

최종보고서

636.21
L293 u

UR에 대비한 유우, 한우의 수태율 및 생산성 향상 기반구축확립에 관한 연구

Establishment for improving fertility and productivity
of dairy cattle and Korean cattle on protecting UR

경 상 대 학 교

농 립 부

최 종 보 고 서

1995년도 농림수산물특정연구사업에 의하여 완료한 UR에 대비한 유우, 한우의 수태율 및 생산성향상 기반구축확립에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 함께 제출합니다.

- 첨 부 : 1. 최종보고서 8부
2. 자체평가 의견서 8부
3. 최종보고서 디스켓 1매

1996. 11.

주관연구기관 : 경 상 대 학 교

총괄연구책임자 : 강 정 부 (인)

주관연구기관장 : 직인

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “UR에 대비한 유우, 한우의 수태
율 및 생산성 향상 기반구축 확립에 관한 연구”과
제의 최종보고서로 제출합니다.

1 9 9 6. 1 1.

주 관 기 관 명 : 경상대학교
총괄연구책임자 : 강 정 부
협 동 연 구 원 : 박 수 동
협동연구기관명 : 축산기술연구소
협 동 연 구 원 : 정 진 관
협 동 연 구 원 : 성 환 후
협동연구기관명 : 충남대학교
협 동 연 구 원 : 김 덕 환
협동연구기관명 : 경남농촌진흥연구원
협 동 연 구 원 : 강 양 수
협동연구기관명 : 경남축산진흥연구소
협 동 연 구 원 : 김 철 호

요 약 문

I. 제 목

UR에 대비한 유우, 한우의 수태율 및 생산성 향상 기반 구축 확립에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

국내 축산업의 정착, 대외경쟁력 향상에는 제도의 보완, 시설 및 사양관리의 개선, 질 좋은 조사료의 확보등 많은 요인이 걸림돌이 되고 있으나 무엇보다 중요한 것은 관련된 기술개발의 부진에 있는 것으로 지적되고 있다.

더욱이 UR협상, WTO체제의 출범등 주변 여건의 변화에 대처하기 위해서는 지금까지의 보호와 지원체제에서 벗어나 경쟁력을 갖춘 경영합리화와 실용적이면서도 파급효과가 큰 기술개발 즉 조기임신진단, 분만후의 난소의 기능회복 여부, 번식장애의 요인별 분석정립을 위한 기술(ELISA 기법)개발을 추진하기 위하여 실시되었으며 구체적인 목적은 아래와 같다.

- ELISA기법 개발(단크론성 항체 및 다크론성 항체획득, 각종 측정조건 검토)
- 조기임신진단에의 활용
- 분만전후의 난소기능회복 여부판정
- 번식장애별 요인분석에의 활용과 여기에 근거한 대책제시 등을 목표로 하여 실시하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

한, 유우에서의 질병발생중 그 발생피해가 가장크고 발생율이 높은 번식장애를 포함한 난소기능장애 여부의 판정에는 물론 조기임신진단, 수정적기파악을 위한 기술개발을 주 내용으로 하여 실시하였다.

선진각국에서는 앞서 언급한 각종 번식장애, 조기임신 진단실시에 성호르몬 중 특히 progesterone의 동태에 관한 분석에서 그 실효성이 입증되어 이의 활용화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어 본 연구에서는 선진외국에서 시도, 실시하고 있는 방법을 정립하기 위하여 측정방법의 정립과 동시에 현장에서의 실용화를 위한 각종 분석을 실시하여 타당성 여부의 검토까지를 주 범위로 하였다.

지금까지도 국내에서는 거의 대부분 progesterone측정법으로 방사성 동위원소 표지 면역측정법(radioimmunoassay, RIA)이 실시되고 있으나 RIA에서는 기본적으로 방사성 동위원소를 사용할 수 밖에 없어 규격화된 시설과 장비가 갖추어져야 함은 물론이고 처리에는 환경오염에 대한 세심한 배려, 취급 샘플수가 많아야 하는점 외에도 사용하는 방사성 동위원소의 반감기가 길어 어디에서나, 누구나 할 수 없는 어려움을 안고 있어 여기에 대한 보완책으로 방사성 동위원소 대신 전혀 문제가 없는 효소를 사용하고 누구라도 쉽게 사용가능한 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 개발코져 여기에서 가장 중요시 되는 항체(다크론성 및 단크론성)의 획득에 주력하였다.

얻어진 항체를 이용한 측정법개발, 현장활용 여부에 대한 가능성을 검토키로 하였다.

이와는 별도로 도축장에서 한우의 자궁과 난소 특히 난소에 대한 육안적인 검사와 동시에 형태학적인 검색을 동시에 실시하여 현장에서의 체계적인

문제점 파악에 접근코저 하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

○ 주요 연구개발 결과

1. 본 연구에서 기본이 되는 프로제스테론(Progesterone)항체를 획득하기 위하여 종래의 면역접종방법에 의한 다크론성 항체획득과 침단생물학적 기법에 의한 즉, 세포융합 기법에 의해 다크론성항체 획득에 성공하였다.
2. 종래의 RIA에서 탈피하여 새롭고도 안정된 효소면역측정법을 확립하게 되었다.
3. 소규모농가(소규모샘플)는 물론 중, 대규모 농가에서의 샘플처리가 용이해질수 있게 되었다.
4. 지금까지도 분석재료로 혈액 또는 유즙(우유)을 이용한 방법이 실시되고 있으나 본 연구에서는 혈액은 물론 우유를 재료로 사용하여도 아무런 문제가 없음이 입증되었다.
5. 조기임신진단 여부는 인공수정 또는 자연교미후 13일 이내 늦어도 22~23일 이내에 대부분의 예에서 정확한 진단을, 특히 임신이 안된 경우는 100%의 확진이 가능하였다.
6. 분만후의 난소기능회복여부의 판정은 물론 성주기의 폐턴여부를 분만 후 검색한 대부분의 예에서 45~50일 이내에 알수 있었다.
7. 번식장애중 그 피해가 크면서도 정확한 진단이 어려웠던 난소질병중 황체낭종과 난포낭종의 감별을 쉽게, 정확하게 진단할수 있었다.
8. 외견상의 소(한우 및 유우 포함) 관찰에서는 전혀 알 수 없었으나 도축장에서의 난소 및 자궁의 탄력성, 크기 및 형태의 변화 관찰로

난소의 발육부전은 물론 황체낭종 및 난포낭종례를 발견할 수 있었다.

9. 한우의 난포의 조직학적 검색에서 과립-난포막 세포종의 발생례를 볼 수 있어 번식장애우에 대한 조직학적 검색이 동시에 필요함을 알 수 있었다.
10. 국내축산업의 정착화, 국제경쟁력 확보 차원에서의 수태율 향상과 아울러 생산성 향상을 높일수 있는 방안제시가 가능하였다.

○ 활용에 대한 건의

1. 낙농가 자신은 물론 농림부에서 국내의 현실에 초점을 맞춘 상태에서의 계몽과 지도가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.
2. 국내 수의사 및 인공수정사에 대해 실제적인 현장에서의 서비스가 가능하도록 이론과 실제에 관한 교육프로그램이 시급히 개발될수 있도록 추진되어져야 한다.
3. 국내에서 개발된 연구는 물론 해외에서 소개 내지 개발된 정보에 대한 신속한 정보수집을 실시하여 국내활용(보급)에 대한 지침을 전문가 의견을 수렴, 여기에 대한 문제점 및 중, 장기 계획수립이 시행되어져야 한다.
4. 본 연구과제에서 얻어진 결과는 현장활용이 충분히 가능성이 밝혀졌으나, 실제적으로 현장서비스를 할 수 있게 하기 위해서는 전문인력의 지원이 있어야 한다.
보다 더 바람직한 것은 예로 농어민지원 전문기관을 육성하여 정확하면서도 신속한 처방이 가능하도록 추진되어져야 소기의 목적을 달성할수 있을 것으로 판단된다.
5. 농어민관련 특히 축산업의 생산성향상과 관련 국내외의 정보와 기술 개발내용에 대해 먼저 장, 단점에 대한 검토를 실시, 보완내용과 지

적사항을 명기하여 축산인들이 스스로 판단하여 선택할수 있도록 유도되어야 할 것으로 판단된다. 예로 우리나라의 국내여건(사육규모, 전문인력)에 감안한 축산인들의 지도계몽이 바람직할 것으로 느껴진다.

6. 본과제는 1년단기 과제이었기 때문에 여러 가지 여건상 전체적인 것을 다루지 못하고 축산업에서 가장 큰 애로중의 하나인 번식장애에 관련 내분비계 이상에 국한하여 실시 되었기에 현장 활용을 적극적으로 실시하기에는 현장과 연결시켜 하나하나 풀어 나가지 않으면 안될 문제점(예로 신속한 진단과 신속하면서도 빈틈없는 확인 작업 등)이 실시되어야함을 절실히 느낄 수 있었다.
7. 또한 여기에는 사양 관리, 시설, 위생, 사료문제 등의 많은 내,외적 요인들이 관여하고 있어 종합적이고도 체계적인 대책수립과 예방을 위해서는 본 과제에서 얻어진 결과를 바탕으로 한 각 요인별에 대한 지속적인 연구가 적어도 2~3년간 수행될 수 이루어질 수 있다면 종래와 다른 차원에서의 번식장애의 피해 최소화에는 물론 아주 적절한 예방대책 프로그램개발이 이루어질수 있을 것으로 크게 기대된다.

Summary

The contention of the pioneers that indispensability of progesterone in pregnancy maintenance is a biological law of broad validity during 60 years received only isolated support, based on physiologic rather than chemical and clinical data.

However, reliable progesterone assays revealed recently that normal pregnancy maintenance in animals and cannot with stand the reduction of progesterone levels to a critical value.

This information can be expected to promote conceptual and clinical developments, when it is clearly understood that progesterone withdrawal is a qualitative expression and only progesterone withdrawal to a critical value has precise biological meaning.

Particularly, thus progesterone levels in the systemic plasma or skin milk of normal, mature cattle may be used distinguish between non-pregnant state, when corpora lutea are formed, secrete actively and regress at regular intervals, and pregnancy when an active corpus luteum persists.

For these reasons, the assay of progesterone in blood, milk is one of the most useful hormone analyses for monitoring the reproductive state of female mammals.

Analysis or microanalysis of progesterone is being currently performed by radioimmunoassay(RIA) using isotopes.

For the reasons that radioisotopes have some problems of safety in health and environmental pollution, special facilities for its' handling and discard, its short halflife, with its inherent limitations with respect to widespread use, recently in foreign countries radioimmunoassay is being substituted to enzyme immunoassay(EIA) which has higher sensitivity and accuracy in assay without use of radioisotopes.

A number of enzyme immunoassays for progesterone have been reported.

Most progesterone enzyme immuno assays are used double antibody methods. These methods are consume considerable time and reagents because of the requirements for several washing and centrifugation steps involving the reactants.

Because of these several factors, We are developed an effective enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) system instead of enzyme immunoassay using higher titre of progesterone antibody and monoclonal antibody for the direct assay of progesterone.

In practice, progesterone levels were very useful indicator for confirm in the estrus cycle and early pregnant diagnosis.

The assay of progesterone in blood or milk at 0 and 10 to 13 days after artificial insemination or natural coitus must be utilized for confirming the estrus cycle and estrus detection and at 21 to 23 days after insemination for early pregnanat diagnosis.

During the first 13 to 14 days after estrus and ovulation the

secretion of progesterone by the corpus luteum, as measured by levels in plasma dose not differ for uninseminated and pregnant cattle. In the pregnant cattle the high level of plasma progesterone reached about the 14th day after ovulation persists, but varies during periods of one to ten days; in the absence of a conceptus the level declines after 14th day(on average) at first slowly, then by the 17th day, very rapidly towards the basal level. This low level persists for about four days, including those of estrus and ovulation, a highly characteristic pattern which differs so markedly from that in the pregnant cattle that the progesterone level in a single plasma or skim milk sample can provide a reliable diagnosis of pregnancy at this time.

The ovarian activitys in postpartum period is classified into 4 types which were normal cycle, delayed cycle, ceased cycle with lower progesterone level and higher progesterone level.

The ovarian cysts is classified into 3 types : follicular cyst, luteal cyst, and cystic corpus luteum.

Cattle having a progesterone level in blood $< 1.0\text{ng}/\text{m}\ell$ were considered to have follicular cysts and those with levels of $1.0\text{ng}/\text{m}\ell$ or higher were decided as the causes of luteal cyst or cystic corpus luteum.

Luteal cyst was characterized by progesterone levels remaining high in the cattle for 10 days after use such luteotropic agents as human chorionic gonadotropin(hCG) treatment, and cystic corpus luteum was characterized by a decrease in progesterone

level after cattle were treated.

By the rectal palpation technique, it was impossible to differentiate luteal cyst and cystic corpus luteum from follicular cyst.

Progesterone assay at about 10 days interval was very practical as an aid to monitoring ovarian function and dysfunction.

Therwise, gross appearance and histological findings to uterus and ovary of cattle were also very valuable estimate the general condition.

From these results, the progesterone assay obtained could be employed as an indicator of ovarian cyclic activity, estrus, or pregnancy and could be utilized for the improvement of reproductive efficiency and productivity.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	17
1-1. Purpose and Scopes of Research	17
Chapter 2. Antibody Production Against to Progesterone And Establishment of ELISA system	20
2-1. Introduction	20
1. Polyclonal Antibody Production Against to Progesterone	21
2. Monoclonal Antibody Production Against to Progesterone	22
2-2. Analysis of Antibody titre and Characteristics	23
1. Antibody titre check	23
2-3. Before condition of ELISA	30
1. Assay condition of before performance	30
2. Progesterone determination	32
2-4. Results	33
1. Association Constant and Antibody titre to Progesterone	33
2. Cross Reaction Rate	34
3. Polymerization of Bovine Serum Albumin	36
4. Remove of Anti-bovine serum albumin Antibody	36
2-5. Condition of ELISA system	36

1. Repetition	36
2. Recovery Rate	38
2-6. Establishment of ELISA system	38
1. Standard Curve	39
2. ELISA Procedure	40
3. Sensitivity	40
2-7. Discussion.....	41
2-8. References	43

Chapter 3. Application of Early Pregnancy Diagnosis and Monitoring Postpartum Ovarian Activity	48
3-1. Introduction.....	48
3-2. Materials and Methods	50
1. Animals	50
2. Collection of Bovine blood and Milk	50
3. Assay of Progesterone Concentration in Bovine blood and Milk	51
4. Pregnancy diagnosis	52
5. Postpartum Ovarian Activity	53
3-3. Results	53
1. Progesterone concentration on Day of Artificial insemination	53

2. Changes of Progesterone concentration between Nonpregnant and Pregnant cattle after Insemination.....	54
3. Changes of Progesterone concentration in gestation periods	57
4. Monitoring Postpartum Ovarian Activity	59
3-4. Discussion.....	60
3-5. References	65

Chapter 4. Application as an aid for Reproductive disorder especially Ovarian Cysts72

4-1. Introduction.....	72
4-2. Materials and Methods	74
4-3. Results	75
4-4. Discussion.....	81
4-5. References	86

Chapter 5. Conclusion94

목 차

제 1 장 서 론	17
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	17
제 2 장 프로제스테론의 항혈청 획득 및 ELISA기법 확립	20
제 1 절 서설	20
1. 다크론성 항체의 획득	21
2. 단크론성 항체의 획득	22
제 2절 항체가 및 특성조사	23
1. 항체가 측정	23
제 3 절 ELISA기법 개발 실시전의 조건검토	30
1. 측정 실시전의 조건검토	30
2. Progesterone측정	32
제 4 절 연구결과	33
1. 항체가 및 결합정수	33
2. 교차반응율	34
3. 소의 알부민의 중합체	36
4. 항 BSA항체의 제거	36
제 5 절 ELISA기법 조건검토	36
1. 재현성 조사	36

2. 회수율 조사	38
제 6 절 ELISA기법 확립	38
1. 표준곡선	39
2. ELISA 기법	40
3. 측정감도	40
제 7 절 고찰	41
제 8 절 참고문헌	43

제 3 장 초기 임신진단 및 분만후

난소기능 회복판정에의 활용

제 1 절 서설	48
제 2 절 재료 및 방법	50
1. 공시동물	50
2. 혈액 및 유즙채취	50
3. 혈액 및 유즙에서의 progesterone 농도측정	51
4. Progesterone 측정에 의한 임신진단	52
5. 분만후 난소기능 회복상태	53
제 3 절 연구결과	53
1. 수정일의 progesterone 농도	53
2. 수정후 임신우군과 비임신우군에서의 progesterone 농도변화 ...	54
3. 임신기간중의 progesterone 농도변화	57
4. 분만후 난소기능 회복상태	59
제 4 절 고찰	60

제 5 절	참고문헌65
제 4 장	번식장애 특히 난소낭종 진단에의 활용72
제 1 절	서설72
제 2 절	재료 및 방법74
제 3 절	연구결과75
제 4 절	고찰81
제 5 절	참고문헌86
제 5 장	결 론94

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

축산업의 대외 경쟁력 향상에는 많은 요인이 관여하고 있으나 무엇보다 중요한 것은 기술개발의 부진이 가장 큰 장애가 되고 있다.

경영 합리화에 있어서 가장 큰 애로는 관리, 사양의 관리, 사양의 불합리 등과 같은 각종요인에 의한 번식장애의 이상으로 인해 이상 성주기의 발현 또는 소실, 나아가서는 불임, 우량감소 등과 경제적 손실이 너무도 커 여기에 대한 대책이 무엇보다 시급한 실정에 있다.

국내의 경제성 동물중 金相哲 등의 유우에 대한 조사에 의하면 대단위 목장의 사육두수의 평균 47.9(약 48%)가 번식장애에 걸려 있었고 분만후에는 53~54%로 오히려 증가해 그 피해의 심각성을 가늠케 해 주고 있다.

본 연구자 역시 대단위 및 중, 소규모 목장을 대상으로 한 실태조사에서는 거의 대부분의 유우가 번식장애에 걸려 있거나, 걸린 경력을 갖고 있어 낙농기술의 후진성으로 이에 대한 대책이 시급함을 절감하지 않을 수 없었다.

더욱이 최근의 UR 협상이후의 국내 축산업의 존립을 위해서는 지금까지의 보호와 지원체제에서 벗어나 국제경쟁력을 갖춘 경영합리화와 실용적이면서도 파급효과가 큰 기술개발에 주력하지 않을 수 없다.

가축 특히 한우와 유우의 증식율과 두당 생산성 향상으로 합리적인 경영향상으로 전환시키기 위해서는 먼저 인공수정의 적기파악이 기본적으로 가장 중요하다 하겠다.

더욱이 수정 이후에는 생체에 아무런 영향을 주지 않으면서도 조기에 수정여부를 알아 낼 수 있는 임신진단 기술이 절실히 요청된다.

특히 국내의 축산농가 및 낙농가들이 안고 있는 가장 큰 애로는 각종 요인에 의한 번식장애의 피해로 성주기의 연장 내지 불임, 유량 감소, 사료낭비등과 같은 피해는 물론이고 이 중 상당수는 도태에 이르는 경우가 많아 경제적 손실이 너무도 크나 여기에 대한 대책이 없는데 있다.

소의 번식장애는 현재 牛群관리시 가장 문제가 되고 있는 유방염, 발굽병과 함께 국내 목장의 3대 질병중의 하나로 이로 인한 피해는 너무도 큰 것으로 알려져 있다. 번식장애중의 한 요인인 수태율 저하로 인한 경제적 피해만 하더라도 연간 1,200억원에 이를 것으로 추정되고 있을 정도로 심각하다. 그러나 국내 한, 유우에 발생하고 있는 번식장애에 대한 구체적이고도 체계적인 대책이 마련되어 있지 않은 상태에 있어 여기에 대한 대책이 무엇보다 시급하다 하겠다.

본 연구진은 가축의 번식장애 요인 감별 중 가장 큰 애로 사항인 발정감정, 임신진단, 번식장애별 요인분석 등을 조기에 진단하여 축산업 및 정밀 분석화학의 발전에 기여코저 1986년부터 progesterone측정에 관한 연구를 RIA(radioimmunoassay)에 의존하지 않으면서도 specificity, sensitivity 및 신뢰성이 RIA와 같거나 보다 우수한 enzyme immunoassay(EIA)를 개발코저 EIA개발의 필수요건인 항체(1st and 2nd antibody) 및 enzyme conjugate를 자체 개발하여 assay system에 검토를 거쳐 실시 가능함을 입증한 바 있다.

그러나 현재 EIA에 사용하고 있는 항체 즉 항혈청은 종래의 면역방법에 의해 획득한 것으로 획득 개체별에 따라 antibody titre가 일정치 않고 carrier protein에 대한 항체생성의 간섭 작용으로 실시

에는 사전에 carrier protein에 대한 항체제거 작업이 필요하며 이외 affinity constant가 낮아 극미량의 progesterone 측정에의 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 응용에는 어려움이 있음이 밝혀져 여기에 대한 개선책이 절실히 progesterone에 대한 monoclonal antibody(MCA)를 생산, 획득하여 ELISA기법에 활용하여 사용코져 하는데 있다.

