WW and Santos JE. 2014. Plasma anti-Mullerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J Dairy Sci* 97, 6888–6900.
- Sirard MA. 2012. Factors affection oocyte and embryo transcriptomes. *Reprod Domest Anim* 47(suppl4), 148–155.
- Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB and Dode MA. 2009. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev* 21, 655–664.
- da Silva JCB, Ferreira RM, Maturana Filho M, Naves JR, Santin T, Pugliesi G and Madureira EH. 2017. Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 90, 65–73.
- Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CR, Moreira RJ, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ and Baruselli PS. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* 82, 318–324.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F and Sirard MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 66, 38–43.
- Nivert AL, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P and Sirard MA. 2012. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 143, 165–171.
- Bo GA, de la Mata JJ, Baruselli PS and Menchaca A. 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86, 388–396.
- Day ML. 2015. State of the art of GnRH-based timed AI in beef cattle. *Anim Reprod* 12, 473–478.
- Bo GA, Baruselli PS and Mapletoft RJ. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim Reprod* 10, 137–142.
- Bo GA, Cedeno A and Mapletoft RJ. 2019. Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle. *Anim Reprod* 16, 411–422.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38, 1171–1180.
- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30, 733–741.
- Takahashi Y and First NL. 1993. In vitro fertilization of bovine oocytes in the presence of theophylline. *Anim Reprod Sci* 34, 1–18.
- Nagano M. 2019. Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. *J Reprod Dev* 65, 195–201.
- Truong T and Gardner DK. 2017. Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Human Reprod* 32, 2404–2413.
- Hassan BMS, Fang X, Roy PK, Shin ST and Cho JK. 2017. Effect of alpha lipoic acid as an antioxidant supplement during in vitro maturation medium on bovine embryonic development. *J Emb Trans* 32, 123–130.

1. Kim D, Moon J, Ha J, Kim D and Yi J. 2021. Vaccines 9, 419.



Vaccines 2021, 9, 419

8 of 9

Article

Effect of Foot-and-Mouth Disease Vaccination on Acute Phase Immune Response and Anovulation in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*)

Daehyun Kim ¹✉, Joonho Moon ²✉, Jaehung Ha ¹✉, Doyoon Kim ¹✉ and Junkoo Yi ^{1,*}✉

¹ Livestock Research Institute, 186 Daeryongsan-ro, Anjeong-myeon, Yeongju 36092, Gyeongangbuk-do, Korea; [redacted]
² Lantico Co., Ltd., 21th Floor, 234 Teheran-ro, Gangnam-gu, Seoul 06221, Korea; [redacted]

* Correspondence: [redacted]

Abstract: Vaccination against foot-and-mouth disease is the most common method for preventing the spread of the disease; the negative effects include miscarriage, early embryo death, lower milk production, and decreased growth of fattening cattle. Therefore, in this study, we analyze the side effects of vaccination by determining the acute immune response and ovulation rate after vaccinating cows for foot-and-mouth disease. The test axis was synchronized with ovulation using 100 Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) cows from the Gyeongangbuk-do Livestock Research Institute; only individuals with estrus confirmed by ovarian ultrasound were used for the test. All test axes were artificially inseminated 21 days after the previous estrus date. The control group was administered 0.9% normal saline, the negative control was injected intramuscularly with lipopolysaccharide (LPS; 0.5 µg/kg), and the test group was administered a foot-and-mouth disease virus vaccine (FMDV vaccine; bioafogen, O and A serotypes, inactivated vaccine) 2, 9, and 16 days before artificial insemination. White blood cells and neutrophils increased significantly 1 day after vaccination, and body temperature in the rumen increased for 16 h after vaccination. Ovulation was detected 1 day after artificial fertilization by ovarian ultrasound. The ovulation rates were as follows: control 89%, LPS 60%, FMDV vaccine (−2 d) 50%, FMDV vaccine (−9 d) 75%, and FMDV vaccine (−16 d) 75%. In particular, the FMDV vaccine (−2 d) test group confirmed that ovulation was delayed for 4 days after artificial insemination. In addition, it was confirmed that it took 9 days after inoculation for the plasma contents of haptoglobin and serum amyloid A to recover to the normal range as the main acute immune response factors. The conception rate of the FMDV vaccine (−2 d) group was 20%, which was significantly lower than that of the other test groups.

