

최 종  
연구보고서

초음파유도 난포란을 이용한 고능력 젖소의  
체외수정란 및 송아지 생산에 관한 연구

Production of Dairy Calves by Transfer of  
*In Vitro* Produced Embryos Using  
Follicular Oocytes Collected by Ultrasound-Guided  
Aspiration

연구기관  
경 상 대 학 교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “초음파유도 난포란을 이용한 고능력 젖소의 체외수정란 및 송아지 생산에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 11. 20.

주관연구기관명 : 경상대학교  
총괄연구책임자 : 박 충 생 (경상대학교)  
연 구 원 : 최 상 용 (경상대학교)  
          이 효 중 (경상대학교)  
          이 정 규 (경상대학교)  
          강 양 수 (경상남도 농촌진흥원)

# 요 약 문

## I. 제 목

초음파유도 난포란 채란에 의한 고능력 젖소의 체외수정란 및 송아지 생산에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

세계적으로 무한경쟁의 시대에 직면하여 우리나라 축산업에 있어서도 젖소 및 한우의 품질개선과 생산비 절감방안을 시급히 수립해야 할 것이다. 이를 위하여는 무엇보다도 종축의 개량 효과를 극대화함으로써 경쟁력을 제고해 나가야 할 것이다. 특히 우리나라는 젖소의 사육두수가 적어 종축선발에 엄청난 비용을 투입할 수도 없는 등 어려움이 많으므로 극히 우수한 젖소의 수정란을 다량생산 이용하여 종축을 개량하는 기법의 개발이 대단히 필요한 연구과제인 것이다.

최근 선진국에서는 생명공학적인 기법의 하나인 체외수정란의 생산과 이를 이식하는 기술은 상당 수준까지 발전되어 있다. 그러나, 국내에서는 아직까지는 실용화 단계에는 이르지 못하고 있고, 체외수정란의 생산도 도축되는 소의 난소에서 난포란을 채취하여 이용함으로써 가축개량의 효과를 기대하기에는 어려운 실정이다. 이러한 견지에서 우수한 젖소로부터 난포란을 채취하여 체외수정란을 생산한다면 종빈우의 선발강도를 향상시키고 세대간격을 단축시켜 개량효과를 극대화할 수 있을 것이다.

또한 이 기법의 확립은 쌍자생산, 복제동물의 생산, 성감별 정자의 수정에 의한 송아지의 성조절 기술 및 유전자전이 동물 생산 등 여러가지 생명공학적인 기술발전의 기초를 구축하는데 이용될 수도 있게 되므로 연구개발이 매우 필요한 것으로 생각된다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 초음파를 이용한 난포란의 채란 방법의 개발

본 연구의 목적은 고능력 젖소의 수정란을 최소의 경비로 최대한 대량 생산하여 이식에 이용함으로써 종빈우의 선발강도를 높혀 젖소의 개량효과를 증진할 수 있는 기법을 개발하고자 초음파를 이용한 난포란의 채란과 이들 난포란의 체외성숙, 수정 및 배양기법을 확립하고, 이들 수정란을 이식하여 실용적 수준의 수태율을 얻고자 함에 있다. 따라서 이를 위한 세부 연구내용은:

- 1) 본 연구실에 주식회사 메디슨에서 기증한 초음파 진단기 (SONOACE 1500)가 인체의 난포란 채취용으로 개발된 것이므로 젖소에 활용할 경우 제기될 수 있는 문제점을 찾아내어 이를 보완하고, 고가의 1회용 주사침의 재 활용 및 대체방안을 연구하고,
- 2) 도축우에서 채취한 난소에서 초음파진단기에 의한 난포란의 채란에 따른 문제점 확인과 이에 대한 개선책 연구와,
- 3) 과배란을 유기할 경우와 과배란 처리를 하지 않고 난포란을 채란할 경우의 채란율 및 난자의 질적등급을 평가하여,
- 4) 이러한 장비와 기술의 개발로 생축으로부터 난포란의 채란을 반복적으로 수행함으로써 체외수정란의 생산을 위하여 소요되는 경비 및 문제점을 도출하여 이를 보완하고자 한다.

#### 2. 체외수정란의 생산을 위한 최적 배양체계 구축

본 연구에서는 체외배양기법을 응용하여 저렴하게 다량의 우수한 수정란의 생산체계를 확립하고자 한다. 따라서, 고능력 젖소의 수정란을 최소의 경비로 최대한 대량 생산하여 이식에 이용함으로써 종빈우의 선발강도를 높혀 젖소의 개량효과를 증진할 수 있는 기법을 개발하고자, 초음파를 이용하여 채란된 난포란과 도축우의 난소에서 채란된 난포란을 이용하여 최적 배양체계 구축을 위한 체외성숙, 수정 및 배양기법을 확립하고, 후기배로 발달한 체외수정란을 동결·융해하여 생존율을 조사함에 있다. 따라서 이를

위한 세부 연구내용은:

- 1) 초음파유도에 의한 생체 난포란의 채란을 조사 및 등급평가를 계속적으로 실시하고,
- 2) 도축우의 난소에서 채집된 난포란의 체외수정을 및 동결정액의 활력을 조사하여,
- 3) 체외수정란의 배 발달을 조사 및 배양체계를 확립하고,
- 4) 후기배로 발달한 체외수정란의 동결 및 융해후 생존율에 관하여 조사하고자 한다.

### 3. 체외수정란을 이용한 산자 생산

본 연구는 고능력 젖소의 수정란을 최소의 경비로 최대한 대량 생산하여 체외수정란 이식에 이용함으로써 증빈우의 선발강도를 높혀 젖소의 개량효과를 증진할 수 있는 기법을 개발하고자 초음파를 이용한 난포란의 채란과 이들 난포란의 체외성숙, 수정 및 배양기법을 확립하고, 이들 수정란을 이식하여 실용적 수준의 수태율을 얻고자 함에 있다. 따라서 우수한 형질의 체외수정란을 이용한 산자생산을 위한 세부 연구내용은:

- 1) 수란우의 개체별 또는 우군별 건강 조사 및 수란우로서 적합 여부 조사
- 2) 비외과적 방법에 따른 수태율 조사
- 3) 비외과적 방법에 따른 경산우와 미경산우의 수태율 조사
- 4) 발정동기화 시킨 군과 자연발정 군의 수태율 조사
- 5) 동결란과 신선란의 수태율 조사에 관하여 연구하고자 한다.

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 초음파를 이용한 난포란의 채란 방법의 개발

Holstein 육성우에서 초음파유도로 난포란을 채란하는 기법을 확립하고자 관련 요인에 관한 연구를 실시하였다. 사용한 초음파진단기는 SONOACE-1500 및 SONOACE-600이었으며, 6.5 MHz convex scanner에

58 cm, 17 gauge needle을 사용하였고, vacuum pump는 75~85 mmHg의 vacuum pressure를 유지하도록 조절하여 사용하였다. 난포발달을 촉진하기 위하여 FSH를 다회 사용한 경우는 총 400 mg FSH (Folltropin®-V, Vetrepharm Pty. LTD., Australia)를 1일 2회 3일간 나누어 90, 90; 70, 70; 40, 40 mg 씩 6회 근육주사 하였으며, 최종처리 후 12시간에 난포발달 조사 및 채란을 실시하였다. 그리고 FSH 1회 처리군은 400 mg FSH를 25% PVP에 혼합하여 근육주사하였으며, 처리후 60시간과 48시간에 난포발달 조사 및 채란을 실시하였다. 또한 FSH 농도를 각각 400, 200 및 100 mg으로 조절하여 single dose로 25% PVP에 첨가하여 1회 근육주사하였으며, 각각 FSH 처리 후 60시간에 난포발달 조사 및 난포란 채란을 실시하였다. 자연 채란구는 발정주기 중 임의의 시기에 FSH 전처리 없이 난포 조사 및 채란 하였다. 채란은 주 1회로 하였는데, 먼저 동물을 진정시키고 질벽을 완화시키기 위해서 1 mg/체중 100 kg 수준의 detomidine hydrochloride (Domosedan®, Canada)를 미정맥에 투여하였으며, 또한 복부의 긴장을 방지하기 위해서 2% Hostacain 4~6 ml (또는 2% Lidocain 3~6 ml + Adrenaline)을 미근부의 제 1, 2 미추간에 주사한 후 채란하였으며, 실험의 결과는 다음과 같다.

예비 실험으로서 도축 한우 난소로부터 초음파진단기로 채란하여 채란율을 조사한 성적은 vacuum pump를 이용한 경우에 80.7%로 나타나 manual syringe를 사용한 경우의 47.1% 보다 높은 유의적 ( $P < 0.05$ ) 차이를 나타내었다.

초음파진단에 의한 FSH 전처리우와 무처리우의 난소에서 난포발달 상태를 조사한 바 무처리군에서는 71.0%의 소난포가 관찰되었으나, FSH 처리군에서는 70.5~92.8%의 중난포가 관찰되었다. 특히 무처리군에서 소난포의 우점에 의해 채란이 용이한 중난포 이상의 난포수는  $4.6 \pm 1.9$ 개로 총 가시난포수  $9.7 \pm 2.2$ 개에 비하여 훨씬 적었다. 그리고 처리군과 무처리군 중에서 400 mg FSH를 single dose로 전처리후 60 시간에 채란가능 난포수는 총 가시난포  $21.2 \pm 2.3$ 개중  $21.0 \pm 2.0$ 개로 가장 높게 나타났으며, 각 처리군 간에는 유의차 ( $P < 0.05$ )가 인정되었다. 또한 각기 다른 농도에 따른 FSH 처리우의 난포발달 상태에 있어서도 400 mg FSH를 single dose로 전처리

후 60 시간에 채란가능 난포수는 총 가시난포  $16.2 \pm 1.1$ 개중  $14.2 \pm 0.9$ 개로 가장 높게 나타났으며, 무처리군과 다른 처리군간의 유의차 ( $P < 0.05$ )가 인정되었다.

초음파 유도에 의한 난포란의 채란율은 400 mg FSH single dose 처리군과 무처리군에서 46.3~75.0%로 나타났으나, 처리군간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다. 그리고 1회당 채란된 난포란의 수는 FSH 처리후 60시간에서  $10.6 \pm 2.2$ 개로서 FSH 처리후 48시간의  $7.8 \pm 2.7$ 개 및 무처리군의  $3.4 \pm 3.0$ 개 보다 높게 나타났으며, 채란된 난포란 중 Grade I 과 II 등급의 회수율은 각 처리군 간에 31.8~64.0%로 나타났으나 역시 처리군 간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다. 또한 각기 다른 농도에 따른 FSH 처리군에 있어서 난포란의 채란율은 처리군과 무처리군간의 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았으나, 1회당 채란된 난포란의 수에 있어서는 400 mg FSH 처리후 60시간에서  $10.0 \pm 0.8$ 개로서 다른 처리군과 무처리군간의 유의차 ( $P < 0.05$ )가 인정되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 초음파유도로 난포란을 채란하는 방법으로서는 본 연구의 범위에서는 400 mg FSH를 25% PVP 용액에 혼합하여 1회 전처리한 후 60시간에 75~85 mmHg의 음압을 유지하는 진공펌프로 흡입함이 가장 효율적인 것으로 판단되었다. 그리고 200 mg이나 100 mg 같은 저농도 FSH 처리는 난포란의 발달에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나, 호르몬처리를 병행하지 않는 무처리우에 있어서도 주당 2회의 채란을 지속적으로 수행한다면 연구 결과에서처럼 이용 가능한 난포란을 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이에 따른 지속적인 연구가 진행됨으로써 과배란 채란에 비하여 훨씬 경제적인 방법으로 발전될 수 있을 것으로 기대된다.

## 2. 체외수정란의 생산을 위한 최적 배양체계 구축

초음파를 이용한 난포란의 채란에 있어서 유전적으로 가치있는 동물(공란우)로부터 얻어진 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하기 위해서는 소수의 난포란 배양에 적합한 배양체계의 구축이 필수적이므로 체외성숙, 수정 및 배양에 따라 적합한 최적 배양체계를 구축하고자, 도축장에서 도축

된 한우의 난소에서 최소한 2층 이상의 난구세포를 가지고 세포질이 충실한 난포란을 채란하여 실험에 공시하였다. 난포란의 체외성숙용 배양액으로 LH (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), FSH (35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 그리고 estradiol-17 $\beta$  (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 Ham's F-10에 BCS 또는 EGF를 각각 첨가하여 24시간 동안 체외성숙을 유도하였으며, 체외수정에 필요한 정자를 준비하기 위하여 정자용 TALP medium을 이용하여 swim-up 방법 또는 Percoll density gradient 방법으로 운동성을 가진 활력있는 정자를 채취하여  $2 \times 10^6$  cell/ml 농도로 성숙된 난자와 수정시켰다. 체외배양에 있어서 체외수정 후 체외배양용 배양액 TCM-199 또는 HECM-6에 3~4일 동안 초기 체외수정란을 배양시킨 다음 10% BCS가 첨가된 신선 TCM-199 배양액으로 수정란을 옮겨 48시간마다 신선 TCM-199배양액으로 교체하여 7~10일까지 후기배로의 발달을 유도하였다. 또한 초기 수정란을 배양하는데 있어서 HECM-6에 PVA, BSA 또는 BCS를 각각 첨가하거나 난관상피세포와의 공배양을 실시하고, 또한 배양액 droplet의 volume에 따른 수정란 수의 비율에 따라 후기배로의 발달을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

체외성숙시에는 Ham's F-10 배양액에 EGF를 첨가하여도 수정율과 배반포기배로의 발달율에는 BCS를 첨가한 경우와는 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 그리고 체외수정시 정자를 준비하는데 있어서도 Swim-up 방법과 Percoll density gradient 방법에 있어서 수정율은 각각 80.2%와 81.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 체외수정 후 체외배양용 배양액으로 TCM-199과 HECM-6를 이용한 결과, 수정율에 있어서는 각각 80.5%와 72.0%로 TCM-199에서 약간 높은 경향을 나타내었으나, 배반포기배로의 발달율에 있어서는 26.7%와 42.4%로 TCM-199에 비해 HECM-6에서 훨씬 높게 나타났다. 그리고 HECM-6 배양액에서 수정란의 초기 배양시 난관상피세포와의 공배양군과 공배양을 하지 않는 군에 있어서는 수정율과 발달율에 있어서 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 또한 HECM-6 배양액에 PVA, BSA 및 BCS를 각각 첨가하였을 때, 수정율에 있어서는 PVA 첨가군에서 약간 낮게 나타났으나, 배반포기배로의 발달율에 있어서는 세 첨가군 모두 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

체외배양시 4-well 이나 droplet을 이용하였을 때 수정을, 후기배로의 발달을 및 부화율에 있어서 두 군간에 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 수정란의 배양에 있어서  $50\ \mu\text{l}$  droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10, 20, 30, 40개 및 50개로 조절하여 배양한 결과,  $50\ \mu\text{l}$  droplet에 30개와 40개의 수정란으로 배양하는 것이 후기배로의 발달율에 있어서 각각 47.4% 및 44.9%로 높게 나타나 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내었다. 그리고  $20\ \mu\text{l}$ 의 droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10개 및 20개로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 32.0, 36.7% 및 35.0%로서 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 또한 체외배양액의 droplet volume과 체외수정란의 비율을  $10\ \mu\text{l}:10$ 개,  $20\ \mu\text{l}:20$ 개 및  $50\ \mu\text{l}:50$ 개로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 32.0, 36.7% 및 35.0%로서 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 그리고 체외수정 후 체외배양시 난관상피세포와 공배양 하지 않은 군과 공배양군과의 할구수를 체외배양 8일째 조사한 결과 각각  $96.6\pm 4.0$ 개 및  $106.7\pm 5.1$ 개로 나타나 두 처리군 간에 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

이상의 실험 결과들을 종합해보면, EGF가 첨가된 체외성숙용 배양액 Ham's F-10으로 24시간 동안 체외성숙을 유도하여 Percoll density gradient 방법으로 채취된 운동성을 가진 활력정자와 매정하여 체외수정을 시킨 다음 HECM-6 체외배양액으로 3~4일 동안 초기 배양을 한 후, 10% BCS가 첨가된 신선 TCM-199 배양액으로 옮겨 후기배로의 발달율을 유도하는 것이 체외수정란의 생산율을 높이는데 효율적인 것으로 사료되며, 체외수정 후 체외배양에 있어서 배양액과 수정란의 비율을  $1\ \mu\text{l}$ 당 0.6~1개 정도로 조절하여 배양하는 것이 후기배로의 발달율을 높이는데 효율적인 것으로 사료된다.

따라서, 대부분의 소 난포란들은 적절한 배양체계의 구축으로 소수의 수정란으로 체외성숙, 수정 및 배양했을 때 배반포기배까지 충분히 발달할 수 있다는 것을 나타내었다. 이것은 초음파를 이용한 난포란 채란에 있어서 각각의 공란우로부터 얻어진 소수의 난포란을 이용한 체외수정란의 생산체계 구축에 대한 폭넓은 연구의 장을 열어 놓았으며, 우수한 증빈우의 난포란을 이용한 체외수정란 생산에 있어서도 확실한 수정란의 계통을 유지할 수 있

을 것으로 사료된다.

### 3. 체외수정란을 이용한 송아지 생산

젖소 및 한우를 이용하여 초음파유도 난포란 채란에 의해 생산된 체외수정란을 이용하여 송아지를 생산하기 위해 본 연구를 실시하였다. 호르몬 처리는 400 mg FSH를 25% PVP와 혼합하여 1회 근육주사 후 60시간에 난포란 채란을 실시하였다. 채란된 난포란은 체외성숙용 배양액으로 LH (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), FSH (35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 그리고 estradiol-17 $\beta$  (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 Ham's F-10에 EGF를 첨가하여 24시간 동안 체외성숙을 유도하였으며, 체외수정에 필요한 정자를 준비하기 위해 정자용 TALP medium을 이용하여 Percoll density gradient 방법으로 운동성을 가진 활력있는 정자를 채취하여  $2 \times 10^6$  cell/ml 농도로 성숙된 난자와 수정시켰다. 체외배양에 있어서 체외수정 후 11종의 아미노산이 첨가된 체외배양용 배양액 HECM-6에 3~4일 동안 초기 체외수정란을 배양시킨 다음 10% BCS가 첨가된 신선 TCM-199 배양액으로 수정란을 옮겨 48시간마다 신선 TCM-199배양액으로 교체하여 7~10일까지 후기배로의 발달을 유도하였으며, 위의 방법으로 생산된 체외수정란을 비외과적방법으로 수란우에 이식하여 생산된 송아지에 관한 연구의 결과는 다음과 같다.

도축장에서 도축되는 한우의 난소를 이용하여 채란된 난포란과 초음파유도에 의해 채란된 젖소의 난포란에 있어서 수정율은 각각 72.9%와 75.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배의 발달율에 있어서도 각각 34.1%와 38.4%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

젖소와 한우를 공란우로 이용하여 초음파 유도에 의한 난포란 채란율에 있어서는 각각 61.7% 및 60.1%로 나타나 두 품종간에 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 채란된 난포란 중 체외수정에 공시할 수 있다고 평가되는 Grade II 등급 이상의 회수율을 보면 젖소에서는 59.6%로 나타났으나, 한우에 있어서는 69.3%로 나타나 두 품종간에 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내었다.

초음파유도에 의해 채란된 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하는데

있어서 젓소와 한우의 수정율은 각각 74.9%와 77.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배로의 발달율에 있어서도 각각 39.2%와 40.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

도축 한우의 난소에서 채란된 난포란을 이용하여 생산된 114개의 체외 수정란을 14두의 한우 수란우와 24두의 젓소 수란우에 이식하여 각각 한우 수란우 4두 (28.6%)와 젓소 수란우 9두 (37.5%)의 수태율을 얻었으며, 송아지의 생산은 한우 수란우 4두와 젓소 수란우 5두에서 각각 7마리씩 총 14마리의 한우송아지 (Single: 5, Twins: 6, Triplets: 3)를 생산하였다. 그러나, 임신된 젓소 수란우 9두 중에서 1두는 유방염으로 인하여 도태되었으며, 3두는 유산하였다.

초음파 유도에 의해 채란된 한우의 난포란을 이용하여 생산된 20개의 체외수정란을 1두의 한우 수란우와 6두의 젓소 수란우에 이식하여 6마리의 한우 송아지 (Single: 1, Twin: 2, Triplets: 3)를 생산하였다.

그리고 초음파 유도에 의해 채란된 젓소의 난포란을 이용하여 생산된 58개의 체외수정란을 22두의 젓소 수란우에 이식하여 8두 (36.4%)의 수태율을 얻었다. 이들 임신된 8두의 수란우 중에서 2두는 유방염으로 인하여 도태되었고, 1두는 유산하였으며, 2두는 각각 1두씩 정상송아지를 분만하였고, 나머지 3두는 각각 1998년 12월 1일 (2두)과 12월 25일 (1두)에 분만할 예정이다. 초음파 유도에 의해 생산된 신선 수정란을 이용하여 이식한 경우에는 25두의 수란우에서 12두 (48.0%)가 임신하였으나, 동결 수정란을 이용하여 이식한 경우에는 4두 모두 임신되지 않았다.

위의 결과에서 나타난 바에 의하면, 앞으로 체외수정란을 이식하는데 있어서 신선란을 이용하는 방법이 유리할 것으로 사료되며, 또한 수란우의 엄격한 선발과 임신중인 수란우의 사양관리에 좀 더 세심한 주의가 필요할 것으로 사료된다. 그리고 본 연구에서 초음파유도에 의해 채란된 난포란으로부터 생산된 젓소의 체외수정란을 이식한 4두의 젓소 수란우에서는 아직까지 임신여부가 확인되지 않았으며, 또한 21개의 체외수정란이 동결·저장 중에 있으며 지속적인 연구가 지속적으로 수행되어질 것이다.

또한, 추후에도 초음파를 이용하여 고능력 젓소와 한우의 난포란 채란을 지속적으로 수행하여, 본 연구실에서 다년간 축적된 체외수정란의 생산기술

을 바탕으로 하여 생산된 체외수정란을 이식하여 송아지 생산율을 향상시키고자 한다.