최근에는 환경오염에 대한 우려는 물론이고 여기에 대한 규제 역시 강화되어 기술개발 역시 여기에 부응하여 대책을 세울 수 밖에 없어 이런 측면에서 볼 때 이외의 중요성은 더 이상 언급할 필요가 없다 하겠다.

기술적인 측면에서는 최근까지도 앞서 밝힌 liquid phase(液相)의 EIA에서 solid phase의 ELISA기법에의 적용에는 높은 titre의 항혈청 및 specificity가 요구되어 어려움이 많으나 앞서 언급한 바와 같은 progesterone의 다크론성 항체의 사용과 동시에 progesterone의 단크론성항체(MCA)의 사용은 이상과 같은 제반 문제점을 해결해 줄 것으로 기대되기 때문에 따라서 본 연구자는 한우 및 유우를 대상으로 개체 별에 대한 신속하면서도 정확한 progesterone호르몬의 분석으로 번식장애의 요인 분석, 임신진단, 난소기능의 규명에 활용함을 그 범위로 하여 수태율의 향상, 분만간격의 단축, 번식장애의 예방대책 수립에 활용해 생산성 향상에 크게 기여코져 하는데 있다.

제 2 장 프로제스테론(Progesterone)의 항혈청 획득 및 ELISA 기법 확립

제 1 절 서 설

현재 널리 활용되고 있는 각종 분석법에서 사용되고 있는 항체 즉 항혈청은 기존의 면역접종 방법에 의하여 생산, 회수하여 사용하고 있는 것으로 면역접종 방법에서의 노하우, 투여량(접종량) 등에서의 차이가 있는 것으로 알려져 있으나 기본적으로는 종래의 방법에서 탈피하지 못하고 있다.

사용되고 있는 실험동물(주로 New Zealand 백색토끼)의 개체에 따라서 똑같은 방법에 의거 실시하여도 항혈청 생성량에서의 차이는 물론 항체가가 높은 것도 있는가 하면 항체가가 크게 올라가지 않는 경우 등 항체가 자체에도 차이가 크기 때문이다.

프로제스테론(Progesterone, P4)을 포함한 스테로이드 호르몬, 특히 프로제스테론은 원래의 구성이 지질(lipid)인데다 분자량 역시 313.4로 극히 적어 자체로는 도저히 항체 생성능력을 가지지 못해 여기에 결합 적합한 단백질(주로 bovine albumin)을 이용(carrier protein)하여 사용할 수 밖에 없어 carrier protein에 대한 항혈청도 함께 생성되기에 이의 간섭작용이 너무도 큰 것이 또한 문제점이 되고 있다. 이와 같은 근원적인 문제점을 보완하기 위하여 최근 국내에서도 활발히 도입, 시도하고 있는 생명공학기법중의 하나인 세포융합기법을 도입, 연속배양이 불가능한 항체생산세포를 연속배양, 성장이 가능한 적합 암세포주(myeloma cell line)와 세포융합시켜 단클론성항체(monoclonal anti-

body, MCA)를 생산, 획득, 조건검토를 거쳐 활용토록 하였다.

단크론성항체는 앞서의 다크론성항체와는 달리 생산에는 많은 기술적인 어려움이 많고, 성공 확률에 대한 불확실성이 있으나 한 번 획득하면 거의 영구적인 장점이 있어 이를 획득, 조건검토를 거쳐 활용토록 하였다.

1. 다크론성 항체의 획득

항원으로서는 11α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin(Sigma Co.)을 사용하였다. 면역접종동물로는 New Zealand 백색 토끼(평균체중 1.5Kg, 수컷) 5마리에 면역접종시켜 작제하였다.

항원인 11α -hydroxyprogesterone hemisuccinate-BSA(Sigma Co.) 25mg을 멸균생리식염수 때로는 pH 7.2 PBS로 완전 용해시켜 최종량을 25mℓ로 하여 1mg/mℓ의 항원량으로 하였다. Emulsion작제는 pisto rin 연속주사기(Fujihira Kyogyo Co, FHK) 2개(5mℓ)를 동시에 연결시켜 혼화가 아주 힘든 상태까지 emulsion시켜 완전 겔 상태로 하였다. 사용후의 나머지 용량은 -20°C 에 보관, 사용하였다. 항원량은 개체당 $1000\mu\text{g}(1\text{mg})$ 으로 하여 1차 접종후 4주간격으로 실시, 2차접종후 부터 항체가를 측정하여 항체생성 여부를 분석하였다. 실제로 있어서는 앞서의 조절 항원량 3mℓ(실제항원량 3mg)에 penicillin G(1,000,000단위) 1mℓ와 완전 Freund's adjuvant(Freund's complete adjuvant, FCA) 4mℓ씩의 비율로 하여 다시 완전 emulsion시켜 주로 背側양쪽 피내에 접종시켰다. 접종전 구충제 투여로 콕시듐 등 기생충구제는 물론 하리(-), 식욕 및 원기 왕성한 상태에서 체중측정 후 실시하였다.

2차접종후에는 보조제(adjuvant)는 완전보조제(Difco Lab.) 대신 불완전보조제(Freund's incomplete adjuvant, FIA)를 사용하였다. 본 연구에서는 5차 접종후 항체가를 다시 측정, 확인하여 2주후 항혈청을 전량 회수하였다.

2. 단크론성 항체의 획득

항원은 다크론성항체 획득시에서와 같은 11α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin을 사용하였다. 면역접종동물로는 6~8주령 주로 8주령의 암컷 BALB/C마우스의 복강내에, 항원으로서의 투여량은 $50\mu\text{g}$, $100\mu\text{g}$ 및 $200\mu\text{g}$ 으로 하여 2주 간격으로 실시하였다 (수컷은 세포융합률이 암컷의 1/3수준으로 알려져 있음).

항원조제는 다크론성 항체획득시와 같은 요령으로 멸균생리식염수로 $1\text{mg}/\text{ml}$ 로 한 후 조절된 항원량 1에 1회 접종시에는 FCA 9의 비율로 하여 연속주사기(18G 사용)로 emulsion을, 이후는 FAC 대신 FIA를 사용하였고 최종접종(본 연구에서는 6회 접종)-항체가 높음 확인-에서는 항원량만으로 정맥주사하여 3일 후 비장적출 하여 세포융합에 사용하였다.

각 투여량별에 따라서는 3마리 이상의 BALB/C마우스를 이용하였다.

세포융합에 사용된 암세포주는 P3-X63-Ag8-U1(일명 P3UI), 비장세포수(임파구수)는 1×10^8 , P3UI의 세포수는 1×10^7 으로 Polyethylene glycol 4,000을 사용, 세포융합기법에 의거 작제하였다.

세포융합후의 각 클론(clone)별에 대한 항체가 측정은 다크론성 항체에서와 같이 RIA 및 ELISA기법을 동시에 활용하여 실시하였다.

제 2 절 항체가(antibody titer) 및 특성조사

1. 항체가 측정

측정을 위한 샘플로 마우스는 무균적인 심장채혈(생명유지나 이후의 항체생성 능력에도 전혀 문제가 없었음)을, 토끼에서는 heparin처리한 시험관을 준비한 후 이정맥(ear vein)에서 채취하였다.

마우스의 경우 심장채혈전 각각 1mℓ의 인산염 완충용액(PBS, PH 7.0) 용액을 넣은 시험관을 준비한 후 심장채혈하여 3,000rpm 15분간 원심분리하여 혈청을 획득하여 단계별(100×, 1000×, 5000× 등) 희석하여 실시하였다.

토끼에서도 같은 방법으로 실시 하였으나, 혈청 대신 혈장을 이용, 0.1M PBS(pH 7.2)로 단계별 희석 측정하였다.

항체가 측정방법은 종래의 RIA분석과 동시에 현재까지도 거의 실시되지 않고 있는 ELISA기법을 활용, 실시하였다.

측정조건 검토에 있어서 안정성과 정확도를 높이기 위해 종래에 널리 활용되고 있는 난백알부민 등을 사용하여 실시 하였으나 결과치가 일정치 않았던 관계로 이후에는 저농도의 제라틴(gelatin)을 사용함으로써 안정성을 높일 수 있었다.

1) RIA에 의한 항체가 측정

0.2% 제라틴 함유 0.1M 인산염 완충용액(PBS, pH 7.0) 0.1mℓ로 전처리한 후 면역접종후의 토끼와 마우스의 혈청 또는 혈장(실제는 항혈청임)을 상기의 PBS로 단계별 희석하여 0.1mℓ씩 넣은 후 잘 혼합시켜 3H-progesterone(0.25 μ ci/mℓ)을 0.1mℓ씩 첨가 완전 혼합시켜 실온에 5시간 반응시킨 후 1% dextran coated charcoal(DCC) 0.2mℓ

씩을 가한 후 3000rpm 15분간 원심분리한 후 상청액(supernatant solution)에 대한 scintillation counting을 실시하였다. 1% DOC용액 조제는 다음과 같이하여 사용하였다.

1. 2% charcoal solution in 0.05M PBS(pH 7.0)
2. 0.2% dextran T-70 solution 0.05M PBS(pH 7.0)
3. Mix well equal volume of the above solutions and store at 4℃

1% dextran coated charcoal용액은 Norit A(Charcol 즉 activated carbon, Kishida Chem. Co.)와 dextran T-70(Pharmacia fine Chem)을 사용하여 작제하였다(Table 1). 1% DCC용액을 사용할 때에는 반드시 vortexing하여 실시하였다. Scintillator용으로는 PPO{(2, 5, diphenyloxazole, Nakarai Chem. Co.)와 POPOP(2, 2'-p-phenylene-bis-(5-phenyl-oxazole), Nakarai Chem. Co.), 1, 4, dioxane(액체 scintillator용, Daiichi Chem. Co.) 및 naphalene(액체 scintillator용, Nakarai Chem. Co.)으로 작제하여 실온에 보관, 사용하였다. RIA에 의한 단크론성 항혈청에서의 항체가 progesterone의 기본 측정법은 그림 1과 같이 실시하였다.

다크론성 progesterone항혈청에서의 항체가 측정에는 BSA항체에 의한 간섭작용이 커 항체가가 낮아 다크론성 progesterone항혈청에서는 BSA다량체(BSA polymer)를 인위적으로 만든 후 BSA다량체에 의한 BSA항체의 완전한 제거를 실시한 후 RIA, 이후의 ELISA샘플로 이용하였다.

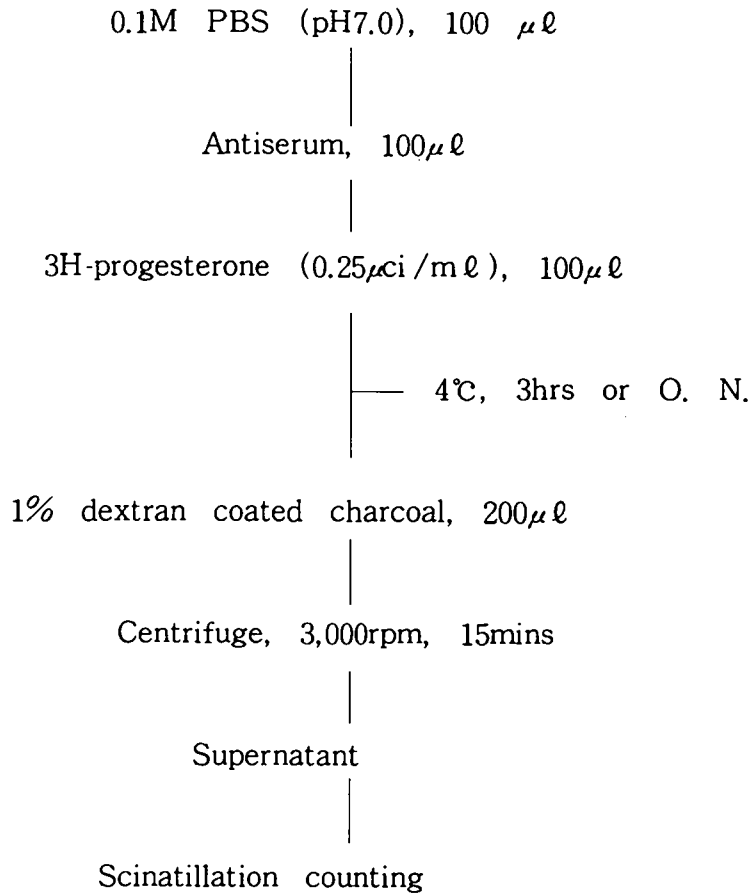


그림 1. The procedure of progesterone antibody titre by RIA

2) ELISA기법에 의한 항체가 측정

progesterone의 항체가 측정의 보고는 없으나 본 연구에서의 항체가 측정의 기본 방법은 그림 2와 같이하여 실시하였다(그림 2. 참조). RIA에서와는 달리 pure progesterone(Sigma Co.)은 최저 용량의 absolute methanol로 해서 용해 시킨 후 0.1MPBS(pH 7.2)로 희석하여 항원량을 조절하여 일정용량(50μℓ)으로 통일하여 ELISA plate에 첨가하여 37℃ incubator내에 넣어 dry up시켜 모식화 된 일련의 과정으로 실시하였다.

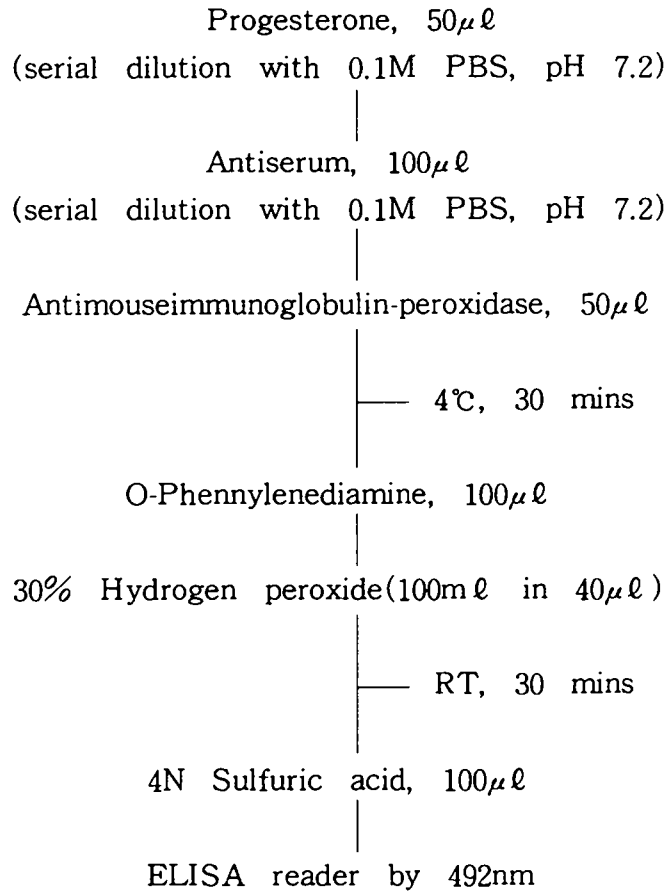


그림 2. The procedure of progesterone antibody titer by ELISA.

3) 다크론성 항혈청 및 단크론성 항혈청에서의 anti-bovine serum albumin(anti-BSA)항체가 측정

11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin을 항원으로하여 New Zealand white rabbit에 면역접종시켜 획득한 항혈청 중에는 당연히 anti-BSA antibody가 混在해 있을 가능성이 매우 높기에 항 BSA항체 여부에 대한 검색을 실시하여 여기에 대한 대비책 즉, 항 BSA항체를 제거토록 하였다.

OPD(o-phenylenediamine)는 그림 3에서와 같이 0.1Mphosphate-cit-

rate buffer(pH 5.0)로 용해시켜 0.4mg /mℓ 농도로 하였으나 반응정지제 투여전 반드시 30% H₂O₂용액을 첨가하여 사용하였다.

BSA(1 mg /mℓ) in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9. 6), 100μℓ

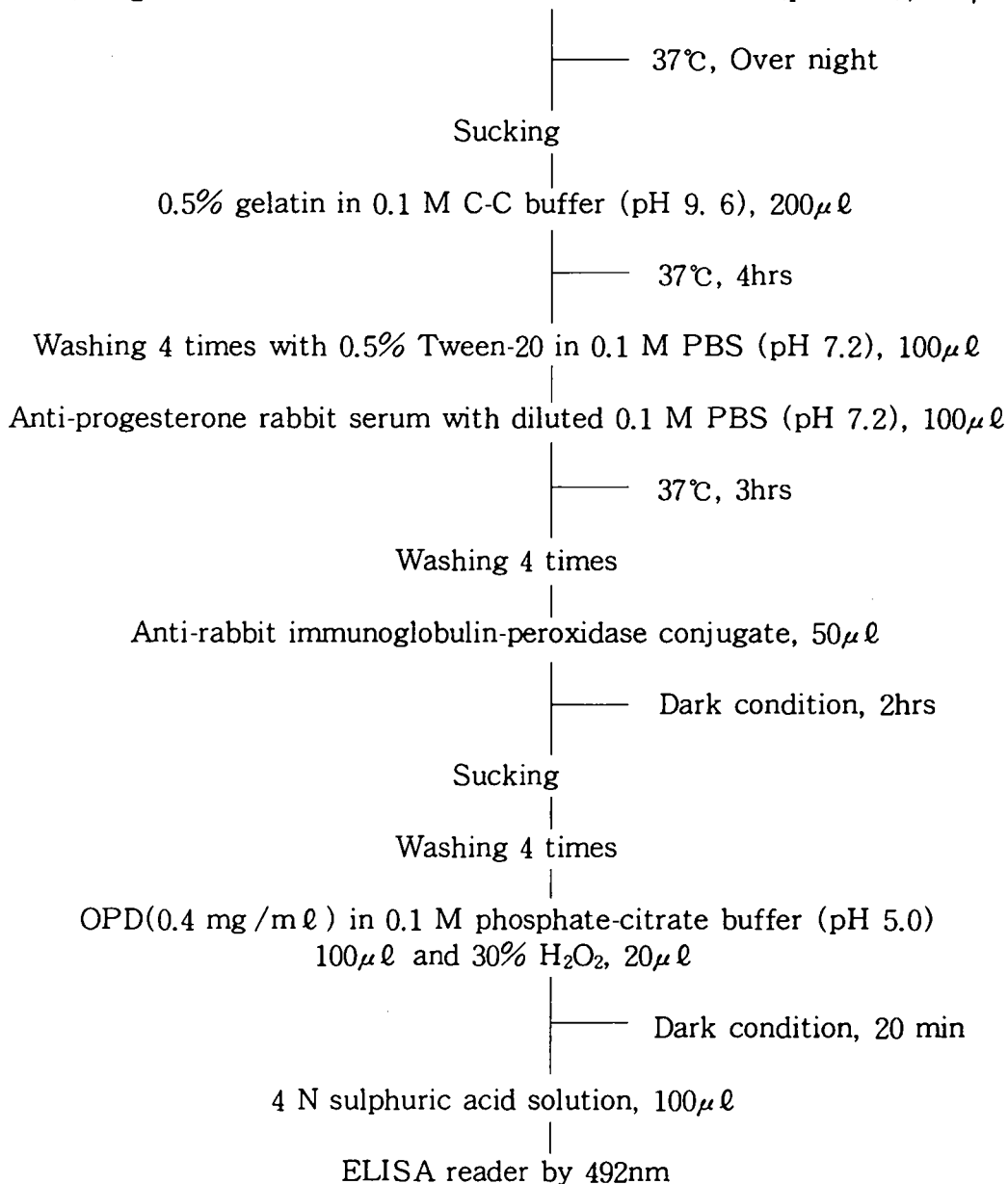


그림 3. Anti-BSA antibody detection by ELISA

4) Bovine serum albumin의 重合體(polymer)합성

Cross-linking제로서 사용되고 있는 “glutaraldehyde”를 이용, 항원 또는 항체단백질을 重合體로 만들어 이때의 반응액의 pH가 단백질의 등이온점이 될 때에는 不溶化物(不溶性)로 될 수 있고 cross-link된 不溶性의 단백질은 특수한 용액중에서는 안정하기에 면역 흡착제로 활용하기 위하여 그림 4와 같이하여 실시하였다. 0.1M phosphate buffer (pH 6.8)는 0.1M NaH_2PO_4 (12.0g/L로 하여 39:61의 비율로 하여 조절, 작제하였고 glutaraldehyde (Katayama Chem Co. 전자현미경용)는 2.5% glutaraldehyde를 멸균 탈이온 증류수로 희석하여 사용하였다. 예비실험에서 %농도를 각각 달리하여 실시한 결과 1% glutaraldehyde에서는 분자량 크기 200,000의, 2.5%에서는 500,000크기를, 이 이상에서는 오히려 크기가 작아 2.5%의 glutaraldehyde용액을 사용하게 되었다.