Keywords: FMD vaccine; anovulation; acute phase immune response; artificial insemination; Hanwoo



Citation: Kim, D.; Moon, J.; Ha, J.; Kim, D.; Yi, J. Effect of Foot-and-Mouth Disease Vaccination on Acute Phase Immune Response and Anovulation in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*). *Vaccines* **2021**, *9*, 419. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050419>

Academic Editor: Elizabeth Keadar

Received: 26 March 2021
 Accepted: 29 April 2021
 Published: 22 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Foot-and-mouth disease (FMD) is a common disease in cattle (*Bos taurus*, *Bos indicus*) that leads to economic loss [1]. Therefore, the governments of many countries, including those in North America, Western Europe, South America, and Asia, have developed vaccination strategies to prevent the introduction and spread of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in cattle [2]. FMDV vaccination is a powerful strategy to control the proliferation of FMDV [3]. Various FMDV vaccines, such as adeno and viral vector-based, virus-like particles, peptide and DNA vaccines, plant-based vaccines, and inactivated vaccines, have been used [4–7]. The most widely used vaccine in the world is the inactivated FMDV vaccine (O and A serotypes) [5,8].

However, negative effects of FMDV vaccination (early embryo loss, sperm infertility, increased acute-phase reaction protein levels, and decreased milk production) have been reported in previous studies [8–10]. Administration of FMDV vaccines 30 days after artificial insemination increases early pregnancy loss in dairy cows [8]. Increased fetal

acute-phase proteins, and ovulation is delayed due to increased gene expression associated with inflammatory cytokines and the acute-phase immune response.

5. Conclusions

In summary, injecting Korean cattle with an FMDV vaccine decreased the ovulation rate when administered 2 days before artificial insemination compared with 9 or 16 days before artificial insemination. Acute-phase reaction proteins, such as haptoglobin and SAA, were increased for 8–9 days after the FMDV vaccine was administered. The pregnancy rate decreased two-fold when the FMDV vaccine was injected 2 days before artificial insemination. These results suggest that FMDV vaccine protocols should be changed to minimize the negative effects related to reproductive performance in cows. Artificial insemination should only be considered 10 days after an FMDV vaccine is administered to avoid the acute-phase immune reaction and anovulation.

Author Contributions: Conceptualization, D.K. (Daehyun Kim) and J.Y.; methodology, D.K. (Daehyun Kim) and J.Y.; software, J.M.; validation, D.K. (Daehyun Kim), D.K. (Doyoon Kim) and J.H.; formal analysis, D.K. (Daehyun Kim) and D.K. (Doyoon Kim); investigation, D.K. (Daehyun Kim) and D.K. (Doyoon Kim); data curation, J.M.; writing—original draft preparation, D.K. (Daehyun Kim); writing—review and editing, D.K. (Daehyun Kim) and J.Y.; visualization, D.K. (Daehyun Kim); supervision, J.Y.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Financial support for this study was granted by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (IPET) through a Food, Agriculture, Technology convergence creative talent training project funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (T2011023) and a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT; No. NRF-2020R1F1A1052024).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Gyeongangbuk-do Livestock Research Institute, Yeongju, Korea (protocol code GARC/12/19 approved at 7 December 2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: This research was supported by Gyeongangbuk-do Livestock Research Institute under the research project title of “Improvement of managing technology using real-time biometric information in Korean cattle”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Grubman, M.J.; Baxt, B. Foot-and-mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 465–493. [\[CrossRef\]](#)
2. Kahn, S.; Geale, D.W.; Kitching, P.R.; Bouffard, A.; Allard, D.G.; Duncan, J.R. Vaccination against foot-and-mouth disease: The implications for Canada. *Can. Vet. J.* **2002**, *43*, 345–354.
3. Rodriguez, L.L.; Grubman, M.J. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine* **2009**, *27* (Suppl. 4), D90–D94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Zhang, L.; Zhang, J.; Chen, H.T.; Zhou, J.H.; Ma, L.N.; Ding, Y.Z.; Liu, Y.S. Research in advance for FMD novel vaccines. *Vet. J.* **2011**, *8*, 268. [\[CrossRef\]](#)
5. Singh, R.K.; Sharma, G.K.; Mahajan, S.; Dhama, K.; Biswasgudananay, S.H.; Hosaini, M.; Sreenivas, B.P.; Chaitanya, W.; Gupta, V.K.; Sanyal, A. Foot-and-Mouth Disease Virus: Immunobiology, Advances in Vaccines and Vaccination Strategies Addressing Vaccine Failures—An Indian Perspective. *Vaccines* **2019**, *7*, 90. [\[CrossRef\]](#)
6. Kamel, M.; El-Sayed, A.; Castañeda Vazquez, H. Foot-and-mouth disease vaccines: Recent updates and future perspectives. *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 1501–1513. [\[CrossRef\]](#)
7. Shahzad, A.; Habibi-Firkoobi, M. Developing Vaccines Against Foot-and-Mouth Disease: A Biotechnological Approach. *Arch. Res. Inst.* **2018**, *75*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)

학술대회 발표 자료

1. 한국동물생명공학회 정기 학술대회 포스터 발표 (2021.6.18.)