#### 4. 활용에 대한 건의

- 1) 축협중앙회 유우개량사업소와 경남 낙농기술 산학연구회를 중심으로 고능력 젖소를 선정하고, 초음파유도 체외수정란을 본 대학교에서 생산하여 낙농가의 젖소에 이식하도록 한다.
- 2) 본 연구결과를 농촌진흥청 축산기술연구소, 축협중앙회 한우개량사업소 및 경상남도 농촌진흥원과 협력하여 젖소와 한우의 수정란이식에 의한 종축개량 사업에 활용될 수 있도록 한다.
- 3) 초음파유도 체외수정란의 이용 기법이 성공적으로 개발됨으로써 쌍자 송아지, 성조절 송아지의 생산, 핵이식에 의한 복제송아지 및 유전자전이 송아지의 생산 등의 2단계 연구를 위한 기초자료로 활용될 것이다.

## S U M M A R Y

### Part I :

Ultrasound-guided follicular aspiration was performed in Holstein heifers once weekly with or without pretreatment of single or multiple decreasing doses using a total of 400 mg Folltropin®-V. Follicular oocytes were aspirated with a 6.5 MHz convex-array ultrasound transducer designed for intravaginal use. All of the visible follicles larger than 4 mm in diameter were punctured with a 17 gauge, 55 cm needle at each aspiration session and the follicular fluids containing oocytes were obtained by vacuum suction. The results obtained were as follows:

As a preliminary experiment, the recovery rates of follicular oocytes by ultrasound-guided aspiration from the isolated ovaries of Korean native cows were compared between suction methods using manual syringe or vacuum pump. The recovery rate of oocytes using vacuum pump (80.7%) was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than that of manual syringe (47.1%).

The follicles were counted by their size in diameter with ultrasound image, and recovery rates and grades of follicular oocytes collected by ultrasound-guided aspiration were investigated in Holstein heifers pretreated with or without FSH. A group of heifers were injected with a total 400 mg FSH by multiple decreasing doses as twice a day for 3 days. Another 2 groups were injected with a single dose of 400 mg FSH mixed with 25% PVP. Ultrasound observation of follicle population and/or ultrasound-guided transvaginal oocyte aspiration were performed 12 hrs following the last FSH injection in multiple dose group, and 48

or 60 hrs after FSH injection in single dose group.

Most of the visible follicles had a small size of less than 3 mm in diameter in unstimulated heifers (71.0%), but medium size in all heifers treated with FSH (70.5 to 92.8%). The number of OPU follicles per session ( $4.6 \pm 1.9$ ) were much less than the visible follicle counts ( $9.7 \pm 2.2$ ) in unstimulated heifers due to the small dominant follicles. Among 4 groups of heifers the most visible as well as OPU follicles were observed in the heifers at 60 hrs following treatment of a single dose of 400 mg FSH ( $21.2 \pm 2.3$  and  $21.0 \pm 2.0$ ), and a significant difference of the follicle counts between the groups was found ( $P < 0.05$ ).

The rates of oocyte recovery from the follicles by ultrasound-guided aspiration were varied 46.3 to 75.0% in the heifers unstimulated and treated with a single dose of 400 mg FSH, but the difference was not significant between the groups. The number of recovered oocytes per session was appeared to be highest at aspiration at 60 hrs following single FSH ( $10.6 \pm 2.2$ ) than those in aspiration at 48 hrs after single FSH ( $7.8 \pm 2.7$ ) or the unstimulated heifers ( $3.4 \pm 3.0$ ). The proportion of grade I and II oocytes to all oocytes collected was varied 31.8 to 64.0% between the groups. However, there was not found significant difference in both the number of oocytes recovered per session and the percentage of grade I and II oocytes.

From the above results it was concluded that the more oocytes of superior quality might be recovered economically by ultrasound-guided aspiration at 60 hrs following the pretreatment of a single dose of 400 mg FSH and by suction using a vacuum pump system of about negative pressure of 75 to 85 mmHg.

## Part .II:

This study was conducted to establish the optimal conditions for IVP embryos using oocytes derived from follicles of slaughter-house ovaries. The developmental rates of embryos produced from *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture were determined by different culture conditions.

The ovaries of Hanwoo were obtained from a local slaughter-house and kept on 30 to 35°C in physiological saline containing antibiotics and transported to laboratory within 4 hrs. The oocytes were aspirated from visible follicles of 2~7 mm in diameter using 18 gauge needle attached to a 50 ml tube by vacuum pump. The recovered oocytes which were completely surrounded by at least 2 layers of cumulus cells in combination with a homogeneous cytoplasmic pigmentation were used. The selected oocytes were washed 3 or 4 times with D-PBS containing 10% BCS and matured *in vitro* (IVM) in Ham's F-10 supplemented with 10% BCS or 0.01 µg/ml EGF at 39°C under 5% CO<sub>2</sub> in air for 24 hours.

They were fertilized *in vitro* (IVF) with fresh or frozen sperm separated by Percoll density gradient or swim-up in TALP media.

The zygotes were cultured with or without BOEC in media (HECM-6 supplemented 11 amino acid and/or TCM-199 supplemented 10% BCS) for 7 to 10 days.

The results obtained were as follow:

The cleavage rate and the developmental rate to blastocysts after maturation in Ham's F-10 with EGF or BCS was similar (76.0% vs. 44.0% in EGF, 75.9% vs. 43.6% in BCS, respectively).

The cleavage rate and the developmental rate to blastocysts after

fertilized by either swim-up or Percoll separated spermatozoa was not significantly ( $P < 0.05$ ) different between the two methods: swim-up (80.2% vs. 29.2%) and Percoll (81.9% vs. 26.5%).

The cleavage rate of IVM-IVF oocytes was significantly ( $P < 0.05$ ) higher following IVC using TCM-199 (80.5%) than HECM-6 (72.0%). However, the developmental rate to blastocysts was significantly ( $P < 0.05$ ) higher following IVC using HECM-6 until day 3 or 4, and then transferred into TCM-199 (42.2%) than TCM-199 from day 1 to day 9 (26.7%).

The cleavage rate and the blastocyst developmental of embryos produced *in vitro* after HECM-6 media exchange in day 3 or day 4 was not significantly ( $P < 0.05$ ) different (78.6% vs. 45.5% in day 3, 75.0% vs. 43.2%, respectively).

The cleavage rate and the developmental rate to blastocysts after co-culture with or without BOEC in HECM-6 medium was not significantly ( $P < 0.05$ ) different (74.2% vs. 41.4% with BOEC, 73.9% vs. 43.5% without BOEC, respectively).

The cleavage rate of IVM-IVF oocytes was significantly ( $P < 0.05$ ) higher following *in vitro* culture in HECM-6 supplemented with BSA (75.0%) and BCS (76.7%) than PVA (72.5%), however, the developmental rate to blastocysts was not significantly ( $P < 0.05$ ) different between supplements: PVA (42.2%), BSA (40.5%) and BCS (38.0%), respectively.

The cleavage rate and the developmental rate to blastocysts after *in vitro* culture in 4-well plate or droplets under paraffin oil was similar (75.0% vs. 51.3% in 4-well plate, 77.1% vs. 51.5% in droplet, respectively). And the hatching rate was not affected significantly

( $P < 0.05$ ) by culture condition as 87.0% in 4-well plate compared with 91.4% in droplet.

Of the cleaved embryos, the percentage of embryos developed to blastocyst stage after *in vitro* culture using 5, 10, 20, 30, 40 and 50 embryos in 50  $\mu\text{l}$  droplet system was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in 30 (47.4%), 40 (44.9%) and 50 (43.8%) than 5 (35.7%), 10 (38.7%) and 20 (40.1%) embryos, respectively.

The percentage of embryos developed to blastocyst stage after *in vitro* culture using 5, 10 and 20 embryos in 20  $\mu\text{l}$  droplet system was similar as 32.0, 36.7 and 35.0%, respectively.

The percentage of embryos developed to blastocyst stage after *in vitro* culture with equal density in culture drops was similar (42.4% in 10/10, 40.6% in 20/20 and 40.8% in 50/50, respectively).

The number of blastomere of blastocyst stage after co-culture with or without BOEC in the same period was not significantly ( $P < 0.05$ ) different ( $106.7 \pm 5.1$  and  $96.6 \pm 4.0$ ).

These results indicated that the successful production of IVF embryos depends on optimal conditions of *in vitro* culture system. In conclusion, the most transferable IVP embryos could be produced from Ham's F-10 medium for IVM, Percoll density gradient method for IVF sperm separation and *in vitro* culture in HECM-6 until day 3 or day 4, and then transferred into TCM-199 until day 9 within adequate embryo density in culture droplets after insemination.

### Part III:

The objective of this study was to produce calves by SHD- and OPU-IVF embryo transfer.

Ultrasound-guided follicular oocyte aspiration in Holstein and Hanwoo was performed at 60 hrs after injection of 400 mg FSH single dose.

Following *in vitro* maturation (IVM), Fertilization (IVF) and culture (IVC) using oocytes derived from SHD and OPU, day-7 and day-8 blastocysts were transferred.

The results obtained were as follows:

The cleavage rate and the developmental rate to blastocysts was not significantly ( $P < 0.05$ ) different between the oocytes obtained by SHD (72.9% vs. 34.1%) and OPU (75.9% vs. 38.4%).

The rate of oocyte recovery from the follicles by ultrasound-guided aspiration were not significantly ( $P < 0.05$ ) different between Holstein (61.7%) and Hanwoo (60.1%), but the rate of oocytes useful for IVF was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in Hanwoo (69.3%) than Holstein (59.6%).

The cleavage rate and the developmental rate to blastocysts was not significantly ( $P < 0.05$ ) different between Holstein (74.9% vs. 39.2%) and Hanwoo (77.9% vs. 40.9%).

The nonsurgical transfer of 114 fresh SHD-IVF embryos in 38 recipients on day 8 of estrus cycle resulted 13 pregnancies (34.2%), but one of them was sacrificed during gestation period from mastitis and the other one was aborted. The 14 calves were morphologically normal at birth.

Seventy fresh OPU-IVF embryos were transferred nonsurgically to 21 recipients on day 8 of estrus cycle. Pregnancy rate following embryo

transfer was 41.4% (12 recipients). Two of them was sacrificed during gestation period from mastitis and the other two was aborted. The transfer of eight frozen OPU-IVF embryos resulted in no pregnancy. Nevertheless, the 5 OPU-calves have already been born and 3 pregnancies have been confirmed.

# CONTENTS

Abstract .....	2
Summary .....	11
Contents (English) .....	18
Contents .....	19
Chapter 1. Introduction .....	29
Chapter 2 Follicular oocyte aspiration and grade by ultrasound .....	29
Chapter 3. Establish of the optimal conditions for IVP embryos .....	54
Chapter 4. Calf production following transfer of IVF embryos .....	88
Chapter 5. Expectation effects .....	108

# 목 차

제 1 장 서 론 .....	26
제1절 연구개발의 목적 및 중요성 .....	26
제 2 장 초음파를 이용한 생축 난포란의 채란 및 등급분류	
1. 서론 .....	30
2. 재료 및 방법 .....	31
1) 공시동물 .....	31
2) 호르몬 처리 .....	32
3) 채란용 기자재 .....	32
4) 난포란의 채란 .....	32
5) 난포란의 회수 .....	34
6) 난포란의 등급분류 .....	34
7) 통계학적 분석 .....	34
3. 결과 및 고찰 .....	35
1) 도축난소에서 초음파 유도 난포란 채란 성적 .....	35
2) 초음파 진단에 의한 FSH 처리방법에 따른 난포발달 성적 .....	36
3) 초음파유도 난포란 채란을 및 등급에 미치는 FSH 처리의 효과 .....	38
4) 초음파 진단에 의한 FSH 농도에 따른 난포발달 성적 .....	41
5) 초음파유도 난포란 채란을 및 난자등급에 미치는 FSH 처리 농도의 효과 .....	43
6) 주 2회 영속적인 초음파유도에 의한 난포란의 채란 .....	44

4. 적요 .....	46
-------------	----

Literature Cited .....	49
------------------------	----

## 제 3 장 체외수정란의 생산을 위한 최적 배양체계 구축

1. 서론 .....	55
-------------	----

2. 재료 및 방법 .....	57
------------------	----

1) 난포란의 채란 .....	57
------------------	----

2) 난포란의 체외성숙 .....	57
--------------------	----

3) 체외수정용 정자의 준비 .....	58
-----------------------	----

4) 체외수정 .....	59
---------------	----

5) 체외수정란의 공배양을 위한 난관상피세포의 준비 .....	60
------------------------------------	----

6) 체외수정란의 체외배양 .....	60
----------------------	----

7) 통계학적 분석 .....	62
------------------	----

3. 결과 및 고찰 .....	63
------------------	----

1) 체외성숙시 EGF 첨가에 따른 수정을 및 발달을 .....	63
-------------------------------------	----

2) 체외수정용 정자준비 방법에 따른 수정을 및 배 발달을 .....	64
--	----

3) 체외배양액에 따른 후기배로의 발달을 .....	67
------------------------------	----

4) 체외배양액의 교체시기에 따른 배 발달을 .....	69
--------------------------------	----

5) 체외배양시 난관상피세포와의 공배양에 따른 배 발달을 .....	70
---------------------------------------	----

6) 체외배양시 각기 다른 첨가물에 따른 수정을 및 배 발달을 .....	72
--	----

7) 체외수정 후 4-well plate 또는 droplet 배양에 따른 수정을 및 배 발달을 .....	74
---	----

8) 체외수정후 droplet 배양시 수정란의 밀도에 따른 배 발달을 .....	75
9) 난관상피세포와의 공배양에 따른 할구수 조사 .....	78

4. 적요 .....	80
-------------	----

Literature Cited .....	83
------------------------	----

## 제 4 장 체외수정란을 이용한 송아지 생산

1. 서론 .....	89
-------------	----

2. 재료 및 방법 .....	91
------------------	----

1) 공란우의 선정 .....	91
------------------	----

2) 수란우의 조건 .....	92
------------------	----

3) 발정 확인 .....	93
----------------	----

4) 수정란이식 및 임신확인 .....	94
-----------------------	----

3. 결과 및 고찰 .....	95
------------------	----

1) 도축장 난소 및 초음파 유도 난포란 채란에 의한 체외수정란의 생산 .....	95
--	----

2) 젖소 및 한우의 초음파 유도 난포란 채란을 및 체외수정란의 생산 .....	97
---	----

3) 체외수정란의 이식에 의한 수태율 및 송아지 생산 .....	99
-------------------------------------	----

4) 체외수정란의 동결·융해후 이식에 의한 수태율 조사 .....	102
--------------------------------------	-----

4. 적요 .....	104
-------------	-----

Literature Cited .....	107
------------------------	-----

## 제 5 장 기대효과

1. 기술적 측면 .....	110
2. 경제·산업적 측면 .....	110

## <표 목차>

### 제 2 장 초음파를 이용한 생축 난포란의 채란 및 등급분류

Table 1. Recovery rates of follicular oocytes derived from slaughter-house Hanwoo ovaries by ultrasound-guided aspiration using syringe or vacuum pump .....	8
Table 2. Effects of FSH injection regimens and subsequent observation time on follicular development in Holstein heifers .....	10
Table 3. Effects of FSH injection regimens and subsequent OPU time on number and grade of oocytes collected by transvaginal ultrasound-guided OPU in Holstein heifers .....	12
Table 4. Effect of single dose treatment of Follitrofin®-V on follicular development in Holstein heifers .....	15
Table 5. Effects of single dose treatment of Follitrofin®-V on number and grade of oocytes collected by ultrasound-guided OPU in Holstein heifers .....	16
Table 6. Follicles aspirated and oocytes collected from cows that were aspirated twice weekly for 4 weeks by ultrasound-guided OPU .....	18

### 제 3 장 체외수정란의 생산을 위한 최적 배양체계의 구축

Table 1. Composition of HECM-3 medium for <i>in vitro</i> culture of bovine IVF embryos .....	35
Table 2. Composition of amino acids for HECM-6 .....	36
Table 3. Development of embryos produced <i>in vitro</i> by different culture system for IVM .....	37
Table 4. Effect of swim-up and Percoll treatment for increasing motile spermatozoa used for IVF on subsequent <i>in vitro</i> development of bovine embryos .....	40
Table 5. Effect of culture methods on <i>in vitro</i> development of bovine IVF embryos .....	42

Table 6. Blastocyst development of embryos produced <i>in vitro</i> following media exchange with HECM-6 at day-3 or day-4 of culture .....	44
Table 7. Effect of BOEC co-culture in HECM-6 on <i>in vitro</i> development of bovine IVF embryos .....	45
Table 8. Effect of various supplements in HECM-6 media on <i>in vitro</i> development of bovine IVF embryos .....	47
Table 9. Blastocyst development of <i>in vitro</i> fertilized bovine follicular oocytes in droplets under paraffin oil or 4-well plates .....	49
Table 10. Effect of embryo numbers in group culture system on <i>in vitro</i> development of bovine IVF embryos .....	50
Table 11. Effect of embryo numbers on blastocyst development in a constant 20 $\mu$ l droplets .....	51
Table 12. Effect of different volumes with equal embryo density in culture drops on <i>in vitro</i> development of bovine IVF embryos .....	52
Table 13. Effect of co-culture with BOEC on blastomere counts of <i>in vitro</i> developed bovine IVF embryos .....	53

#### 제 4 장 체외수정란을 이용한 송아지 생산

Table 1. Development of bovine embryos derived from oocytes collected by SHD and OPU .....	69
Table 2. Number of follicular oocytes aspirated by ultrasound .....	72
Table 3. Development of embryos derived from follicular oocytes aspirated by ultrasound-guided OPU .....	73
Table 4. Pregnancies and calf production following transfer of SHD-IVF embryo .....	74
Table 5. Pregnancies and calf production following transfer of OPU-IVF embryo .....	75
Table 6. Pregnancy rate following transfer of fresh and frozen OPU-IVF embryos .....	76

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구개발의 목적 및 중요성

### 1. 연구개발의 목적

세계적으로 무한경쟁의 시대에 직면하여 우리나라 낙농업도 우유의 품질개선과 생산비 절감방안을 시급히 수립해야 할 것이다. 이를 위하여는 무엇보다도 종축의 개량 효과를 극대화함으로써 경쟁력을 제고해 나가야 할 것이다. 우리나라는 젖소의 사육두수가 적어 종축선발에 엄청난 비용을 투입할 수도 없는 등 어려움이 많으므로 극히 우수한 젖소의 수정란을 다량생산 이용하여 종축을 개량하는 기법의 개발이 대단히 필요한 연구과제인 것이다.

최근 선진국에서는 생명공학적인 기법의 하나인 체외수정란의 생산과 이를 이식하는 기술은 상당 수준까지 발전되어 있다. 그러나, 국내에서는 아직까지는 실용화 단계에는 이르지 못하고 있고, 체외수정란의 생산도 도축되는 소의 난소에서 난포란을 채취하여 이용함으로써 가축개량의 효과를 기대하기에는 어려운 실정이다. 이러한 견지에서 우수한 젖소로부터 난포란을 채취하여 체외수정란을 생산한다면 종빈우의 선발강도를 향상시키고 세대간격을 단축시켜 개량효과를 극대화할 수 있을 것이다.

1982년 체외수정란에 의한 송아지가 처음 생산된 이후 그 동안 많은 기초연구를 거쳐 1995년 Hasler 등은 1,884두에 초음파유도 체외수정란을 이식하여 56%의 수태율을 얻는데 성공하고 있다.

따라서 본 연구에서는:

(1) 그 동안 본 연구진은 경상남도 농촌진흥원과 공동으로 김해 도축장에서 도축되는 한우 난포란을 이용하여 산유능력이 낮은 젖소에게 체외수정란을 이식하여 송아지를 생산하였고

(2) “주식회사 메디슨”의 인체용 초음파진단기 (Sonoace - 1500)를 기증받아 젖소에 사용할 수 있도록 일부 개조하여 생체에서 난자를 채취하는 기초실험을 진행 중에 있고,

(3) 1992년 초부터 축협중앙회 유우개량사업소, 경상남도, 경상대학교 축산 관련 교수 및 학생 그리고 이 지역의 선도 낙농가(대경목장 외 56목장)들이 경남낙농기술 산학연구회를 결성하여 젖소의 등록 선형심사 그리고 산유능력 점정사업을 실시하여 왔기에 지역 낙농가들이 소유하고 있는 소수의 고능력 젖소도 확인 되었기에,

(4) 이들 경남지역 낙농가들과 산학협동으로 고능력 젖소에서 초음파 유도 난포란을 채취하여 점정된 우수 종모우의 정자로 체외수정시켜 이들 수정란을 이식시키는 기법을 확립함으로써 조속히 젖소를 개량하여 낙농업의 경쟁력 제고에 기여하고자 한다.

## 2. 연구개발의 중요성

### 가. 기술적 측면

종축의 개량 효과를 높이기 위하여 최근 수정란이식 기법이 널리 이용되고 있으나 수정란 이식 기술을 실용화하려면 수정란의 생산비가 보다 절감되고 안정적으로 대량생산이 될 수 있어야 하는데 이를 위하여는 기존의 과배란 효율을 향상시키는 연구도 필요하지만 지금까지의 연구결과 한계에 도달한 것으로 판명되어 최근에는 체외수정란의 이용을 적극 검토해 오고 있다.

지금까지의 체내수정란의 이용 기법은 과배란 처리 후 수정하여 외과적 혹은 비외과적 방법으로 수정된 난자를 채란하고 있는데 과배란 유기를 위하여 4일간 고가의 호르몬을 1일 2회씩 주사해야 하고, 연간 두당 20개 정도의 수정란을 생산하지만 매회 일정한 수의 수정란을 회수하기도 어려움을 뿐아니라, 과배란 유기후 난소낭종 등 부작용도 염려되고 있다.

최근의 국외 연구결과에 의하면 초음파유도 난포란을 체외수정시키는 기법으로는 연간 두당 약 100여개 이상의 이식 가능한 수정란을 생산할 수 있다. 초음파유도에 의한 난포란 채취기법은 임신우에서도 난포란 채취가 가능한 만큼 실제로는 더 많은 수정란을 확보 이용할 수도 있다.