Sephadex G-200 beads 멸균은 110℃, 20분간 autoclave하였고 column volume은 $58 \times 1.552 \times 3.14$ 로 하여 일차로는 멸균증류수로 膨化시킨 후 0.1M PBS (pH 7.2)로 column 저면부로 I 정도까지 충전시킨 후 일정속도를 유지시켜 나가면서 Sephadex G-200 beads를 충전시켜 가면서 부유하는 입자는 sucker로 흡인, 제거하였다(그림 4. 참조).

Chromatography에서의 fraction collector로는 Frac-100 (Pharmacia fine Chem. Co.)을 사용하였다. Peak가 높게 나타난 fraction (tube numbering) 것만 회수 사용시까지 -20℃ 보존하여 사용하였다.

5) Anti-BSA antibody의 제거

항BSA항체의 제거 즉 흡착을 위한 최적조건 설정을 하기 위하여 반응시간, 용량, 온도의 변화 등에 대한 예비실험 결과 항원항체반응

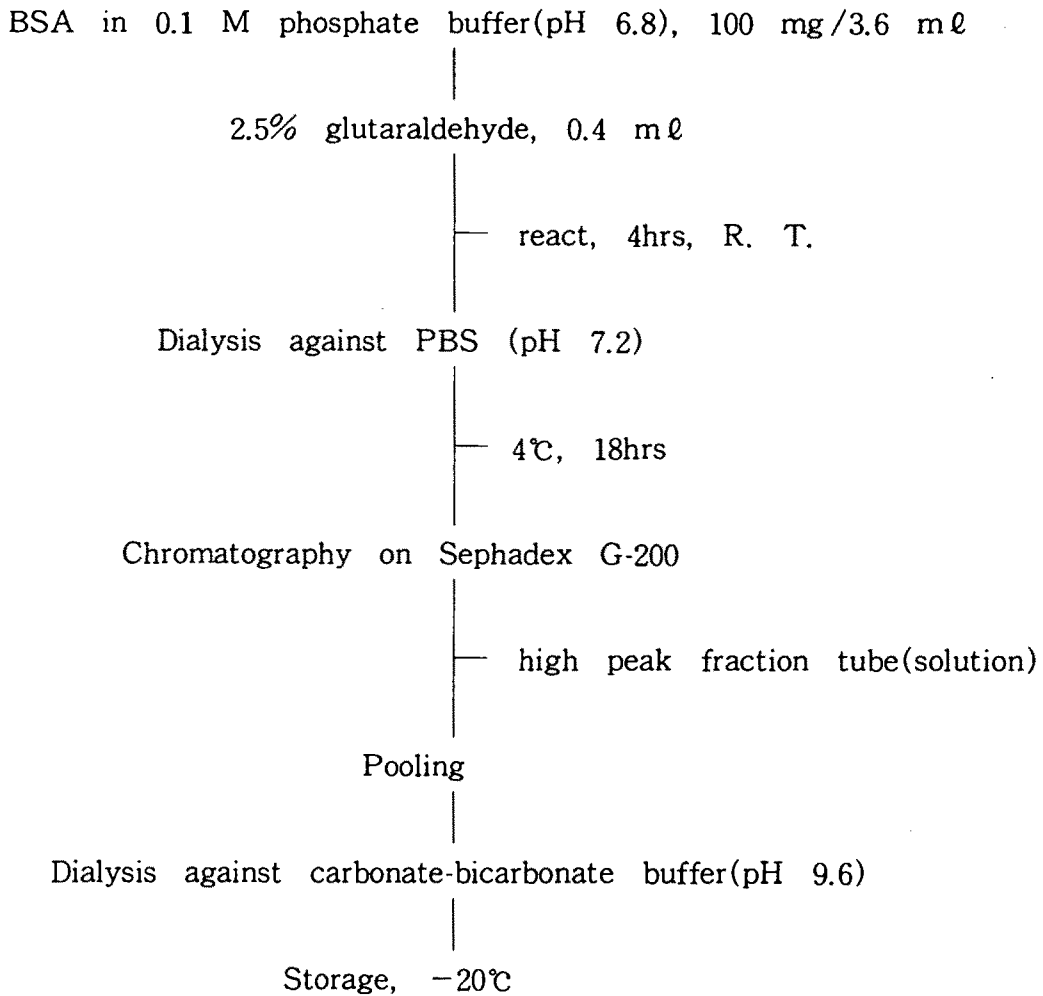


그림 4. Polymerization of BSA monomer by glutaraldehyde

자체는 오히려 monomer BSA가 적합하였다.

항BSA polymer로 하여 다크론성 항혈청을 일정량 넣은 후 이의 2배 이상 용량의 BSA polymer를 넣어 잘 혼화시켜 8,000rpm, 30분간 (4°C)으로하여 상층액을 회수, 또는 column통과시켜 측정 한 결과 항 BSA항체는 전혀 검출되지 않았고 항 progesterone항체만을 검출 할 수 있었다.

6) 교차반응 검사 및 앞서 획득한 단크론성 항혈청 및 단크론성 association constant(KA)분석 항혈청에서의 교차반응 검색은 progesterone과 관련이 깊은 스테로이드계 호르몬으로 하여 실시하였다. 이와 동시에 단크론성 및 다크론성 항혈청에 대한 KA치를 Scatchard분석에 의거 구하였다.

제 3 절 ELISA기법 개발 실시전의 조건 검토

1. 측정실시전의 조건 검토

1) Coating buffer의 조건

ELISA 측정에 있어서 중요시 되고 있는 어려움중의 하나가 coating buffer의 조건이 되고 있어 각종 예비실험을 실시한 결과 Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g 및 NaN_3 0.3g을 증류수 1000ml에 용해 한 다음, pH 9.6으로 조정하여 4℃에 보존하면서 사용한 것이 가장 안정적이었다.

2) Assay buffer의 조건

Assay buffer는 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 195ml와 0.2 M Na_2HPO_4 305ml 를 섞고 여기에 8.7g의 NaCl 과 1.0g의 BSA를 넣고 증류수로 1000ml가 되게 만들어 (0.1% BSA 용액) 4℃에 보존 하면서 사용한 것이 일정한 반응을 나타내었다.

3) Washing solution

Washing solution으로는 여러종류가 있으나 본 연구결과에서는 0.05%

Tween 20이 함유된 0.15M NaCl을 사용함이 좋았다.

4) Enzyme conjugate

Conjugate로는 progesterone - 3 - O - carboxymethyloxime - horseradish - peroxidase(Cappel Co.)로 1:20,000의 희석배율이 결과치가 높게 나타났다.

5) 기질액의 stock solution

0.05M Citrate(anhydrous), pH4.0, 40mM ABTS(2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt와 30% H₂O₂의 2.0%농도의 첨가가 가장 발색이 좋았다.

Working solution은 10mℓ per plate로 계산하여 아래와 같이 하여 실시하였다.

Desired volume(mℓ)	0.05M Citrate	2.0% H ₂ O ₂	40mM ABTS
25mℓ 기준시	24.6mℓ	80μℓ	250μℓ
50mℓ 기준시	49.4mℓ	160μℓ	0.5mℓ

6) 반응정지액의 stock solution

0.15M HF(hydrofluoric acid) + 0.006M NaOH, 1.0M ethylenediamine tetraacetic acid-disodium salt(EDTA-2Na)으로 조제하여, 사용함이 좋았다.

사용할 때에는 10mℓ per plate로 계산하여 앞서와 같은 방법으로 다음과 같이 하여 실시하였다.

Desired volume(ml)	0.15M HF Soln. (ml)	1.0M EDTA
25ml 기준시	25	25 μ l
50ml 기준시	50	50 μ l

7) 표준 용액의 stock solution

progesterone(4-Pregnene-3,20-dione : Sigma, Chem. Co., U. S. A.) 1mg을 10ml의 ethanol로 용해시켜 100,000pg/ul의 농도로 만든 후 ethanol(James Burrough(F. A. D.)Ltd., U. K.)로 희석하여 10,000ul/ml (A), 1,000ul/ml (B), 100ul/ml (C), 10ul/ml (D)의 농도로 만들어 즉시 -20°C 에 보존하면서 사용 하거나 수일 이내 사용할 때에는 4°C 에 보존, 사용하여도 아무런 문제가 없었다.

사용할 때에는 Stock된 표준용액을 이용, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20ng/ml의 농도로 하여 $65^{\circ}\text{C} \sim 68^{\circ}\text{C}$ 의 water bath 속에서 증발, 건조시킨 후 2.5ml의 enzyme-conjugate를 분주시킨 후 15초간 vortexing하여 사용하였다.

2. Progesterone 측정

측정코자 하는 검체 샘플 100 μ l를 13 \times 100mm 시험관에 넣고 N-hexane 2ml를 분주하여 2분간 vortex 한 후 -70°C 냉동고에 30초 이상 정치하여 검체 샘플을 완전히 얼린 다음 상층액의 추출액을 12 \times 75mm시험관에 옮겨 37°C incubator 또는 60°C 에서 휘발건조 시켰다. 휘발 건조된 시험관에 50 μ l 최적량(본 연구에서는 50 μ l)의 conjugate를 분주한 후 15초간 vortex시켜 재 부유시켜 사용하였다.

앞서 획득한 progesterone 항혈청은 coating buffer로 1:5000으로 희

석하여 각 well에 $50\mu\ell$ ($50\mu\text{g}/\text{ml}$)씩 분주한 후 4°C 에서 overnight시켜 coating하였다. Coating 후 5회 세척하고 EIA buffer를 well 당 $50\mu\ell$ 씩 분주한 후 sealing하여 상온에서 2시간 감작시켰다. 감작 후 washing solution으로 5회 반복 세척한 다음 기질액을 well당 $100\mu\ell$ 씩 각 well에 분주하고 seling하여 상온에서 1시간 감작시켰다. 감작 후 반응정지액을 well당 $100\mu\ell$ 씩 분주하여 반응을 정지시켰고, 반응 후 흡광도 측정은 ELISA Reader(Dynatech MR700, Dynatech Lab., U. S. A)로 파장 $405\sim 410\text{nm}$ 에서 측정하였으나 기본적인 protocol은 그림 6(제 4절 내용중에 포함되어 있음)과 같이 하여 실시하였다.

검체 샘플로는 혈액은 3,000rpm, 20분간 저온원심분리(4°C)시켜 혈청 또는 혈장을 회수하여 사용하였고 유즙은 같은 조건으로 지방층을 완전 제거시킨 탈지유(skim milk)를 사용하였다.

제 4 절 연구결과

1. progesterone에 대한 항체가 및 結合定數(association constant)

종래의 면역접종방법에 의하여 획득한 다크론성 항혈청에서의 항체를 RIA 및 ELISA로 분석한 결과 RIA 및 ELISA 관계없이 1.5×10^5 이었으나 오차범위는 RIA가 9.8%로 ELISA 7.8%로 RIA가 높았다.

단크론성 항혈청에서의 항체는 RIA 및 ELISA에 의거 분석한 결과 2×10^6 으로 다크론성 항혈청에서의 항체가 보다 높았다.

결합정수는 다크론성 항혈청에서는 2×10^9 , 단크론성 항혈청에서는 2×10^{10} 이었다.

2. 교차반응율

다크론성 항혈청 및 단크론성 항혈청에서의 progesterone을 표준 (100%)하여 이와 유사한 스테로이드계 홀몬에 대한 분석결과는 각각 다음과 같았다(표1, 표2 참조).

표 1, 2에서 알수 있는 바와 같이 단크론성 항혈청에서의 교차반응율은 다크론성 항혈청에서 보다 낮게 나타나 다크론성 항혈청보다 우수함을 알 수 있었다. 다크론성 항혈청을 사용한 교차반응에서 pregnenolone과는 0.002%, estrogen과는 0.0001%, testosterone과는 0.118%로 1% 이내로 매우 낮았다. 11α -deoxycorticosterone과는 2.271%로 다소 높았으나 NaKaO가 보고한 pregnenolone과는 19.52%, 11α -deoxycorticosterone과의 10.11%에 비교하여 볼 때 매우 낮음을 알 수 있었다. 이와 같은

표 1. 다크론성 항혈청에서의 교차반응

Steroids	Cross-reaction(%)
Progesterone	100.0
Pregnenolone	0.002
Estrone	0.0001
Estradiol- 17β	0.003
Aldosterone	0.009
Hydrocortisone(Cortiol)	0.008
Cortisine	0.009
Corticosterone	0.999
Testosterone	0.118
11α -deoxycorticosterone	2.271

표 2. 단크론성 항혈청에서의 교차반응 및 50% binding(B-50%)

Steroids	B-50%	Cross-reaction(%)
Progesterone	85pg	100
Pregnenolone	5.5pg	0.002
Estorne	100 μ g	0.116
Estradiol-17 β	45 μ g	<0.001
Aldosterone	1.05 μ g	<0.001
Hydrocortisone (cortisol)	1.2 μ g	0.008
Cortisone	1.00 μ g	0.007
Corticosterone	8.7ng	0.009
Testosterone	73ng	0.997
(11 α -dehydrocycortisone)	3.9ng	2.179

결과는 progesterone의 다크론성 항혈청에서도 carrier protein으로 이용된 bovine serum albumin(BSA)에 대한 항BSA항체가 상당량 존재하기 때문으로 생각되며 본 연구에서는 항 BSA항체 제거가 매우 의의가 클 것으로 판단되었다.

Munro등 역시 progesterone을 자체적으로 작제하여 사용한 ELISA에서 측정감도는 낮았는데 이것 역시 항BSA항체의 존재가 측정에 크게 간섭한 결과로 보고한 바 있어 여기에 의한 간섭 가능성이 큰 것으로 생각된다.

본 연구에서는 획득한 progesterone항혈청에서도 상당량의 항BSA항체를 함유(항체가 2×10^4)하고 있음이 확인되어 이의 제거(흡수)가 절실히 필요함을 느낄 수 있었다.

3. Bovine serum albumin(BSA)의 重合體

Irshad등이 사람의 B형간염의 표면항원(hepatitis B surface antigen, HBsAg)을 BSA重合體로 만들어 검출한 보고의 내용에 근거하여 앞서 밝힌 방법(그림 4.참조)에 의하여 중합시킨 BSA重合體생성은 2.5% glutaraldehyde용액이 가장 좋았고 획득한 분자량 크기는 5×10^5 이었다.

4. 항BSA항체의 제거

항BSA항체의 제거는 획득한 다크론성 항혈청을 앞서의 BSA重合體로 37℃, 30분간 incubation에 이어 10,000rpm, 20분간 원심분리 또는 8,000rpm, 30분간(4℃)원심분리한 상층액에서는 전혀 검출(존재)되지 않았다. 대조확인을 위하여 BSA농도를 $0.1 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 로 하여 BSA重合體를 10^{-6} 배 희석시켜 ELISA측정한 결과에서도 뚜렷한 양성(검출)반응을 나타내어 앞서의 과정에서의 항BSA항체의 완전제거(흡수)를 확인할 수 있었다.

제 5 절 ELISA기법 조건검토

1. 재현성 조사

1) 측정내 변동계수(intra-assay coefficient of variation)

본 실험계의 재현성을 조사하기 위하여 소의 혈청을 이용하여 6회에 걸쳐 실시한 측정내 변동 계수를 조사한 성적은 4.5%로 오차범위가 매우 낮았다(표 3. 참조).

Progesterone농도는 ng/ml로 하여 나타내었다.

표 3. Intra-assay precision of the analysis for progesterone concentration

Indicator	Replications						Mean±SD*	C.V.(%)***
	1	2	3	4	5	6		
Optical density	0.230	0.227	0.234	0.243	0.229	0.220	0.230±0.007	
% Bound**	22.9	22.7	23.4	24.3	22.9	22.0	23.0 ±0.699	
Progesterone	5.8	6.0	5.6	5.4	5.7	6.2	5.8 ±0.261	4.5

* : SD=standard deviation

** : % Bound=E/E0×100., E:absorbance reading of sample
E0:absorbance reading of zero standard

*** : C.V.=coefficient of variation.

2) 측정간 변동계수(inter-assay coefficient of variation)

표 4에서와 같이 개체가 다른 4마리의 유우의 혈액을 대상으로하여 각 개

표 4. Inter-assay coefficient of variation of analysis for progesteroneconcentration

Repli- cation	Pool A		Pool B		Pool C		Pool D	
No.	%Bound*	P ₄ (ng/ml)***	%Bound	P ₄ (ng/ml)	%Bound	P ₄ (ng/ml)	%Bound	P ₄ (ng/ml)
1	90.9	0.19	85.7	0.29	45.3	1.55	30.2	3.6
2	90.5	0.20	81.5	0.36	41.7	1.80	30.5	3.5
3	88.4	0.23	82.9	0.34	43.8	1.70	26.8	4.3
Mean±S.D	89.7±1.1	0.21±0.02	83.4±1.76	0.33±0.03	43.6±1.47	1.68±0.1	29.2±1.7	3.8±0.36
C.V.(%)	1.2	8.2	2.1	8.8	3.4	6.1	5.7	9.4

* : % Bound=E/E0×100, E : absorbance reading of sample
E0 : absorbance reading of zero standard

** : C. V. =coefficient of variation.

*** : P₄(ng/ml)=progesterone(ng/ml).

체별로 똑 같은 시료(혈청)에서의 3회 반복 실시한 progesterone농도의 측정간 변동계수는 6.1%에서 9.4%까지의 범위이었다.

Bound %에 대한 변동계수는 개체별의 progesterone농도에 따라서 차이는 컸으나 변동계수는 1.2%에서 5.7% 범위 이내로 매우 낮았다.

2. 회수율 조사

예비실험 결과 progesterone농도가 확인된 개체의 progesterone농도(0.25ng/ml)를 기준으로 한 대조군과 여기에다 일정량(1.0ng/ml)을 첨가한 상태에서의 회수율은 표 5와 같았다.

표 5. Recovery rate of added progesterone to bovine serum

Progesterone added(ng/ml)	Initial concentration (ng/ml)	Calculated concentration (ng/ml)	Recovery rate (%)
0	0.25	0.25	100.0
1.0	0.25	1.12	89.4
2.0	0.25	2.06	91.6

이상에서 알 수 있는 바와 같이 progesterone농도(0.25ng/ml)를 기준으로 하여 여기에 1.0ng/ml를 첨가한 상태에서 1.12ng/ml로 89.6%의 회수율을, 2.0ng/ml를 첨가한 상태에서 2.06ng/ml로 91.6%의 회수율로 평균 90% 이상의 회수율을 나타내었다.

제 6 절 ELISA기법 확립

지금까지의 결과를 바탕으로 하여 ELISA기법 확립을 위하여 측정감도

및 표준곡선을 일차적으로 구하였다. 현장에의 활용을 위한 샘플로 혈액에서는 혈청 또는 혈장을, 유즙은 탈지유에 대한 전처리과정을 단계적으로 실시한 후 본 연구에 착수하였다.

1. 표준곡선

ELISA system개발 조건 검토에서의 최적조건에 맞추어 실시한 결과는 그림 5와 같았다.

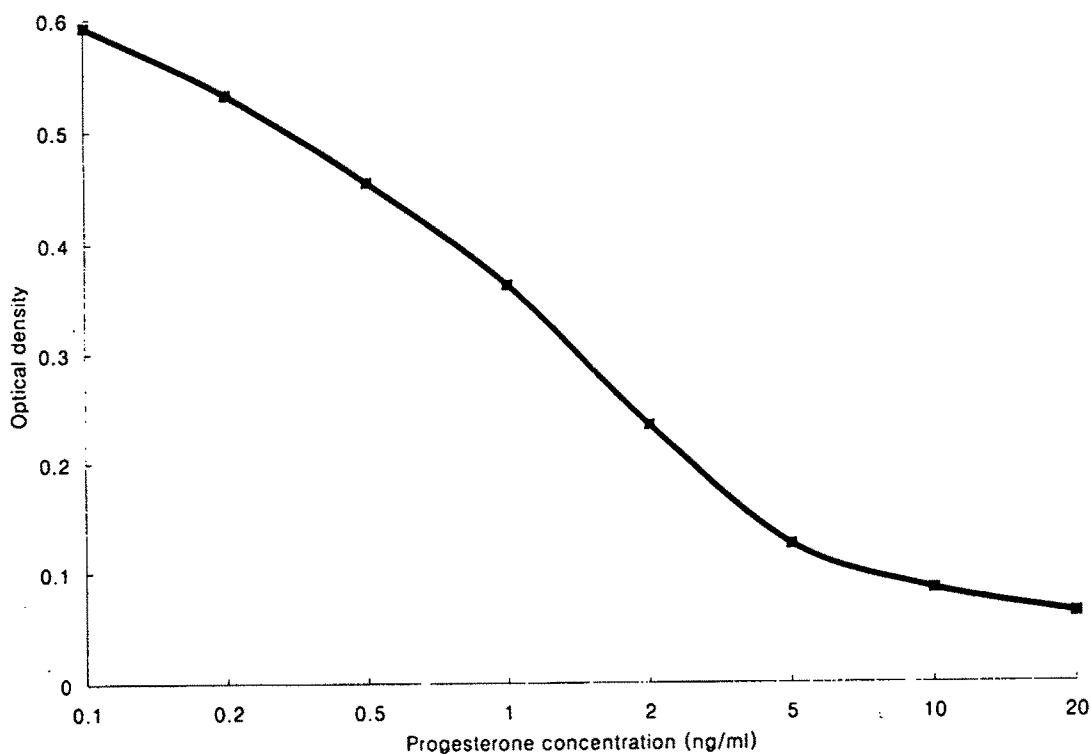


그림 5. Standard curve for enzyme-linked immunosorbent assay of progesterone.