2021년 한국동물생명공학회 정기 학술대회
(2021 KSARB Annual Symposium)



- ▶ 일시 : 2021년 6월 18일 (18 June, 2021)
- ▶ 장소 : 대구컨벤션뷰로(대구 북구 유통단지로 14길 17)
- ▶ 주관 : 사단법인 한국동물생명공학회
- ▶ 후원 : 21세기생명과학문화재단, 대구컨벤션뷰로, 대구대학교 한국생명과학연구원 국가연구안전관리본부 한국과학기술단체총연합회, (사)한국농식품생명과학협회
- ▶ 협찬 : (주)송강G.L.C. (주)오두사이언스, 다온바이오텍, (주)태경에드랩

*이 발표논문집은 정부재원(과학기술진흥기금 및 복권기금)으로 한국과학기술단체총연합회의 지원을 받아 발간되었습니다

사 단 법 인 한국 동물 생명 공 학 회
The Korean Society Of Animal Reproduction and Biotechnology

2021 KSARB Annual Symposium General Reproduction, Superovulation, AI, ET

P 13
한우 암소에서 구제역 백신 접종에 따른 배란지연을 역이용한 배란동기화 방법
최대현¹, 이준구², 하계정³, 김도윤³, 이원희³, 이찬우³, 이윤석³
¹충청남도 축산기술연구소, ²경희대학교 동물생명과학과, ³한양대학교 생명공학부

구제역(FMD, foot-and-mouth disease)은 *Bos Taurus*와 *Bos indicus* 종의 소에서 가장 흔하게 발생하는 질병이며 발생 시 심각한 경제적 손실을 동반한다. 우리나라를 포함한 북아메리카, 유럽, 남아메리카, 아시아 등의 정부에서는 구제역을 통제하기 위해 구제역 백신(FMDV, foot-and-mouth disease virus vaccine)을 접종하고 있으며 가장 흔하게 사용되는 백신은 불활화 백신(Inactivated FMDV, O and A serotypes)이다. 그러나 구제역 백신 접종에 따라 조기배사율, 정자 수정 능력 저하, 임신 면역반응 증가, 유생신장 저하 등의 부작용에 관련된 국외 연구결과가 보고되었다. 그리고 본 연구팀의 이전 연구결과에 따르면 한우 암소에서 구제역 백신 접종 후 만추위내 체온 증가, 급성면역반응 증가(haptoglobin, SAA), White blood cells와 neutrophils 증가, 배란지연(anoovulation) 증가, 수태율 저하(20%) 등을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 GnRH-LPG2α-GnRH 기반의 배란동기화 방법에서 첫 번째 GnRH (Gonadotropin-releasing hormone)의 함량을 조절하여 구제역 백신접종에 따른 배란지연을 해소 또는 역이용하여 수태율 저하를 개선할 수 있는지 확인하고자 한다.

본 연구에서는 정상복도 축산기술연구소의 한우 암소 47두(Control 23두, Test 24두)를 활용하였다. Control은 자연 발정 개체를 확인하여 인공수정 하였고, Test group은 구제역 백신 2ml/head, BIOAFTOGEN, FMD vaccine, > 6PD50, O1 Campos, A24 Cruzeiro and A2001 Argentina serotypes) 접종 6일 후 500µg GnRH(Gonadorelin, gonadorelin acetate 100 µg/ml, DONGBANG, Korea)를 주사하였고, 구제역 백신 접종 13일 후 25 mg PGF2a analogue (altalyse, dinoprost tromethamine 5 mg/ml, Zoetis, US)를 근육 주사하였으며, 15일 후 250 µg GnRH (Gonadorelin, gonadorelin acetate 100 µg/ml, DONGBANG, Korea)를 근육 주사한 후 16일째 일괄 인공수정 하였다. 난소 초음파를 통해 확인한 결과 구제역 백신 접종일에서 모든 시험축에서 10mm이상의 난포가 1개 이상 존재하였다. 구제역 백신 접종 6일 후 Test group의 난소초음파 검사를 통해 24두 중 18두(75.0%)가 배란이 지연(13mm 이상 난포 존재되는 것을 확인)되었고, 구제역 백신 접종 9일(500µg GnRH 주사 3일 후) 개시시킨 결과 배란 지연된 18두 중에서 15두(72.2%)가 배란된 것을 확인 할 수 있었다. 인공수정 40일 이후 외장초음파와 검사를 통해 수태율을 분석 결과 Test group은 24두 중 17두가 임신(70.8%)되었고, Control은 23두 중 13두가 임신(56.5%)되었다. 따라서 GnRH-LPG2α-GnRH 기반의 배란동기화 방법을 병행하여 적용한 결과 수태율이 개선되는 효과를 확인하였기 때문에 향후 추가적인 연구를 수행하여 구제역 백신 접종에 따른 수태율 저하를 개선 배란동기화 프로그램을 개발하는데 유용하게 활용될 수 있다고 판단된다.