또한 이 기법의 확립은 쌍자생산, 복제동물의 생산, 성감별 정자의 수

정에 의한 송아지의 성조절 기술 및 유전자전이 동물 생산 등 여러가지 생명공학적인 기술발전의 기초를 구축하는데 이용될 수도 있게 되므로 연구개발이 매우 필요한 것으로 생각된다.

#### 나. 경제적 측면

기존의 과배란 유기법에 의한 체내수정란은 과배란 처리 후 외과적 혹은 비외과적 방법이나 복강경을 이용한 채란법 등으로 생산된 수정란으로서 과배란을 위한 호르몬 처리, 수정시 일반적으로 2 straw의 정액을 2회 수정하므로 고가의 정액의 다량 사용 등으로 1개의 이식 가능한 수정란의 생산비가 약 30만원 정도의 막대한 비용이 소요된다. 그러나 초음파유도 난포란의 회수 방법은 미근부 국소마취를 위한 소량의 마취제만 이용되고 체외수정시 한개의 종모우 정액으로 다량의 난자를 수정시킬 수 있으므로 수정란의 생산비를 현재의 호르몬주사에 의한 과배란 처리법에서의 경비의 30%정도로 절감시킬 수 있다. 또한 고능력 수송아지의 생산으로 종모우나 정액수입에 소요되는 외화를 절약할 수 있으며 암송아지는 산유량을 향상시켜 두당 연간 120만원 이상의 유대지수를 향상시킬 수 있다.

#### 다. 사회적 측면

근래 가축 인공수정 기술의 발달로 종축개량이 괄목할 만큼 이루어져 왔으나, 인공수정은 종모우를 이용한 개량 뿐이므로 종빈우의 선발효과를 높일 수 없었다. 수정란 이식 기술의 개발로 새로운 개량방법이 주목받게 되었다. 그러나 수정란 이식기술이 개발된지 20여년이 지났으나 우량 종빈우에서의 수정란의 생산이 기술적 경제적 이유 등으로 여의치 않아 개량을 원하는 일반 양축가들은 실망적인 상태에 있다고 할 수 있다.

초음파유도 체외수정란 이용 기법이 확립되면 수정란이식이 조속히 실용화될 것이며 따라서 장래에 대하여 불안해 하고 있는 양축 농민들이 이를 통하여 종축개량에 대한 희망을 조속히 갖게 하고 번식관리에도 더욱 세심한 주의를 하게 되어 영농의욕도 고취시켜 줄 것이다.

또한 일반 체외수정란 이용 기술은 수정란 생산비가 저렴하여 한우와 젖소의 송아지 가격이 현저히 차이가 날 경우는 한우에서 젖소 송아지를

생산하거나 젖소에서 한우 송아지를 쌍자생산케 하는 등 한우 혹은 젖소 사육농가에게 장래에 대한 불안감을 해소시켜 줄 수도 있다.

## 제 2 장 초음파를 이용한 생축 난포란의 채란 및 등급분류

### 1. 서 론

소의 체외수정란 생산과 이식 기술은 주로 도축우 난소에서 수정란을 저렴하게 생산하여 쌍태유기에 사용할 목적으로 연구되어 오고 있으며, 국내에서도 체외수정란의 생산과 수정란이식에 관한 연구가 활발하게 진행되어 체외수정란 유래의 송아지가 생산된 바 있다 (황 등, 1993; 박 등, 1994; 한 등, 1994). 그러나 이 경우에는 종축의 개량에는 별로 도움이 되지 못한다. 체내수정란 이식은 유전적 능력이 우수한 암소의 선발강도를 높여 유전적 개량 효과를 높이고자 함에 그 주된 목적을 두고 있다. 이 경우에도 종빈우의 선발강도를 크게 제고할 수 있기 위하여는 이식 가능한 체내수정란의 생산효율이 높아야만 하는데 일정한 한계에 부딪히고 있다. 이러한 견지에서 그 대안의 하나로서 최근 우수한 암소로부터 가급적 저렴하게 많은 수의 난포란을 채취하여 체외수정란을 생산 이용해 보려는 연구를 활발히 수행해 오고 있다.

소에서 초음파유도 난포란의 채취와 이를 이용한 체외수정란 생산에 관하여 Pieterse 등(1988)이 처음으로 보고한 이후, 이에 관한 연구가 다양한 방면으로 활발하게 진행되어 왔다. 이러한 일련의 연구들은 성선자극호르몬을 처리했거나 또는 처리하지 않은 소에서 (Pieterse 등, 1988, 1991a, b, 1992; Kruip 등, 1993; Walton 등, 1993; Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995; Meintjes 등, 1995; Stubbings 와 Walton, 1995), 난소의 기능이 활성적이지 못한 소에서 (Bols 등, 1995), 미성숙 송아지에서 (Brogliatti와 Adams, 1996; Duby 등, 1996; Presicce 등, 1997), 불임우에서 (Looney 등, 1994), 또는 임신초기 1/3 기간의 소에서 (Meintjes 등, 1995) 각각 난포란을 채란하는 연구를 수행한 바 있으며, 초음파진단기를 이용한 난포란의 채란에

사용할 일회용 needle의 개발 (Bols 등, 1995), 직장용과 인체용 질내 삽입 탐촉자 간의 비교 (Scott 등, 1994), 발정후 주 1회 또는 2회 난포란 채란법의 비교 (Gibbons 등, 1994, 1995; Looney 등, 1994; Bungartz 등, 1995; Hasler 등, 1995) 및 채란시 환경온도와 습도가 채취된 난포란의 체외발달에 미치는 영향 (Broussard 등, 1996) 등에 관한 연구를 실시해 오고 있다. 또한 국내에서도 이와 관련된 연구들이 보고되고 있다 (이 등, 1996, 1997, 1998; 박 등, 1997; 이 등, 1997; 최 등, 1997 a, b).

이에 따라 Holstein 젖소 육성우 및 한우를 이용하여 초음파유도 난포란 채란을 위한 기본적 조건 확립을 위하여, FSH의 반복처리와 1회처리 및 무처리에 있어서의 난포수 조사 및 채란 가능한 난포수의 확인, 그리고 채란율과 채란된 난포란의 등급분류를 실시하여 체외수정에 공시될 난포란의 공급 가능성을 조사하여 체외수정란의 생산에 대한 기초자료로 이용하고자 본 연구를 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 공시동물

실험에 공시한 젖소 및 한우는 번식장애가 없고 건강하고 정상적인 발정주기를 발현한 Holstein 젖소 육성우 10두 및 한우 경산우 5두를 각각 사용하였다. 실험우의 사양은 경상남도 산청군 신안면 소재 셋별목장에서 사양표준에 준하여 위탁 관리하였으며, 정기적으로 질병과 건강상태 유무를 검진하였다.

### 2) 호르몬처리

공시동물의 호르몬처리에는 FSH (Folltropin<sup>®</sup>-V, Vetrepharm Pty. LTD., Australia)를 이용하였으며, 실험 1과 실험 2로 각각 나누어 실시하

였다.

실험 I에서는 처리우를 FSH 처리 방법에 따라 3그룹으로 나누어 사용하였다. 그룹 1은 Meintjes 등(1995)의 방법에 준하여 multiple decreasing doses로 400 mg FSH (20 ml)를 12시간 간격으로 2회/1일 3일간 (4.5, 4.5; 3.5, 3.5; 2, 2 ml) 근육주사 하였으며, 최종처리 후 12시간 만에 난포발달 조사 및 난포란 채란을 실시하였다. 그룹 2와 그룹 3은 single dose로 400 mg FSH를 25% PVP에 첨가하여 1회 근육주사하였으며, 각각 FSH 처리 후 60시간과 48시간에 난포발달 조사 및 난포란 채란을 실시하였다.

실험 II에서는 처리우를 FSH의 농도에 따라 3그룹으로 나누어 사용하였다. 그룹 1, 2, 3은 FSH 농도를 각각 400 mg, 200 mg, 100 mg으로 조절하여 single dose로 25% PVP에 첨가하여 1회 근육주사하였으며, 각각 FSH 처리 후 60시간에 난포발달 조사 및 난포란 채란을 실시하였다.

### 3) 채란용 기자재

난포란 채란을 위한 장비는 국내 Medison사에서 제작한 SONOACE-1500 및 SONOACE-600을 사용하였고 탐촉자는 6.5 MHz convex scanner를 사용하였다. Needle guide는 본사에서 제작한 탐촉자와 함께 장착하도록 되어 있고, needle (Cook<sup>®</sup>, Australia)은 17 gauge, 50 cm 길이의 50 ml tube를 장착하고, 몇차례 반복적으로 채란에 사용할 수 있도록 하였다. Vacuum pump (THOMAS<sup>®</sup>, USA)는 75~85 mmHg의 vacuum pressure (분당 흡입량: 27~29 ml)를 유지하도록 조절하여 사용하였다 (Gibbons 등, 1994).

### 4) 난포란의 채란

초음파를 이용한 난포란의 채란은 호르몬 처리우와 무처리우에서 중난포 직경 (4~10 mm) 이상의 난포에서 주 1회 또는 2회 실시하였다. 난포란의 채란을 위해서는 공시동물을 완전히 고정시켜서 채란시 일어날 수 있는

동물의 움직임을 방지하도록 하였다 (Rath, 1993). 채란우를 보정틀에 고정시킨 후 진정시키고, 질벽의 긴장을 완화시키기 위해서 1 mg/100 kg의 detomidine hydrochloride (Domosedan<sup>®</sup>, Canada)를 미정맥에 주사하였다. 또한 복부의 긴장을 방지하기 위해서 2% Hostacain 4~6 ml (또는 2% Lidocain 3~6 ml + Adrenaline)을 미근부의 제 1, 2 미추간에 주사하여 진정을 유도하였다. 직장내의 분을 제거하고 회음부와 외음부의 오물을 깨끗하게 닦아내고 70% alcohol로 세척한 후, paper towel로 닦아서 건조시켰다.

탐촉자의 사용은 초음파의 전달이 용이하도록 초음파용 gel을 멸균된 콘돔의 내·외부에 바르고 콘돔을 탐촉자의 헤드부분에 씌운 후 needle guide를 장착하였다. 탐촉자의 조작자는 한손은 직장검사용 장갑을 끼고 윤활제를 바른 후 직장을 통해 삽입하여 난소의 위치를 파악하고 채란 가능한 난포의 유무를 확인한 후, 다른 한손으로는 탐촉자를 질을 통해서 질벽 가까이에 위치시킨 후 난소와 탐촉자의 위치를 가능한 가까이 밀착시키고 모니터를 통해서 위치를 재확인하였다. 채란가능한 난포가 모니터상으로 나타나면 puncture line 부위로 난포를 이동시키고 needle의 끝부분이 모니터상에 약간 비치도록 이동시킨 후 난포내로 needle을 진입시킴과 동시에 vacuum pump의 음압을 이용하여 난포액과 난포란이 함께 흡입되도록 하였다. Tube에 난포액이 나오는 것을 확인하면서 난포내에 들어 있는 needle을 천천히 회전시켜서 난포에 있는 액을 가능한 완전하게 흡입토록 하였다. 난소와 탐촉자를 동시에 이동시키면서 다른 난포의 위치를 확인한 후 위의 방법과 마찬가지로 난포액과 난포란을 흡입하도록 하였다. 작업이 완료된 후 탐촉자와 needle을 후퇴시키고, needle은 10 IU/ml Heparin이 첨가된 기본배양액 (D-PBS + 10% FBS)으로 세척하여 needle속에 남아 있는 난포액을 완전히 흡입하였다. 채란작업은 가능한 정확하고 신속하게 작업을 완료하도록 하였다.

## 5) 난포란의 회수

난포란과 난포액이 들어있는 tube를 채란 후 즉시 실험실로 운반하여 실온에서 약 25~30분간 정치시킨 후 침전된 하층액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 구획이 그어져 있는 60 mm 배양접시에 옮겨서 40× 배율의 도립현미경 (Olympus, Japan) 하에서 난포란을 회수한 후 기본배양액 (D-PBS + 10% BCS)으로 4~5회 세척한 후 등급별로 분류·선발하였다.

## 6) 난포란의 등급분류

회수한 난포란의 등급분류는 난구세포와 세포질의 충실도에 따라서 아래와 같이 4등급으로 분류하였다:

- (1) Grade I: 4층 이상의 난구세포층이 충만하고 균일한 세포질을 가진 것.
- (2) Grade II: 1~3층의 난구세포층을 가진 것.
- (3) Grade III: 부분적으로 또는 완전히 나화된 것.
- (4) Grade IV: 난구세포층이 팽회되었거나 퇴화된 난포란.

## 7) 통계학적 분석

실험 결과치의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package의  $\chi^2$ -test 및 개체당 평균 난포수, 채란가능 난포수 및 1회당 채란 난포수에 대한 처리별 least square means와 유의성 검정을 위하여 아래의 선형모형으로 SAS proc GLM을 이용하여 다중검정을 실시하였다.

$$y_{ijkl} = \mu + t_i + I_j + R_k + e_{ijkl}$$

여기서  $y_{ijkl}$  = 각조사치

$\mu$  = 조사치의 평균

$t_i$  = 처리방법의 효과 ( $i = 1, 4$ )

$I_j$  = 개체의 효과 ( $j = 1, \dots, 7$ )

$R_k$  = 반복회수의 효과 ( $k = 1, \dots, 5$ )

$e_{ijkl}$  = 조사에 따른 오차 효과

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 도축난소에서 초음파유도 난포란 채란 성적

생체에서 초음파유도로 난포란을 채취하기 위한 예비적 실험으로서 도축 한우 난소로부터 초음파진단기로 채란하여 채란율과 체외수정에 공시할 수 있는 난포란의 비율을 조사한 성적은 Table 1에서 보는 바와 같다.

Table 1. Recovery rates of follicular oocytes derived from slaughter-house Hanwoo ovaries by ultrasound-guided aspiration using syringe or vacuum pump\*

Ultrasound-guided aspiration using	No. of follicles aspirated	No.(%) of oocytes recovered	No.(%) of oocytes classified by grade				
			GI	GII	GIII	GIV	GI+GII
Manual syringe	68	32(47.1) <sup>a</sup>	3( 9.4)	18(56.3)	7(21.2)	4(12.5)	21(65.7) <sup>c</sup>
Vacuum pump	83	67(80.7) <sup>b</sup>	8(12.0)	38(56.7)	18(26.7)	3( 4.5)	46(68.7) <sup>c</sup>

† Different superscripts in the same column indicate a significant difference ( $P < 0.05$ ).

\* Classification of cumulus-oocyte complexes (COCs); Grade I:  $\geq 4$  layers of compact cumulus cells, Grade II: 1 to 3 cumulus layers, Grade III: denuded, Grade IV: expanded or degenerated cumulus.

즉 초음파유도로 syringe를 사용하여 수동적으로 채란한 경우에는 47.1%의 채란율을 얻었으나, 이에 비하여 초음파유도 vacuum pump (vacuum pressure; 75 mmHg, 26 ml/min)를 이용한 경우에는 80.7%의 채란율을 보여 현저하게 좋은 성적을 얻을 수 있었다. 그러나 체외수정에 공시할 수 있는 Grade I, II의 난포란 비율 (%)에 있어서는 manual

syringe와 vacuum pump 사용법 간에 유의적 차이가 없었다. 그래서 Grade I, II의 난포란 채취수에 있어서 vacuum pump 사용법이 보다 효과적인데, 이 경우 vacuum pressure는 75~100 mmHg 수준 (Gibbons 등, 1994, 1995; Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995; Meintjes 등, 1995; Konish 등, 1996; Giorgio 등, 1997)이 적당하다고 본 연구와 비슷한 경향을 보고하였다. 본 연구의 계속성을 감안한다면 본 실험에서 사용한 vacuum pump는 40~150 mmHg vacuum pressure를 조절할 수 있었으며, 또한 염가로 제작·구비하여 채란해 본 결과 높은 채란효율을 얻을 수 있어 매우 실용적인 것으로 판단되었다.

## 2) 초음파진단에 의한 FSH 처리방법에 따른 난포발달 성적

초음파진단에 의한 생체 난포란의 채란을 위하여 호르몬 처리우와 무처리우의 난소에서 난포발달 상태를 조사한 바 그 결과는 Table 2와 같다. 즉 FSH를 처리한 3군 ① 400 mg을 multiple decreasing doses로 최종 처리후 12 시간, ② 400 mg을 single dose로 처리후 60 시간, ③ 400 mg을 single dose로 처리후 48 시간에 조사한 두당 총 가시난포의 수는 각각  $16.4 \pm 2.4$ ,  $21.2 \pm 2.3$  및  $13.9 \pm 2.6$ 개로서 무처리우의  $9.7 \pm 2.2$ 개에 비하여 많은 경향이였으며, 특히 FSH 400 mg을 single dose로 처리한 60 시간후의 경우는 유의적( $P < 0.05$ )으로 많게 나타났다. 또한 채란이 용이한 중난포 (4~10 mm) 이상의 난포수에 있어서는 FSH 처리우에서 각각  $15.8 \pm 2.2$ ,  $21.0 \pm 2.0$ , 및  $12.1 \pm 2.3$ 개로 어느 처리구에서도 무처리구의  $4.6 \pm 1.9$ 개 보다 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높게 나타났으며, 그 중에서도 FSH 1회 처리후 60시간에서 가장 많은 난포수를 나타내었다.

Table 2. Effects of FSH injection regimens and subsequent observation time on follicular development in Holstein heifers\*

Observation time & hormone treatments	No. of sessions	Total no.(%) of follicles observed			Total	Mean $\pm$ SE/session	
		Large ( $\geq 11$ mm)	Medium (4~10 mm)	Small ( $\leq 3$ mm)		Visible follicles	Follicles available for OPU***
Spontaneous	26	8(2.9)	72(26.1)	196(71.0)	276	9.7 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	4.6 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
12 hrs after multiple 400 mg FSH**	16	17(5.9)	245(85.4)	25( 8.7)	287	16.4 $\pm$ 2.4 <sup>ab</sup>	15.8 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
48 hrs after single 400mg FSH	8	1(0.8)	86(70.5)	35(28.7)	122	13.9 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	12.1 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>
60 hrs after single 400mg FSH	14	7(1.9)	350(92.8)	20( 5.3)	377	21.2 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	21.0 $\pm$ 2.0 <sup>c</sup>

\*LS Mean  $\pm$  SE. Different superscripts in the same column indicate a significant difference ( $P < 0.05$ ).

\*\*A total of 400 mg FSH (Folltropin<sup>R</sup>) was given twice a day for 3 days by decreasing dose.

\*\*\*Follicles larger than 4 mm in diameter.

Bungartz 등(1995)도 FSH 처리우가 무처리우 보다 채란된 난포의 수가 많았다고 ( $10.6 \pm 0.7$  vs.  $8.9 \pm 0.5$ ) 보고하였고, Stubbing과 Walton (1995)은 무처리우에서 채란 빈도를 주 2회로 하면 주 1회 FSH 처리 채란할 경우와 비슷한 수준의 채란가능 난포수를 나타낸다고 하였으며 ( $15.7 \pm 3.3$  vs.  $14.2 \pm 1.9$ ), 무처리우에 있어서 주 2회 반복적 채란을 실시하면 점진적으로 채란가능한 난포수가 증가하나, 호르몬 처리우에 있어서는 채란가능 난포수가 변하지 않는다고 하였다. 그리고 Meintjes 등(1995)은 비임신우에 40 mg

FSH 처리와 임신우에 40 mg FSH 처리에서 각각  $31.0 \pm 4.9$ ,  $25.3 \pm 11.2$ 개의 난포를 관찰하여 본 연구의 FSH 처리우 중에서 25% PVP가 첨가된 FSH 1회 처리후 60시간에 조사된 군에서 나타난  $21.2 \pm 2.3$ 개 보다 높은 난포수를 나타내었다. Goodhand 등(1996)은 무처리우와 FSH single dose 및 multiple doses 처리우에서 각각 16.7, 20.0 및 24.6개의 난포를 관찰하여 본 연구의 무처리우와 multiple doses 처리우 및 FSH single dose (48 hrs)의 난포수  $9.7 \pm 2.2$ ,  $16.4 \pm 2.4$  및  $13.9 \pm 2.6$ 개 보다는 높게 나타났으나, FSH 처리우 중에서 FSH single dose (60 hrs)에서의 난포수  $21.2 \pm 2.3$ 개와는 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 본 연구에서 채란가능 난포수는 FSH 처리우와 무처리우 간에 유의적 ( $p < 0.05$ )인 차이를 나타내고 있으며, FSH 처리우 중에서도 처리 방법에 따라 즉 FSH single dose 60 시간에서  $21.0 \pm 2.0$ 개로 나타나 multiple doses 및 FSH single dose (48 hrs)의  $15.8 \pm 2.2$ ,  $12.1 \pm 2.3$ 개 보다 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 많은 결과를 얻었다. 이러한 결과를 미루어 보아 초음파를 이용한 난포란 채란을 위하여는 FSH single dose (60 hrs)의 방법을 이용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

### 3) 초음파유도 난포란 채란을 및 등급에 미치는 FSH 처리 방법의 효과

초음파유도 난포란 채취를 위하여 FSH를 전처리하는 방법에 관한 전향의 결과에서 25% PVP에 혼합하여 1회 근육주사하고 60시간에 채란하는 방법이 multiple decreasing doses에 비하여 유의적으로 많은 채란가능 가시난포를 발달시킬 수 있었고 또한 이 방법은 매우 간편하기 때문에 초음파유도 채란에서는 1회 처리법과 무처리법 만을 비교 실험하였다. 즉 FSH 400 mg을 25% PVP에 혼합하여 1회 근육주사한 우군에서 처리후 60시간과 48시간에 각각 난소에서 초음파유도로 채취한 난포란의 채란율 및 등급평가의 결과를 무처리 우군과 비교해 보면 Table 3과 같다. 즉 호르몬 처리우에 있어서의 채란율은 60시간에서 46.3%, 48시간에서 75.0%로 나타나

무처리군의 62.9%와 비슷하게 나타났다. 그래서 1회 채란에서 얻은 두당 평균 채란수는 호르몬 처리후 60시간과 48시간군에서 각각  $10.6 \pm 2.2$  및  $7.8 \pm 2.7$ 개로 나타나 무처리군의  $3.4 \pm 3.0$ 개 보다 높은 경향이었으나 처리군간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다.