2. ELISA 기법

기본적인 실시기법은 그림 6과 같이 하여 실시하였다.

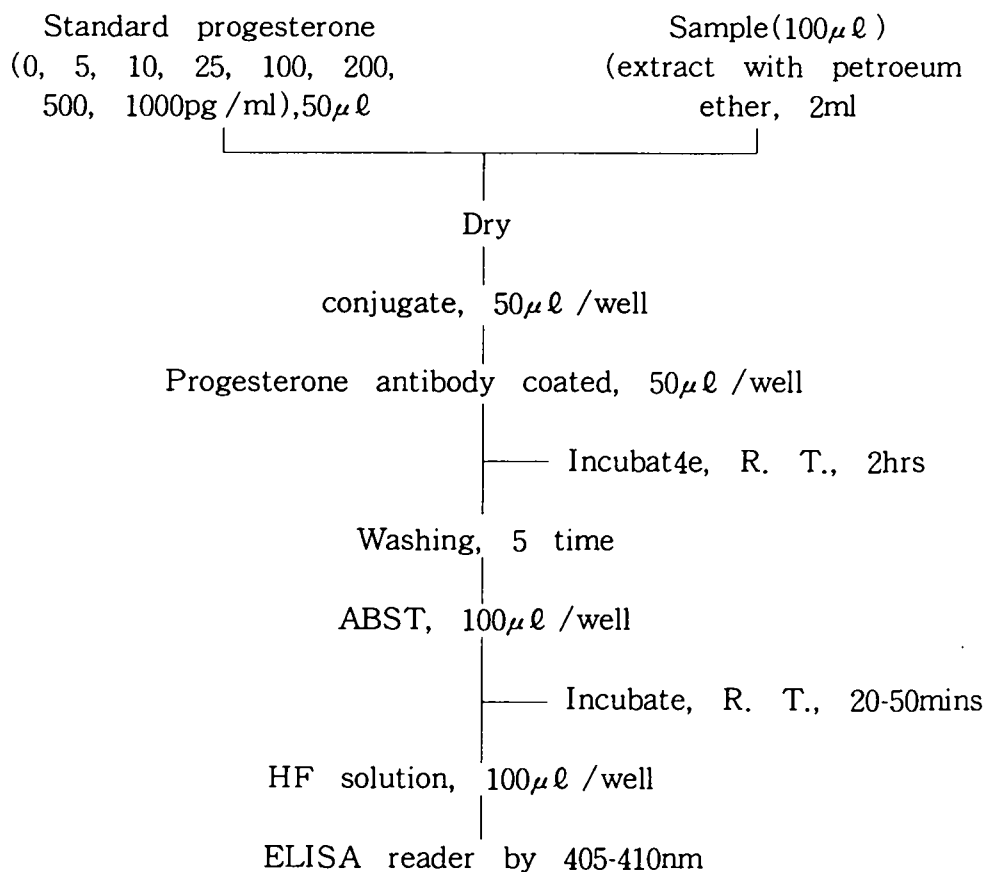


그림 6. Enzyme-linked immunosorbent assay for progesterone concentration

3. 측정감도

표준곡선에 대한 최소 측정감도는 0.2pg /well로 매우 높았다.

제 7 절 고 찰

국내의 축산농가, 낙농가들이 가장 고민하고 있는 대상의 하나가 각종 요인에 의한 번식장애의 피해임은 이미 입증된 상태에 있다. 번식장애에 의한 피해를 줄이기 위한 노력은 팔목한만한 상황이나 좀처럼 개선되지 않고 있는 실정에 있음은 주지의 사실이다. 선진외국에서도 각종 방법이 동원되고 있으나 이 중 하나가 홀몬분석법이 되고 있다.

가장 큰 이유중의 하나가 초기에, 언제라도 가능하다는 점이라 할 수 있겠다. 그러나 여기에서도 해결해야 할 여러 문제점이 내재하고 있다. 항혈청의 항체가를 포함한 안정되면서도 재현성이 높은 기법개발이 절실히 요구되기 때문이다. 그러면서도 특수한 시설과 장소를 요구하지 않고 환경오염 등의 문제가 없는 분석법의 개발에 주력하지 않을 수 없는 상황에 있다.

효소를 표지물질로 사용하는 enzyme immunoassay(EIA)에 의한 progesterone농도의 측정은 Dray 등에 의해 실시 되었으나 종래의 일항체법에 의한 액상상태에서의 측정에서는 항원 항체반응이 미약해 측정감도가 낮고 측정내 변동계수 및 측정간 변동계수가 높아 어려움이 있었다. 일항체법을 개선한 액상의 EIA인 이항체법에서는 특이성 뿐만 아니라 정도에서 일항체법과는 달리 RIA와 비교해서도 조금도 손색이 없음이 입증되고 있으나 측정계 하나 하나에 대한 조건설정이 되어야 하는 난점을 안고 있으며, 항체에 결합된 항원과 결합되지 않은 항원(B/F)을 분리 하기 위해 원심분리등의 번거로운 과정을 거쳐야 했다.

이에 비해 고상법은 비교적 조작이 간편하고 신속히 수행할 수 있어 임상영역에 응용할 수 있는 가능성이 높다. 본 연구에 사용한 방법은 Munro와 Stabenfeldt의 방법을 약간 변형한 고상법으로 측정감도,

회수율, 재현성에 있어서 보고된 RIA 성적과 비교할 때 손색이 없는 것으로 생각된다.

고상법의 단점으로 지적되고 있는 이른바 “모서리 현상(edge effect)”에 대하여 Arnstadt 와 Cleere는 coating 시에 감작조건을 조절하면 well간의 변동을 1-3% 정도로 줄일 수 있었으며, 그러한 결함이 있는 plate라면 안쪽 60 well만 사용 하면 이 변동을 줄일 수 있다고 하였다. 본 실험에서도 edge effect라고 생각되는 변동은 일어나지 않아서 Arnstadt 와 Cleere의 주장을 확인할 수 있었다.

Webb 등은 소의 혈장 progesterone을 RIA 법으로 재현성을 조사한 바 측정내 변동계수가 4.0ng/ml 이하 농도에서는 4.8%, 4.0ng/ml 이상에서는 13.2%이며 측정간 변동계수는 12.1%였다고 하였고, Hoffmann 등은 RIA로 3-7%라고 하였고, Heap 등은 RIA로 우유에서 18.9%를 보고한 바 있다. EIA법으로 재현성의 측정은 Arnstadt와 Cleere에 의하면 우유중에서 측정내 변동계수는 4.8-7.7%, 측정간 변동계수는 7.4-9.2%였다고 하였으며, Cleere 등은 소의 혈장내 progesterone 농도 측정에서의 측정내 변동계수는 5%를 넘지 않았으며 측정간 변동계수는 9%정도였고 우유중에서는 측정내, 측정간 변동계수는 8-13%로 보고하였다. Kamonpatana 등은 측정내 변동계수는 13.56%, 측정간 변동계수는 13.45%를 보고 하였다.

본 실험에서는 측정내 변동계수는 4.5%, 측정간 변동계수는 6.1-9.4% 로서 Webb 등과 Kamonpatana 등의 성적보다는 낮고 Hoffmann 등과 Arnstadt 와 Cleere의 성적과 유사한 결과를 나타내어 재현성이 양호한 것으로 생각된다.

Nakao는 EIA 액상법에 의한 회수율은 $98.1 \pm 11.4\%$ 였다고 하였으며, Kamonpatana 등은 EIA법으로 0.5ng/ml첨가 시는 110%, 2.5ng/ml첨

가 시는 71.24%의 회수율을 보고했고, Cleere 등은 혈장에서는 81.4-92%, 우유에서는 98-106.4%의 회수율을 보고한 바 있다. Hofmann 등은 RIA법에 의해 93-100%의 회수율을 보고 하였으며, Wendorf 등은 89%의 회수율을 보고하였다.

본 실험에서의 회수율은 1.0ng/ml첨가시에 88.0%, 2.0ng/ml첨가 시에는 88.9%로서 Kamonpatana 등의 성적보다는 약간 높았으나, Cleere와 Wendorf등의 성적과 유사한 회수율을 나타내었고 최소 측정 감도는 0.2pg/well로 매우 높아 본 연구에서의 결과의 분석법 확립은 매우 안정되면서도 활용이 충분한 것으로 입증되었다.

제 8 절 참고문헌

1. Arnstadt, K. I. and W. F. Cleere. 1981. Enzyme-immunoassay of progesterone in milk from cows. J. Reprod. Fert. 62:173-180.
2. Arnstadt, K. I. 1983. Steroid determination in milk by enzyme-immunoassay (EIA). Steroid Biochem. 19(1):423-424.
3. Cleere, W. F., et. al. 1984. A high performance, high through-put enzyme immunoassay for the analysis of progesterone in plasma or milk. Irish Veterinary Journal 39:6-14.
4. Dray, F., J. M. Andrieu and F. Renaud. 1975. Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using β -galactosidase as label Biochemica at Biophysica Acta 403:131-138.

5. Heap, R. B., et. al. 1976. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. *Br. Vet. J.* 132(5):445-464.
6. Henricks, D. M., et. al. 1971. Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer. *J. Animal Science* 33(2):450-454.
7. Hoffmann B, et al. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle ; Methodological approaches and present status of application in Germany. *Br. Vet. J.* 1976;132(5):469-476.
8. Hooker, C. W. and T. R. Forbes. 1947. A bio-assay for minute amounts of progesterone. *Endocrinology* 41:158-163.
9. Irshad M, Gandhi BM, Chawla TC, et al. Studies on Hb5 Ag binding with polymerised human serum albumin by ELISA. *J virol Meth* 1987;16:75-85.
10. Kamonpatana, M., et. al. 1979. Oestrus control and pregnancy diagnosis in the swamp buffalo : comparison of enzymeimmunoassay and radioimmunoassay for plasma progesterone. *Theriogenology* 11(5):399-406.
11. Kang, C. B. et. al. 1985. Optimization of immunoassay procedures for the measurement of progesterone. *Korean J. Anim.*

Reprod. 9(2) 105-112.

12. Kang, C. B., H. J. Lee and S. Y. Choe. 1991. A study on production of early pregnancy diagnostic kit in cattle. I. Production of polyclonal antibody to progesterone and removal of anti-bovine serum albumin antisera. Korean J. Vet. Res. 31(2):217-222.
13. Kang, C. B., H. J. Lee and S. Y. Choe. 1991. A study on production of early pregnancy diagnostic kit in cattle. I. Production of early pregnancy diagnostic kit. Korean J. Vet. Res. 31(2):223-228.
14. Kishimoto, Y., H. Kato and M. Mitani. 1987. Enzyme immunoassay of progesterone in bovine plasma and skim milk and its application to early pregnancy diagnosis. J. Japan Vet. Me. Asso. 40:161-164.
15. Marcus, G. J. and A. J. Hackett. 1986. Use of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extraction. J. Dairy Sci. 69:818-824.
16. Meisterling, E. M. and R. A. Dailey. 1987. Use of concentrations of progesterone and estradiol-17 β in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. J. Dairy Sci. 70:2154-2161.

17. Munro, C. and G. Stabenfeldt. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocr.* 101:41-49.
18. Nakao, T. 1980. Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta Endocr.* 93:223-227.
19. Pennington, J. A., S. L. Spahr and J. R. Lodge. 1976. Factors affecting progesterone in milk for pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Br. Vet. J.* 132(5):487-496.
20. Pennington, J. A., L. H. Schultz and W. F. Hoffmann. 1985. Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding: Field study in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 68:2740-2745.
21. Pope, G. S., et. al. 1976. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br. Vet. J.* 132(5):497-506.
22. Sauer, M. J., J. A. Foulkes and P. M. O'Neill. 1982. Use of micro-titre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk: application of heterologous systems for improved sensitivity *Br. Vet. J.* 138:522-532.
23. Shemesh, M., N. Ayalon and H. R. Lindner. 1973. Early pregnancy diagnosis based upon plasma progesterone levels in the cow and ewe. *J. Anim. Sci.* 36(4):726-729.

24. Short, R. V. 1958. Progesterone in blood. I. The chemical determination of progesterone in peripheral blood. J. Endocr. 16:415-425.
25. Short, R. V. and I. Levett. 1962. The fluorimetric determination of progesterone in human plasma during pregnancy and the menstrual cycle. J. Endocr. 25:239-245.
26. Van der Molen, H. J. and A. Aakvaag. 1967. Determination of progesterone in human peripheral blood using gas-liquid chromatography with electron capture detection. J. Clin. Endocr. Met 25 : 1625-1629.
27. Webb, R., et. al. 1980. Plasma progesterone and gonadotrophin concentrations and ovarian activity in post-partum dairy cows. J. Reprod. Fert. 59:133-143.
28. Wendorf, G. L., M. S. Lawyer and N. L. First. 1983. Role of adrenals in the maintenance of pregnancy in cows. J. Reprod. Fert. 68:281-287.
29. Yokota, O., et. al. 1985. Heterologous enzyme immunoassay of progesterone in serum and milk from farm animals. J. Coll. Dairying 11:141-161.
30. 金相哲, 趙忠鎬, 李光源. 젖소 繁殖障碍의 發生現況 및 治療 후 受胎率에 관한 調査研究. 大韓獸醫學會誌. 26(1) 163-174(1986).

제 3 장 초기 임신진단 및 분만 후 난소기능 회복판정에의 활용

제 1 절 서 설

유, 한우의 생산성 향상을 위해서 현장에서 절실히 요구되고 있는 것으로는 초기임신진단 못지 않게 중요한 것 중의 하나가 자궁을 포함한 난소의 기능회복에 있다. 난소의 기능회복이 빨라야 분만간격의 단축(정상화)이 이루어질 수 있기 때문이다. 혈액 및 유즙중 progesterone농도의 측정은 특히 소에서 黃體의 기능을 추측하는 방법중의 하나로 인식되고 있다. 가축번식영역에 있어서도 授精適期の 판정, 繁殖障礙 및 妊娠의 早期診斷 나아가 卵巢疾患에 대한 치료의 효과판정 등에 응용되어 그 실용성이 주목되고 있다. 이 중 progesterone농도의 측정에 의한 임신진단은 Shemesh 등이 혈액에서 보고한 이래, 최근에는 시료채취가 용이한 유즙, 분변 및 타액까지도 활용되고 있는 상황에 있다. 혈중 progesterone농도 측정에 의한 임신판정 기준과 그 정확성에 대하여 Wishart등은 3.0ng/ml 이상으로 그 적중율은 89.9%로 보고하였다. 한편 국내에서 鄭과 金은 유우 및 한우에서 3.6-3.9ng/ml 이상, 申은 한우에서 $4.23 \pm 1.00\text{ng/ml}$ 로 보고한 바 있다.

이상적인 번식효율의 지표로서는 첫 수태율 90%, 분만간격 360일을 제시하고 있으나, 국내의 유, 한우의 분만간격은 보고자에 따라 다르지만 369-455일, 또는 그 이상으로 저수태성이 크게 문제가 되고 있다. 따라서 번식효율의 低調, 舍飼와 방목우간의 progesterone농도의 변동요인, 임신양성 기준치에 대한 보고자간의 차이 등은 앞으로 progesterone농도

측정에 의한 유, 한우의 조기임신 진단의 실용화라는 관점에서 보다 상세한 검토가 절실한 상황에 있음은 너무도 당연하다 하겠다. 본 연구에서는 자연발정시에 인공수정을 실시한 유, 한우를 대상으로 수정일을 기준으로 하여 2일 간격으로 하여 수정후 24일까지에(실제는 이후도 계속) 걸쳐 혈액 및 유즙중의 progesterone 농도를 측정하여 여기에 기초한 조기임신진단을 실시하여 그 활용성 여부의 검토를 실시토록 하였다.

분만간격의 단축(정상화)이 동시에 이루어져야 축산업의 정착화에 크게 기여할 수 있는데 유, 한우의 이상적인 분만간격은 1년(12개월)으로 이내로 수행될 수 있도록 하기 위해서는 분만후 빠른 시일내, 가능하면 45일 이내, 늦어도 60일 이내에는 난소의 기능회복이 되어져 발정주기가 인정되어 분만후 늦어도 3개월 이내에 수태를 시켜야 하나 현실적으로는 많은 어려움이 있다. 분만 후 발정재귀의 지연 즉 분만간격의 지연에는 여러 가지 요인이 관여하고 있음은 잘 알려져 있는 사실이나 현장에서의 어려움은 난소의 기능회복 여부를 정확히 파악하여 이상이 인정될 때에는 상황에 알맞는 처치가 시행되어져야 하나 실제 임상에서 자궁 및 난소의 기능회복 여부를 종래의 임상검사(직장검사)만으로 파악하기는 어렵고 고도로 숙련된 수의사가 아니고서는 판단하기 어려운 문제로 되어 있어 어려움이 많다.

분만 후 자궁을 포함한 난소기능회복 및 첫 배란시기를 progesterone 농도의 측정에 의하여 가능한 것이 밝혀져 가고 있어 조기임신진단과 동시에 난소의 기능회복 여부에 활용코져 분만상황에 관계없이 유우의 유즙을 재료로 하여 실시코져 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 공시동물

개체별 번식기록과 관리가 확실하고 성주기가 확인된 50두 이상의 착유우를 보유하고 있는 목장의 유우(Holstein)와 20두 이상의 한우를 보유하고 있는 목장을 대상으로 하여 실시하였다. 본 연구에 사용된 유, 한우의 산차수는 1-7산차(평균 3.4), 연령은 2-10(평균 5.2)년이었다.

발정감정은 통상적인 종래의 발정증후의 관찰 및 직장검사에 의한 성숙난포의 확인으로 실시하였다. 발정감정이 어려운 경우는 개체별 기록에 의거 홀몬 분석 후 이를 성주기와 관련시켜 판단, 이후의 재료로 사용하여 조기임신진단에 활용하였다.

분만 후의 난소기능 회복여부 판정에의 활용을 위한 공시동물로는 경산우(Holstein) 68두를 분만상황에 관계없이 선정하였으며 산차수는 1-7(평균 2.8)산, 연령은 2-10(평균 5.4)년이었다.

발정관찰 역시 분만 후 10일부터 90일까지 매일 오전, 오후 육안적으로 관찰하였고 직장검사는 원칙적으로 10일 간격으로 하여 실시하였다. 난소기능 회복상태는 progesterone농도의 변화(상승)시기 즉 탈지유종의 농도가 1.0ng/ml 이상일 때를 난소내에 기능황체가 존재하는 것으로 인정하여 기존의 분류방법에 의거 분류하였다.

2. 혈액 및 유즙채취

조기 임신진단을 위한 샘플로 혈액은 공시동물의 경정맥 또는 미정

맥에서 각각 5mℓ를 채혈하여 실온에서 약 1시간 응혈시켜 4℃ 12시간 이상 보존하여 1,500×g로 20분간 원심분리하여 분리한 혈청은 측정시 까지 -70℃에 냉동보존하여 사용하였다.

채취시 Na₂EDTA처리한 혈액은 거의 대부분 1시간 이내에 1,500×g로 같은 조건으로 하여 혈장을 분리, 보존하였다.

유즙채취는 각 공시우로부터 착유직후(後搾乳)의 유즙을 오후 착유시 分房에 관계없이 채취하여 즉시 원심분리가 되지 않을 때에는 즉시 4℃ 냉장고에 보관하여 가능한 한 2시간 이내에 3000×G, 20분간 저온 원심분리하여 상청액인 지방층은 절단시켜 제거한 다음 탈지유만을 채취하여 혈액에서와 같은 요령으로 하여 분석시 까지 -70℃에 보존하여 사용하였다. 유즙은 혈액채취와는 달리 시료채취가 매우 용이할 뿐 더러 유, 한우의 생체반응에 영향이 없을 것으로 판단되어 인공수정 전후, 수정후는 수정당일로 부터 수정후 23-24일경까지의 유즙을 매일 같은 조건으로 채취하여 조기 임신진단에의 활용여부의 검토에는 물론 발정확인 여부에의 가능성도 동시에 검토기로 하였다.

임신 확인은 홀몬분석법 외 수정 후 40일경 전후 때로는 60일을 전후하여 직장검사법에 의하여 실시 하였으며 최종확인 은 이후의 분만여부의 확인을 통하여 실시하였다.

분만후의 난소기능회복 여부판정에의 활용을 위해서는 분만후 10일부터 5일 간격을 원칙으로 하여 90일 까지 앞서와 같은 방법으로 유즙을 채취, 지방층의 완전제거 후 탈지유를 재료로 하여 progesterone농도분석에 사용하였다.