Key words: 구제역 백신, 배란지연, 배란동기화, 수태율, 한우
E-mail: chunja2411@korea.kr

2. IETS 48th Annual conference 포스터 발표 (2022.1.13.)

Program Book

48th Annual Conference of the International Embryo Technology Society

Adaptation of Early Life to Prepare for a Healthy Future



Hyatt Regency Savannah
Savannah, Georgia
January 10-13, 2022

Scientific Program Co-Chairs:
Hilde Aardema and Flavio Vieira Meirelles

Embryo Culture Reproduction, Fertility and Development

Table 1. Follicles and and transferable embryos following in vitro or in vivo embryo production

Treatment group	No. of follicles aspirated	No. of COCs aspirated	Usable mature oocytes obtained	No. of transferable embryos produced
In vitro embryo production after ovari pick-up	14.4 ± 0.7	11.9 ± 0.7	9.4 ± 0.5	4.5 ± 0.7
In vivo embryo production	14.3 ± 1.0	-	-	3.0 ± 0.8

68 Developmental competency of bovine embryos derived from oocytes with granulated ooplasm after in vitro culture
K. Song¹, J. Park¹, W. Lee¹ and G. Jung¹
¹LAART Bio Inc., Seoul, Republic of Korea

Although it has been well accepted that oocytes with homogeneous ooplasm are suitable for IVF, a lot of bovine oocytes collected by transvaginal follicular aspiration have dark granules in the ooplasm and their developmental competency is not clear. The aim of this study was to determine the preimplantation competency of bovine embryos derived from oocytes with granulated ooplasm after IVF and culture. Slaughterhouse-derived cumulus-oocyte complexes (COCs) surrounded by compact cumulus cell layers were selected and grouped as follows: (1) oocytes with homogeneous ooplasm (H group), and (2) oocytes with dark granulated ooplasm (Gr group). All COCs were matured for 22 h in TCM199 (supplemented with 0.125% bovine serum albumin, FSH, LH, and epidermal growth factor), subsequently fertilized (20 h), and cultured until Day 8 post-IVF. The cleavage rate (24 h and 48 h post-IVF), blastocyst formation (Day 7 post-IVF), cell number of blastocyst (Day 7 post-IVF) and mRNA expression of interferon-1 (IFN-1) (Day 8 post-IVF) were analyzed by t-test (GraphPad Prism 8; GraphPad Inc.). The cleavage rate at 48 h post-IVF was not different between groups (92.5% and 94.9%, respectively, P = 0.2156), but the ratio of embryos cleaved early before 24 h was higher in the Gr group (187/331 = 56.9%) than in the H group (171/404 = 42.0%; P < 0.05) and fewer embryos cleaved after 27 h in the Gr group (42/231 = 12.6%) than in the H group (77/404 = 19.2%; P < 0.05). The total blastocyst rate of Gr group embryos (205/348 = 59.5%) was significantly higher than that of H group embryos (206/436 = 46.8%; P < 0.05), but the total cell number of blastocysts in the Gr group was not different from that of H group (124.5 and 105.2, respectively; P = 0.083). The ratio of blastocysts derived from early cleaved embryos to total blastocysts was higher in Gr (143/205 = 67.4%) than in H (100/206 = 48.6%; P < 0.05). The blastocyst rate of early cleaved embryos in Gr (74.8%) was higher than that of H (57.6%; P < 0.0005). In quantitative PCR analysis of Day 8 blastocysts, relative mRNA expression of IFN-1 was not different between Gr group embryos and H group embryos (P = 0.2256). In conclusion, oocytes with granulated ooplasm cleaved faster than those with homogeneous ooplasm after IVF and had sufficient developmental competency to preimplantation stage blastocysts. Although the expression level of IFN-1 in embryos derived from granulated oocytes was not different from that derived from homogeneous oocytes, further studies for evaluation of embryo quality are necessary to fully understand the pre- and postimplantation competency of oocytes with granulated ooplasm.

This research was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through the Agriculture, Food and Rural Affairs' Convergence Technologies Program for Educating Creative Global Leader Program funded by the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs (MAFRA; 120011-02-2-C0000).