그리고 채란된 난포란 중 채외수정에 이용할 수 있다고 평가되는 Grade I 과 II 등급의 회수율을 보면 호르몬 처리후 60시간군에서 64.0%, 48시간군에서는 51.7%로서, 무처리군의 31.8% 보다는 높은 경향이었으나 역시 처리군 간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다.

Table 3. Effects of FSH injection regimens and subsequent OPU time on number and grade of oocytes collected by transvaginal ultrasound-guided OPU in Holstein heifers

Aspiration time & hormone treatments	No. of aspiration sessions	No. of follicles aspirated	No.(%) of oocytes recovered	No.(%) of oocytes classified by grade				Mean $\pm$ SE /session
				G I	G II	G III	G IV	
Spontaneous	5	35	22(62.9) <sup>a</sup>	2( 9.1)	5(22.7)	9(40.9)	6(27.3)	$3.4 \pm 3.0^b$
48 hrs after single 400 mg FSH	6	80	60(75.0) <sup>a</sup>	20(33.3)	11(18.3)	15(25.0)	14(23.3)	$7.8 \pm 2.7^b$
60 hrs after single 400 mg FSH	10	246	114(46.3) <sup>a</sup>	29(25.4)	44(38.6)	16(14.0)	25(21.9)	$10.6 \pm 2.2^b$

†LS Mean  $\pm$  SE. Values with same superscripts in the same column were not significant difference ( $P < 0.05$ ).

\*All of the visible follicles larger than 4 mm in diameter were aspirated.

본 연구에서 무처리우와 호르몬처리우의 총 난포란 채란율은 54.3%로 나타났으며, 이러한 결과는 Pieterse 등(1992), Kruip 등(1993), Fry 등(1994), Gibbons 등(1994), Bols 등(1995) 및 Becker 등(1997)들의 초음파유도 채란율과 비슷한 수준이었으나, Van der Schans 등(1991)과 Loony 등(1994)의 채란율 60~70%보다는 약간 낮은 성적이었다. 그러나 초음파를 이용한 채란에 있어서 정확하게 채란율을 비교 평가하기는 어렵다. 그 이유는 가시난포로서 중난포 (4~10 mm) 이상의 난포를 채란할 경우에도 실제로는 소난포 ( $\leq 3$  mm)들로 부터도 채란될 수 있기 때문이라고 하였다 (Becker 등, 1996).

다배란 유도-체내수정란 생산법과 달리 초음파유도 채란-체외수정란 생산법에서는 주 1회 혹은 주 2회 자연채란이 가능하다는 점이 중요한 이점의 하나일 수 있다. 다만 유용한 등급의 난포란을 얼마나 채취할 수 있는지가 실용화의 가부를 결정짓는 중요한 요인이 될 것이다. 본 연구에서는 미경산 Holstein 소에서 주 1회 간격으로 자연채란한 경우 평균  $3.4 \pm 3.0$ 개의 난포란을 얻을 수 있었는데, Gibbons 등(1994)은 주 1회 채란에서  $6.8 \pm 2.0 \sim 7.7 \pm 1.8$ 개를, 그리고 주 2회 채란에서는 1회당  $9.5 \pm 1.1$ 개, 1주당  $19.0 \pm 2.2$  개를 얻었으며, 1회당 Looney 등(1994)은 6.3개, Bungartz 등(1995)은  $8.9 \pm 0.5$ 개의 난포란을 얻고 있으나, Hasler 등(1995)은  $4.9 \pm 4.5$ 개, Goodhand 등(1996)은 3.5~4.7개의 난포란을 얻어 본 연구와 비슷한 결과를 보고하고 있다. 그리고 FSH 400 mg을 25% PVP에 혼합하여 single dose로 전처리하였을 경우 본 연구에서는 60 시간 후에 채란한 경우 평균  $10.6 \pm 2.2$ 개의 난포란을 얻어 Goodhand 등(1996)의 5.0~5.5개 보다 높은 성적을 나타내었다. 또한 FSH를 multiple decreasing doses로 전처리하였을 경우 1회 채란 당 Gibbons 등(1994)은  $6.2 \pm 1.1$ 개, Looney 등(1994)은 8.6개, Goodhand 등(1996)은 5.7~6.2개의 난포란을 채란하여 본 연구의 single dose 처리군에서의 난포란 수보다는 약간 낮은 경향이었으나, Bungartz 등(1995)은  $10.6 \pm 0.7$ 개의 난포란을 얻어 본 연구의 single dose 처리군과 비

슷한 결과를 보고하였다.

그리고 본 연구에서 자연채란하여 얻은 난포란 중 IVF에 사용할 수 있는 등급이 31.8%에 불과하였다. 그러나 Gibbons 등(1994)은 75.8~91.5%, Looney 등(1994)은 83.7%, Bungartz 등(1995)은 65.2%, Hasler 등(1995)은 82.0%로서 상당히 높게 보고되고 있으나, Gibbons 등(1995)은 52.5%로 상당히 낮은 결과를 보고하고 있는데 이러한 차이는 적용한 등급기준과 채란 기술 숙련도의 차이에 기인될 것으로 생각된다. 또한 FSH 400 mg을 single dose로 전처리하였을 경우 본 연구에서는 60 시간과 48시간 후에 채란한 경우 각각 64.0, 51.7%의 체외수정 가능 난포란을 채란하여 Goodhand 등(1996)의 48.0%와 비슷한 성적을 나타내었다. 그리고 FSH를 multiple doses로 전처리하였을 경우에 Bungartz 등(1995)은 66.0%, Meintjes 등(1995)은 48.0~56.0%, Goodhand 등(1996)은 49.1~63.0%로 나타나 본 연구의 single dose 처리군에서의 성적과 비슷한 경향이었으나, Gibbons 등(1994)은 84.2%, Looney 등(1994)은 83.7%로서 높은 결과를 보고하였다.

#### 4) 초음파 진단에 의한 FSH 농도에 따른 난포발달 성적

초음파 진단에 의한 생체 난포란의 채란을 위하여 전향의 결과에서는 FSH의 농도를 25% PVP를 첨가하여 최종 400 mg으로 하고, 호르몬 처리 후 60시간에 난포발달 확인 및 채란하는 방법이 타 처리군에 비하여 유의적으로 많은 채란 가능 가시난포를 발달시킬 수 있었고 또한 이 방법은 매우 간편하였다. 그러나, 400 mg FSH의 1회용 가격이 매우 비싸기 때문에 본 실험에서는 FSH의 처리농도를 각각 다르게 처리하여 비교 실험하였다. 즉 FSH의 농도를 각각 400, 200 및 100 mg으로 조절하여 25% PVP에 혼합하여 1회 근육 주사한 후 60시간에 각각 난소에서 난포발달 상태를 조사한 바, 그 결과는 Table 4에 나타난 것과 같다. FSH를 각기 다른 농도 400, 200 및 100 mg을 single dose로 처리한 후 60 시간에 조사한 두당 총

가시난포의 수는 각각  $16.2 \pm 1.1$ ,  $8.5 \pm 2.0$  및  $9.4 \pm 1.5$ 개로 나타났으며, 무처리우에서는  $9.2 \pm 1.3$ 개로 나타났다. 200 및 100 mg FSH 처리우에 있어서는 무처리우와 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았으나, 특히 400 mg FSH를 single dose로 처리한 60 시간후의 경우에 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 가장 많은 가시난포를 나타내었다. 또한 채란이 가능한 중난포 (4~10 mm) 이상의 난포수에 있어서는 400 mg FSH를 single dose로 처리한 60시간후의 경우에  $14.2 \pm 0.9$ 개로 나타나, 200 과 100 mg FSH 처리구 및 무처리구에 있어서 각각의 난포수  $3.9 \pm 1.6$ ,  $6.2 \pm 1.2$  및  $6.8 \pm 1.1$ 개 보다 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높게 나타났다.

Table 4. Effect of single dose treatment of Folltropin<sup>®</sup>-V on follicular development in Holstein heifers

Observation time & hormone treatments*	No. of sessions	Total no.(%) of follicles observed				Mean $\pm$ SE/session	
		Large ( $\geq 11$ mm)	Medium (4~10 mm)	Small ( $\leq 3$ mm)	Total	Visible follicles	Follicles available for OPU**
Spontaneous	23	5( 2.3)	153(71.8)	55(25.8)	213	$9.2 \pm 1.3^b$	$6.8 \pm 1.1^b$
Single 400 mg FSH	32	20( 3.9)	431(84.0)	62(12.1)	513	$16.2 \pm 1.1^a$	$14.2 \pm 0.9^a$
Single 200 mg FSH	10	6( 7.1)	33(38.8)	46(54.1)	85	$8.5 \pm 2.0^b$	$3.9 \pm 1.6^b$
Single 100 mg FSH	18	8( 4.7)	102(60.4)	59(34.9)	169	$9.4 \pm 1.5^b$	$6.2 \pm 1.2^b$

†LS Mean  $\pm$  SE. Different superscripts within the same column denote significant ( $P < 0.05$ ) difference.

\*Examined at 60 hrs after injection of hormone.

\*\*Follicles larger than 4 mm in diameter.

5) 초음파유도 채란을 및 난자등급에 미치는 FSH 처리 농도의 효과

초음파 유도 난포란 채취를 위하여 채란 가능한 난포의 발육을 위한 각각의 처리군에 있어서 앞의 Table 4에서 나타난 난포의 발육성적에 따라 초음파 유도에 의한 난포란 채란을 실시하였다. 즉 FSH의 농도를 각각 400, 200 및 100 mg으로 조절하여 25% PVP에 혼합하여 1회 근육 주사한 후 60시간에 각각 난소에서 채란 가능한 난포란을 초음파 유도로 채란한 난포란의 채란율 및 등급평가의 결과를 무처리군과 비교해 보면 Table 5와 같다.

Table 5. Effects of single dose treatment of Folltropin®-V on number and grades of oocytes collected by ultrasound-guided OPU in Holstein heifers\*

Aspiration time & hormone treatments*	No. of aspiration sessions	No. of follicles aspirated**	No.(%) of oocytes recovered	No.(%) of oocytes by grade				Mean ± SE/ session
				G I	G II	G III	G IV	
Spontaneous	23	220	121(55.0) <sup>a</sup>	15(12.4)	55(45.5)	21(17.4)	30(24.8)	5.3 ± 1.0 <sup>b</sup>
Single 400 mg FSH	32	521	320(61.4) <sup>a</sup>	49(15.3)	137(42.8)	66(20.6)	68(21.2)	10.0 ± 0.8 <sup>a</sup>
Single 200 mg FSH	6	52	28(53.8) <sup>a</sup>	1( 3.6)	13(46.4)	4(14.3)	10(35.7)	4.7 ± 1.8 <sup>b</sup>
Single 100 mg FSH	18	167	102(61.1) <sup>a</sup>	17(16.7)	38(37.3)	24(23.5)	23(22.5)	5.7 ± 1.0 <sup>b</sup>

†LS Mean ± SE. Different superscripts within the same column denote significant (P < 0.05) difference.

\*Aspirated at 60 h after injection of FSH.

\*\*All the visible follicles larger than 4 mm in diameter were aspirated.

호르몬 처리우에 있어서의 채란율은 각각 400 mg에서 61.4%, 200 mg에서는 53.8% 그리고 100 mg에서는 61.6%로 나타나 무처리군의 55.0%와 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 1회 채란에서 얻은 두당 평균 채란수는 400 mg FSH 처리군에서  $10.0 \pm 0.8$ 개로 나타나 200 mg FSH 처리군  $4.7 \pm 1.8$ 개, 100 mg FSH 처리군  $5.7 \pm 1.0$ 개 및 무처리군의  $5.3 \pm 1.0$ 개 보다 높은 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내었다. 그리고 채란된 난포란 중에서 체외수정에 이용될 수 있는 Grade I 과 II 등급의 회수율은 각각 400 mg FSH 처리군 58.1%, 200 mg FSH 처리군 50.0%, 100 mg FSH 처리군 53.9% 및 무처리군에서는 57.9%로 나타나 각 처리군 간에 약간의 차이는 나타내었으나 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이는 나타나지 않았다.

#### 6) 주 2회 연속적인 초음파 유도에 의한 난포란의 채란

Table 6에 나타난 바와 같이 자연채란우에 있어서 4주동안 주 2회의 연속적인 초음파유도에 의한 생체 난포란을 채란한 결과는 다음과 같다. 1회 당 채란된 난포수, 회수된 난포란과 체외수정에 공시할 수 있는 난포란의 수 및 채란율에 있어서 초기 1주에 각각 15.5, 8.8, 6.8개 및 77.3%로 나타났으나, 주 2회의 반복적인 채란 기간이 길어질수록 2, 3, 4주에서 채란된 난포수와 회수된 난포란 및 체외수정에 공시할 수 있는 난포란의 수가 초기 1주에 비하여 감소하였다. 그러나 2, 3, 4주간에는 채란된 난포수와 회수된 난포란 및 체외수정에 공시할 수 있는 난포란의 수가 비슷한 경향을 나타내었으며, 총 채란율에 있어서도 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 6. Follicles aspirated and oocytes collected from cows that were aspirated twice weekly for 4 weeks by ultrasound-guided OPU\*

		Aspiration period (week)				Total
		1	2	3	4	
Mean per session:						
Follicles aspirated	n	15.5	6.0	8.8	10.2	40.5
Oocytes collected	n	8.8	4.0	4.8	5.2	22.8
COCs selected (>GIII)	n	6.8	2.3	2.8	2.8	14.5
	%	77.3	57.5	58.3	53.8	63.6
Total for period:						
Follicles aspirated	n	62	24	35	41	162
Oocytes collected	n	35	16	19	21	91
	%	56.5	66.7	54.3	51.2	56.2

\*Cows treated without FSH.

결론적으로 초음파유도로 난포란을 채란하는 방법으로서 본 연구의 범위에서는 FSH 400 mg을 25% PVP 용액에 혼합하여 1회 전처리한 후 60 시간에 75~85 mmHg의 음압을 유지하는 진공펌프로 흡입함이 가장 효율적인 것으로 판단되었다. 그리고 200 mg이나 100 mg 같은 저농도 FSH 처리는 난포란의 발달에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나, 호르몬처리를 병행하지 않는 무처리우에 있어서도 주당 2회의 채란을 지속적으로 수행한다면 연구 결과에서처럼 이용 가능한 난포란을 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이에 따른 지속적인 연구가 진행됨으로써 과배란 채란에 비하여 훨씬 경제적인 방법으로 발전될 수 있을 것으로 기대된다.

## 4. 적 요

Holstein 육성우에서 초음파유도로 난포란을 채란하는 기법을 확립하고자 관련 요인에 관한 연구를 실시하였다. 사용한 초음파진단기는 SONOACE-1500 및 SONOACE-600이었으며, 6.5 MHz convex scanner에 58 cm, 17 gauge needle을 사용하였고, vacuum pump는 75~85 mmHg의 vacuum pressure를 유지하도록 조절하여 사용하였다. 난포발달을 촉진하기 위하여 FSH를 다회 사용한 경우는 총 400 mg FSH를 1일 2회 3일간 나누어 90, 90; 70, 70; 40, 40 mg 씩 6회 근육주사 하였으며, 최종처리 후 12시간에 난포발달 조사 및 채란을 실시하였다. 그리고 FSH 1회 처리군은 400 mg FSH를 25% PVP에 혼합하여 근육주사하였으며, 처리후 60시간과 48시간에 난포발달 조사 및 채란을 실시하였다. 또한 FSH 농도를 각각 400, 200 및 100 mg으로 조절하여 single dose로 25% PVP에 첨가하여 1회 근육주사하였으며, 각각 FSH 처리 후 60시간에 난포발달 조사 및 난포란 채란을 실시하였다. 자연채란구는 발정주기 중 임의의 시기에 FSH 전처리 없이 난포 조사 및 채란하였다. 채란은 주 1회로 하였는데, 먼저 동물을 진정시키고 질벽을 완화시키기 위해서 1 mg/체중 100 kg 수준의 detomidine hydrochloride (Dormosedan<sup>R</sup>, Canada)를 미정맥에 투여하였으며, 또한 복부의 긴장을 방지하기 위해서 2% Hostacain 4~6 ml (또는 2% Lidocain 3~6 ml + Adrenaline)을 미근부의 제 1, 2 미추간에 주사한 후 채란하였으며, 실험의 결과는 다음과 같다.

예비 실험으로서 도축 한우 난소로부터 초음파진단기로 채란하여 채란율을 조사한 성적은 vacuum pump를 이용한 경우에 80.7%로 나타나 manual syringe를 사용한 경우의 47.1% 보다 높은 유의적 ( $P < 0.05$ ) 차이를 나타내었다.

초음파진단에 의한 FSH 전처리우와 무처리우의 난소에서 난포발달 상태를 조사한 바 무처리군에서는 71.0%의 소난포가 관찰되었으나, FSH 처

리군에서는 70.5~92.8%의 중난포가 관찰되었다. 특히 무처리군에서 소난포의 우점에 의해 채란이 용이한 중난포 이상의 난포수는  $4.6 \pm 1.9$ 개로 총 가시난포수  $9.7 \pm 2.2$ 개에 비하여 훨씬 적었다. 그리고 처리군과 무처리군 중에서 400 mg FSH를 single dose로 전처리후 60 시간에 채란가능 난포수는 총 가시난포  $21.2 \pm 2.3$ 개중  $21.0 \pm 2.0$ 개로 가장 높게 나타났으며, 각 처리군 간에는 유의차 ( $P < 0.05$ )가 인정되었다. 또한 각기 다른 농도에 따른 FSH 처리우의 난포발달 상태에 있어서도 400 mg FSH를 single dose로 전처리후 60 시간에 채란가능 난포수는 총 가시난포  $16.2 \pm 1.1$ 개중  $14.2 \pm 0.9$ 개로 가장 높게 나타났으며, 무처리군과 다른 처리군간의 유의차 ( $P < 0.05$ )가 인정되었다.

초음파 유도에 의한 난포란의 채란율은 400 mg FSH single dose 처리군과 무처리군에서 46.3~75.0%로 나타났으나, 처리군간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다. 그리고 1회당 채란된 난포란의 수는 FSH 처리후 60시간에서  $10.6 \pm 2.2$ 개로서 FSH 처리후 48시간의  $7.8 \pm 2.7$ 개 및 무처리군의  $3.4 \pm 3.0$ 개 보다 높게 나타났으며, 채란된 난포란 중 Grade I 과 II 등급의 회수율은 각 처리군 간에 31.8~64.0%로 나타났으나 역시 처리군 간에 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았다. 또한 각기 다른 농도에 따른 FSH 처리군에 있어서 난포란의 채란율은 처리군과 무처리군간의 유의차 ( $P < 0.05$ )는 인정되지 않았으나, 1회당 채란된 난포란의 수에 있어서는 400 mg FSH 처리후 60시간에서  $10.0 \pm 0.8$ 개로서 다른 처리군과 무처리군간의 유의차 ( $P < 0.05$ )가 인정되었다.

이상의 결과를 종합해보면 초음파유도로 난포란을 채란하는 방법으로서 본 연구의 범위에서는 400 mg FSH를 25% PVP 용액에 혼합하여 1회 전처리한 후 60시간에 75~85 mmHg의 음압을 유지하는 진공펌프로 흡입함이 가장 효율적인 것으로 판단되었다. 그리고 200 mg이나 100 mg 같은 저농도 FSH 처리는 난포란의 발달에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나, 호르몬처리를 병행하지 않는 무처리우에 있어서도 주당 2회의 채란

을 지속적으로 수행한다면 연구 결과에서처럼 이용 가능한 난포란을 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이에 따른 지속적인 연구가 진행됨으로써 과배란 채란에 비하여 훨씬 경제적인 방법으로 발전될 수 있을 것으로 기대된다.

## Literature Cited

1. Becker, F., Kanitz, W., Nurnberg, G., Kurth, J. and Spitschak, M. 1996. Comparison of repeated transvaginal ovum pick up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments. *Theriogenology*, 46:999-1007.
2. Bols, P. E. J., Vandenheede, J. M. M., Van Soom, A. and de Kriuf, A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43:677-687.
3. Briogliatti, G. M. and Adams, G. P. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, 45:1163-1176.
4. Broussard, J. R., Rocha, A., Lim, J. M., Blair, R. M., Roussel, J. D. and Hansel, W. 1996. The effect of environmental temperature and humidity on the quality and developmental competence of bovine oocytes obtained by transvaginal ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology*, 45:351. abstr.
5. Bungartz, L., Lucas-Hahn, A., Rath, D. and Niemann, H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 43:667-675.
6. Duby, R. T., Damiani, P., Looney, C. R., Fissore, R. A. and Robl, J.

- M. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology*, 45:121-130.
7. Fry, R. C., Simpson, T. L., Squires, T. J., Parr, R. A. and Damanik, R. M. 1994. Factors affecting transvaginal oocyte pick-up in heifers. *Theriogenology*, 41:197. abstr.
  8. Gibbons, J. R., Beal, W. E., Krisher, R. L., Faber, E. G., Pearson, R. E. and Gwazdauskas, P. G. 1994. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 42:405-419.
  9. Gibbons, J. R., Krisher, R. L., Carlin, S. K., Pearson, R. E. and Gwazdauskas, F. C. 1995. *In vitro* embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular oocyte aspiration. *Theriogenology*, 43:1129-1139.
  10. Goodhand, K. L., Broadbent, P. J., Hutchinson, J. S. M., Watt, R. G., Staines, M. E. and Higgins, L. C. 1996. *In-vivo* oocyte recovery and *in-vitro* embryo production in cattle pre-treated with FSH, progestogen and estradiol. *Theriogenology*, 45:355. abstr.
  11. Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, L. S., Stokes, J. E. and Trimmer, S. A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-159.

12. Konishi, M., Aoyagi, Y., Takedomi, T., Itakura, H., Itoh, T. and Yazawa, S. 1996. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, 45:573-581.
13. Kruip, Th. A. M., Boni, R., Roelofsen, M. W. M., Wurth, Y. A. and Pieterse, M. C. 1993. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 39:251. abstr.
14. Looney, C. R., Lindsey, B. R., Gonseth, C. L. and Johason, D. L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
15. Meintjes, M., Bellow, M. S., Broussard, J. R., Paul, J. B. and Godke, R. A. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.*, 73:967-974.
16. Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruip, Th. A. M. and Taverne, M. A. M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762.
17. Pieterse, M. C., Vos, P. L. A. M., Kruip, Th. A. M., Wurth, Y. A., van Beneden, T. H., Willemse, A. M. and Taverne, M. A. M. 1991a.

Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24.

18. Pieterse, M. C., Vos, P. L. A. M., Kruip, Th. A. M., Willemse, A. M. and Taverne, M. A. M. 1991<sub>b</sub>. Characteristics of bovine estrus cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles from ovum pick-up. *Theriogenology*, 35:401-413.
19. Pieterse, M. C., Vos, P. L. A. M., Kruip, Th. A. M., Wurth, Y. A. van Beneden, T. H., Willemse, A. H. and Taverne, M. A. M. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG-treated cows. *Theriogenology*, 37:273. abstr.
20. Presicce, G. A., Jiang, S., Simken, M., Zhang, L., Looney, C. R., Godke, R. A. and Yang, X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.*, 56:386-392.
21. Rath, D. 1993. Featured article: Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. *Embryo Transfer Newsletter*, 11:10-15.
22. Scott, C. A., Robertson, L., de Moura, R. T. D., Paterson, C. and Boyd, J. S. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Veterinary Record*, 134:440-443.
23. Stubbings, R. B. and Walton, J. S. 1995. Effect of

ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 43:705-712.

24. van der Schans, A., van der Weaterlaken, L. A. J., de Wit, A. A. X., Eyestone, W. H. and de Boer, H. A. 1991. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, 35:288. abstr.
25. Walton, J. S., Christie, K. A. and Stubbings, R. B. 1993. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on bovine ovarian dynamics. *Theriogenology*, 39:336. abstr.
26. 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 8:143-149.
27. 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 광대오, 이효종, 최상용. 1994. 체외성숙·수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우의 이식에 의한 산자의 생산. *한국가축번식학회지*, 18:47-54.
28. 한용만, 이철상, 이정호, 김선정, 신상태, 김동훈, 이훈택, 정병현, 정길생, 김영수, 김영훈, 이곤세, 김교국, 황윤식, 이경광. 1994. 체외수정란 유래의 송아지 생산. *한국가축번식학회지*, 18:7-13.
29. 이병천, 이강남, 김남렬, 황우석. 1996. 송아지 난소에서 초음파 유도에 의한 한우의 미성숙난자 채취시에 bST-FSH 처리효과에 관한 연구.

한국수정란이식학회지, 11:103-109.

30. 박충생, 조성근, 강태영, 최창용, 손우진, 박성재, 공일근, 이정규, 최민철, 이효종, 최상용. 1997. 젖소의 초음파 유도 채란율에 대한 FSH 전처리 효과의 비교. 한국가축번식학회지, 21:147~156.
31. 이병천, 윤기영, 김현일, 노상호, 이강남, 황우석. 1997. 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구. 한국수의학회지, 37:917-924.
32. 이효종, 강태영, 조성근, 박준규, 손우진, 최민철, 최상용, 박충생. 1997. 과배란처리 한우에서 초음파 유도에 의한 난자채란에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 12:195~202.
33. 최민철, 강태영, 조성근, 최창용, 손우진, 이효종. 1997a. 초음파유도 난포란 채취를 위한 기본 기술의 개발, I. 초음파상에 나타난 한우 난소, 난포 및 황체의 크기 측정. 한국수정란이식학회지, 12:203~209.
34. 최민철, 조성근, 강태영, 박준규, 손우진, 이효종. 1997b. 초음파유도 난포란 채취를 위한 기본 기술의 개발, II. 소의 마취방법과 채란기구의 개발. 한국수정란이식학회지, 12:211~218.
35. 이병천, 윤기영, 김정태, 이강남, 노상호, 신태영, 박종임, 김남렬, 주석천, 백남용, 이은송, 임정묵, 이우근, 황우석. 초음파 유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구, 2. 임신우 유래 난포란으로부터 산자생산에 관하여. 한국수정란이식학회지, 13:77-86.

# 제 3 장 체외수정란의 생산을 위한 최적 배양 체계의 구축

## 1. 서 론

세계적으로 도축우의 난소로부터 채란한 미성숙 난포란을 이용한 체외 수정란의 생산기술은 어느 정도로 확립되어져 있으며, 현재에도 더 나은 체외배양체계의 구축을 위해 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이와 함께 난포란을 개별적으로 체외배양의 전과정 (*In vitro* maturation-fertilization-culture)을 거쳐 생산하는 체외수정란 생산기술의 체계적 발달은 몇몇 연구의 분야에 흥미를 가져다 줄 수 있을 것이다. 난포란 또는 수정란의 대사 활동, 핵복제 그리고 초음파를 이용한 난포란채란 (Ultrasound-guided ovum pick-up: OPU)과 같은 연구들은 체외수정란을 생산하는데 있어서 체외성숙, 수정 및 배양 단계에 따른 난포란과 수정란의 개별적 배양체계의 확립이 요구된다. 특히 초음파를 이용한 난포란 채란에 있어서 유전적으로 가치있는 동물 (공란우)로부터 얻어진 난포란으로 체외수정란을 생산하기 위해서는 소수의 난포란 배양에 적합한 배양체계의 확립이 필수적이다. 그러나, 몇몇 연구보고서에서는 난포란과 수정란을 개별적으로 배양했을 때 그룹배양과 비교해서 매우 낮은 후기배로의 발달율을 보고하였다 (Blondin 과 Sirard 등, 1995; Ferry 등, 1994; Gardner 등, 1994; Kato와 Tsunoda, 1994).

체외수정란의 개별적 생산체계의 확립에는 많은 실용적 잇점에 있으며, 그러한 생산체계는 난포형성 및 난자발달에 관한 연구자들의 이해력을 향상시키는데 도움이 될 것이다. 난포란의 성숙과 초기 배발달의 과정에 관한 연구는 어느정도 확립되어 있음에도 불구하고, 여러가지 체외수정란 생산체계에 있어서 성숙된 난포란의 배반포기배로의 발달율은 30~40% 정도로 보고되어 왔다 (Brackett와 Zuelke, 1993). 이러한 체외수정란 생산체계

(IVP system)의 한계요인은 난포란 채란시 난포의 크기와 환경 및 난포란 자체의 질 (quality)에 있다고 설명하였다 (Blondin과 Sirard, 1995; Hazeleger 등, 1995; Lonergan 등, 1994; Pavlok 등, 1992). 이러한 가설들을 증명하기 위한 방법은 난포란이 개별적으로 상실배 또는 배반포 단계까지 발달해 나갈 수 있는 체외배양체계가 구축되어야 하며, 따라서 후기배로 발달할 수 있는 충분한 능력을 지닌 우수한 난포란을 확인·선발함과 동시에 그들이 유래된 난포의 환경적 특성을 인식해야 한다.

본 연구의 목적은 난포란과 수정란을 개별적으로 각각 체외성숙, 수정 및 배양하여 기존 그룹배양의 후기배 발달율에 상응하는 배양체계를 구축하고자 하는 것이다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 난포란의 채란

최적 체외배양 체계를 확립하기 위한 기초 실험으로서 공시할 난포란은 김해시의 도축장 (덕성산업과 태강산업)에서 도축되는 소의 난소에서 채란된 난포란과 초음파를 이용한 젖소의 난포란을 각각 이용하였다.

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살직후 난소를 적출하여 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin (100  $\mu$ g/ml)이 함유된 생리식염수 (30~35 $^{\circ}$ C)가 들어있는 보온병에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하였고, 미성숙 난포란을 채란하기 전 난소주위의 지방과 결합조직을 제거하고, 생리식염수로 3~4회 세척한 후, 18-G needle이 부착된 50 ml tube를 이용하여 75~85 mmHg의 vacuum pressure (분당 흡입량; 27~29 ml)가 유지된 vacuum pump (THOMAS<sup>®</sup>, U.S.A.)를 이용하여 난포란을 채란하였다. 난포란의 채취시 사용된 배양액은 5% FCS가 첨가된 D-PBS를 사용하였다. 흡입된 난포액은 5~10 분간 정치시킨 후 침전된 하부액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 직경 60 mm 배양접시에 옮겨 40X 배율의 도립현미경 (Olympus Co., Japan)에서 난포란을 수집한 후 체외성숙용 기본배양액 (Ham's F-10 + 10% FCS)으로 4~5회 세척하면서 선발하였다. 난포란의 선발은 난구세포의 부착정도와 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등 (1991)의 방법에 준하여 실시하였으며, 최소한 1층 이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것을 선발하여 실험에 공시하였다.

### 2) 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙에 사용한 배양액은 25 mM HEPES가 첨가된 TCM-199 (Earle's salt, Sigma, U.S.A.) 또는 Ham's F-10 (Nutrient Mixture F-10 [HAM], Sigma, U.S.A.)의 기본배양액을 Baxter (Baxter Healthcare Co., U.S.A.)의 물 1 l로 제조하여 0.2  $\mu$ m filter (Gelman Sci.,

U.S.A.)로 여과한 후 pH 7.2~7.3으로 조정된 후 50 ml tissue culture flask (Falcon, U.S.A.)에 45 ml씩 분주하여 4℃의 냉장고에 보관하면서 약 2 주간 사용하였다. 체외성숙 배양액은 TCM-199 또는 Ham's F-10 배양액에 sodium pyruvate (56 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), penicillin G (100 units/ml)와 hormones으로는 LH (10 µg/ml), FSH (35 µg/ml), estradiol-17 β (1 µg/ml)를 첨가하며, 혈청으로 10% BCS (Bovine Calf Serum, HyClone®, U.S.A.) 또는 0.01 µg/ml EGF (Epidermal Growth Factor, Sigma, U.S.A.)를 각각 첨가하였다. 이와 같이 준비된 배양액은 100 mm dish (Nunc, Denmark)에 100 µl씩 drop 분주하여 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39℃ CO<sub>2</sub> incubator 에서 18 시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도하였다. BCS (Gibco. Co., U.S.A.)는 56℃에서 30 분간 비활성화시켜 0.2 µm membrane filter (Gelman Sci., U.S.A.)로 여과한 후 10 ml씩 tube에 분주하여 -20℃에서 냉동보관하면서 사용하였다.

체외성숙은 Wiemer 등 (1991)의 방법에 준하여 체외성숙 배양액을 100 mm dish (Nunc, Denmark)에 100 µl씩 drop 분주하여 18 시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 다음, 체외성숙용 배양액에 등급별로 15~20 개의 난포란을 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39℃ CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 동안 체외성숙을 유도하였다. 난포란의 체외성숙에 이용한 체세포는 김해 도축장에서 적출 운반된 난소에서 과립막세포나 난관상피 세포를 사용하였으며, 그 농도는 각각  $1\sim 2 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 난포란과 같이 24 시간 동안 공배양을 실시하여 난구세포의 팽창 정도와 세포질의 충실도 등으로 체외성숙도를 판정하여 체외수정에 공시할 난포란을 결정하였다.

### 3) 체외수정용 정자의 준비

난포란의 체외수정을 위한 정자의 준비는 동결정액 또는 신선정자를 이용하여 Swim-up 또는 Percoll density gradient 방법으로 실시하였다. Swim-up 방법은 heparin (5 units/ml)이 첨가된 세척용 sperm-TALP

medium으로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39°C CO<sub>2</sub> incubator에서 실시하였다.

Swim-up의 유도는 15 ml conical plastic tube에 농후정자와 세척용 sperm-TALP medium이 층을 이루도록 하기 위해서 tube의 아래층에 정자를 넣고 그 위의 층에 sperm-TALP medium을 섞이지 않도록 조심스럽게 분주한 후 45°의 각도로 눕혀서 1 시간 동안 활력 정자의 부유를 유도하였다.

Percoll density gradient 방법은 heparin (5 units/ml)이 첨가된 세척용 sperm-TALP medium으로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 15 ml conical plastic tube의 아래층에 90% Percoll 2 ml을 넣고 그 위의 층에 45% Percoll 2 ml을 두 층이 섞이지 않도록 조심스럽게 부어 놓은 다음, 신선정액 또는 동결정액 1 ml을 tube의 맨 윗층에 넣어 700×g로 30분 동안 원심분리 시켰다. Swim-up을 유도하여 부유된 상층액의 정자와 Percoll에서 침전된 하층액의 정자만을 각각 채취하여 500×g에서 2회 5분간 원심분리한 후, 수정능획득을 위하여 BSA (5 mg/ml), caffeine (5 mM) 및 heparin (10 µg/ml)이 첨가된 수정용 IVF-TALP medium을 5 ml 첨가하여 다시 500×g에서 5분간 원심분리한 후 약 1 ml의 수정용 IVF-TALP medium을 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 10~15분간 처리하여 수정능획득을 유도하였다.

#### 4) 체외수정

체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 IVF-TALP medium으로 3~4회 세척한 후 수정용 IVF-TALP medium에 100 µl drop당 15~20 개의 난자를 옮긴 다음 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 2 × 10<sup>6</sup> sperms/ml이 되도록 조절하여 매정한 후, 24시간 동안 39°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 수정을 유도하였다. 최종 정자의 농도는 hemocytometer 또는 Makler Counting Chamber로 정자의 수를 계산하였다.

## 5) 체외수정란의 체외배양을 위한 난관상피세포의 준비

도축장에서 채취한 난관의 오염을 방지하기 위하여 penicillin G (500 units/ml)와 streptomycin (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 들어있는 4°C의 생리식염수에 담아 3~4시간 이내에 실험실로 운반하였다. 항생제가 들어 있는 생리식염수로 세척한 다음 멸균된 휴지로 난관표면을 닦고 멸균된 수술기구로 결합조직과 지방덩어리를 완전히 제거하였다. 70% alcohol에서 20초간 소독을 한 후 생리식염수로 2~3회 세척한 다음 오염가능성이 있는 난관의 양끝 부분을 약 1 cm 정도를 잘라내었다. TCM-199 medium 1 ml가 들어있는 10 ml syringe로 난관협부에서 누두부쪽으로 관류시킨 다음 핀셋으로 난관을 압착하면서 난관상피세포를 채취하였다. 채취한 난관상피세포는 500×g에서 5 분간 원심분리시켜 상층액은 제거하고 나머지 pellet 부분을 2 회 이상 원심분리기로 세척하여  $1\sim 2 \times 10^6$  cells/ml의 최종농도로 조절하여 48시간 동안 배양시킴으로써 epithelial vesicle cells을 선별하여 체외수정란과의 공배양에 이용하였다.

## 6) 체외수정란의 체외배양

체외수정된 수정란은 10% BCS가 첨가되어 있는 TCM-199 배양액 또는 기본 배양액 Hamster Embryo Culture Medium (HECM; Schini and Bavister, 1998)을 약간씩 변형시킨 HECM-3 (Table 1)에 11종의 아미노산 (Table 2)이 첨가된 배양액 HECM-6으로 4~5회 세척하여 난구세포와 정자를 완전히 제거한 다음 난관상피세포에서 공배양 하거나 난관상피세포가 첨가되지 않은 배양액에서 후기배로의 발달을 조사하였다. 체외배양액으로 TCM-199을 사용할 경우에 있어서 난관상피세포와 공배양할 경우 48 시간마다 신선한 배양액으로 교환하며, 5일이 경과한 후 신선한 난관상피세포로 교환하였다. 체외배양액 HECM-6를 사용할 경우 11종의 아미노산 이외에 각각 0.1 mg/ml Polyvinylalcohol (PVA, Sigma, U.S.A.), 3 mg/ml

BSA-V (Fraction-V, Sigma, U.S.A.) 및 10% BCS를 첨가하여 drop 당 수정란의 비율과 함께 3~4일간 HECM-6에서 배양한 후, 10% BCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 체외수정란을 옮겨 7~9일 까지 배양하여 후기배로의 배 발달을 조사하였다.

Table 1. Composition of HECM-3 medium for *in vitro* culture of bovine IVF embryos\*

Component	Concentration (mM)
PVA	0.1 mg/ml
NaCl	113.80
KCl	3.00
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.90
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.46
NaHCO <sub>3</sub>	25.00
Na-Lactate	4.50
1 M HCl**	1.4 µl/ml

\*Bring medium to volume with approved Milli-Q water and measure osmotic pressure (BM-3 = 275±5 mOsmos/Kg).

\*\*1 M HCl was used to reduce pH to prevent precipitation during storage and culture.

Table 2. Composition of amino acids for HECM-6

Component	Concentration (final mM)
Taurine	0.50
Asparagine	0.01
Cysteine	0.01
Histidine	0.01
Lysine	0.01
Proline	0.01
Serine	0.01
Aspartic Acid	0.01
Glycine	0.01
Glutamic Acid	0.01
Glutamine	0.20

#### 7) 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM (General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square mean을 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 체외성숙시 EGF 첨가에 따른 수정율 및 배 발달율

최적 배양체계 구축을 위하여 도축장에서 도축되는 한우의 난소에서 채란된 난포란을 이용하여, 다각적인 면에서 체외성숙, 체외수정 및 체외배양을 거친 체외수정란의 생산 결과는 다음과 같다. Table 3에서는 도축 난소의 난포란을 이용하여 체외성숙시 기존의 체외성숙용 배양액 Ham's F-10에 혈청으로 10% BCS를 첨가하여 왔으나 가격이 비싸므로 저가의 EGF를 첨가하여 수정율과 후기배로의 발달율에 차이점이 나타나는지를 조사하였다. 본 실험의 결과, EGF와 BCS의 수정율은 각각 76.0%와 75.9%로 나타났으며, 배반포기까지의 발달율에 있어서도 각각 44.0%와 43.6%로 나타나 두 첨가구 사이에 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이는 나타나지 않았다.

Table 3. Development of embryos produced *in vitro* by different culture system for IVM\*

Treatments	Replicates	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocyst
EGF	6	392	298 (76.0) <sup>a</sup>	131 (44.0) <sup>a</sup>
BCS	6	435	330 (75.9) <sup>a</sup>	144 (43.6) <sup>a</sup>

† Values with same superscripts in the same column were not significantly different ( $P<0.05$ ).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml; Culture medium: transferred into TCM-199 after culturing in HECM-6 until day 4 post-IVF.

체외성숙시 EGF의 첨가가 미성숙난자의 체외성숙 후 핵과 세포질성숙 및 수정율과 후기배로의 발달율에 미치는 영향에 관한 연구에 있어서, Coskun 등(1991)은 미성숙난자의 체외성숙시 성숙용 배양액 DME/F-12에 10 ng/ml의 EGF를 첨가하였을 경우 수정율과 4~8 세포기 까지의 발달율에 있어서 혈청이 첨가되지 않은 경우 보다 높은 성적을 나타내었다고 보고하였다.

Lonergan 등(1996)은 체외성숙시 체외성숙용 배양액 TCM-199에 1~100 ng/ml의 EGF를 첨가하면 수정율에 있어서는 TCM-199 단독배양 또는 10% FCS가 첨가된 TCM-199에 배양했을 때 보다 높은 성적을 나타내었고, 부화율에 있어서는 10 ng/ml 첨가구에서 가장 높은 성적을 나타내었다고 보고하였다. 그러나 이들은 체외성숙시 FCS (10%), EGF (10 ng/ml) 및 FCS+EGF 첨가구에 있어서 수정율은 각각 76, 73 및 75%를 나타내었고, 후기배로의 발달율에 있어서는 각각 48, 41 및 42%로 나타내었다고 보고하여 본 실험의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

이러한 결과를 볼 때 미성숙 난포란의 체외성숙시 배양조건이 수정율과 후기배로의 발달에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 따라서 체외성숙용 배양액에 고가의 혈청을 첨가하는 것보다는 저가의 EGF를 첨가하는 것이 체외수정란의 생산에 사용되는 비용의 일부를 절감할 수 있으리라 사료된다.

## 2) 체외수정용 정자준비 방법에 따른 수정율 및 배 발달율

체외수정란을 생산하기 위하여 체외성숙 후 체외수정에 필요한 정자를 준비하는데 있어서 정자의 초기 분리과정은 IVF에 사용되는 운동성을 가진 정상 정자의 회수율을 높이기 위하여 반드시 필요하다. 현재까지 소에 있어서 IVF를 위한 정자의 준비 기술 방법과 운동성 정자의 회수율을 높이기 위한 기술 방법은 swim-up, Percoll density gradients 및 glass wool을 이용해 왔다. 이 중에서 현재 가장 보편적으로 사용되어지고 있는 기술은

swim-up 방법이다. 그러나 이 방법은 한 개의 동결정액 straw에서 IVF에 필요한 적정 정자의 농도를 회수하기는 쉽지 않다. 그러나 Parrish 등(1989, 1990)은 소의 동결·융해 정자의 분리에 있어서 Percoll 방법이 적합하다고 보고한 바 있다.

도축장에서 수집한 난소로부터 난포란을 채취하여 체외성숙 시킨 후 체외수정에 사용되는 운동성을 가진 정상 정자의 회수율을 높이기 위하여 현재까지 본 연구실에서 사용하여 왔던 swim-up 방법과 Percoll 방법을 비교·조사하였으며, 그 결과는 Table 4와 같다. 즉, 수정율에 있어서 Percoll의 방법으로 채취된 정자를 이용하였을 경우에 81.9%의 수정율을 나타내어 Swim-up 방법으로 채취된 정자를 이용하였을 경우에서의 80.2%의 수정율과는 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 그리고, 후기배로의 발달율에 있어서 swim-up 방법으로 채취된 정자를 이용하였을 때는 29.2%로 나타났으며, Percoll 방법에서 나타난 후기배로의 발달율은 26.5%로서 두 처리군간에 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 swim-up 방법에서 나타난 29.2%의 약간 높은 후기배로의 발달율 결과만으로는 현재 가장 보편적인 swim-up 방법이 정자의 분리에 적합하다고 단정하기는 어렵다. 특히 본 연구실에서 실험한 결과로는 동결정액에 있어서의 운동성을 가진 활력정자의 분리는 swim-up 방법 보다는 Percoll 방법을 이용하는 것이 유리하다고 사료되며, 또한 활력정자를 분리하는데 있어서 육안적 활력평가방법에 의한 결과 swim-up 방법에서는 70% 정도의 활력정자가 관찰된 데 비해 Percoll 방법에 의해서는 90% 이상의 활력도가 높은 정자가 분리되었다. 따라서 체외수정에 있어서 Percoll 방법에 의해 분리된 활력도가 높은 정자를 이용하여 체외수정시 수정율을 충분히 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of swim-up and Percoll treatment for increasing motile spermatozoa used for IVF on subsequent *in vitro* development of bovine embryos\*

Type of sperm treatments	Replicates	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocyst
Swim-up	3	162	130 (80.2) <sup>a</sup>	38 (29.2) <sup>a</sup>
Percoll	3	226	185 (81.9) <sup>a</sup>	49 (26.5) <sup>a</sup>

† Values with same superscripts in the same column were not significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml; Culture medium: TCM-199 and OEC (oviductal epithelial cell).