3. 혈중 및 유즙에서의 progesterone농도 측정

혈액은 앞서 언급한 바와 같은 방법으로 하여 혈청 또는 혈장을,

유즙은 탈지유를 각각 이용하여 전처리과정을 거쳐 앞서의 ELISA기법에 의거 실시하였다.

혈청 또는 혈장 및 탈지유에서의 전처리 과정은 sample용량을 각각 $100\mu\ell$ 씩으로 하여 petroleum ether (N-hexane도 무방) $2\text{m}\ell$ 를 첨가하여 완전 용해시킨 후 -70°C 또는 -20°C 냉동고에 30초 이상 보관하여 얼게 한 후 용매제에 함유된 상청액만을 회수하여 60°C 이하의 incubator에서 용매액을 완전 증발시킨 후 분석에 활용하였다(그림 7. 참조).

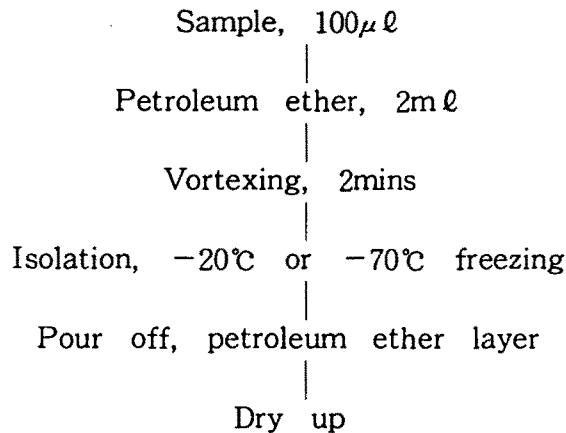


그림 7. Extraction of bovine sample for progesterone assay

4. Progesterone측정에 의한 임신진단

성주기가 확인된 개체에서 progesterone농도가 $1.0\text{ng}/\text{m}\ell$ 이상을 나타내는 개체는 황체기능을 갖고 있는 것으로 판단, 임신진단은 수정후 20-24일경에 $3.0\text{ng}/\text{m}\ell$ 이상을 유지하면서 성주기가 반복되지 않는 경우를 임신양성으로 하였다.

5. 분만후의 난소기능

분만후 10일부터 5일 간격으로 90일까지 유즙에서의 progesterone 농도가 $1.0\text{ng}/\text{m}\ell$ 이면 난소내에 기능황체가 존재하는 것으로 인정하였고 이후 정상 발정(성)주기를 나타낸 것은 난소기능의 회복으로 판정하였으나 분류는 Morino등과 崔 등의 방법에 따라 발정(성)주기를 실시하였다.

제 3 절 연구결과

1. 수정일의 Progesterone농도

앞서의 ELISA기법에 의한 progesterone농도분석과 이후의 확인에서 임신이 확인된 Holstein 76두와 비임신이 확인된 Holstein 23두에서 실시한 수정일(A. I. O) 또는 발정일(DO)에서의 혈청 또는 혈장에서의 progesterone농도는 $0.26\text{-}0.86\text{ng}/\text{m}\ell$ 의 범위로 임신군에서는 $0.36\pm 0.14\text{ng}/\text{m}\ell$, 비임신군에서는 $0.32\pm 0.12\text{ng}/\text{m}\ell$ 를 나타내었으나 임신군과 비임신군에서의 유의성은 인정되지 않았다. 또한 혈청과 혈장에서의 progesterone의 농도 차이는 볼 수 없었다. 탈지유에서의 수정당일의 progesterone농도는 혈청 또는 혈장 보다는 다소 낮았다(0.21 ± 0.04).

정상적인 성주기가 확인된 한우 83두에서 수정일의 임신군에 있어서의 progesterone농도는 $0.21\pm 0.38\text{ng}/\text{m}\ell$, 비임신군에서는 $0.28\pm 0.41\text{ng}/\text{m}\ell$ 로 Holstein유우와 비교하여 크게 차이가 없었다.

2. 수정후 임신우군 및 비임신우군에서의 progesterone의 농도변화

수정당일로 부터 2일 간격으로 채혈과 유즙채취를 실시하여 Holstein 유우에서의 임신군과 비임신군에서의 분석결과는 다음과 같았다(표 6과 표 7 및 그림 8, 9 참조).

표 6. 임신군 및 비임신군에서의 수정후 24일까지의 혈중 progesterone 농도 비교(Holstein)

(ng / m l)

Days after A.I.	Non-pregnant group(N=23)	Pregnant group(N=76)
0	0.32±0.12	0.36±0.14
2	0.58±0.25	0.59±0.27
4	0.81±0.32	0.88±0.36
6	1.96±0.42	1.98±0.34
8	2.87±0.49	2.96±0.52
10	3.88±0.68	3.82±0.64
12	4.75±0.91	4.79±0.93
14	5.02±1.17	5.16±1.22
16	6.13±2.19	6.23±2.26
18	1.97±0.84	6.21±1.30
20	0.83±0.49	5.25±1.41※
22	0.68±0.51	4.73±1.45※
24	0.47±0.50	4.62±1.26※

※ Means significantly different at $P < 0.01$ between non-pregnant group and pregnant group.

표 6에서 보는 바와 같이 정상적인 성주기가 확인된 유우 99두를

대상으로 하여 실시한 결과 인공수정후 18-24일 사이에 발정 재귀현상을 보였거나 이후 확인에서 임신되지 않았던 23두의 비임신군과 임신한 76두에 대한 일령별 경과에서 인공수정후 14, 16일까지는 임신여부에 관계없이 거의 차이를 볼 수 없었다. 그러나 수정 후 20일 이후 부터는 현저한 차이를 나타내었다($P < 0.01$). 비임신군에서는 progesterone 농도는 인공수정후 18일에는 $1.97 \pm 0.84 \text{ ng/ml}$, 임신군에서는 $6.21 \pm 1.30 \text{ ng/ml}$ 이었고 비임신군과 임신군에서의 인공수정후 20일, 22일, 24일에서의 농도는 비임신군에서는 0.83 ± 0.49 , 0.68 ± 0.51 , $0.47 \pm 0.50 \text{ ng/ml}$ 으로 1.0 ng/ml 이하이었으나 임신군에서는 5.25 ± 1.41 , 4.73 ± 1.45 , $4.62 \pm 1.26 \text{ ng/ml}$ 으로 임신군과 비임신군에서의 차이가 커

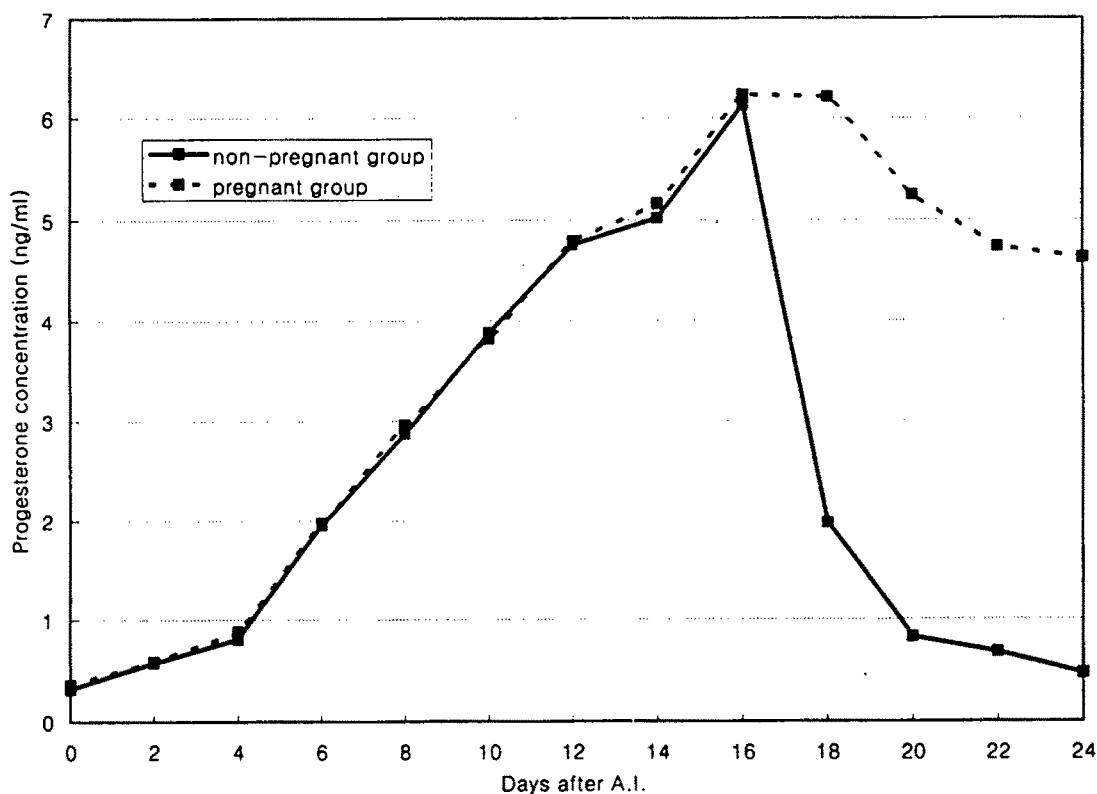


그림 8. 임신군 및 비임신군에서의 수정후 24일까지의 혈중 progesterone농도 비교(Holstein)

($P<0.01$) 조기 임신진단여부에의 활용에는 인공수정후 18일 이후, 가
능하면 20-24일 사이에서의 progesterone측정은 매우 큰 임상적 의의가
있음을 알 수 있었다(그림 8 참조).

이와 동시에 실시한 앞서의 한우에서의 progesterone의 수정후 일령별
(2일 간격) 농도변화는 Holstein유우와 같이 수정후 14, 16일까지는 임
신군, 비임신군 관계없이 차이가 없었으나 수정 후 18일 이후 부터는
뚜렷한 차이를 나타내었다. 수정후 18일에서 부터 24일 까지의 임신군,

표 7. 임신군 및 비임신군에서의 탈지유중의 progesterone농도 비교 (Holstein)
(ng / m l)

Days after A.I.	Non-pregnant (N=23)	Pregnant (N=76)
0	0.18±0.20	0.16±0.18
2	0.32±0.21	0.32±0.20
4	0.68±0.25	0.71±0.18
6	1.65±0.52	1.69±0.43
8	2.71±0.68	2.88±0.69
10	3.42±0.80	3.50±1.08
12	4.15±0.96	4.21±0.92
14	4.88±1.07	4.79±1.99
16	5.26±2.08	5.49±1.24
18	1.82±0.76	5.41±1.30
20	0.66±0.54	5.01±1.25※
22	0.51±0.42	3.86±1.47※
24	0.34±0.25	3.81±1.28※

※ Means significantly different at $P<0.01$ between non-pregnant group
and pregnant group.

비임신군에서의 progesterone농도변화의 페-턴은 유우와 같아 한, 유우(Holstein)구별없이 활용가능함을 알 수 있었다.

혈중 progesterone의 농도 측정과 동시에 동일 개체별에 대한 탈지유에서의 분석결과는 표 7과 같았다.

수정후 18일에서 24일에서의 혈액 및 탈지유에서의 progesterone농도의 변화 폭이 넓지 않고 혈액에서는 3.0ng/ml 이상, 탈지유에서는 0ng/ml 이상으로 나타나 임신으로 판정되었던 76두를 대상으로 수정후 60일을 전후하여 직장검사 결과 72두가 임신으로 확인되어 임신양성 진단율은 94.7%이었다. 최종 분만확인 결과 69두가 정상 분만하여 총 분만두수는 69두로 최종 임신양성 진단율은 90.8%이었다.

이와는 별도로 수정후 20일 이후 부터 혈중 또는 탈지유중의 progesterone농도가 1ng/ml 이하이었던 개체에서의 임신은 Holstein, 한우에 관계없이 이후의 직장검사, 분만상황 기록 확인에서도 비임신으로 확인되어 임신 음성진단율은 매우 낮음을 알 수 있었다.

탈지유중의 progesterone농도 자체는 혈청 또는 혈장에서 보다는 다소 낮게 나타나 수정일에서는 혈액에서는 $0.32 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$, 탈지유에서는 0.18 ± 0.20 내지 $0.16 \pm 0.18 \text{ ng/ml}$ 으로 다소의 차이는 있었으나 수정후 16일까지는 혈액에서와 마찬가지로 유의성 있는 변화는 임신군, 비임신군에서 볼 수 없었다. 수정후 18일 이후 부터는 임신군과 비임신군에서의 변화의 차이가 컸고 progesterone농도의 변화의 페-턴은 혈액에서와 같은 양상을 나타내어 농도자체의 차이는 있어도 기본적인 페-턴에 있어서는 같음을 알 수 있었다(그림 9 참조).

3. 임신기간중의 progesterone농도 변화(Holstein)

임신기간별에 따른 progesterone농도의 변화를 파악하기 위하여 임신

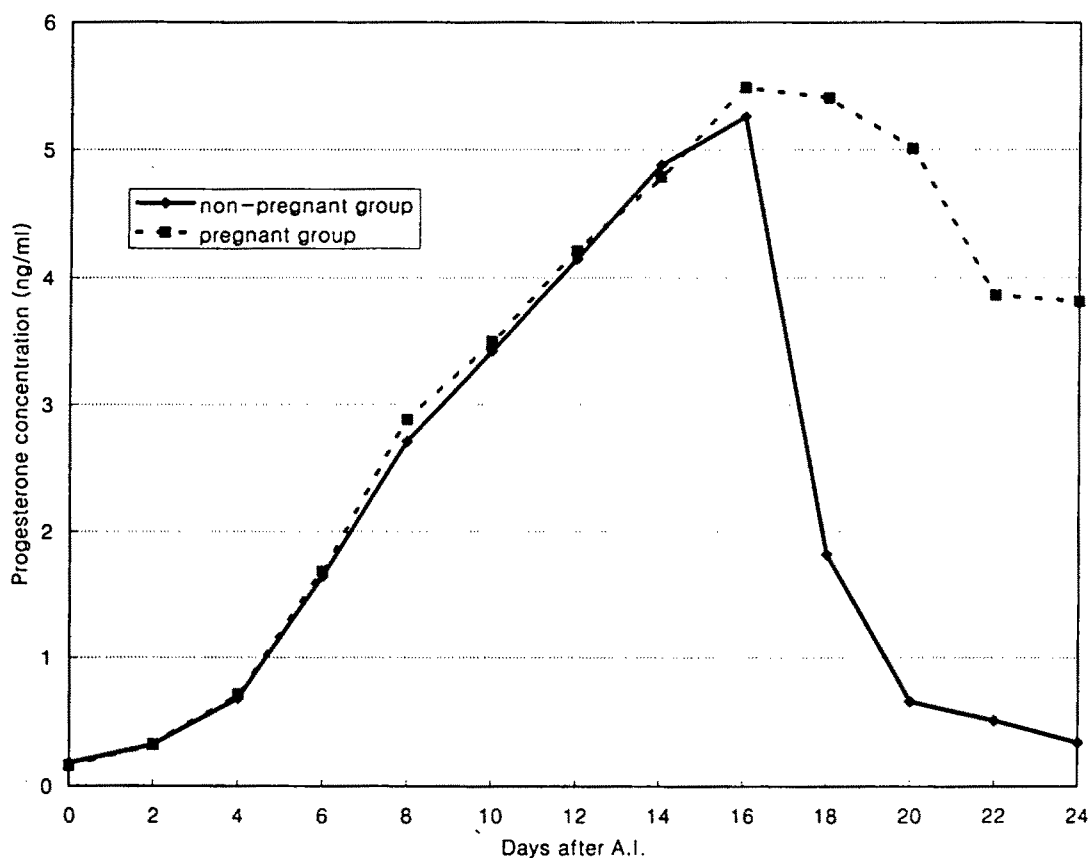


그림 9. 임신군 및 비임신군에서의 수정후 24일까지의 탈지유중의 progesterone농도비교(Holstein)

이 확인된 임신우를 대상으로 조기 임신진단에 이어 1개월 간격으로하여 혈액(혈청 사용)과 탈지유에서의 성적은 표 8과 같았다.

조기 임신진단에 이어 임신이 된 경우의 Holstein에 대한 임신기간 별에 대한 분석을 실시한 결과는 임신기간이 경과할수록 progesterone 농도가 증가하는 경향을 보였으나 5개월 이후 부터는 거의 일정한 수준을 유지함을 알 수 있었다. 혈액과 유즙에서의 차이는 앞서와 같은 경향을 보였으나 시료로서 양쪽 다 활용가능함을 알 수 있었다.

표 8. 임신기간별에 따른 Progesterone농도변화(Holstein), (N=28)

		(ng /mℓ)								
months sample	1 months	2 months	3 months	4 months	5 months	6 months	7 months	8 months	9 months	
Serum	4.2±1.21	3.9±1.42	3.6±1.25	4.1±1.83	7.1±1.12	7.2±1.24	7.1±1.24	6.6±1.83	7.2±1.88	
Skim milk	3.8±1.18	3.4±1.28	3.8±1.51	3.2±1.02	8.2±0.98	6.3±1.26	5.7±1.42	5.9±1.53	6.6±1.46	

조기 임신진단에 이어 임신이 된 경우의 Holstein에 대한 임신기간 별에 대한 분석을 실시한 결과는 임신기간이 경과할수록 progesterone 농도가 증가하는 경향을 보였으나 5개월 이후 부터는 거의 일정한 수준을 유지함을 알 수 있었다. 혈액과 유즙에서의 차이는 앞서와 같은 경향을 보였으나 시료로서 양쪽 다 활용가능함을 알 수 있었다.

4. 분만후의 난소기능 회복상태

분만후 10일부터 90일까지 탈지유중의 progesterone(P4)농도측정에 의한 난소기능회복은 progesterone농도의 상승시기와 이후의 변동 즉 정상 성주기의 발현 여부와 직장검사 소견에 따라 분류하였다(표 9.참조).

분만후 20일 이전에 progesterone농도가 1ng /mℓ 이상으로 상승하고 이어서 정상적인 성주기(발정주기)를 나타낸 Type I(정상형)에는 68두 중 10두로서 14.7%, 분만후 21일부터 60일 사이에 progesterone농도의 상승(1ng /mℓ 이상)에 이어 정상 성주기를 나타낸 Type II(지연형)는 39두로서 57.4%, 분만후 20일 이전에 progesterone농도의 상승(증가)이 있었으나 이후 1ng /mℓ 이하로 계속 지속되다가 50일 이후 정상 성주기를 나타낸 Type III(低値性 周期停止型)은 6두로서 8.8%, 분만후 40

표 9. 분만후의 난소기능 회복상태별에 따른 페-턴(Holstein)

Types	Pattern of P ₄ * profiles	No. of cows (%)	Ovarian states (rectal palpation)	No. of cows (%)
I	Normal	10 (14.7)	Normal	10 (14.7)
II	Cycle delayed	39 (57.4)	inactive ovary	39 (57.4)
III	Cycle ceased with low P ₄ *	6 (8.8)	III-a inactive ovary	4 (5.9)
			III-b follicular cyst	2 (2.9)
IV	Cycle ceased with high P ₄ *	3 (4.4)	Persistent corpus luteum	3 (4.4)
V	Acyclicity	10 (14.7)	V-a inactive ovary	8 (11.8)
			V-b follicular cyst	2 (2.9)
Total		68 (100.0)		68 (100.0)

* P₄=Progesterone

일 이내에 progesterone농도의 상승이 있고 성주기가 인정된 후 3 ng/ml 이상으로 지속되거나 성주기의 발현없이 높게 지속되는 Type IV(高値性 周期停止型)는 3두로서 4.4%, 분만후 80일까지도 자궁의 수복이 되지 않았고 progesterone농도 역시 1ng/ml 이상으로 상승하지 않았던 Type V(無周期型)는 10두로서 14.7%이었다.

이상과 같이 분만후의 난소기능회복 여부에의 활용은 충분히 가능한 것으로 판단되나 보다 더 많은 개체에서의 정밀한 추적이 필요한 것으로 생각된다.

제 4 절 고 찰

소의 조기 임신진단 방법으로 국내에서는 대부분이 직장검사, 최근에는 초음파진단에 의존하여 실시되고 있는 상황에 있으나 여기에는 많

은 경험과 숙련을 요함은 물론이고 더욱이 직장검사의 경우 자체의 한계가 있어 어려움이 많다. 더우기 최근에는 사양, 육종기술의 개발로 소의 비유능력은 크게 향상되어가고 있는 반면 번식장애는 오히려 종전보다 증가하는 추세에 있다. 이와 같은 상황에서 번식장애에 의한 피해를 줄여 생산실적을 향상시키기 위해서는 분만후 빠른 시일내에 난소 또는 자궁의 이상을 조기에 알아내어 조기에 치료하고, 수정후 역시 되도록 빠른 시일내에 적어도 수정후 20일 이내에 알아내어 임신되지 않은 경우는 신속히 여기에 알맞는 대책이 요구된다.