69 DNase treatment of extracellular vesicles released by in vitro-produced bovine embryos increases accuracy of preimplantation genetic testing
J. Cabezas¹, D. Caamaño¹, B. Melo-Báez¹, P. Silva-Bañez¹, P. Poblete¹, Y. S. Wong² and L. Rodríguez-Alvarez¹
¹Laboratory of Animal Biotechnology, Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Universidad de Concepción, Chile; ²Chile

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-enclosed nanoparticles released from cells that are involved in intercellular communication. EV populations can be isolated from different biological fluids and are usually made up of three types: exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies. EVs contain several bioactive molecules such as proteins, metabolites, mRNA, and microRNA. In the last decade, free DNA in cell's secretome has been reported and it seems that this DNA is part of the EV cargo and/or is located on the outer surface of the EVs. The free DNA present in fluids has gained importance during the last year for diagnostic and prognostic purposes, becoming a type of liquid biopsy. In humans, DNA in embryo culture medium (eDNA) has been used for preimplantation genetic diagnosis (PGD), with almost 80% accuracy. However, a significant proportion of DNA in culture medium is of nonembryonic origin, including cumulus cells. In this sense, embryonic DNA within EVs could help to separate the contaminants and increase the accuracy of genetic diagnosis. In this work, we proposed DNase treatment of embryo-derived EVs. For this purpose, bovine embryos were produced in vitro by IVF. Embryos were cultured in groups up to Day 5 in synthetic oviductal fluid (SOF) medium. On Day 5, morulae were selected and cultured in EV-depleted SOF medium (SOF-d) until Day 7.5. At this moment, conditioned culture medium (CCM) was collected and subjected to EVs separation. First, CCM was cleaned by serial centrifugation to remove cells and debris and then EVs were isolated by density-gradient Optiprep™ (Tululand, Merck KGaA) and ultracentrifugation (OPFC) by 18 h. Isolated EVs were separated in two groups: (1) wild-type EVs (wEVs), and (2) treated with 2 U of DNase I (M0305, New England Biolabs) (dEVs). The DNase treatment was applied before the EVs. Subsequently, the DNase was inactivated at 75°C for 10 min. The size, concentration, and zeta potential were measured by NanoSight NS300 and Zeta potential NS500 (Malvern Instruments Ltd.), respectively. EVs were lysed using the lysis buffer from the Cells-to-cDNA™ II

지식재산권

1. 세포보관 용기 디자인 - 출원

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2020.09.09
 특기사항 공개신청(우)
 출원번호 30-2020-0042920 (검수번호 1-1-2020-0956361-51)
 출원인명칭 경상북도 (관련부서:경상북도혁신기술연구소장)(2-2001-037280-1)
 대리인명칭 특허법인대백(0-2008-100101-3)

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 주재국 또는 본청에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부번호: 033(기안료5) - 납부번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고려연속 정보변경(경정), 경정 신청서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 - 민원서비스다문로드 - 특허법 시행규칙 별지 제3호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허 실용신안/나 마드리드 제도(상표))를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr> 특허마당 PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간: 특허 실용신안일 12개월, 상표 디자인일 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원물 기호로 우원나라에 우선권 주장할 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선권로부터 10개월 이내에 미국특허상표청에 전자국외출원서(PTO SB359)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표특허출원 40-2010-0000000
7. 중언월언이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 공개하지 않은 경우, 특허법 제133조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

【주소】 [Redacted]

【국적】 KR

【창작자】

【성명의 국문표기】 이재정

【성명의 영문표기】 HA, Jae-Jung

【주민등록번호】 [Redacted]

【우편번호】 [Redacted]

【주소】 [Redacted]

【국적】 KR

【창작자】

【성명의 국문표기】 정대진

【성명의 영문표기】 JUNG, Dae-Jin

【주민등록번호】 [Redacted]

【우편번호】 [Redacted]

【주소】 [Redacted]

【국적】 KR

【창작자】

【성명의 국문표기】 김병기

【성명의 영문표기】 KIM, Byung-Ki

【주민등록번호】 [Redacted]

【우편번호】 [Redacted]

【주소】 [Redacted]

【국적】 KR

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.
대리인 특허법인대백 (서명 또는 인)

Receipt 4 2020-09-09



디자인등록출원서

【출원구분】 디자인심사등록출원
 【출원인】
 【명칭】 경상북도 (관련부서:경상북도혁신기술연구소장)
 【특허고려번호】 2-2001-037280-1

【대리인】

【명칭】 특허법인대백

【대리인번호】 9-2008-100101-3

【지정된 변리사】 정경숙

【디자인, 복수디자인 여부】 1디자인

【물품명】 제24회

【디자인의 대상이 되는 물품】 세포보관 용기

【단독디자인, 공동디자인 여부】 단독디자인

【창작자】

【성명의 국문표기】 이문구

【성명의 영문표기】 Yi, Jun-Koo

【주민등록번호】 [Redacted]