Parrish 등(1995)은 체외수정에 필요한 정자를 준비하는데 있어서 원심 분리 전에 Percoll density gradient 방법에 이용된 정자의 수는 swim-up 방법에 이용된 정자수의 1/2 정도였음에도 불구하고 원심분리 후 회수된 정자의 수는 Percoll 방법이 swim-up 방법의 2배 이상이었다고 보고하였고, 회수된 운동성 정자의 비교에 있어서도 Percoll 방법을 이용한 군에서 swim-up 방법을 이용한 군에서 보다 훨씬 높은 4.6배의 회수율을 나타내었다고 보고하였다. 또한 이들은 수정율과 후기배로의 발달율에 있어서 수정율은 swim-up 방법을 이용했을 때  $60 \pm 1\%$ 로 나타나 Percoll 방법을 이용했을 때의  $42 \pm 1\%$  보다 높게 나타났으나, 후기배로의 발달율에 있어서는 각각  $29 \pm 1\%$ 와  $35 \pm 4\%$ 로 나타나 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다.

본 실험의 결과에서는 언급되지 않았으나, 활력도를 가진 운동성 정자의 회수율에 있어서 Parrish 등(1991)과 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 체외수정을 위한 정자를 분리하는 방법에 있어서 swim-up 방법보다는 Percoll density gradient 방법을 이용하는 것이 보다 많은 양의 활력을 가진 운동성 정자를 얻는데 유리하고, 정자를 준비하는데 소요되는 시간도 단축시킬 수 있을 것으로 사료된다.

### 3) 체외배양액에 따른 후기배로의 발달율

Table 5에서는 체외수정 후 수정란을 배양하는데 있어서 Pinyopummintr와 Bavister (1991, 1994, 1995)의 2단계 배양방법을 약간 수정하여 체외성숙·수정된 난포란을 체외배양액 TCM-199 (+10% BCS)과 HECM-6 (+11 amino acids)에서 각각 3일동안 배양한 후 TCM-199 배양액으로 옮겨 후기 배반포기까지의 배발달율을 조사하였다. 수정율에 있어서는 TCM-199 배양액에서는 80.5%로 나타나 72.0%를 나타낸 HECM-6 배양액 보다는 높은 유의적 ( $P<0.05$ ) 차이를 나타내었다. 그러나 배반포기까지의 발달율에 있어서는 HECM-6 배양액에서 42.4%의 높은 성적을 나타내어 TCM-199 배양액의 26.7% 보다는 훨씬 높은 유의적 ( $P<0.05$ ) 차이를 나타내었다.

Pinyopummintr와 Bavister (1991)는 체외수정 후 단순배양액 HECM으로 배양했을 때 난관상피세포나 혈청과의 공배양이 없어도 morula까지는 충분히 발달할 수 있으며, 다만 blastocyst 단계에서는 혈청의 첨가가 필요하다고 보고하여 2단계 배양법의 이용 가능성을 시사하였다.

Table 5. Effect of culture media on *in vitro* development of bovine IVF embryos\*

Media**	Replicates	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocyst
TCM-199	6	400	322 (80.5) <sup>a</sup>	86 (26.7) <sup>b</sup>
HECM-6	5	625	450 (72.0) <sup>b</sup>	191 (42.4) <sup>a</sup>

† Different superscripts in the same column indicated a significant difference ( $P < 0.05$ ).

\* Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

\*\* TCM-199: cultured in TCM-199 from day 1 to day 9; HECM-6: cultured in HECM-6 until day 3~4, and then transferred into TCM-199.

McKiernan과 Bavister (1995)는 Golden hamster를 이용하여 HECM을 기본으로 20종의 아미노산을 8종의 HECM에 각각 첨가하여 후기배의 발달을 조사한 결과, 본 연구와 같은 11종의 아미노산이 각각 다른 농도로 첨가된 HECM-6에서  $59 \pm 8\%$ 로 다른 첨가군에 비하여 가장 높은 성적을 나타내었다고 보고하였다.

Pinyopummintr와 Bavister (1996)는 체외성숙·수정 후 수정란을 배양하는데 있어서 1단계 방법으로 10% BCS가 첨가된 TCM-199으로 배양 1일째부터 8일째까지 배양하는 방법과 2단계 방법으로 HECM-3에 lactate, 11종의 amino acid, pyruvate 및 glucose를 각각 첨가하여 수정 후 72시간까지 배양한 후에 10% BCS가 첨가된 TCM-199에서 후기배까지의 발달을 조사한 바, 배반포기배까지의 발달에 있어서 1단계 방법에서는 14.6%를 나타내는데 비하여 2단계 방법에 있어서 pyruvate를 첨가한 군과 lactate와 11종의 amino acid를 첨가한 군에서는 각각 35.6%와 41.4%를 나타내어 높은 후기배로의 발달성적을 보고하였다.

본 연구실에서는 지금까지 주로 체외배양을 TCM-199 배양액에 10% BCS를 첨가하고 난관상피세포와의 공배양을 실시하여 후기배로의 발달을 관찰하였다. 그러나 최근에는 TCM-199과 같은 복합배양액 보다는 HECM-6와 같은 단순배양액에 아미노산을 첨가하여 후기배로의 발달을 조사하고 있다. 이는 TCM-199과 같은 복합배양액에는 초기 수정란의 배발달에 좋지 않는 영향을 미치는 glucose가 함유되어 있기 때문에 이를 배제하기 위하여 직접 연구실에서 제조할 수 있는 단순배양액을 만들어 이용함으로써 이러한 일부 배발달을 저하의 문제점을 극복해 나갈 수 있을뿐만 아니라 수정란의 대사 및 필요성분 조사 등에 이용할 수 있을것으로 사료된다. 본 연구실에서도 기본 HECM-3를 제조하여 11종의 아미노산 (Taurine, Asparagine, Cysteine, Histidine, Lysine, Proline, Serine, Aspartic Acid, Glycine, Glutamic Acid, Glutamine)을 첨가하여 체외수정란의 배양액 (HECM-6)으로 이용하였다.

#### 4) 체외배양액의 교체시기에 따른 배 발달

Table 6에서는 체외수정 후 체외배양액 HECM-6를 이용하여 초기 체외수정란을 체외배양 하는데 있어서 HECM-6에서 3일 또는 4일간 배양한 후 10% BCS가 첨가된 TCM-199으로 수정란을 이동하여 9~10일까지 후기배로의 발달에 차이가 나타나는지를 조사하였다. 수정율에 있어서 3일과 4일간에 각각 78.6%와 75.0%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았으며, 후기배로의 발달에 있어서도 각각 45.5%와 43.2%로 나타나 HECM-6에서의 배양시간이 3일과 4일간에 있어서는 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 배반포기배로의 발달속도에 있어서 HECM-6에서 3일간 배양후 TCM-199으로 이동한 군에서는 수정 후 8일째에 76.0%의 배반포기 발달을 나타낸 반면, HECM-6에서 4일간 배양후 TCM-199으로 이동한 군에서는 수정 후 7일째에 71.0%의 배반포기 발달을 나타내어,

초기 수정란의 체외배양에 있어서 HECM-6에서 4일간 배양 후에 TCM-199으로 수정란을 이동하는 것이 후기 배반포기배로의 발달속도를 빠르게 할 수 있음을 나타내고 있다. 그러나 다만, 후기배로의 발달속도를 나타내는데 있어서 배반포기배의 평가기준에 대한 세심한 주의력이 필요한 것으로 사료된다.

Table 6. Blastocyst development of embryos produced *in vitro* following media exchange with HECM-6 at day-3 or day-4 of culture\*

Exchange of media	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of blastocysts				
			Total	Day 7	Day 8	Day 9	Total
Day 3	210	165(78.6) <sup>a</sup>	75(45.5) <sup>b</sup>	4( 5.3)	57(76.0)	14(18.7)	75(100)
Day 4	617	463(75.0) <sup>a</sup>	200(43.2) <sup>b</sup>	142(71.0)	39(19.5)	19( 9.5)	200(100)

† Values with same superscripts in the same column were not significantly different (P<0.05).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

##### 5) 체외배양시 난관상피세포와의 공배양에 따른 배 발달율

Table 7에서는 미성숙 난포란을 체외성숙 및 체외수정 후 HECM-6를 이용하여 초기 체외수정란의 체외배양을 3일 또는 4일간 배양하는데 있어서 소의 난관상피세포 (bovine oviductal epithelial cell; BOEC)의 첨가군과 무첨가군 사이에 수정율 및 후기 배반포기배로의 발달율에 차이가 나타나 는지를 실험하였다. 수정율에 있어서 첨가군과 무첨가군에서 각각 73.9%와 74.2%로 나타나 두 군간에 유의적 (P<0.05)인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배로의 발달율에 있어서도 첨가군과 무첨가군에서 각각 43.5%와

41.4%로 나타나 두 군간에 발달율에 있어서 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

Table 7. Effect of co-culture with BOEC in HECM-6 media on *in vitro* development of bovine IVF embryos\*

Culture condition	Replicates	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes Cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocyst
HECM-6 only	10	1920	1419 (73.9) <sup>a</sup>	617 (43.5) <sup>b</sup>
Co-culture with BOEC in HECM-6	14	2031	1507 (74.2) <sup>a</sup>	624 (41.4) <sup>b</sup>

† Different superscripts in the same column indicated a significant difference ( $P < 0.05$ ).

\* Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

체외배양시 난관상피세포와의 공배양은 소에서 8~16 세포기의 "cell block 현상"을 극복한다고 하였으나 (Goto 등, 1988; Eyestone과 First, 1989), 몇몇의 연구보고서에서는 소의 미성숙난포란을 체외성숙·수정 후 체외배양 하는데 있어서 난관상피세포와 같은 체세포 (somatic cell)와 공배양을 하지 않아도 8~16 세포기의 발달중지 현상을 극복하여 20~30% 또는 그 이상의 배반포기배로의 발달율을 나타낸다고 보고하였다 (Pinyopummintr와 Bavister, 1991; Fukui 등, 1991; Takahashi와 First, 1992; Kim 등, 1993).

따라서 본 연구에서는 단순배양액 HECM-6에 11종의 아미노산을 첨가 함으로서 난관상피세포와의 공배양을 하지 않아도 난관상피세포와 공배양

한 군과 거의 같은 성적을 나타내었다. 이는 체외배양에 있어서 난관상피세포와의 공배양에서 가끔 발견될 수 있는 오염의 일부 원인을 방지할 수 있을 뿐만 아니라, 초기 수정란의 배양에 있어서 serum이 첨가되지 않는 단순배양액 HECM-6에 난관상피세포와 같은 체세포와 공배양을 하지 않고 단지 11종의 아미노산만을 첨가하여도 후기배로의 발달에 있어서 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

#### 6) 체외배양시 각기 다른 첨가물에 따른 수정율 및 배 발달율

Table 8에서는 초기 체외수정란의 체외배양시 단순배양액 HECM-6에 각기 다른 첨가물 PVA (polyvinyl alcohol), BSA (bovine serum albumin) 또는 BCS (bovine calf serum)를 각각 첨가하여 4일동안 배양한 후, TCM-199 배양액으로 체외수정란을 옮겨 배양함으로써 수정율 및 후기배로의 발달율을 조사하였다. 수정율에 있어서는 PVA 첨가구에서 72.5%로 나타나, BSA 첨가구 75.0%와 BCS 첨가구 76.7%에 비하여 유의적 ( $p < 0.05$ )로 낮았다. 그러나 BSA 첨가구와 BCS 첨가구 간에는 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이가 나타나지 않았다. 그리고 수정 후 후기 배반포기배로의 발달율에 있어서는 PVA, BSA 첨가구 및 BCS 첨가구에서 각각 42.2, 40.5%와 38.0%를 나타내어 각 처리군간의 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이는 나타나지 않았다.

많은 체외배양체계 (IVC system)에 사용되고 있는 화학적으로 규정된 배양액에는 대체로 BSA와 같은 단백질을 함유하고 있다. 그러나 아직까지 수정란의 초기발달에 영향을 미치는 단백질이나 아미노산의 정확한 농도는 규명되어 있지 않다. 지금까지는 체외수정란을 생산하기 위해서는 대부분의 단순배양액에는 주로 BSA를 첨가하여 왔으나, BSA의 대체용으로 PVA를 첨가하여 수정란의 부착을 방지하였다 (Bavister, 1981).

Table 8. Effect of various supplements in HECM-6 media on *in vitro* development of bovine IVF embryos\*

Supplements	Replicates	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocyst
PVA	21	3567	2586 (72.5) <sup>b</sup>	1092 (42.2) <sup>a</sup>
BSA	20	2594	1945 (75.0) <sup>a</sup>	787 (40.5) <sup>a</sup>
BCS	7	600	460 (76.7) <sup>a</sup>	175 (38.0) <sup>a</sup>

† Values with same superscripts in the same column were not significantly different ( $P < 0.05$ ).

\* Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

Flood와 Shirley (1991)는 체외배양액에 첨가되는 BSA의 기초적 역할이 수정란에 유해한 독성물질의 킬레이트화 가능성을 제시하였다.

Ohboshi 등(1996)은 serum-free medium인 mSOFM에 calf serum (CS), BSA, PVA를 각각 첨가하여 수정율과 후기배로의 발달율을 조사한 결과, 수정율에 있어서는 각각 66.9, 78.8 및 76.3%를 나타내어 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았으나, 후기배로의 발달율에 있어서는 CS와 BSA에서 각각 27.8 및 19.5%로 나타나 PVA의 5.7%와 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내었다. 이들은 BSA 또는 CS 대신에 PVA를 첨가하는 것이 후기배로의 발달율을 저하시키는 결과를 보고하였으나, 이는 단순배양액 mSOFM를 이용하여 수정후부터 후기배로의 발달을 유도하였으나, 본 연구는 HECM-6를 이용하여 체외수정 후 수정란을 배양하는데 있어서 2단계 방법으로 체외배양 (수정후 3일 또는 4일까지는 11종의 아미노산이 첨가된 HECM-6로 배양한 다음 10% BCS가 첨가된 TCM-199으로 옮겨서 배반포기배까지 배

양) 하는 것이 후기배로의 발달율을 높일수 있을 것으로 사료되며, 초기수정란의 배양에 있어서 수정 후 3일 또는 4일까지는 11종의 아미노산이 첨가된 단순배양액 HECM-6에 PVA, BSA 또는 BCS를 첨가하여도 후기배로의 발달율에는 차이를 나타내지 않았으며, BSA 또는 BCS와 같은 단백질원을 따로 첨가하지 않고 PVA 만을 첨가하여도 후기배로 발달하는데에는 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

#### 7) 체외수정 후 4-well plate 또는 droplet 배양에 따른 수정율 및 배발달율

채란한 난포란을 체외성숙·수정 후 체외배양액 HECM-6에서 4일동안 배양한 후 TCM-199에 배양하는데 있어서 배양조건을 1 embryo/2  $\mu$ l 4-well plate 비율과 paraffin oil로 피복된 1 embryo/1  $\mu$ l droplet 비율로 실험한 결과 수정율과 후기 배반포기배로의 배발달율 및 부화율을 조사하였다 (Table 9). 수정율은 각각 75.0%와 77.1%로 나타나 각 처리군 간에 유의적인 ( $P < 0.05$ ) 차이점은 나타나지 않았으며, 수정 후 후기 배반포기배로의 발달율에 있어서도 각각 51.3%와 51.5%를 나타내어 처리군간의 차이는 나타나지 않았다. 또한 부화율에 있어서도 각각 87.0%와 91.4%를 나타내었다. 이는 체외수정란을 4-well plate에서 배양하거나 paraffin oil로 피복된 droplet에서 배양을 하더라도 수정율과 배발달율 및 부화율에 있어서는 차이점이 나타나지 않았다. 그리고 4-well plate에서는 체외배양액의 양을 300  $\mu$ l 이하로는 사용하기가 어렵기 때문에 배양액의 양을 100  $\mu$ l 이하로 조절하여 배양할 수 있는 droplet 배양을 실시하여 작은 수의 체외수정란을 소량의 droplet에서 배양할 수 있도록 하기 위한 예비실험으로 본 실험을 수행하였다.

Table 9. Blastocyst development of *in vitro* fertilized bovine follicular oocytes in droplets under paraffin oil or 4-well plates\*

Treatments	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of blastocysts	
			Total	Hatched
4-well (1/2 $\mu$ l)	200	150(75.0) <sup>a</sup>	77 (51.3) <sup>b</sup>	67 (87.0) <sup>c</sup>
Droplet (1/1 $\mu$ l)	350	270(77.1) <sup>a</sup>	139 (51.5) <sup>b</sup>	127 (91.4) <sup>c</sup>

† Values with same superscripts in the column were not significantly different (P<0.05).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

#### 8) 체외수정 후 droplet 배양시 수정란의 밀도에 따른 배 발달율

Table 10에서는 앞의 Table 9에서 설명한 바와 같이 체외배양액의 양을 조절할 수 있는 droplet 방법을 이용하여 50  $\mu$ l의 droplet volume에 체외수정란의 양을 조절하여 일정한 배양액의 양에 따른 각기 다른 체외수정란의 밀도가 후기배로의 발달에 영향을 미치는가를 조사한 결과는 다음과 같다. 50  $\mu$ l의 droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10, 20, 30, 40개 및 50개로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 35.7, 38.7, 40.1, 47.4, 44.9% 및 43.8%로서 유의적 (P<0.05)인 차이를 나타내었다. 그러나, 각 군들 간에 유의성은 인정되었으나 20 embryos/50  $\mu$ l droplet 이상의 군에서는 40% 이상의 높은 배 발달율을 나타내고 있으며, 또한 배양액의 양에 따른 체외수정란의 밀도를 조절하는 지속적인 연구가 현재 진행중에 있다.

Table 10. Effect of embryo numbers in group culture system on *in vitro* development of bovine IVF embryos\*

No. of embryos/50 $\mu$ l droplet	Replicates	No. of embryos used	No.(%) of embryos developed to blastocyst
5	2	140	50 (35.7) <sup>b</sup>
10	5	310	120 (38.7) <sup>b</sup>
20	18	1380	553 (40.1) <sup>b</sup>
30	3	390	185 (47.4) <sup>a</sup>
40	4	510	229 (44.9) <sup>a</sup>
50	3	500	219 (43.8) <sup>ab</sup>

† Different superscripts in the same column indicate a significant difference ( $P < 0.05$ ).

\* Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

Table 11에서는 20  $\mu$ l의 droplet volume에 체외수정란의 양을 조절하여 일정한 배양액의 양에 따른 체외수정란의 밀도가 후기배로의 발달에 영향을 미치는가를 조사한 결과는 다음과 같다. 20  $\mu$ l의 droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10개 및 20개로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 32.0, 36.7% 및 35.0%로서 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이는 나타나지 않았다.

Table 11. Effect of embryo number on blastocyst development in a constant 20  $\mu\text{l}$  droplets\*

No. of embryos/ drop volume ( $\mu\text{l}$ )	Replicates	No. of embryos	
		used	No. (%) of blastocysts
5/20	1	100	32(32.0) <sup>a</sup>
10/20	2	90	33(36.7) <sup>a</sup>
20/20	4	380	133(35.0) <sup>a</sup>

† Values with same superscripts in the column were not significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

Table 12에서는 체외배양액의 droplet volume과 체외수정란의 비율을 10 embryos/10  $\mu\text{l}$ , 20 embryos/20  $\mu\text{l}$  및 50 embryos/50  $\mu\text{l}$ 로 동등하게 조절하여 후기 배반포기배의 발달율을 조사한 결과는 다음과 같다. 후기 배반포기배로의 발달율은 각각 42.0, 40.6% 및 40.8%로서 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

Table 12. Effect of different volumes with equal embryo density in culture drops on *in vitro* development of bovine IVF embryos\*

No. of embryos/ drop volume ( $\mu\ell$ )	Replicates	No. of embryos used	No.(%) of embryos developed to blastocyst
10/10	2	210	89 (42.4) <sup>a</sup>
20/20	3	180	73 (40.6) <sup>a</sup>
50/50	2	350	143 (40.8) <sup>a</sup>

† Values with same superscripts in the column were not significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

### 9) 난관상피세포와의 공배양에 따른 할구수 조사

Table 13에서는 체외수정 후 체외배양시 난관상피세포와 공배양 하지 않은 군과 공배양 군과의 배양 8일째 배반포기배의 할구수를 각각 조사한 결과는 다음과 같다. 즉 체외배양액 HECM-6에서 4일 동안 배양한 다음 TCM-199 배양액으로 체외수정란을 옮겨 배양하면서 체외배양 8일째의 배반포기배의 할구수는 난관상피세포와 공배양 하지 않은 군과 공배양 군에서 각각  $96.6 \pm 4.3$ 개와  $106.7 \pm 4.7$ 개로 나타나 두 처리군 간에 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

Table 13. Effect of co-culture with BOEC on blastomere counts of *in vitro* developed bovine IVF embryos\*

Culture conditions	No. of blastocysts		
	used**	Mean $\pm$ S.E.	Ranges
Culture media only	28	96.6 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	61 ~ 140
Co-culture with BOEC	23	106.7 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>	59 ~ 150

† Values with same superscripts in the column were not significantly different (P<0.05).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml

\*\*Examined 192 h post-insemination.