인공수정에 의한 수태율은 선진외국에서도 경산우에서도 대개 50-60%, 미경산우에서는 70-80% 정도이기 때문에 경산우의 경우 적어도 40% 정도는 임신(수태)되지 않는 것으로 생각하여 되도록 빠른 시간내에 임신 감정을 실시하여 수태되지 않은 예에 대해서는 이의 원인을 파악하여 필요한 처치를 하여 신속히 재수정을 실시하는 것이 공태일수의 연장(간격)을 줄이는 지름길이 된다.

일반적으로 노련한 수의사의 직장검사에 의한 소의 임신진단은 수정후 40일 전후(실제는 40일 이후)로 이 시기에 수태되지 않은 것이 확인되더라도 재 수정은 분만후 60일 이후가 된다.

최근에는 국내에서도 여기에 대한 대책으로 소의 혈액 또는 우유중의 progesterone 호르몬 측정이 간편하면서도 매우 정확한 것으로 알려져가고 있어 이의 활용은 생산성 향상에 크게 기여할 것으로 확신된다. 뿐만 아니라 혈액 또는 우유중의 progesterone 농도의 측정은 난소내 황체의 기능을 가늠할 수 있어 분만후 난소기능의 회복상태를 파악하는데에도 이용되고 있다.

소의 발정주기중 progesterone농도는 개체의 차이, 시료의 종류 및 측정방법에 따라서 약간의 차이가 있으나 일반적으로 난소내 기능황체

의 존재유무에 대한 기준치는 혈장, 혈청 및 탈지유에서는 1.0ng /mℓ, 초乳에서는 3.0ng /mℓ 그리고 乳脂肪에서는 30.0ng /mℓ 를 기준으로 하고 있다.

Progesterone농도를 측정하여 조기 임신진단을 실시할 때 그 검사시기는 비임신우의 경우 황체가 퇴행되어 다음 발정주기로 들어가고 임신우에서는 황체가 계속 존속되는 수정후 19-24일에 일반적으로 실시되고 있다. 앞서의 성적에서 나타난 바와 같이 혈액 및 탈지유중의 progesterone농도측정에 의한 조기 임신진단의 가능시기를 검토하기 위하여 비임신우와 임신우를 대상으로 수정후 24일까지 progesterone농도를 측정하였다. 수정후 20일과 24일에 progesterone농도는 비임신우는 1.0 ng /mℓ 이하인 반면 임신우는 3.0 ng /mℓ 이상으로 나타나 기존의 보고들처럼 수정후 20-24일 사이에 탈지유중 progesterone농도의 기준치를 2.0 ng /mℓ 으로 할 때 조기 임신진단의 가능성이 확인되었다. 이들의 결과를 토대로 수정후 20일에 progesterone농도를 측정하여 조기임신진단을 실시한 다음 이의 정확성을 수정후 60일에 직장검사로 다시 확인한 결과 본 연구에서는 妊娠陽性診斷率이 90.8%, 妊娠陰性診斷率은 100%로 나타났다. 이는 乳牛에서 19-24일 사이에 progesterone농도측정에 의한 임신진단의 정확성은 임신양성진단을 80-97%, 임신음성진단을 84-100%이었다는 보고와 유사한 성적이었다.

Progesterone농도측정에 의한 임신양성 진단율이 100%가 안되는 원인으로서는 발정주기가 18일 이하이거나 24일 이상과 같은 비정상적인 발정주기, 수태후 胚의 早期死, 그리고 생식기관의 病的狀態 등이라고 지적되고 있다. 한편 Bulman과 Lamming은 배의 조기사가 수정후 31-59일 사이에 12%정도가 일어나기 때문에, 수정후 두번째 발정주기인 38일과 46일 사이에 progesterone농도를 한 번 더 측정하면 임신

양성진단율을 높일 수 있다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 앞서 밝힌 바와 같이 수정후 24일에 progesterone농도측정에 의해 임신으로 진단되었던 76두중에서 4두가 수정후 60일에 직장검사에 의해 非妊娠으로 확인되었다. 이의 원인으로는 비정상적인 발정주기, 혹은 胚의 早期死 등이 그 원인일 것이라 생각되나 여기에 대해서는 종합적인 추적과 분석이 필요할 것으로 판단된다.

정상 분만후 60-90일이 지나도 뚜렷한 발정징후를 볼 수 없어 수정시키지 못하는 경우도 많아 어려움이 크다. 분만후 난소의 기능이 정상으로 회복되어 있으면 초회 배란이 빠른 경우는 분만후 14-20일 경에 나타나 이후는 정상보다는 약간 짧은 황체기를 거쳐 정상 성주기를 갖게 된다. 그러나 실제에 있어서는 각종 원인에 의해 난소의 기능회복이 늦어지는 경우가 많다. 선진 외국에서는 분만후 소의 약 62-86%가 20일 이내에 초회 배란을 하여 이후 성주기가 회복하였다는 보고가 있으나 여기에는 물론 나라에 따라, 보고자에 따라서 차이가 많다.

초회발정이 지연되는 원인으로는 분만후의 子宮修復, 분만계절, 영양상태, 포유, 비유량 및 환경 등이, 初回授精을 지연시키는 원인으로는 발정관찰의 잘못과 鈍性發情등이 알려져 있다. 수정을 시켜도 수정이 되지 않는 원인으로는 早期 胎兒死 및 질병 등이 있다. 따라서 분만간격을 단축시키기 위해서는 분만후 난소기능의 회복상태를 정확히 파악한 후 이상이 발견되면 조기에 치료를 실시하여 회복을 촉진시켜야 함은 당연하다.

본 연구에서는 혈장progesterone농도의 상승시기 및 직장검사에 의한 난소기능의 회복상태를 정상형, 지연형, 低値性 周期停止型 및 高値性 周期停止型으로 분류하여 정상형은 전체 68두중 10두(14.7%), 지연형은

39두(57.4%), 저치성 주기정지형은 6두(8.8%), 고치성 주기정지형은 3두(4.4%), 무 주기형은 10두(14.7%)였다. 이것은 Morino 등이 乳牛에서 정상형 18.4%, 지연형 55.3%, 저치성 주기정지형 23.7%, 고치성 주기정지형 2.6%이었다는 보고와 거의 비슷하였다.

Progesterone농도측정 및 직장검사소견에 의한 난소질병의 발생률은 앞서 밝힌 바와 같이 저치성 주기정지형 6두중 난소기능정지가 4두, 난포낭종이 2두, 고치주기정지형 3두는 모두 영구황체였으며, 무주기형 10두중 8두는 난소기능정지, 나머지 2두는 난포낭종이었다. 이는 Morino 등의 지연형 21두중 난소기능정지 11두, 난포낭종 10두, 저치주기정지형 9두중 5두는 난소기능정지, 4두는 난포낭종이었으며 고치주기정지형 1두는 영구황체로 진단하여 전체적인 발생상황은 본 연구와 비슷하였다. Progesterone농도측정에 의한 분만후 난소기능 재귀시기는 분만후 20일까지 14.7%가 재귀되었는데 이는 Van de Wiel 등의 62.0%, Morino 등의 44.7%와는 차이가 있었다.

이와같이 본 연구의 결과가 다른 보고자들 보다 저조한 원인은 저치성 주기정지형, 무주기형, 고치성 주기정지형의 발생율이 많았고 무주기형의 대부분이 분만후 90일 이후까지 난소기능정지 및 난포낭종으로 이행된 결과로 생각된다. 이 외에도 영양상태가 분만후 난소기능의 회복 시기에 영향을 미치는 요인중의 하나라고 했으며 Choi 등은 한우에서 NRC사양표준에 준하여 사육된 우군과 NRC사양표준에 준하지 않은 우군과의 비교에서 분만후 20일까지 난소기능의 재귀시기는 NRC사양표준에 준한 우군은 11.4%, NRC사양표준에 준하지 않은 우군은 0%, 그리고 40일까지는 각각 75%와 40%로 영양상태가 분만후 난소기능 회복 시기에 지대한 영향을 미친다고 보고한 바 있어 집단별, 개체별에 대한 영양상태에 대한 요인 분석도 동시에 수행되어야 할 것으로

판단된다.

이상에서 알 수 있는 바와 같이 유, 한우에서의 progesterone농도측정은 조기 임신진단에의 활용에는 물론 난소기능의 회복상태 및 병적상태를 정확하게 파악하는데 크게 기여할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 분만간격의 연장 및 번식성적에 영향을 미치는 난소기능의 폐-턴 파악은 이들 대부분이 난소기능정지 및 난포낭종에 기인한 것이기에 이들의 발생을 조기에 파악하여 치료를 실시한다면 분만간격의 단축으로 번식효율을 크게 향상시킬 수 있으리라 생각된다.

제 5 절 참고문헌

1. Ball PJH, The relationship of ages and stages of gestation to the incidence of embryonic death in dairy cattle. *Res Vet Sci* 1978; 25: 120-122.
2. Ball PJH, Jackson NW. The fertility of dairy cows inseminated on the basis of milk progesterone measurements. *Br Vet J* 1979; 135: 537-540.
3. Ball PJH. Milk progesterone profiles in relation to dairy herd fertility. *Br Vet J* 1982; 546-551.
4. Booth JM, Davies J, Holdsworth RJ. Use of the milk progesterone test for pregnancy determination. *Br Vet J* 1979; 135: 478-488.

5. Bulman DC, Lamming GE. The use of milk progesterone analysis in the study of oestrus detection, herd fertility and embryonic mortality in dairy cows. *Br Vet J* 1979; 135: 559-567.
6. Bulman DC, Hewitt DS, Lamming GE. The measurement of milk progesterone in suckled cows. *Vet Rec* 1978; 103: 161-162.
7. Bulman DC, Lamming GE. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *J Reprod fert* 1978; 54: 447-458.
8. Choi HS, Kang BK, Lee CG, et al. Studies on the improvement of reproductive efficiency in Korean native cows. -Development of radioimmunoassay for progesterone- *Korean J Vet Res* 1990; 30: 171-175.
9. Claus R, Karg H, Zwiauer D, et al. Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cow by progesterone assay in milk-fat. *Br Vet J* 1983; 139: 29-37.
10. Eastman SAK. Methods of improving the accuracy of positive results from milk progesterone pregnancy tests. *Br Vet J* 1979; 135: 489-490.

11. Foote RH, Oltenacu EAB, Kummerfeld HL, et al. Milk progesterone as a diagnostic aid. *Br Vet J* 1979; 135: 550-558.
12. Gao Y, Short RV, Fletcher TP. Progesterone concentrations in plasma, saliva and milk of cows in different reproductive status. *Br Vet J* 1988; 144: 262-268.
13. Gnzler O, Rattenberger E, Grlach A, et al. Milk progesterone determination as applied to the confirmation of oestrus, the detection of cycling and as an aid to veterinarian and biotechnical measures in cows. *Br Vet J* 1979; 135: 541-549.
14. Hoffiman B, Gnzler O, Hamburger R, et al. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of application in Germany. *Br Vet J* 1976; 132: 469-474.
15. Karg H. Physiological impact on fertility in cattle, with special emphasis on assessment of the reproductive function by progesterone assay. *Livest prod Sci* 1981; 8: 233-246.
16. Karg H, Claus R, Gnzler O. et al. Milk progesterone assay for assessing cyclicity and ovarian dysfunction in cattle. *Proc 9th Int Cong Anim Reprod E AI*. 1980; 119-124.

17. Laing JA, Eastman SAK, Bouttlower JC. The use of progesterone in milk and plasma for pregnancy diagnosis in cattle. *Br Vet J* 1979; 135: 204-209.
18. Laing JA, Gibbs HA, Eastman SAK. A herd test for pregnancy in cattle based on progesterone levels in milk. *Br Vet J* 1980; 136: 413-415.
19. McCaughey WJ, Cooper RJ. An assessment by progesterone assay of the accuracy of oestrus detection in dairy cows. *Vet Rec* 1980; 29: 508-510.
20. McNatty KP, Hudson N, Gibb M, et al. Seasonal differences in ovarian activity in cows. *J Endocr* 1984; 102: 189-198.
21. Morino S, Nakao T, Tsunoda N, et al. Use of direct enzyme immunoassay of milk progesterone for monitoring post partum ovarian activity in dairy cows. *Japan J Anim Reprod* 1984; 30: 61-67.
22. Nakao T, Sugihashi A, Kawata K, et al. Milk progesterone levels in cows with normal or prolonged estrous cycles, referenced to an early pregnancy diagnosis. *Jpn J Vet Sci* 1983; 45: 495-499.

23. Oltenacu PA, Ferguson JD, Lednor. Economic evaluation of pregnancy diagnosis in dairy cattle: a decision analysis approach. *J Dairy Sci* 1990; 73: 2826-2831.
24. Peters AR, Lamming GE. Reproductive activity of the post-partum period. II. Endocrine patterns and introduction of ovulation. *Br Vet J* 1984; 140: 269-280.
25. Peters AR. Reproductive activity of the cow in the post-partum period. I. Factors affecting the length of the post-partum acyclic period. *Br Vet J* 1984; 140: 76-84.
26. Radford HM, Nancarrow CD, Mattner PE. Ovarian function in suckling and non-suckling beef cows post partum. *J Reprod fert* 1978; 54: 49-56.
27. Romagnolo D, Nebel RL. The accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination progesterone test for the validation of estrus and early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Theriogenology* 1993; 39: 1121-1128.
28. Rosenberger G. Gynaecological examination. In: Rosenberger G, ed. Clinical examination of cattle. 2nd ed. Philadelphia: WB saunders Co, 1979; 323-340.

29. Sato S, To K, Takahashi E. Changes in serum progesterone levels and subsequent fertility in cows after artificial insemination. *Jpn J Vet Med Assoc* 1985; 38: 506-509.
30. Shemesh M, Ayalon N, Lavi S, et al. A new approach to the use of progesterone levels for pregnancy determination. *Br Vet J* 1983; 139: 14-48.
31. Sreenen JM, Diskin MG. Early embryonic mortality in the cow: Its relationship with progesterone concentration. *Vet Rec* 1983; 112: 517-521.
32. Takeuchi K, Nakao T., Moriyoshi M, et al. Clinical evaluation of a progesterone enzyme immunoassay kit for cow's milk. *Jpn J Vet Med Assoc* 1987; 40: 90-95.
33. VandeWiel DFM, Kalis CHJ, NasirHussainShah S. Combined use of milk progesterone profiles, clinical examination and oestrus observation for the study of fertility in the post-partum period of dairy cows. *Br Vet J* 1979; 135: 568-577.
34. Williamson NB, Morris RB, Blood DC, et al. A study of oestrous behaviours and oestrus detection methods in a large commercial dairy herd. II. Oestrous sign and behaviour patterns. *Vet Rec* 1972; 91: 58-62.

35. 康炳奎, 崔漢善, 李政吉 등. 韓牛의 繁殖效率 增進에 關한 研究.
-Progesterone 濃度 測定에 의한 早期妊娠診斷-. 大韓獸醫學會誌.
1990; 30: 249-253.
36. 康炳奎, 崔漢善, 李政吉 등. 韓牛의 繁殖效率增進에 關한 研究.
-Progesterone 濃度測定에 의한 早期妊娠診斷-. 大韓獸醫學會誌.
1990; 30: 249-253.
37. 康炳奎, 崔漢善, 李政吉 등. 韓牛의 繁殖效率增進에 關한 研究. -
發情週期 및 妊娠初期의 progesterone 濃度變化-. 大韓獸醫學會誌.
1990; 30: 243-247.
38. 申源執. 韓牛의 早期妊娠診斷에 關한 研究. 韓畜誌. 1980; 22:
401-404.
39. 鄭英彩, 金昌根. 소의 多頭分晩에 關한 연구. I. 소의 早期妊娠診
斷 方法에 關한 研究. 韓畜誌. 1978; 20: 342-345.
40. 崔漢善, 康炳奎, 孫彰好 등. 韓牛의 繁殖效率增進에 關한 研究. -
血中 progesterone 濃度測定에 의한 分娩後 卵巢機能 回復狀態의
檢討-. 大韓獸醫學會誌. 1990; 30: 515-523.

제 4 장 번식장애 특히 난소낭종 진단에의 활용

제 1 절 서 설

소의 번식장애는 유방염, 발굽병과 함께 목장의 가장 큰 3대 질병 중의 하나로 이로 인하여 양축가가 입고 있는 피해는 예측하기 어려운 정도이고 低受胎牛로 인하여 입고 있는 국내 피해액만 하더라도 연간 1,200억원으로 추산될 정도이다.

번식장애의 원인에는 여러가지 요인들이 아주 복합적으로 얹혀 있어 단정적인 진단은 어려운게 사실이다. 사양관리, 사육환경의 불합리는 물론 생식기 이상에 기인한 선천적인 결함, 영양장애, 내분비(호르몬) 장애, 병원성 미생물의 자궁내 감염, 난산으로 인한 자궁 손상등 외에도 최근에는 호르몬제의 남용도 크게 문제가 되고 있는 것으로 알려져 있어 진단에는 많은 어려움이 있다. 그러나 번식장애 중 난소질병이 70-80%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있어 먼저 여기에 대한 대책이 시급함을 알 수 있다.

혈액 또는 유즙중 progesterone(P4) 농도의 측정은 난소의 기능을 추정하는 수단으로 발정확인, 임신진단 및 난소질병의 진단과 치료효과의 판정등에 응용가능함이 보고되어 왔으나 일상적 검사수단으로 이용하기에는 아직까지는 인식부족 등으로 해서 정착되지 못하고 있는 실정에 있다. 여기에는 시료채취에서 부터 분석방법의 표준화, 분석결과의 신뢰도 등도 들 수 있겠다. 예로 시료로서는 乳牛에서는 혈액보다 채취하기 쉬운 유즙을 이용할 수 있으나 정확성을 기하기 위해서는 전처리 과정을 거쳐야 한다.

유즙의 全乳를 사용하는 방법은 유즙을 채취한 그대로 측정할 수 있다는 점에서는 매우 편리하나 乳脂率에 따라서 영향을 받기 때문에 유지율에 대한 조건을 일정하게 해야 하는 필요성이 있고 분석시에도 다소의 어려움이 있다. 한편 탈지유중의 progesterone농도는 乳脂率의 영향을 받지 않으나 절대치가 全乳에 비해서는 낮다는 점이 있다.

분만 후에 다발하는 卵巢囊腫은 臨床的으로는 주로 3형 즉, 卵胞囊腫, 黃體囊腫 및 囊腫樣黃體로 구분되며, 난포낭종의 치료에는 human chorionic gonadotropin(hCG) 또는 gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH)과 같은 luteotropic 제제가, 황체낭종의 치료에는 prostaglandin F_{2a} (PGF $_{2a}$)와 같은 luteolytic 제제가 주로 사용되기 때문에 이러한 약제의 선정에 앞서 정확한 진단이 선행되어야 너무도 당연하다.

난소낭종의 진단에 있어서 종래에 응용되어 왔던 직장검사법은 특히 난포낭종을 감별 진단하기는 때로는 매우 곤란하여 이들의 진단에 대한 progesterone농도측정의 유용성이 강조되고 있는데 예로 Nakao 등은 progesterone농도와 직장검사 소견과의 관련에서 직장검사의 정확성은 난포낭종이 65%, 황체낭종이 19% 그리고 낭종양황체는 16% 이었다고 보고하고 있다. 또한 난포낭종을 치료한 다음 직장검사로 황체화의 정도를 판단하는 것은 부정확하여 역시 직장검사만으로는 한계가 있어 어려움이 크다. 난소낭종은 번식장애우의 질병중 제일 흔하고 발생율이 높는데 더욱이 최근에 와서는 오히려 증가추세에 있어 문제의 심각성을 시사해 주고 있다 하겠다.

혈액 또는 유즙에서의 progesterone농도측정만으로는 내분비계 이상만이 전부는 아니기에 난소질환을 다 파악하지는 못하겠지만 앞서 언급된 직장검사, 초음파 검사에서의 한계점을 보완해 주고 쉽게 활용 가능한 방법으로 제시되어 있어 혈액 또는 유즙에서의 progesterone농도

측정을 실시하여 난소낭종의 감별진단에 활용코저 하였다. 또한 번식장애로 확인된 한우를 대상으로 홀몬제 투여에 대한 반응을 검색기로 하였다.

유우의 난포의 조직학적 구조와 형태변화에 관한 연구는 더러 있으나 한우에서의 보고는 거의 없어 정상상태에서의 난소의 난포와 이상에 대해서 검색하여 향후 번식장애우에 대한 기초자료로 활용코저 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

Progesterone농도측정에 의한 난소낭종의 감별진단을 위한 공시동물로는 번식 기록, 직장검사 및 육안적 관찰에서 분만후 60일이 지나도 발정주기가 재귀되지 않았던 유우(Holstein)에서 난소의 기능 이상으로 인정된 73두를 대상으로하여 10일 간격으로 2회에 걸쳐 실시하였다. 연령은 2-9(평균 4.8)년, 산차수는 1-6(평균 2.9)산이었다.