【우편번호】 [Redacted]

【주소】 [Redacted]

【국적】 KR

【창작자】

【성명의 국문표기】 김대현

【성명의 영문표기】 KIM, Dae-Hyun


【주민등록번호】 [Redacted]

【우편번호】 [Redacted]



지식재산권

2. 세포보관 용기 디자인 - 등록

등록디자인 30-1125659 

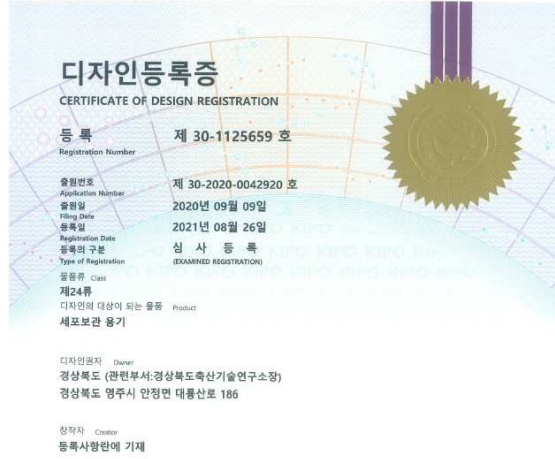
(19) 대한민국특허청(KR)	(46) 공고일자	2021년 09월 02일
(12) 등록디자인공보(S)	(11) 등록번호	30-1125659
	(24) 등록일자	2021년 08월 26일

(52) 분류 85-01
 (51) 국제분류 24-00
 (21) 출원번호 30-2020-0042920
 (22) 출원일자 2020년 09월 02일
 (73) 디자인권자
 경상북도 (관원부서:경상북도혁신기술연구소장)
 경상북도 영주시 안정면 대룡산로 186

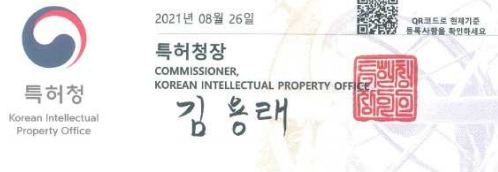
(72) 창작자
 이준규
 김대현
 이재정
 정대진
 김병기

(74) 대리인
 특허법인태백
 이 디자인을 지명한 국가연구개발사업
 과제고유번호 1646020988
 과제번호 120011021
 부과명 농림축산식품부
 과제관리(전문)기관명 농림축산기술기획평가원(IPTI)
 연구사업명 농식품기술융합 창의연구 사업 - 산업기반연구지원
 연구과제명 반도체가 CPU 유해 리스크를 수정한 생산 라인 입력장치
 기 에 례 1/1
 과제수행기관명 (주)카프라이오
 연구기간 2020. 01. 28 - 2022. 01. 27

발달실사권 : 발원권
 (64) 영장 세포보관 용기



위의 디자인은 「디자인보호법」에 따라 디자인등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
 This is to certify that, in accordance with the Design Protection Act, the design has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



등록사항	
디자인	등록 제 30-1125659 호
Registration Number	
창작자 Creators	이준규 김대현 이재정 정대진 김병기

디자인등록번호 제 1125659 호	
[권리관]	
표시번호	등록시항
1번	출원번호 3020년 09월 02일 / 등록번호 2021년 08월 26일 / 출원번호 3020-0042920 / 등록일자(출원)과일상 2021년 08월 19일 / 등록의구분 심사 / 디자인명 디자인 대상의 날카로운 물결을 띠는 물류 / M001 제24류 세포보관 용기 / 출원기관(특정)과일상 2020년 09월 02일 / 2021년 08월 26일 등록
[등록료관]	
제 01 - 03 년분 (2021.08.26 ~ 2024.08.26) 규 약 37,500 원(지방자치단체) 2021년 08월 27일 납입	
[디자인권자관]	
(특허관리자) 경상북도 (관원부서:경상북도혁신기술연구소장) 경상북도 영주시 안정면 대룡산로 186	
순위번호	등록사항
1번 (등록관리자)	경상북도 (관원부서:경상북도혁신기술연구소장) 경상북도 영주시 안정면 대룡산로 186 / 2021년 08월 26일 등록

* 법률 제7269호(2004.10.31)제 47조 2005년 7월 1일부터 시행을 디자인으로 변경 함
 이하어역 1

지식재산권

3. 세포의 동결 및 해동용 플레이트 - 출원

관인생략

출원번호 통지서

출원일자 2020.11.03
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2020-0145225 (접수번호 1-1-2020-1171893-17) (DAS입근코드D9DF)
 출원인명칭 경상북도 (관련부서:경상북도혁신기술연구소장)2-2001-037280-1)
 대리인성명 특허법인태백(9-2008-100101-3)
 발명자성명 이준구 김대현 이재정 정대진 김병기
 발명의명칭 세포의 동결 및 해동용 플레이트

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 (특허고려번호 정보변경(경정), 정정신고서)를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다옴로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식

4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.