## 4. 적 요

초음파를 이용한 난포란의 채란에 있어서 유전적으로 가치있는 동물 (공란우)로부터 얻어진 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하기 위해서는 소수의 난포란 배양에 적합한 배양체계의 구축이 필수적이므로 체외성숙, 수정 및 배양에 따라 적합한 최적 배양체계를 구축하고자, 도축장에서 도축된 한우의 난소에서 최소한 2층 이상의 난구세포를 가지고 세포질이 충실한 난포란을 채란하여 실험에 공시하였다. 난포란의 체외성숙용 배양액으로 LH ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), FSH ( $35 \mu\text{g/ml}$ ) 그리고 estradiol- $17\beta$  ( $1 \mu\text{g/ml}$ )이 첨가된 Ham's F-10에 BCS 또는 EGF를 각각 첨가하여 24시간 동안 체외성숙을 유도하였으며, 체외수정에 필요한 정자를 준비하기 위하여 정자용 TALP medium을 이용하여 swim-up 방법 또는 Percoll density gradient 방법으로 운동성을 가진 활력있는 정자를 채취하여  $2 \times 10^6$  cell/ml 농도로 성숙된 난자와 수정시켰다. 체외배양에 있어서 체외수정 후 체외배양용 배양액 TCM-199 또는 HECM-6에 3~4일 동안 초기 체외수정란을 배양시킨 다음 10% BCS가 첨가된 신선 TCM-199 배양액으로 수정란을 옮겨 48시간마다 신선 TCM-199배양액으로 교체하여 7~10일까지 후기배로의 발달을 유도하였다. 또한 초기 수정란을 배양하는데 있어서 HECM-6에 PVA, BSA 또는 BCS를 각각 첨가하거나 난관상피세포와의 공배양을 실시하고, 또한 배양액 droplet의 volume에 따른 수정란 수의 비율에 따라 후기배로의 발달을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

체외성숙시에는 Ham's F-10 배양액에 EGF를 첨가하여도 수정율과 배반포기배로의 발달율에는 BCS를 첨가한 경우와는 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 그리고 체외수정시 정자를 준비하는데 있어서도 Swim-up 방법과 Percoll density gradient 방법에 있어서 수정율은 각각 80.2%와 81.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 체외수정 후 체외배양용 배양액으로 TCM-199과 HECM-6를 이용한 결과, 수정율에 있

어서는 각각 80.5%와 72.0%로 TCM-199에서 약간 높은 경향을 나타내었으나, 배반포기배로의 발달율에 있어서는 26.7%와 42.4%로 TCM-199에 비해 HECM-6에서 훨씬 높게 나타났다. 그리고 HECM-6 배양액에서 수정란의 초기 배양시 난관상피세포와의 공배양군과 공배양을 하지 않는 군에 있어서는 수정율과 발달율에 있어서 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 또한 HECM-6 배양액에 PVA, BSA 및 BCS를 각각 첨가하였을 때, 수정율에 있어서는 PVA 첨가군에서 약간 낮게 나타났으나, 배반포기배로의 발달율에 있어서는 세 첨가군 모두 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

체외배양시 4-well 이나 droplet을 이용하였을 때 수정율, 후기배로의 발달율 및 부화율에 있어서 두 군간에 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 수정란의 배양에 있어서 50  $\mu$ l droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10, 20, 30, 40개 및 50개로 조절하여 배양한 결과, 50  $\mu$ l droplet에 30개와 40개의 수정란으로 배양하는 것이 후기배로의 발달율에 있어서 각각 47.4% 및 44.9%로 높게 나타나 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내었다. 그리고 20  $\mu$ l의 droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10개 및 20개로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 32.0, 36.7% 및 35.0%로서 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 또한 체외배양액의 droplet volume과 체외수정란의 비율을 10:10, 20:20 및 50:50으로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 32.0, 36.7% 및 35.0%로서 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 그리고 체외수정 후 체외배양시 난관상피세포와 공배양 하지 않은 군과 공배양군과의 할구수를 체외배양 8일째 조사한 결과 각각  $96.6\pm 4.0$ 개 및  $106.7\pm 5.1$ 개로 나타나 두 처리군 간에 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

이상의 실험 결과들을 종합해보면, EGF가 첨가된 체외성숙용 배양액 Ham's F-10으로 24시간 동안 체외성숙을 유도하여 Percoll density gradient 방법으로 채취된 운동성을 가진 활력정자와 매정하여 체외수정을

시킨 다음 HECM-6 체외배양액으로 3~4일 동안 초기 배양을 한 후, 10% BCS가 첨가된 신선 TCM-199 배양액으로 옮겨 후기배로의 발달을 유도하는 것이 체외수정란의 생산율을 높이는데 효율적인 것으로 사료되며, 체외수정 후 체외배양에 있어서 배양액과 수정란의 비율을 1  $\mu$ 당 0.6~1개 정도로 조절하여 배양하는 것이 후기배로의 발달을 높이는데 효율적인 것으로 사료된다.

따라서, 대부분의 소 난포란들은 적절한 배양체계의 구축으로 소수의 수정란으로 체외성숙, 수정 및 배양했을 때 배반포기배까지 충분히 발달할 수 있다는 것을 나타내었다. 이것은 초음파를 이용한 난포란 채란에 있어서 각각의 공란우로부터 얻어진 소수의 난포란을 이용한 체외수정란의 생산체계 구축에 대한 폭넓은 연구의 장을 열어 놓았으며, 우수한 종빈우의 난포란을 이용한 체외수정란 생산에 있어서도 확실한 수정란의 계통을 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

## Literature Cited

1. Avery B. and Greve T. 1995. Impact of Percoll<sup>R</sup> on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. *Theriogenology*, 44:871-878.
2. Bavister, B. D. 1981. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J. Exp. Zool.*, 217:45-51.
3. Blondin, P. and Sirard, M. A. 1995. Oocytes and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 41:54-62.
4. Brackett, B. G. and Zuelke, K. A. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39:43-64.
5. Carolan, C., Lonergan, P., Khatir, H. and Mermillod, P. 1996. *In vitro* production of bovine embryos using individual oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 45:145-150.
6. De Leeuw F. E., De Leeuw A. M., Den Daas J. H. G., Colenbrander B. and Verkleij A. J. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30:32-44.
7. Eyestone, W. H. and First, N. L. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in

- conditioned medium. J. Reprod. Fertil., 85:715-720.
8. Ferry, L., Mermillod, P., Massip, A. and Dessy, F. 1994. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. Theriogenology, 42:445-453.
  9. Fukui, Y., McGowan, L. T., James, R. W., Pugh, P. A. and Tervit, H. R. 1991. Factors affecting the *in-vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 92:125-131.
  10. Gardner, D. K., Lane, M. and Batt, P. A. 1993. Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep pre-attachment embryos developed *in vivo*. Mol. Reprod. Dev., 36:313-319.
  11. Gardner, D. K., Lane, M., Spitzer, A. and Batt, P. A. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. Biol. Reprod., 50:390-400.
  12. Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization. J. Reprod. Fertil., 83:753-758.

13. Hazeleger, N. L., Hill, D. J., Stubbings, R. B. and Walton, J. S. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, 43:509-522.
14. Kane, M. T., Carney, E. W. and Ellington, J. F. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 38:297-313.
15. Keefer C. L. and Paprocki A. M. 1995. Effect of Percoll following sperm separation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 43:244. Abstr.
16. Kim, J. H., Niwa, K., Lim, J. M. and Okuda, K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48:1320-1325.
17. Lane, M. and Gardner, D. 1992. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 7:558-562.
18. Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P. and Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocytes quality and developmental competence following maturation, fertilization and

culture *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 37:48-53.

19. Mermillod, P., Wils, C., Massip, A. and Dessy, F. 1992. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. J. Reprod. Fert., 96:717-723.
20. Parrish, J. J., Krogenaes, A. and Susko-Parrish, J. L. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. Theriogenology, 44:859-869.
21. Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H. and First, N. L. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 25:591-600.
22. Pavlok, A., Lucas-Hahn, A. and Niemann, H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Mol. Reprod. Dev., 31:64-67.
23. Pinyopummintr, T. and Bavister, B. D. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in a chemically defined, protein-free culture media. Biol. Reprod., 45:736-742
24. Pinyopummintr, T. and Bavister, B. D. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. Theriogenology, 41:1241-1249.

25. Pinyopummintr, T. and Bavister, B. D. 1995. Minimum energy substrate requirements for early cleavage stages of bovine embryo development *in vitro*. *Theriogenology*, 43:299. Abstr.
26. Pinyopummintr, T. and Bavister, B. D. 1996. Energy substrate requirements for *in vitro* development of early cleavage-stage bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 44:193-199.
27. Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried-Rutledge, M. L. and First, N. L. 1990. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available follicle stimulating hormone. *Theriogenology*, 34:1035-1039.
28. Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried-Rutledge, M. L. and First, N. L. 1991. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Theriogenology*, 44:256-260.
29. Schini, S. A. and Bavister, B. D. 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.*, 39:1183-1192.
30. Stubbing R. B. and Wosik C. P. 1991. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 35:276. Abstr.
31. Takahashi, Y. and First, N. L. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino

acids and vitamins. *Theriogenology*, 37:963-978.

32. Thibodeaux, J. K., Myers, M. W. and Hansel, W. 1995. The beneficial effects of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived grow factor. *Theriogenology*, 43:336. Abstr.
33. Thibodeaux, J. K., Myers, M. W., Prough, S. G. and White, K. L. 1995. Effect of a serum extender containing growth factors on development of IVM and IVF bovine embryos. *Theriogenology*, 44:423-432.
34. Wiemer, K. E., Watson, A. J., Polanski, V., McKenna, A. I., Fick, G. H. and Schultz, G. A. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Repord. Dev.*, 30:330-338.
35. 조성근, 송상현, 정기화, 강대진, 박충생. 1996. 배양체계가 체외성숙 소 난포란의 체외수정 및 배 발달에 미치는 효과. *한국수정란이식학회지*, 11:15-26.

## 제 4 장 체외수정란을 이용한 송아지 생산

### 1. 서 론

종축의 개량 효과를 높이기 위하여 최근 수정란이식 기법이 널리 이용되고 있으나 수정란 이식 기술을 실용화하려면 수정란의 생산비가 보다 절감되고 안정적으로 대량생산이 될 수 있어야 하는데 이를 위하여는 기존의 과배란 효율을 향상시키는 연구도 필요하지만 지금까지의 연구결과 한계에 도달한 것으로 판명되어 최근에는 체외수정란의 이용을 적극 검토해 오고 있다.

지금까지의 체내수정란의 이용 기법은 과배란 처리 후 수정하여 외과적 혹은 비외과적 방법으로 수정된 난자를 채란하고 있는데 과배란 유기를 위하여 4일간 고가의 호르몬 (FSH 또는 SUPER-OV<sup>®</sup>)을 1일 2회씩 주사해야 하고, 연간 두당 20개 정도의 수정란을 생산하지만 매회 일정한 수의 수정란을 회수하기도 어려울 뿐아니라, 과배란 유기후 난소낭종 등 부작용도 염려되고 있다.

최근의 국외 연구결과 (Pieterse 등, 1988, 1991<sub>a, b</sub>, 1992; Kruip 등, 1993; Walton 등, 1993; Fry 등, 1994; Gibbons 등, 1994, 1995; Loony 등, 1994; Van Soom 등, 1994; Bungartz 등, 1995; Hasler 등, 1995; Meintjes 등, 1995; Stubbings 와 Walton, 1995; Bols 등, 1996; Duby 등, 1996)에 의하면 초음파유도 난포란을 체외수정시키는 기법으로는 연간 두당 약 100여 개 이상의 이식 가능한 수정란을 생산할 수 있다. 초음파유도에 의한 난포란 채취기법은 임신우에서도 난포란 채취가 가능한 만큼 실제로는 더 많은 수정란을 확보 이용할 수도 있다.

또한 이 기법의 확립은 쌍자생산, 복제동물의 생산, 성감별 정자의 수정에 의한 송아지의 성조절 기술 및 유전자전이 동물 생산 등 여러가지 생명공학기술발전의 기초를 구축하는데 이용될 수도 있게 되므로 연구개발

이 매우 필요한 것으로 생각된다.

초음파유도 체외수정란 이용 기법이 확립되면 수정란이식이 조속히 실용화될 것이며 따라서 장래에 대하여 불안해 하고 있는 양축 농민들이 이를 통하여 종축개량에 대한 희망을 조속히 갖게 하고 번식관리에도 더욱 세심한 주의를 하게 되어 영농의욕도 고취시켜 줄 것이다.

따라서 본 연구에서는 Holstein 젖소와 한우를 이용하여 초음파유도에 의해 채란된 난포란으로부터 생산된 체외수정란을 이식하여 송아지를 생산하게 된다면, 한우와 젖소의 송아지 가격이 현저히 차이가 날 경우는 한우에서 젖소 송아지를 생산하거나 젖소에서 한우 송아지를 쌍자생산케 하는 등 한우 혹은 젖소 사육농가에게 장래에 대한 불안감을 해소시켜 줄 수도 있을 것으로 기대되어 본 연구를 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 공란우의 선정

일반적으로 1두당 회수란 수와 수정란 수는 연령, 분만후의 일수, 비유량, 성주기에 대한 성선자극호르몬 투여개시일, 계절, 품종, 산차 등에 관련되므로, 공란우로 선택하는 연령은 10세가 초과하면 원시난포가 적어서 배란수가 감소하므로 초산부터 10세까지의 범위내에서 선택하여 사용하였다. 성성숙과정에 있는 소는 외인성의 성선자극호르몬에 대해서 민감한 반응을 나타내지만 채란 가능한 조건을 충족시킬 수가 없고 능력판정도 불가능하므로 공란우의 후보축으로 제외하였다. 분만후 6개월간 즉, 번식기능이 활발히 활동하고 있는 시기를 선정하여 채란을 한다면 좋은 성적을 얻을 수 있으며, 착유우와 공태우에서는 착유우 편이 과배란에 의한 반응이 좋다. 자궁내막염, 생식기질병, 난소낭종, 장기공태 등의 번식장애 및 노령우 등은 공란우로 부터 제외하는 것이 좋으며, 이상을 요약하면 공란우의 선정에는 다음과 같은 요인을 주의하여 선정하였다.

- ① 유전적으로 우수한 형질을 가진 유전질환이 없는 개체
- ② 번식능력이 높은 개체
- ③ 건강하며 전염성 질환이 없는 개체
- ④ 시장가치가 높은 개체 등.

또한 공란우로서의 직접적인 선정조건은

- ① 産歴이 명료한 개체
- ② 성주기가 정상인 개체
- ③ 임신의 유지에 장애를 가져오는 질병이 없는 개체
- ④ 노령이 아닌 개체

채란하기 전·후에 외음부의 소독을 철저히 하여 초음파유도 난포란 채란에 의한 생식기의 감염을 야기시키지 않도록 주의하였다.

## 2) 수란우의 선발조건

수정란이식을 위하여 먼저 수란우를 선발하여야 하는데 수란우는 공란우와 달리 혈통이나 능력을 기대할 필요는 없지만 번식기능이 정상적인 것을 선발하였다. 그 선발 기준은 다음과 같다.

- ① 정상적인 성주기를 가진 것,
- ② 2회 이상 인공수정을 실시하여 수태하지 않은 소는 사용하지 말것,
- ③ 강건성 및 내병성이 있고 임신을 방해하는 질병이 없을 것,
- ④ 포유능력이 높은 것,
- ⑤ 체격이 큰 것

⑥ 공태기간이 짧은 것, 등을 선발하여 수정란이식 대상으로 이용하며 엄격한 선발기준에 선발된 수란우는 자연발정 및 발정유기를 실시하여 이식을 위한 준비를 실시하였다. 발정유기는 prostaglandin  $F_{2\alpha}$ (Lutalyse : Upjohn)를 대상우에 6 ㎖씩 근육주사한 후 2~3 일후에 발정이 발현되었을 경우, 2~3일 후 황체의 존재유무로서 정확한 배란일자를 판정하고 배란 후 7~8 일에 수정란이식을 실시하고, 2~3 일후에 발정 발현이 안된 경우에는 11 일후에 2 차로 prostaglandin  $F_{2\alpha}$ 를 재주사하여 2~3 일후 발정을 관찰하고 배란확인 및 수정란이식을 실시하였다.

## 3) 발정확인

발정관찰은 1회에 30분간 하되 아침 6시와 오후 6시에 실시하는 2회 관찰법 보다 아침 6시, 오후 2시 그리고 밤 10시의 3회로 실시하면 정확도가 상당히 개선된다. 좋아하는 사료를 섭취하는 중에는 발정관찰이 정확치 못하다.

발정확인율을 개선하기 위해서 고려할 만한 대책은 서두에서 소개한 방법중 정관절제술을 받은 시정모나 testosterone을 주사한 미경산우 androgenized heifer를 이용함이 권장할 만한 것으로 보인다. Vasectomized bull 이나 androgenized heifer를 이용하면서 발정확인율을 높이려면

chin-ball marker나 heat-mount detector 또는 kamar를 사용하면서 잦은 관찰도 병행한다.

#### 4) 수정란이식 및 임신확인

수정란을 수란우의 자궁내에 이식하는 방법은 비외과적방법을 이용하였다. 1972~1973년대에 소의 수정란이식이 북미대륙에서 실용화 될 당시는 거의 전신마취에 의한 정중선절개로서 난의 회수와 이식이 행하여졌다. 그 후 경비와 시간을 절약하기 위해 여러 방법이 검토되었지만 수정란이식은 전신마취보다 간단한 국소마취에 의한 겸부개복수술로 바뀌어갔다. 그러나 근래에는 마취나 수술도 하지 않고 인공수정의 직장, 질법에 준한 자궁경관 경유법으로 이식하는 방법이 개발되어 널리 이용되고 있다.

배란 후 7-8 일이 경과한 수란우에서 직장내의 분비물을 제거한 후 외음부를 깨끗하게 세척하였다. 수정란이식 5-10 분 전에 장관의 운동을 억제하여 이식을 원활히 수행하기 위하여 국소마취제인 Lidocaine (Lidocaine HCl injection, 광명약품공업주식회사) 6-10 ml로 경막외마취하고 이식을 위한 준비를 실시하였다. Cassou rod (0.25 ml)에 2~4개의 체외수정란이 주입된 straw를 장착하고 Cassou rod의 오염을 방지하기 위하여 sheath(덮개)를 씌우고 그위에 외음부와 질에서 오염방지를 위하여 sheath cover를 장착하여 질을 통과하였다. 자궁경관 입구에서 sheath cover를 제거하고 sheath와 Cassou rod만 자궁경관을 통과시켰다. 자궁경관을 통과한 후에는 배란이 확인된 자궁쪽으로 Cassou rod를 유도하여 자궁선단 부위까지 전진시킨후 자궁각을 2-3 회 전방으로 확장시킨 후 손으로 자궁각을 감싸듯이 하여 이식기 선단을 그 속으로 밀어 넣어 가능한한 자궁각심부에 삽입하였다.

자궁경관에서는 가능한 한 출혈이 되지 않도록 부드럽게 조작하고 이식기가 자궁각에 삽입된 후에는 곧바로 수정란을 이식하였으며, 또한 자궁각에서 이식기를 좌우-상하로 조작하지 않도록 하고 이식기의 선단이 가능한

한 자궁벽에 접촉되지 않도록 하였다. 수정란이 안전하게 이식될 수 있도록 sheath를 약간 뒤로 후퇴시켜 수정란을 주입하였다.

임신확인은 이식후 약 21일이 경과하여도 발정이 발생되지 않는 소는 일단 임신 가능성을 가지고 이식 후 약 60일까지 예외 주시하면서 발정관찰을 실시하였다. 이식 후 25~30일에는 초음파를 이용하고, 이식후 약 60일경에 직장촉진에 의한 임신감정을 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 도축장 난소의 난포란 채란 및 초음파유도 난포란 채란에 의한 체외 수정란의 생산

도축장 (김해 덕성산업 및 태강산업)에서 도축되는 한우의 난소에서 채란된 난포란과 초음파유도에 의해 젖소와 한우의 난소에서 채란된 난포란을 각각 이용하여 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 의한 체외수정란의 생산 결과는 다음과 같다. Table 1에서는 도축장에서 도축되는 한우의 난소를 이용하여 채란된 난포란과 초음파유도에 의해 채란된 젖소의 난포란에 있어서 수정율은 각각 72.9%와 75.9%로 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배의 발달율에 있어서도 각각 34.1%와 38.4%로 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

Table 1. Development of bovine embryos derived from oocytes collected by SHD and OPU\*

Groups	Replicates	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocysts
SHD	40	1452	1058(72.9) <sup>a</sup>	361(34.1) <sup>b</sup>
OPU	42	357	271(75.9) <sup>a</sup>	104(38.4) <sup>b</sup>

† Values with same superscripts in the column were not significantly different ( $P<0.05$ ).

\*SHD group: Slaughterhouse-driven (SHD) ovaries.

\*OPU group: Ovum Pick-Up by ultrasound-guided.

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml; Culture medium: culture in HECM-6 until day 4 after IVF, and then transferred into TCM-199.

본 연구를 실험하는데 있어서 체외성숙, 수정 및 배양에 사용된 배양액들은 앞서 Part II에서 나타난 최적의 체외수정란 생산용 배양액을 이용하였다.

즉, 체외성숙용 배양액 Ham's F-10에 hormones으로 LH (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), FSH (35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), estradiol-17 $\beta$  (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 첨가하고 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EGF (Epidermal Growth Factor, Sigma, U.S.A.)를 첨가하여, 체외성숙 배양액을 100 mm dish에 100  $\mu\text{l}$ 씩 drop 분주하여 18 시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 다음, 체외성숙용 배양액에 등급별로 15~20 개의 난포란을 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39°C CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

체외수정에 필요한 정자를 준비하는데 있어서는 Percoll density gradient 방법으로 heparine (5 units/ml)이 첨가된 세척용 sperm-TALP medium으로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 15 ml conical plastic tube의 아래층에 90% Percoll 2 ml을 넣고 그 위의 층에 45% Percoll 2 ml을 두 층이 섞이지 않도록 조심스럽게 부어 놓은 다음, 신선정액 또는 동결정액 1 ml을 tube의 맨 윗층에 넣어 700 $\times$ g로 30분 동안 원심분리 시켰다. Percoll에서 침전된 하층액의 정자만을 각각 채취하여 500 $\times$ g에서 2회 5분간 원심분리한 후, 수정능획득을 위하여 BSA (5 mg/ml), caffeine (5 mM) 및 heparine (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 수정용 IVF-TALP medium을 5 ml 첨가하여 다시 500 $\times$ g에서 5분간 원심분리한 후 약 1 ml의 수정용 IVF-TALP medium을 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 10~15분간 처리하여 수정능획득을 유도하였다. 체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 IVF-TALP medium으로 3~4회 세척한 후 수정용 IVF-TALP medium에 100  $\mu\text{l}$  drop당 15~20 개의 난자를 옮긴 다음 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 2 $\times$ 10<sup>6</sup> sperms/ml이 되도록 조절하여 매정한 후, 24시간 동안 39°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 수정을 유도하였다.