시료로서는 혈액과 유즙을, 혈액은 혈장을 분리하여 사용하였고, 유즙은 탈지유를 각각 사용하였다. 이들의 분리방법 및 전처리과정은 앞서 밝힌 바와 같은 방법으로하여 ELISA기법에 의거 progesterone농도 측정을 동시에 실시하였다.

이와 동시에 현재 주로 현장에서 실시하고 있는 방법을 채택하여 난소기능 이상에 대한 홀몬제 치료 후의 반응과 임신과의 관계를 파악코저 분만후 60일이 지나도 정상 발정주기가 확인되지 않고 난소의 기능이상으로 인정된 한우 58두에서 직장검사 결과 황체가 확인된 개체는 prostagrandin F_{2a} (PGF_{2a}, Lutalyse, Upjohn Co.)로 처리(치료)후 발정이 인정된 것은 인공수정시켜 수정일과 수정후는 2일, 7일, 15일,

18일 및 21일째에 각각 채혈하여 혈중 progesterone농도 분석과 이후의 임신과의 관계를 추적토록 하였다.

임상검사 및 직장검사 결과 난포낭종으로 확인된 개체는 gonadotrophin releasing hormone(Cystorelin Santofi, Animal health, Inc) 200 μ g으로 처리하여 이후 발정이 인정된 개체는 앞서와 동일한 방법으로 하여 역시 혈중 progesterone농도 분석과 임신과의 관계를, 이와는 별도로 발정주기와 관계없이 progesterone reduced insert devices (PRID, Sanofi, Animal health, Inc)를 질내에 삽입한 후 11일째에 제거와 동시에 PGF_{2a}를 주사하여 발정이 인정된 개체 역시 앞서와 동일한 방법으로하여 실시하였다.

이 외 정상상태 및 이상상태에서의 한우의 난포의 조직학적 구조와 변화를 검색하여 향후 번식장애 유, 한우에 대한 기초 자료로 활용하기 위하여 도축장에서 도축된 한우 50두를 무작위로 하여 도축후 난소를 즉시 채취하여 육안적인 관찰에 이어 10% formalin액에 고정시켜 paraffin절편을 제작하여 hematoxylin-eosin(HE)염색을 실시한 후 검경하였다.

제 3 절 연구결과

공시유우에서 직장검사 및 progesterone농도측정에서 10일 간격으로 실시하여, progesterone농도는 혈장과 탈지유에서 1ng/ml 이하로 직장검사로 검사당일 모두 낭종이 존재한 경우는 난포낭종으로 난소에 아무런 구조물도 인정되지 않고 자궁 역시 무력한 상태이면 난소기능정지로, 혈장과 탈지유에서의 progesterone농도가 1ng/ml 이상으로 직장검사 결과 낭종이 존재한 경우는 황체낭종으로, 황체가 존재한 경우는

영구황체로 진단한 혈장과 탈지유에서의 초회에서의 progesterone농도는 표 10과 같았다.

표 10. 난소질병별에 따른 Progesterone농도 변화(Holstein)

Classification	No.	Progesterone concentration (ng / m l)	
		Serum	Skim milk
Inactive ovaries	38	0.34 ± 0.03	0.29 ± 0.03
Follicular cyst	13	0.62 ± 0.08	0.58 ± 0.04
Luteal cyst	12	3.82 ± 0.43	2.98 ± 0.36
Persistent corpus luteum	10	3.93 ± 0.86	2.87 ± 0.30

난소의 질병별에 대한 혈장중의 progesterone농도는 초회(첫날)와 10일후에서 난소기능정지에서 각각 $0.34 \pm 0.03 \text{ ng / m l}$, $0.37 \pm 0.05 \text{ ng / m l}$, 난포낭종에서 $3.82 \pm 0.43 \text{ ng / m l}$, $4.02 \pm 0.68 \text{ ng / m l}$, 영구황체에서 $3.93 \pm 0.86 \text{ ng / m l}$, $3.88 \pm 0.95 \text{ ng / m l}$ 으로 질병별에 대한 감별진단이 가능함을 알 수 있었으나 각 질병별에 있어서의 검사첫날과 10일후에서의 유의성은 볼 수 없었다.

탈지유중의 progesterone농도는 혈장에 비교하여 다소 감소하는 경향은 나타났으나 농도수준에서의 변화는 볼 수 없었다.

탈지유중의 progesterone농도는 초회와 10일후에서 난소기능정지에서 각각 $0.29 \pm 0.03 \text{ ng / m l}$, $0.36 \pm 0.06 \text{ ng / m l}$, 난포낭종에서 $0.58 \pm 0.04 \text{ ng / m l}$, $0.61 \pm 0.07 \text{ ng / m l}$, 황체낭종에서 $2.98 \pm 0.36 \text{ ng / m l}$, $3.01 \pm 0.38 \text{ ng / m l}$, 영구황체에서 $2.87 \pm 0.30 \text{ ng / m l}$, $2.47 \pm 0.41 \text{ ng / m l}$ 으로 탈지유중의 progesterone농도변화 역시 같은 경향을 나타내어 감별진단에의 활용이 충분함을 알 수 있었으나 progesterone농도측정에 의한

난소질병별에 대한 감별에서 특히 황체낭종과 영구황체의 경우는 직장 검사를 보조 수단으로 동시에 활용하면 그 신뢰성을 크게 높일 수 있을 것으로 생각되었다.

한우의 번식장애우에 대한 홀몬제 투여후 발정이 인정된 개체 58두에 대해서 임신군(N=31두)과 비임신군(N=27두)에서의 수정일(D-0), 수정후 2일(D+2), 수정후 7일(D+7), 수정후 15일(D+15), 수정후 18일(D+18) 및 수정후 21일(D+21)에서의 혈장 progesterone농도는 표 11과 같았다.

표 11. 임신우군 및 비임신우군에서의 수정일로 부터 수정후 24일까지의 혈장농도 비교(한우)

임신여부	D-0 SE	D+2 SE	D+7 SE	D+15 SE	D+18 SE	D+21 SE
임신	0.21 ^a ±0.51	0.05 ^a ±0.24	1.81 ^a ±0.42	5.25 ^a ±0.73	5.75 ^a ±0.57	6.12 ^a ±0.25
미임신	1.09 ^a ±0.412	0.45 ^a ±0.20	2.54 ^a ±0.38	4.35 ^a ±0.66	1.54 ^b ±0.54	0.64 ^b ±0.23

※ P<0.01

임신군의 수정당일의 혈장 progesterone농도는 0.21±0.51ng /mℓ 으로 낮았으나 비임신군에서는 1.1±0.42ng /mℓ 으로 임신군에 비해서는 1ng /mℓ 이상으로 높았다.

임신군에서는 수정후 시일이 경과됨에 따라서 progesterone농도의 증가를 볼 수 있었고 수정 후 18일째에는 5.8±0.57ng /mℓ 를 나타내어 수정후 21일째까지 지속하는 것을 볼 수 있었다(그림 10.참조).

반면 비임신군에서는 수정후 15일째까지의 progesterone농도 분석에서는 크게 차이가 없었으나(수정 당일 제외) 수정후 18일에서는 크게 차이가 있었다(P<0.01). 이와 같은 현상은 수정후 21일에서는 임신군에 비교하여 더욱 더 큰 차이를 보였으나 경향은 마찬가지였다(P<0.01).

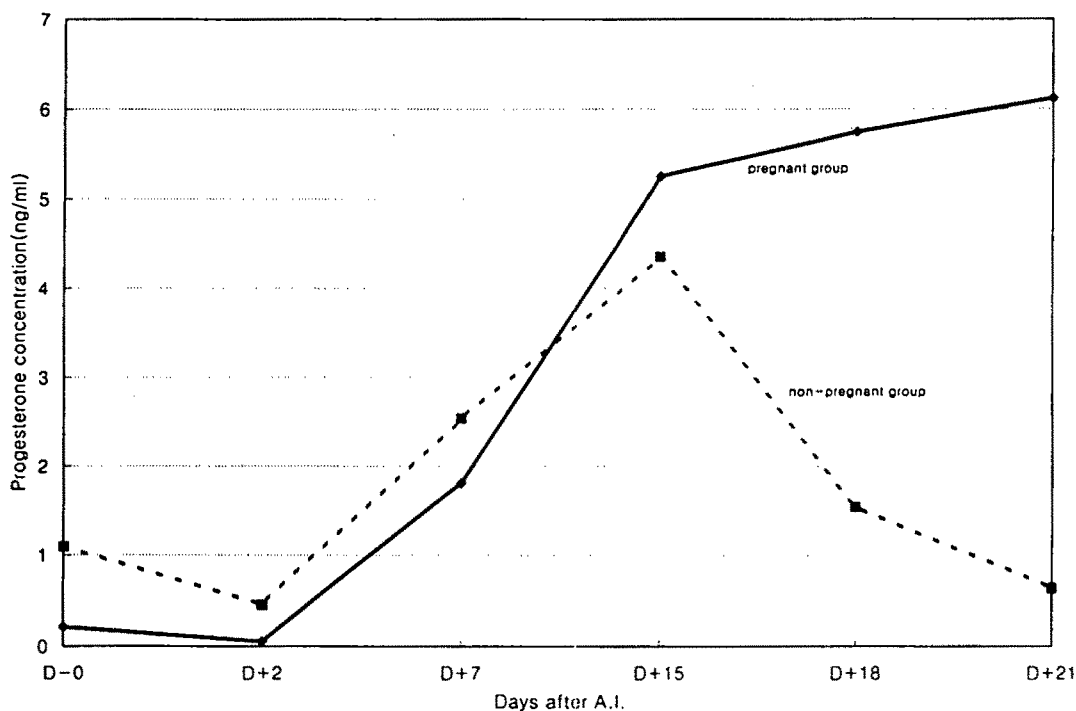


그림 10. 임신군 및 비임신군에서의 혈장 progesterone농도 비교 (한우)

번식장애 한우에 대한 치료(홀몬제 처리)후 임신군에 대한 수정일로부터 수정후 21일 사이의 혈장 progesterone농도는 표 12과 같았다.

표 12. 임신군에서의 홀몬제 투여별에 대한 혈장 progesterone농도변화(한우)

처리구분	D-0	D+2	D+7	D+15	D+18	D+21
GnRH	0.05 ^a ±1.24	0 ^a ±0.59	1.19 ^a ±0.89	5.63 ^a ±1.53	6.64 ^a ±1.14	7.01 ^a ±0.54
PGF _{2α}	0.45 ^a ±0.72	0.06 ^a ±0.34	0.93 ^a ±0.73	4.17 ^a ±1.25	4.51 ^a ±1.02	6.44 ^a ±0.44
PRID+PGF _{2α}	0.13 ^a ±0.53	0.10 ^a ±0.25	3.30 ^a ±0.52	5.95 ^a ±0.97	6.10 ^a ±0.76	4.92 ^b ±0.29

※ P<0.05

GnRH(N=15), PGF_{2α}(N=8), PRID+PGF_{2α}(N=8)투여군 모두 수정

후 2일까지는 혈장 progesterone농도치는 0.1ng/ml 수준으로 매우 낮았다. 수정 7일째에는 홀몬제에 따라 농도의 차이는 있었으나 1ng/ml에 근접하거나 1ng/ml 이상으로 상승하였다. 수정후 15일째에는 4ng/ml 이상으로 다 같이 증가하여 수정후 18일, 21일까지 거의 같은 수준으로 유지함을 알 수 있었다(그림 11 참조).

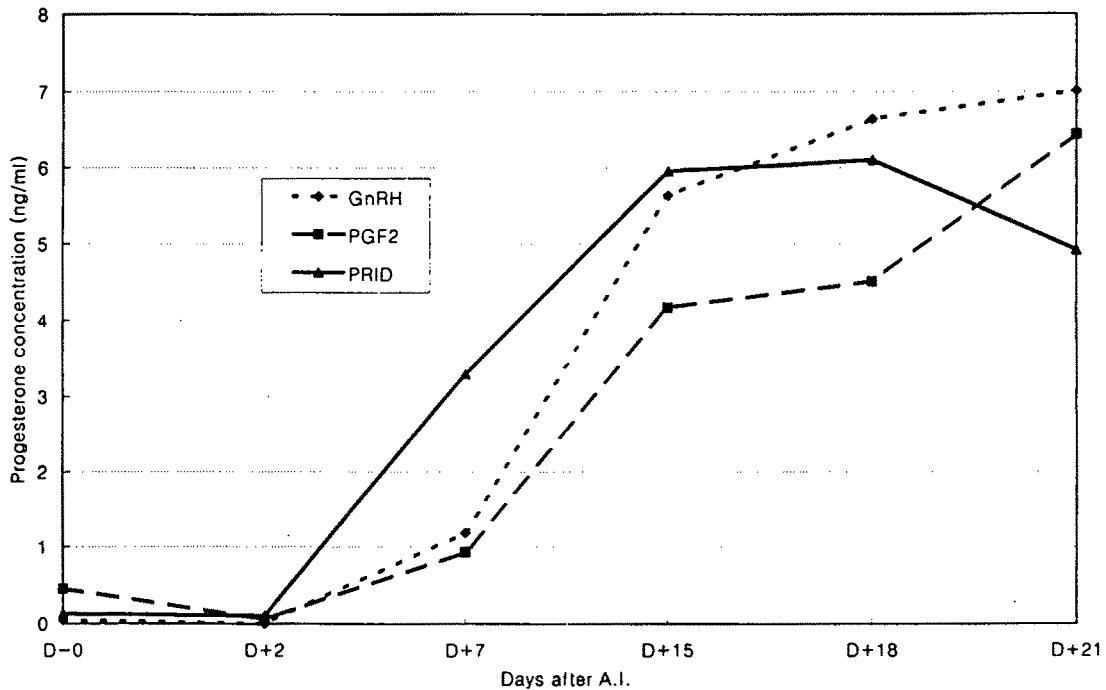


그림 11. 임신군에서 홀몬제 투여별에 대한 혈장 progesterone농도변화

GnRH, PGF_{2α} 및 PRID로 처리후 발정이 인정된 개체군에서의 미임신우군에서 수정일로 부터 수정후 21일까지의 혈장 progesterone농도 변화는 표 13과 같았다.

표 13에서 알 수 있는 바와 같이 PGF_{2α} 투여군(N=8) 및 PRID 투여군(N=3)에서는 수정일의 혈장 progesterone농도가 1ng/ml 이상으로 높았고 GnRH 투여군(N=16)에서의 미임신우군에서는 매우 낮았다.

표 13. 미임신우군에서의 홀몬제 투여별에 대한 혈장 progesterone농도변화
(ng /mℓ)

처리구분	D-0	D+2	D+7	D+15	D+18	D+21
GnRH	0.01 ^a ±0.78	0.04 ^a ±0.37	1.96 ^a ±0.73	3.45 ^a ±1.25	1.63 ^a ±0.93	0.39 ^a ±0.44
PGF _{2α}	2.23 ^a ±0.59	1.22 ^a ±0.31	0.80 ^a ±0.52	3.74 ^a ±0.88	1.54 ^a ±0.69	0.28 ^a ±0.33
PRID	1.04 ^a ±0.78	0.11 ^a ±0.37	2.85 ^a ±0.73	5.86 ^a ±1.25	1.46 ^a ±1.14	1.24 ^a ±0.44

수정후 7일에서는 2ng /mℓ 전후로 임신우군에서의 progesterone농도보다 오히려 임신우군에 비해서는 다소 높았으나 수정후 18일에서는 2ng /mℓ 이하로 낮았다. 수정후 21일에서는 모두 1ng /mℓ 이하로 매우 낮았다(그림 12 참조).

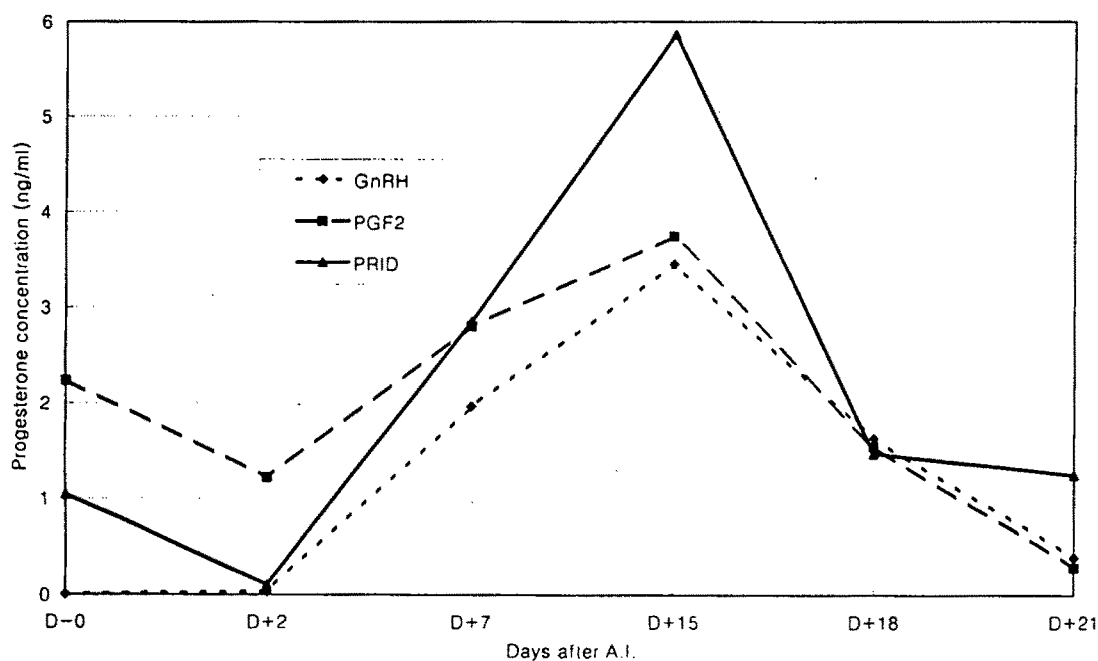


그림 12. 미임신우군에서의 홀몬제 투여별에 대한 혈장 progesterone농도 변화

도축장에서 도축된 한우 50두에서의 난포에서의 조직학적 구조와 변화에 대한 소견을 요약하면 정상상태의 난포에서의 이차난포(secondary follicle, sf)와 성숙난포(Graafian follicle, gf)로 부터 성숙난포와 퇴축(퇴행)단계의 황체가 있었는가 하면 성숙난포와 가황체, 가황체가 퇴행하여 결합조직으로 대치된 백체(corpus albicans, ca)와 적체 소견을, 폐쇄난포와 임신황체를 나타낸 것 등 단계가 다양하였다. 이 외 난소의 발육부전 및 난포낭종, 황체낭종의 예도 다수 발견 되었다.

도축된 50두중 1두에서 과립-난포막 세포종(granulosa-theca cell tumor)의 발생도 볼 수 있어 번식장애우에 대해서 체계적이고 종합적인 진단을 위해서는 조직, 형태학적인 검색이 이루어져야함을 절실히 느낄 수 있었다(Legends for figures 참조). 본 재료는 도축전의 일련의 경과(예로 번식 기록 및 질병발생 상황, 사양관리 등의 기초 자료)에 대한 확인이 불확실 하여 아쉬운 점이 많았으나 한우에서도 과립-난포막 세포종의 발생을 볼 수 있었기에 기능적 이상만이 아닌 형태학적 변화를 수반한 번식장애우도 상당수 있을 것으로 판단되었다.

제 4 절 고 찰

소의 번식장애는 지역과 여건에 크게 관계없이 발생율이 오히려 증가하는 추세에 있다. 발생율은 나라에 따라서, 보고자에 따라서 차이가 있으나 번식장애 중 가장 높은 비율을 차지하고 있는 것은 난소 질병으로 알려져 있다.

국내의 경우 소의 조기 임신진단 및 난소질병의 진단은 현재도 대부분이 직장검사에 의존하여 실시되고 있는 상황에 있다. 직장검사에 의한 임신진단의 경우 임상경험이 아주 풍부한 수의사의 경우라도 인공수정후 38일 대개는 40일이 지나야 가능한 상태이다.