5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허실용신안나 마드리드 제도(상표))를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허/마드리드-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허실용신안은 12개월, 상표디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장을원시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 전자적고관하기서(PTO/SB/39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

7. 중립권이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.

8.기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.


Kesp7.4.2020-11-03



특허출원서


【출원구분】 특허출원
 【출원인】
 【영칭】 경상북도 (관련부서:경상북도혁신기술연구소장)
 【특허고려번호】 2-2001-037280-1
 【대리인】
 【영칭】 특허법인태백
 【대리인번호】 9-2008-100101-3
 【지정된 변리사】 정경록, 윤종환
 【발명의 국문명칭】 세포의 동결 및 해동용 플레이트
 【발명의 영문명칭】 Plate for cells freezing and thawing
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 이준구
 【성명의 영문표기】 Yi, Jun-Koo
 【주민등록번호】 [REDACTED]
 【우편번호】 [REDACTED]
 【주소】 [REDACTED]
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 김대현
 【성명의 영문표기】 KIM, Dae-Hyun
 【주민등록번호】 [REDACTED]
 【우편번호】 [REDACTED]
 【주소】 [REDACTED]
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 이재정
 【성명의 영문표기】 Lee, Jae-Jung
 【주민등록번호】 [REDACTED]
 【우편번호】 [REDACTED]
 【주소】 [REDACTED]
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 정대진
 【성명의 영문표기】 Jung, Dae-Jin
 【주민등록번호】 [REDACTED]
 【우편번호】 [REDACTED]
 【주소】 [REDACTED]
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 김병기
 【성명의 영문표기】 Kim, Byung-Ki
 【주민등록번호】 [REDACTED]
 【우편번호】 [REDACTED]
 【주소】 [REDACTED]
 【출원언어】 국어
 【심사청구】 청구
 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.
 대리인 특허법인태백 (서명 또는 인)
 【수수료】
 【기본출원료】 0 면 46,000 원
 【가산출원료】 23 면 0 원
 【우선권주장료】 0 건 0 원
 【심사청구료】 9 항 539,000 원

3-1



기술료 입금 내역서

1. 1차년도 기술료 납입




영수증

기업명 : (주)라트바이오 기준일시 : 2022.03.14 (09:34:16)

거래일시	2022.03.11 (13:30:29)		
이체구분	건별특시	출금계좌	
입금은행	신한	입금계좌	
입금금액	1,400,000 원	수취인성명	농기평(IPET)
수수료	0 원	거래메모	기술료_1차
입금인코드		업체사용 Key	
입금통장표시내용	(주)라트바이오	출금통장표시내용	농기평(IPET)

본 명세서는 인터넷뱅킹에서 이루어진 거래를 출력한 것으로서 거래의 참고용으로만 사용하시기 바랍니다.
이체구분이 '대량' 이체의 성격일 경우 수취인이 공백이면 수취인성명 조회 없이 이체한 경우입니다.

2. 2차년도 기술료 납입



영수증

기업명 : (주)라트바이오 기준일시 : 2022.03.14 (09:34:16)

거래일시	2022.03.11 (13:30:27)		
이체구분	건별특시	출금계좌	
입금은행	신한	입금계좌	
입금금액	1,400,000 원	수취인성명	
수수료	0 원	거래메모	기술료_2차
입금인코드		업체사용 Key	
입금통장표시내용	(주)라트바이오	출금통장표시내용	농기평(IPET)

본 명세서는 인터넷뱅킹에서 이루어진 거래를 출력한 것으로서 거래의 참고용으로만 사용하시기 바랍니다.
이체구분이 '대량' 이체의 성격일 경우 수취인이 공백이면 수취인성명 조회 없이 이체한 경우입니다.