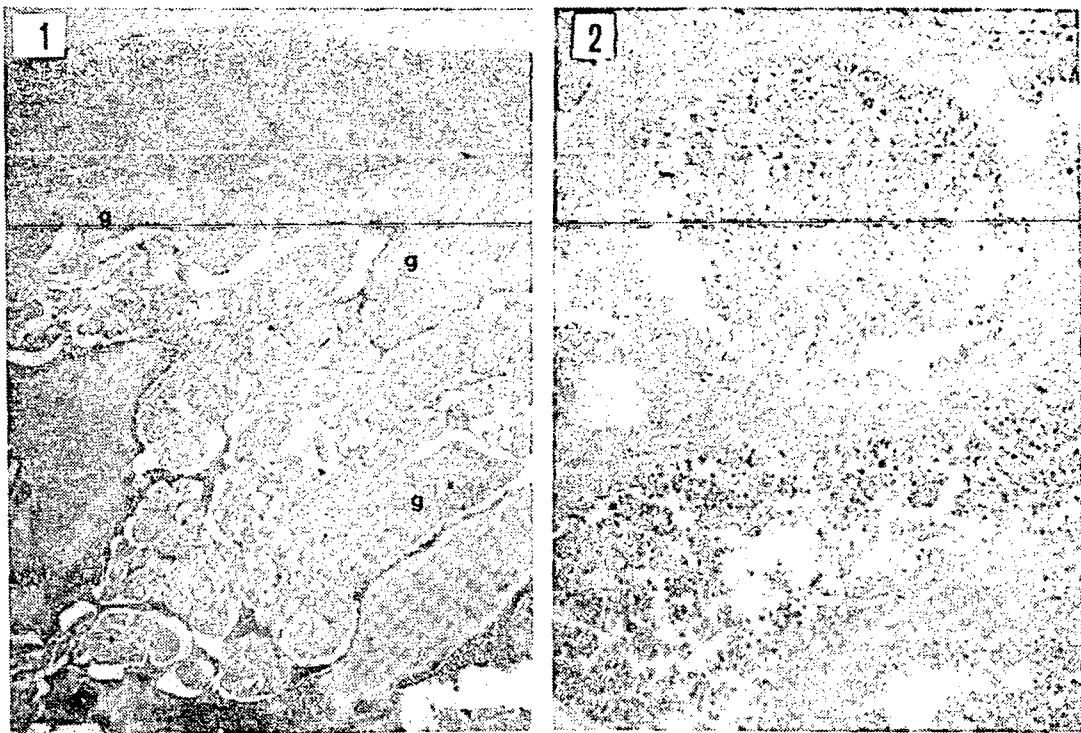
Legends for Figures

Fig. 1. 과립-난포막 세포종(granulosa-theca cell tumor)

이 종양은 난포의 과립세포 또 속난포막세포에서 발생한 것으로 여러 난포가 융합하여 난포의 경계가 불분명할뿐더러 거대한 과립세포붕괴(g)를 이루고 있음을 볼 수 있다. HE염색, 10×

Fig. 2. 과립-난포막 세포종(granulosa-theca cell tumor)

Fig. 1의 확대소견으로 크고 작은 난포에 증식된 과립 세포가 충만해 있음을 알 수 있다. HE염색, 200×



최근 국내에서 시도되고 있는 초음파 진단기법 역시 이론적으로는 25일경에도 가능한 것으로 알려져 있으나 실제적으로는 이 이후가 아니면 어려운 것으로 알려져 있어 현장에서의 어려움이 큼은 앞서 밝힌 바 있다.

본 연구에서는 유, 한우에 관계없이 수정후 늦어도 20-24일 사이의 혈액 또는 유즙에서의 progesterone농도 측정만으로도 임신여부의 확인에서 특히 비임신의 경우는 100%에 가깝게 나타났음을 입증하여 이후의 대책수립이 가능함을 입증한 바 있다.

난소질병 역시 국내에서는 대부분이 직장검사에 의존하고 있으나 난소질병중 큰 비중을 차지하고 있는 난소낭종의 진단에 있어서 감별진단하기는 때로는 매우 어려움이 있음이 알려져 있다.

오래전 부터 일본의 경우 대동물 임상연수기관이 발족되어 현장 서비스를 적극적으로 추진하고 있는 경우인데도 Nakao 등의 보고에 의하면 progesterone농도 측정에 의한 진단과 직장검사에 의한 결과와의 비교에서 직장검사에서의 정확성이 난포낭종에서 65%, 황체낭종이 19%, 낭종양 황체가 16%임을 밝혀 직장검사의 정확도가 떨어짐을 밝힌 바 있어 난소낭종의 감별진단에도 progesterone호르몬 측정이 크게 유용함을 알 수 있다.

본 연구에서 난포낭종, 기능성황체 및 황체낭종의 감별진단을 위하여 10일 간격으로 2회 progesterone농도를 측정, 분석한 결과 난소기능정지레와 난포낭종레에서는 혈장과 탈지유 관계없이 검사일 모두(2회) 1ng/ml 이하이었고, 황체낭종레와 영구황체레에서는 모두 1ng/ml 이상으로 나타나 난소낭종별에 대한 감별진단이 가능함을 알 수 있었다. 이들에 있어서 검사일 10일 사이에서의 progesterone농도 자체는 차이가 없었다. 둔성발정은 발정증상의 관찰은 어렵지만 progesterone농도는

정상적인 발정주기의 양상을 나타내고 있음이 알려져 있다.

Nakao는 또한 둔성발정에서 10일 간격에서 2회에 걸친 결과에서 검사 첫날에 progesterone농도가 높았던 경우는 10일 후에는 낮게, 반대로 검사 첫 날에 낮았던 경우는 10일 후에는 높게 나타나 10일 사이의 progesterone농도는 서로 차이가 있음을 보고한 바 있으나 본 연구에서도 둔성발정에서는 같은 결과를 얻어 신뢰성이 있음이 알 수 있었다.

Progesterone농도 측정에 의한 난소질병의 검사에서의 검사간격에 대해서 구체적으로 검토된 보고는 많지 않으나 대표적인 예는 Claus 등은 초진일로 부터 6일후로, Nakao는 난소질병의 진단에서 10일 간격으로 2회 실시하는 방법을 제시하고 있다.

본 연구에서도 난소질병의 진단을 위해 10일 간격으로 2회 실시하였는데 이것은 기능황체의 지속기간이 약 10일간이라는 점을 고려하면 타당할 것으로 생각되나 앞서의 조기 임신진단 및 난소기능회복 여부에서의 활용에서와 같이 그 용도가 넓고, 번식장애우에 대한 비교분석에의 활용에는 물론 본 연구에서도 얻어진 바와 같이 치료효과의 판정에도 응용가능한 점으로 미루어 보아 검사회수 및 검사간격은 현장 여건에 맞춘 프로그램이 개발되어져야 할 것으로 판단된다.

Gao등은 발정기, 황체기 및 임신기간중에서 타액, 탈지유, 전유 및 혈장중의 progesterone의 측정치 비교에서 시료에 따른 절대치에서의 차이는 있었으나 이들의 변화 패턴은 같음을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 난소질병우를 한 대상에서 혈장과 탈지유중에서의 progesterone농도의 절대치에는 차이가 있었으나 변화양상은 동일함을 알 수 있었다. 그러나 유우에서의 시료로서는 채취자체가 유즙이 혈액보다 용이하고, 소에 대한 스트레스도 적고 유즙중의 탈지유는 유지방 보다는

그 처리가 비교적 단순하다는 Pope와 Swinburne의 보고와 또한 탈지유중의 progesterone농도는 착유시기나 소의 分房에 관계없이 일정하다는 Hoffman등 및 Pennington등의 기존보고에 의해 판단하면 앞으로 유우에서의 progesterone농도 측정에서는 유즙 즉 탈지유를 사용하는 것이 보다 편리하면서도 신뢰성에는 문제가 없는 것으로 생각되었다.

지금까지의 결과에서 알 수 있는 바와 같이 직장점사로는 정확한 점별이 곤란한 난포낭종과 황체낭종의 진단에서 약 10일 간격으로 2회 실시하면 거의 정확한 진단이 가능할 것으로 나타났다.

유우에 이어 한우에서 번식장애우에 대한 홀몬제 투여후의 progesterone농도 변화와 임신과의 관계에서 임신군에서는 수정일의 progesterone농도가 정상상태에서의 수준과 거의 같음을 알 수 있어 흥미로웠다.

수정후는 경과일령에 대한 변화가 수정후 15일까지는 임신, 비임신군 관계없이 비슷한 수준의 progesterone농도를 나타내었으나 수정후 18일째부터는 확연한 차이를 나타내어 번식장애우에 대한 치료에의 판정에는 물론 임신진단에도 충분히 활용가능함을 알 수 있었다. 비임신군에 있어서 수정일의 progesterone농도가 GnRH의 경우를 제외하면 1ng/ml 이상으로 높았는데 이것은 발정관찰의 잘못 또는 기능황체의 존재가 있었던 것으로 생각된다. 실제 본 연구에서는 progesterone측정은 수정일 당일에 이루어진 것이 아니고 이후 실시되었기에 앞으로는 수정일에서의 분석이 신속히 이루어져 홀몬 농도와 결부시켜 수정시킬 필요가 있음을 알 수 있었다. 비임신군에서의 GnRH 투여군에 있어서 수정일에 있어서 progesterone농도는 낮았는데 이것은 난소의 기능부전, 발육이상 등과도 관련이 깊을 것으로 생각되어 향후 많은 개체의 검색이 수반되어야 할 것으로 판단된다. 본 연구에서는 둔성발정에 대

해 많은 개체를 상대로 실시하지는 못했으나 Bulman과 Wood는 분만 이후 다음 수정시까지에서의 발생율이 10.7%, Claus등은 야외 임상례에서의 progesterone농도에서의 감별로 32%의 보고가 있어 본 연구에서의 결과는 이들에 대한 감별진단에도 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

난포낭종에 대한 GnRH 치료효과는 대상한우 31두중 15두가 치료효과를 나타내어 이후 임신되었고, 황체낭종에 PGF_{2α}를 투여한 16두중에서는 8두가 임신되었다. PRID와 PGF_{2α}투여군에서는 11두중 8두가 이후 임신하였다.

이와 같은 결과는 다른 보고자의 보고내용과 유사하여 크게 차이는 없었으나 향후 보다 많은 개체에서 세분하여 정밀추적과 분석을 실시하면 번식장애우에 대한 치료효과 역시 높일 수 있을 것으로 크게 기대된다.

PRID와 PGF_{2α}투여군에서 치료효과(임신)가 높게 나타났는데 이것은 PRID 단독투여 보다는 이후의 병용이 효과가 클 것으로 생각된다.

생전의 추적조사와 동시에 시행되지는 못했지만 도축된 한우에서 과립-난포막 세포종을 발견 할 수 있어 앞으로는 난소의 기능이상 검색만이 아닌 형태학적 검색이 동시에 수행되어지면 번식장애우에 대한 보다 더 구체적이고 체계적인 방안제시가 가능할 것으로 생각된다.

제 5 절 참고문헌

1. Ball PJH. Milk progesterone profiles in relation to dairy herd fertility. *Br Vet J* 1982; 138: 546-551.

2. Ball PJH. The relationship of ages and stage of gestation to the incidence of embryonic death in dairy cattle. *Res Vet Sci* 1978; 25: 120-122.
3. Ball PJH, Jackson NW. The fertility of dairy cows inseminated on the basis of milk progesterone measurements. *Br Vet J* 1979; 135: 537-540.
4. Ball PJH. The relationship of ages and stage of gestation to the incidence of embryonic death in dairy cattle. *Res Vet Sci* 1978; 25: 120-122.
5. Ball PJH, Jackson NW. The fertility of dairy cows inseminated on the basis of milk progesterone measurements. *Br Vet J* 1979; 135: 537-540.
6. Ball PJH, Lamming GE. Diagnosis of ovarian acyclicity in lactating dairy cows and evaluation of treatment with gonadotrophin -releasing hormone or a progesterone - releasing intravaginal device. *Br Vet J* 1983; 139: 522-527.
7. Bierschwal CJ, Garverick HA, Martin CE, et al. Clinical response of dairy cows with ovarian cysts to GnRH. *J Anim Sci* 1971; 41: 1660-1665.

8. Bulman DC, Lamming GE. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *J Reprod Fert* 1978; 54: 447-458.
9. Bulman DC, Lamming GE. The use of milk progesterone analysis in the study of oestrus detection, herd fertility and embryonic mortality in dairy cows. *Br Vet J* 1979; 135: 559-567.
10. Cantley TC, Garverick HA, Bierschwal CJ, et al. Hormonal response of dairy cows with ovarian cysts to GnRH. *J Anim Sci* 1975; 41: 1666-1673.
11. Carroll DJ, Pierson RA, Hauser ER, et al. Variability of ovarian structures and plasma progesterone profiles in dairy cows with ovarian cysts. *Theriogenology* 1990; 34: 349-370.
12. Claus R, Karg H, Zwiauer D, et al. Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cow by progesterone assay in milk-fat. *Br Vet J* 1983; 139: 29-37.
13. Cox NM, Thompson FN, Culver DH. Milk progesterone to predict reproductive status in a commercial dairy herd. *J Dairy Sci* 1978; 61: 1616-1621.

14. Dailey RA, Inskeep EK, Washburn SP, et al. Use of prostaglandin F2a or gonadotropin releasing hormone in treating problem breeding cows. *J Dairy Sci* 1983; 66: 1721-1727.
15. Dawson FLM. Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of ovarian function in the cows. *Vet Rec* 1975; 96: 218-220.
16. Dinsmore RP, White ME, English PB. An evaluation of simultaneous GnRH and cloprostenol treatment of dairy cattle with cystic ovaries. *Can Vet J* 1990; 31: 280-284.
17. Dinsmore RP, White ME, Guard CL, et al. Effect of gonadotropin releasing hormone on clinical response and fertility in cows cystic ovaries, as related to milk progesterone concentration and days after parourition. *JAVMA* 1989; 195: 327-330.
18. Dobson H, Rankin JEF, Ward WR. Bovine cystic ovarian disease: Plasma hormone concentrations and treatment. *Vet Rec* 1977; 101: 459-461.
19. Gao Y, Short RV, Fletcher TP. Progesterone concentrations in plasma, saliva and milk of cows in different reproductive states. *Br Vet J* 1988; 144: 262-268.

20. Hoffman B, Gnzler O, Hamburger R, et al. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of application in Germany. *Br Vet J* 1976; 132: 469-474.
21. Humbolt P, Thibier M. Progesterone monitoring of anestrus dairy cows and subsequent treatment with a ptostaglandin F2a analogue or gonadotropin-releasing hormone. *Am J Vet Res* 1980; 41: 1762-1766.
22. Ijaz A, Fahning ML, Zemjanis R. Treatment and control of cystic ovarian disease in dairy cattle: A review. *Br Vet J* 1987; 143: 226-273.
23. Karg H, Claus R, G nzler O, et al. milk progesterone assay for assessing cyclicity and ovarian dysfunction in cattle. *Proc 9th Int Cong Anim Reprod & AI* 1980; 2: 119-124.
24. Lamming GE, Bulman DC. The use of milk progesterone radioimmunoassay in the diagnosis and treatment of subfertility in dairy cows. *Br Vet J* 1976; 132: 507-517.
25. McCaughey WJ, Gordon FJ. Milk progesterone assay: A comparison of inter-quarter and sampling time variation. *Br Vet J* 1979; 135: 512-518.

26. Nakao T, Harada A, Kimura M, et al. Effect of fenprostalene 14 days after fertirelin treatment on intervals from treatment to conception in cows with follicular cysts diagnosed by milk progesterone test. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 207-210.
27. Nakao T. Practical uses of milk progesterone assays in bovine reproduction. *J Vet Clinic* 1986; 282: 5-19.
28. Nakao T, Sugihashi A, Saga n, et al. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cyst, and cystic corpus luteum in cows. *Am J Vet Res* 1983; 44: 888-890.
29. Pathiraja N, Oyedipe E, Vohir AA. Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of corpora lutea in zebu cows. *Br Vet J* 1986; 142: 467-471.
30. Pennington JA, Spahr SL, Lodge JR. Influences on progesterone concentration in bovine milk. *J Dairy Sci* 1981; 64: 259-266.
31. Pope GS, Swinburne JK. Reviews of the progress of dairy science: Hormones in milk: their physiological significance and value as diagnostic aids. *J Dairy Res* 1980; 47: 427-449.

32. Ribadu AY, Dobson H, Ward WR. Ultrasound and progesterone monitoring of ovarian follicular cysts in cows treated with GnRH. *Br Vet J* 1994; 150: 489-497.
33. Seguin BE. Prostaglandin therapy in cattle with unobserved estrus. In: Morrow DA, ed. *Current therapy in Theriogenology*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1980; 296-299.
34. Seguin BE. Use of prostaglandin in cows with unobserved oestrus. *Acta Vet Scand* 1981; 77: 343-352.
35. Shemesh M, Ayalon N, Lavi S, et al. A new approach to the use of progesterone levels for pregnancy determination. *Br Vet J* 1983; 139: 14-48.
36. Shozu O, Nakamura M, Akuzawa E. The first post-partum estrus and conception rate, in Japanese black cow raising either in grazing or non-grazing condition. *Jpn J Anim Reprod* 1986; 32: 165-170.
37. Sprecher DJ, Nebel RL, Whitman SS. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. *Theriogenology* 1989; 31: 1165-1172.

38. Whitmore HI, Hurtgen JP, Mather EC. Clinical response of dairy cattle with ovarian cyst to single or repeated treatments of gonadotropin releasing hormone. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 174: 1113-1115.
39. Zemjanis R. Incidence of anestrus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1961; 139: 1203-1206.
40. 姜炳奎, 崔漢善, 鄭永基. 韓牛 및 乳牛의 卵巢囊腫에 관한 解剖組織學的 所見 및 卵巢호르몬 分析. 大韓獸醫學會誌. 1987; 27: 141-151.
41. 姜炳奎, 崔漢善, 崔相功 등. Progesterone 濃度測定에 의한 乳牛의 繁殖效率增進에 관한 研究. II. 血液 및 乳汁 中 progesterone 濃度測定에 의한 卵巢囊腫의 鑑別診斷. 大韓獸醫學會誌 1994; 34: 181-188.

제 5 장 결 론

1995년도 농림수산부 특정 연구사업에 의하여 실시된 “UR에 대비한 유우, 한우의 수태율 및 생산성향상 기반 구축 확립에 관한 연구”의 결과를 요약하면 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 낙농업에서 그 피해가 크면서도 발생율이 높은 번식장애에 대한 진단(ELISA)기법을 개발하기 위하여 항원인 progesterone에 대해 그 기본이 되는 항혈청은 종래의 방법에 의한 다크론성 항혈청 획득외의 세포융합기법에 의하여 교차반응율이 매우 낮으면서도 결합정수가 높은 단크론성 항체를 얻을 수 있어 일정한 조건에서의 비교 분석이 가능하게 되었다.
2. ELISA(효소면역 측정법)기법의 확립으로 종래의 RIA에서 탈피하여 특수한 시설과 장소를 요하지 않으면서도 방사능 물질을 사용하지 않아 누구라도 쉽게 활용할 수 있는 기틀을 마련하였다. 또한 RIA에서는 여러 가지 여건상 많은 샘플 수를 요하나 ELISA에서는 검체수가 적어도 전혀 문제가 되지 않기에 현장 활용이 매우 용이할 것으로 판단되었다.
3. 대개의 경우 분석재료로 혈액 또는 유즙중의 하나를 재료로 사용하고 있으나 본 연구결과 혈액 또는 유즙(탈지유)중의 어느 것을 사용하여도 전혀 문제가 되지 않음을 알 수 있었다.
4. 임신진단에의 활용에는 수정일로 부터 18일이내, 늦어도 20-24일 이내에 가능하여 조기 임신진단이 가능하였으나 임신의 최종확진(100%)에는 착상과 모체간의 요인이 많아 이후의 검색이 필요함

을 알 수 있었다.

비임신의 경우는 100%진단이 가능하여 여기에 근거한 충분한 조치가 가능함을 알 수 있었다.

5. 분만이후의 난소기능회복 여부에의 활용에는 물론 둔성발정의 검색에도 활용 가능함을 알 수 있었다.
6. 난소질병중 특히 난포낭종과 황체낭종, 난소기능정지의 감별을 정확하게 진단할 수 있었다.
7. 수태율을 높이기 위해서는 발정관찰은 물론이나 오인도 충분히 있을 수 있기에 유즙 또는 혈액에서의 progesterone농도 측정이 당일에 이루어져 여기에 근거한 대책(재수정 등)을 마련하면 더욱 더 수태율을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.
8. 일반적으로 한우는 유우에 비하여 번식장애우가 적은 것으로 알려져 있으나 도축장에서의 확인 결과 난소의 발육부전, 난포낭종 및 황체낭종레도 발견할 수 있어 번식장애우가 상당수 있을 것으로 판단되며 더욱이 조직학적 검색에서 과립-난포막 세포종의 발생레도 볼 수 있어 앞으로는 번식장애우에 대한 생전의 각종 기록과 자료분석과 아울러 조직학적 검색이 동시에 이루어져야 함을 느낄 수 있었다.

이상에서 언급한 바와 같이 본 연구과제는 1년간의 단기과제였기 때문에 정확한 개체수의 다량확보, 이후의 정밀 추적, 확인작업에 어려움이 있어 개체수를 다량으로 확보하여 추진하지 못해 아쉬운 점이 많지만 안정되면서도 손쉽게 측정할 수 있는 효소면역측정법의 확립으로 조기 임신진단(특히 비임신)에의 활용에는 물론 분만후 난소기능회복여부, 난소질병 중 난포낭종, 황체낭종, 난소기능정지의 감별진단, 번

식장애우에 대한 치료효과의 판정에도 활용 가능성이 밝혀져 유, 한우의 수태율 향상에는 물론 생산성 향상에도 기여할 수 있는 기틀을 마련한 것으로 판단된다.