매출액 증빙서류

1. 2020년도 세금계산서

전자계산서				20200515-1000000-17463571				전자세금계산서				20200829-1000000-96009379				전자계산서				20200828-1000000-96019280			
발행 번호 (문자)	477-89-00533	통신망 번호 (숫자)	0203000000	발행 일자	2020.05.15	발행 시간	14:48:00	발행 번호 (문자)	477-89-00533	통신망 번호 (숫자)	0203000000	발행 일자	2020.08.29	발행 시간	14:48:00	발행 번호 (문자)	477-89-00533	통신망 번호 (숫자)	0203000000	발행 일자	2020.08.28	발행 시간	14:48:00
발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	
발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	
작성일자	2020-05-15	공급가액	1,440,000	부가가치세	288,000	합계	1,728,000	작성일자	2020-08-29	공급가액	14,803,037	부가가치세	2,960,607	합계	17,763,644	작성일자	2020-08-28	공급가액	42,440,000	부가가치세	8,488,000	합계	50,928,000
월	일	품목	수량	단가	공급가액	비고		월	일	품목	수량	단가	공급가액	비고		월	일	품목	수량	단가	공급가액	비고	
05	15	충청비	30	3,000	90,000			08	29	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	4	500,000	2,000,000			08	28	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	4	500,000	2,000,000		
05	15	수용현상	9	150,000	1,350,000			08	29	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	31	200,000	6,300,000			08	28	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	4	350,000	1,400,000		
								08	29	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	159	50,000	7,927,273			08	28	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	31	390,000	12,390,000		
합계금액	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합계금액	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합계금액	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합금

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 조회 가능한 전자세금계산서입니다.
발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급"과 전자세금계산서 "제외발급사실조회"를 이용하시기 바랍니다.

전자계산서				20201106-1000000-827919193				전자계산서				20201216-1000000-96919323				전자계산서				20201216-1000000-96938738			
발행 번호 (문자)	477-89-00533	통신망 번호 (숫자)	0203000000	발행 일자	2020.11.06	발행 시간	20:00:00	발행 번호 (문자)	477-89-00533	통신망 번호 (숫자)	0203000000	발행 일자	2020.12.16	발행 시간	7:00:00	발행 번호 (문자)	477-89-00533	통신망 번호 (숫자)	0203000000	발행 일자	2020.12.16	발행 시간	4:56:00
발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	
작성일자	2020-11-06	공급가액	20,000,000	부가가치세	4,000,000	합계	24,000,000	작성일자	2020-12-16	공급가액	7,800,000	부가가치세	1,560,000	합계	9,360,000	작성일자	2020-12-16	공급가액	4,560,000	부가가치세	912,000	합계	5,472,000
월	일	품목	수량	단가	공급가액	비고		월	일	품목	수량	단가	공급가액	비고		월	일	품목	수량	단가	공급가액	비고	
11	06	기초정보	200	1	200,000,000			12	16	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	3	450,000	1,350,000			12	16	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	9	390,000	3,510,000		
								12	16	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	3	100,000	300,000			12	16	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	9	100,000	900,000		
								12	16	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	41	150,000	6,150,000			12	16	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	1	150,000	150,000		
합계금액	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합계금액	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합계금액	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합금

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 조회 가능한 전자세금계산서입니다.
발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급"과 전자세금계산서 "제외발급사실조회"를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				20201216-1000000-96903336				전자세금계산서				20201216-1000000-96935332				전자계산서				20201228-1000000-12410608			
발행 번호 (문자)	477-89-00533	통신망 번호 (숫자)	0203000000	발행 일자	2020.12.16	발행 시간	2:00:114	발행 번호 (문자)	477-89-00533	통신망 번호 (숫자)	0203000000	발행 일자	2020.12.16	발행 시간	1:01:317	발행 번호 (문자)	477-89-00533	통신망 번호 (숫자)	0203000000	발행 일자	2020.12.28	발행 시간	9:00:000
발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	발행 처 명	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	주요정보 업종 구분	
작성일자	2020-12-16	공급가액	2,309,114	부가가치세	461,823	합계	2,770,937	작성일자	2020-12-16	공급가액	1,891,817	부가가치세	378,363	합계	2,270,180	작성일자	2020-12-28	공급가액	990,000	부가가치세	198,000	합계	1,188,000
월	일	품목	수량	단가	공급가액	비고		월	일	품목	수량	단가	공급가액	비고		월	일	품목	수량	단가	공급가액	비고	
12	16	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	3	197,318	591,954			12	28	충청비	1000	5	5,000			12	28	충청비	30	3,000	90,000		
								12	16	수용현상(아파트,가설) 및 소모품	32	45,455	1,454,760			12	28	수용현상	6	150,000	900,000		
합계금액	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합계금액	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합계금액	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합금	합금

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 조회 가능한 전자세금계산서입니다.
발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급"과 전자세금계산서 "제외발급사실조회"를 이용하시기 바랍니다.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품 기술융합 창의인재양성 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품 기술융합 창의인재양성 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.