체외배양액으로 HECM-6를 사용하여 11종의 아미노산 이외에 각각

0.1 mg/ml PVA, 3 mg/ml BSA-V 또는 10% BCS를 첨가하여 drop당 적정 수정란의 비율과 함께 3일 또는 4일간 HECM-6에서 배양한 후, 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 체외수정란을 옮겨 7~9일 까지 배양하여 후기배로의 배 발달을 유도하였다.

지금까지의 체외수정란은 주로 도축우의 난소에서 채란된 난포란을 이용하여 체외성숙, 수정 및 배양을 통해 생산하였으므로, 초음파 유도에 의해 생축으로부터 채란된 난포란을 이용하여 생산되는 체외수정란의 배양기법에 있어서도 도축 난소로부터 채란된 난포란을 이용한 배양기법과 같은 과정을 통하여 양질의 체외수정란을 생산 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 2) 젖소 및 한우의 초음파유도 난포란 채란율 및 체외수정란의 생산

초음파유도 난포란 채취를 위하여 FSH를 전처리하는 방법으로 400 mg FSH를 25% PVP에 혼합하여 1회 근육주사하고 60시간에 채란하는 방법이 가장 효율적이고 간편하였기 때문에, 젖소와 한우를 이용하여 위의 방법으로 호르몬을 처리하여 초음파 유도 난포란 채란율과 체외수정에 공시할 수 있는 난포란의 회수율을 각각 비교한 결과는 Table 2와 같다. 즉 젖소와 한우의 채란율에 있어서는 각각 61.7% 및 60.1%로 나타나 두 품종간에 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 채란된 난포란 중 체외수정에 공시할 수 있다고 평가되는 Grade II 등급 이상의 회수율을 보면 젖소에서는 59.6%로 나타났으나, 한우에 있어서는 69.3%로 나타나 두 품종간에 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내었다.

위의 결과들을 미루어 채란율에 있어서는 한 연구자가 계속적으로 난포란 채란을 실시하였기에 차이가 나타나지 않는다 하더라도, Kruip 등(1994)과 Van Soom 등(1994)은 초음파유도 난포란 채란을 위하여 사용되는 공란우들 사이에 있어서는 체외수정란의 생산을 위한 채란된 난포란들의 능력에 있어서 개체간의 차이가 심하다고 보고하였다. 따라서 본 연구에 있어서

도 두 품종이 다르다 하더라도 공시된 동물들에 있어서 개체차이가 충분히 나타날 수 있을 것으로 사료된다.

Table 2. Number of follicular oocytes aspirated by ultrasound\*

Breed of Cows	Sessions	No. of follicles aspirated	No.(%) of oocytes recovered	No.(%) of oocytes used for IVF
Holstein	39	639	394(61.7) <sup>a</sup>	235(59.6) <sup>b</sup>
Hanwoo	12	271	163(60.1) <sup>a</sup>	113(69.3) <sup>a</sup>

† Different superscripts in the same column indicated a significant difference ( $P < 0.05$ ).

Aspirated at 60 hrs after injection of 400 mg FSH single dose.

초음파유도에 의해 젃소와 한우의 난소에서 채란된 난포란을 각각 이용하여 후기배로의 발달율에 있어서 두 품종간의 차이점이 나타나는지를 규명하기 위하여 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 의한 후기배로의 배발달율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 수정율에 있어서 젃소와 한우에서 각각 74.9%와 77.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배로의 발달율에 있어서도 각각 39.2%와 40.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 초음파 유도 난포란 채란을 위해서 사용되는 젃소 및 한우의 체외수정란 생산에 있어서 두 품종간에 차이점은 나타나지 않았으므로 초음파에 의해서 채란된 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하기 위해서는 상황에 따라서, 즉 한우와 젃소의 송아지 가격이 현저히 차이가 날 경우에는 한우에서 젃소 송아지를 생산하거나 젃소에서 한우 송아지를 생산케 하는 등 젃소와 한우를 충분히 활용할 수 있을 것으로 사료된다

다.

Table 3. Development of embryos derived from follicular oocytes aspirated by ultrasound-guided OPU\*

Breed of Cows	Sessions	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocysts
Holstein	39	235	176(74.9) <sup>a</sup>	69(39.2) <sup>b</sup>
Hanwoo	12	113	88(77.9) <sup>a</sup>	36(40.9) <sup>b</sup>

† Values with same superscripts in the same column were not significantly different (P<0.05).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml; Culture medium: culture in HECM-6 until day 4 after IVF, and then transferred into TCM-199.

### 3) 체외수정란의 이식에 의한 수태율 및 산자생산

도축장에서 도축되는 한우의 난소에서 채란된 난포란과 초음파유도에 의해 채란된 젖소와 한우의 난포란을 이용하여 생산된 체외수정란을 수란우 (젖소 및 한우)에 각각 이식하여 얻어진 수태율과 송아지 생산의 결과는 Table 4와 Table 5에 나타나는 바와 같다.

도축 한우의 난소에서 채란된 난포란을 이용하여 생산된 114개의 체외수정란을 14두의 한우 수란우와 24두의 젖소 수란우에 이식하여 각각 한우 수란우 4두 (28.6%)와 젖소 수란우 9두 (37.5%)가 수태하였으며, 송아지의 생산은 한우 수란우 4두와 젖소 수란우 5두에서 각각 7마리씩 총 14마리의 한우송아지 (Single: 5, Twins: 6, Triplets: 3)를 생산하였다. 그러나, 임신된 젖소 수란우 9두 중에서 1두는 유방염으로 인하여 도태되었으며, 3두는

유산하였다.

Table 4. Pregnancies and calf production following transfer of SHD-IVF embryos<sup>†</sup>

Embryo donor breed	Embryo recipients				No. of cows aborted (fetuses)	No. of calves born			
	Breed	No. of cows used	No. of embryos transferred	No.(%) of cows pregnant		Single	Twins	Triplets	Total
Hanwoo	Hanwoo	14	42	4(28.6)	0	2	2	3	7
	Holstein	24	72	9*(37.5)	3 (1 single 2 twins)	3	4	0	7
Total		38	114	13(34.2)	3 (1 single 2 twins)	5	6	3	14

<sup>†</sup>All of the donor embryos were derived from Hanwoo slaughterhouse ovaries.

\*One of them was sacrificed during gestation period from mastitis.

초음파 유도에 의해 채란된 한우의 난포란을 이용하여 생산된 20개의 체외수정란을 1두의 한우 수란우와 6두의 젃소 수란우에 이식하여 6마리의 한우 송아지 (Single: 1, Twin: 2, Triplets: 3)를 생산하였다. 그리고 초음파 유도에 의해 채란된 젃소의 난포란을 이용하여 생산된 58개의 체외수정란을 22두의 젃소 수란우에 이식하여 8두 (36.4%)의 수태율을 얻었다. 이들 임신된 8두의 수란우 중에서 2두는 유방염으로 인하여 도태되었고, 1두는 유산하였으며, 2두는 각각 1두씩 정상송아지를 분만하였고, 나머지 3두는 각각 1998년 12월 1일 (2두)과 12월 25일 (1두)에 분만할 예정이다.

Table 5. Pregnancies and calf production following transfer of OPU-IVF embryos<sup>†</sup>

Embryo donor breed	Embryo recipients				No. of calves born				
	Breed	No. of cows used	No. of embryos transferred	No.(%) of cows pregnant	No. of cows aborted (fetuses)	Single	Twins	Triplets	Total
Hanwoo	Hanwoo	1**	2	1(100.0)	0	0	0	3	3
	Holstein	6	18	3( 50.0)	1 (twins)	1	2	0	3
Holstein	Holstein	22	58	8*( 36.4)	1 (triplets)	2	0	0	2
Total		29	78	12( 41.4)	2 (1 twins 1 triplets)	3	2	3	8

<sup>†</sup>All of the donor embryos were derived from OPU.

\*Two of them was sacrificed during gestation period from mastitis.

\*\*Three of them will born calves in Dec. ~1st. and Dec. ~25th. 1998.

\*\*OPU-IVF embryos transfer after artificial insemination.

Kruip 등(1994)과 Van Soom 등(1994)은 초음파유도 난포란 채란을 위하여 사용되는 공란우들 사이에 체외수정란의 생산을 위한 난포란들의 능력에 있어서 개체간의 차이가 심하다고 보고하였다. 또한 체외수정에 사용된 일부정액들은 다른 정액에 비해 높은 수정능력을 나타낸것과 마찬가지로, 일부 특정 공란우의 미성숙 난포란에서도 다른 공란우에서 채란된 미성숙 난포란을 이용한 것보다 높은 체외수정란의 생산율을 나타내었다고 보고하였다 (Van Soom 등, 1994). Looney 등(1994)은 200두의 공란우를 이용하여 1회 채란에서 두당 평균 6.3개의 난포란을 채란하였고, 배반포기배까지 16.4%의 발달율을 나타내었다. 그리고 813개의 체외수정란을 이식하여 324두 (40%)의 수태율을 보고하였다. Hasler 등(1995)은 155두의 공란우를 이용하여 1회 채란에서 두당 평균 4.9개의 난포란을 채란하여 이 중에서

4.1개의 난포란을 체외수정에 공시하였고, 2268개의 체외수정란을 이식하여 1220두 (53.8%)의 수태율을 보고하였다. Bols 등(1996)은 12두의 Belgian Blue 육우를 이용하여 106회의 자연채란으로 547개의 난포에서 332개 (60.7%)의 난포란을 채란하여 1회 채란에서 두당 평균 3.1개의 난포란을 채란하였으며, 채란된 332개의 난포란을 체외수정에 공시하여 55개 (16.5%)의 배반포기배를 생산하여 1회 채란에서 두당 평균 0.52개의 배반포기배를 생산하였다고 보고하였으며, 또한 이들은 3두의 공란우를 500  $\mu$ g pFSH와 100  $\mu$ g pLH (Stimufol<sup>®</sup>, Rhone Merieux)를 4일 동안 1일 2회씩 주사하여 6회의 초음파 유도 난포란을 채란하여, 1회 채란에서 두당 평균 난포수 20.8개, 채란된 난포란 수 6.3개 및 배반포기배 1.5개를 생산하였다고 보고하였다. 그리고 이들은 생산된 체외수정란 62개를 이식하여 5마리의 정상 송아지를 생산하였고 7두의 수란우는 임신 중이라고 보고하였다. 국내에서는 이병천 등(1998)이 임신중인 젖소의 난포란을 채란하여 생산된 체외수정란을 이식하여 송아지를 생산하였다고 보고하였다.

#### 4) 체외수정란의 동결·융해후 이식에 의한 수태율 조사

Table 6에서는 초음파 유도로 채란된 난포란을 이용하여 생산된 체외수정란을 신선란과 동결란을 이용하여 수란우에 이식한 결과를 나타내고 있다. 신선란을 이용하여 이식한 경우에는 17두의 수란우에서 8두 (47.1%)가 임신하였으나, 동결란을 이용하여 이식한 경우에는 4두 모두 임신되지 않았다.

Table 6. Pregnancy rate following transfer of fresh and frozen OPU-IVF embryos

Embryo	No. of embryos transferred	No. of recipients	Pregnancy rate(%)
IVF-fresh	54	17	8(47.1)
IVF-frozen	8	4	0( 0.0)

실험두수가 충분하지는 않았으나, 앞으로는 초음파 유도에 의하여 채란된 난포란으로부터 생산된 체외수정란은 가급적이면 신선란의 상태에서 이식에 이용하는 것이 수태율 및 송아지 생산에 유리할 것으로 사료된다.

위의 결과에서 나타난 바에 의하면, 앞으로 체외수정란을 이식하는데 있어서 신선란을 이용하는 방법이 유리할 것으로 사료되며, 또한 수란우의 엄격한 선발과 임신중인 수란우의 사양관리에 좀 더 세심한 주의가 필요할 것으로 사료된다. 그리고 본 연구에서 초음파유도에 의해 채란된 난포란으로부터 생산된 젖소의 체외수정란을 이식한 4두의 젖소 수란우에서는 아직까지 임신여부가 확인되지 않았으며, 또한 21개의 체외수정란이 동결·저장 중에 있으며 지속적인 연구가 지속적으로 수행되어질 것이다.

또한, 추후에도 초음파를 이용하여 고능력 젖소와 한우의 난포란 채란을 지속적으로 수행하여, 본 연구실에서 다년간 축적된 체외수정란의 생산기술을 바탕으로 하여 생산된 체외수정란을 이식하여 송아지 생산율을 향상시키고자 한다.

## 4. 적 요

젖소 및 한우를 이용하여 초음파유도 난포란 채란에 의해 생산된 체외 수정란을 이용하여 송아지를 생산하기 위해 본 연구를 실시하였다. 호르몬 처리는 400 mg FSH를 25% PVP와 혼합하여 1회 근육주사 후 60시간에 난포란 채란을 실시하였다. 채란된 난포란은 체외성숙용 배양액으로 LH (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), FSH (35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 그리고 estradiol-17 $\beta$  (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 Ham's F-10에 EGF를 첨가하여 24시간 동안 체외성숙을 유도하였으며, 체외수정에 필요한 정자를 준비하기 위해 정자용 TALP medium을 이용하여 Percoll density gradient 방법으로 운동성을 가진 활력있는 정자를 채취하여  $2 \times 10^6$  cell/ml 농도로 성숙된 난자와 수정시켰다. 체외배양에 있어서 체외수정 후 11종의 아미노산이 첨가된 체외배양용 배양액 HECM-6에 3~4일 동안 초기 체외수정란을 배양시킨 다음 10% BCS가 첨가된 신선 TCM-199 배양액으로 수정란을 옮겨 48시간마다 신선 TCM-199배양액으로 교체하여 7~10일까지 후기배로의 발달을 유도하였으며, 위의 방법으로 생산된 체외수정란을 비외과적방법으로 수란우에 이식하여 생산된 송아지에 관한 연구의 결과는 다음과 같다.

도축장에서 도축되는 한우의 난소를 이용하여 채란된 난포란과 초음파유도에 의해 채란된 젖소의 난포란에 있어서 수정율은 각각 72.9%와 75.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배의 발달율에 있어서도 각각 34.1%와 38.4%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

젖소와 한우를 공란우로 이용하여 초음파 유도에 의한 난포란 채란율에 있어서는 각각 61.7% 및 60.1%로 나타나 두 품종간에 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 채란된 난포란 중 체외수정에 공시할 수 있다고 평가되는 Grade II 등급 이상의 회수율을 보면 젖소에서는 59.6%로 나타났으나, 한우에 있어서는 69.3%로 나타나 두 품종간에 유의적

( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내었다.

초음파유도에 의해 채란된 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하는데 있어서 젖소와 한우의 수정율은 각각 74.9%와 77.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배로의 발달율에 있어서도 각각 39.2%와 40.9%로 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다.

도축 한우의 난소에서 채란된 난포란을 이용하여 생산된 114개의 체외수정란을 14두의 한우 수란우와 24두의 젖소 수란우에 이식하여 각각 한우 수란우 4두 (28.6%)와 젖소 수란우 9두 (37.5%)의 수태율을 얻었으며, 송아지의 생산은 한우 수란우 4두와 젖소 수란우 5두에서 각각 7마리씩 총 14마리의 한우송아지 (Single: 5, Twins: 6, Triplets: 3)를 생산하였다. 그러나, 임신된 젖소 수란우 9두 중에서 1두는 유방염으로 인하여 도태되었으며, 3두는 유산하였다.

초음파 유도에 의해 채란된 한우의 난포란을 이용하여 생산된 20개의 체외수정란을 1두의 한우 수란우와 6두의 젖소 수란우에 이식하여 6마리의 한우 송아지 (Single: 1, Twin: 2, Triplets: 3)를 생산하였다.

그리고 초음파 유도에 의해 채란된 젖소의 난포란을 이용하여 생산된 58개의 체외수정란을 22두의 젖소 수란우에 이식하여 8두 (36.4%)의 수태율을 얻었다. 이들 임신된 8두의 수란우 중에서 2두는 유방염으로 인하여 도태되었고, 1두는 유산하였으며, 2두는 각각 1두씩 정상송아지를 분만하였고, 나머지 3두는 각각 1998년 12월 1일 (2두)과 12월 25일 (1두)에 분만할 예정이다. 초음파 유도에 의해 생산된 신선 수정란을 이용하여 이식한 경우에는 25두의 수란우에서 12두 (48.0%)가 임신하였으나, 동결 수정란을 이용하여 이식한 경우에는 4두 모두 임신되지 않았다.

위의 결과에서 나타난 바에 의하면, 앞으로 체외수정란을 이식하는데 있어서 신선란을 이용하는 방법이 유리할 것으로 사료되며, 또한 수란우의 엄격한 선발과 임신중인 수란우의 사양관리에 좀 더 세심한 주의가 필요할 것으로 사료된다. 그리고 본 연구에서 초음파유도에 의해 채란된 난포란으

로부터 생산된 젖소의 체외수정란을 이식한 4두의 젖소 수란우에서는 아직  
까지 임신여부가 확인되지 않았으며, 또한 21개의 체외수정란이 동결·저장  
중에 있으며 계속적인 연구가 지속적으로 수행되어질 것이다.

또한, 추후에도 초음파를 이용하여 고능력 젖소와 한우의 난포란 채란을  
지속적으로 수행하여, 본 연구실에서 다년간 축적된 체외수정란의 생산기술  
을 바탕으로 하여 생산된 체외수정란을 이식하여 송아지 생산율을 향상시  
키고자 한다.

## Literature Cited

1. Bols, P. E. J., Van Soom, A., Vanroose, G. and de Kruif, A. 1996. Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgian Blue donor cows: preliminary results. *Theriogenology*, 45:359. abstr.
2. Bungartz, L., Lucas-Hahn, A., Rath, D. and Niemann, H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 43:667-675.
3. Duby, R. T., Damiani, P., Looney, C. R., Fissore, R. A. and Robl, J. M. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology*, 45:121-130.
4. Fry, R. C., Simpson, T. L., Squires, T. J., Parr, R. A. and Damanik, R. M. 1994. Factors affecting transvaginal oocyte pick-up in heifers. *Theriogenology*, 41:197. abstr.
5. Gibbons, J. R., Beal, W. E., Krisher, R. L., Faber, E. G., Pearson, R. E. and Gwazdauskas, P. G. 1994. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 42:405-419.
6. Gibbons, J. R., Krisher, R. L., Carlin, S. K., Pearson, R. E. and Gwazdauskas, F. C. 1995. *In vitro* embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular

oocyte aspiration. *Theriogenology*, 43:1129-1139.

7. Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, L. S., Stokes, J. E. and Trimmer, S. A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-159.
8. Kruip, Th. A. M., Boni, R., Wurth, Y. A., Roelofsen, M. W. M. and Pieterse, M. C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 42:675-684.
9. Meintjes, M., Bellow, M. S., Broussard, J. R., Paul, J. B. and Godke, R. A. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.*, 73:967~974.
10. Pieterse, M. C., Vos, P. L. A. M., Kruip, Th. A. M., Willemse, A. H. and Taveme, M. A. M. 1988. *Theriogenology*, 30:751~762.
11. Pieterse, M. C., Vos, P. L. A. M., Kruip, Th. A. M., Wurth, Y. A., van Beneden, T. H., Willemse, A. M. and Taverne, M. A. M. 1991a. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24.
12. Pieterse, M. C., Vos, P. L. A. M., Kruip, Th. A. M., Willemse, A. M. and Taverne, M. A. M. 1991b. Characteristics of bovine estrus

cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles from ovum pick-up. *Theriogenology*, 35:401-413.

13. Pieterse, M. C., Vos, P. L. A. M., Kruij, Th. A. M., Wurth, Y. A. van Beneden, T. H., Willemse, A. H. and Taverne, M. A. M. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG-treated cows. *Theriogenology*, 37:273. abstr.
14. Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A. R., Ysebaert, M. T. and de Kruif, A. 1994. Salvage of oocytes from sterile genetically valuable cows, resulting in the birth of a calf. *Anim. Reprod. Sci.*, 36:187-196.
15. 이병천, 윤기영, 김정태, 이강남, 노상호, 신태영, 박종임, 김남렬, 주석천, 백남용, 이은송, 임정목, 이우근, 황우석. 1998. 초음파 유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구, 2. 임신우 유래 난포란으로부터 산자생산에 관하여. *한국수정란이식학회지*, 13:77~86.

## 제 5 장 기대 효과

### 1. 기술적 측면

가. 초음파를 이용하여 한 개체에서 매주 2회씩 장기간 난포란을 채란함으로써 고능력 젖소로부터 우수한 유전자원을 다량 확보한다.

나. 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양의 기법을 확립하여 1) 복제동물의 생산, 2) 성감별 정자의 수정에 의한 송아지의 성조절 기술, 3) 유전자전이 동물생산 기술등 여러가지 생명공학적인 기술 발전의 기초를 구축한다.

다. 체계적인 산학협동으로 고능력 젖소의 수정란이식 기술을 실용화하여 낙농산업의 경쟁력을 제고 한다.

라. 고능력 젖소의 난포란을 초음파유도로 채취 체외수정란을 성공적으로 생산 이용할 수있게 되면 이 기술을 한우개량에도 즉각 이용할 수 있게 되므로 한우의 경쟁력 강화에도 도움이 될 것이다.

마. 젖소와 한우개량을 가속화하여 이들 산업의 경쟁력을 제고하고,, 한우와 젖소의 가격동향에 따라 품종간 교차 수정란 이식을 가능케 하여 축산의 안정적 발전을 기대함으로써 농민들의 양축의욕을 고취한다.

### 2. 경제·산업적 측면

가. 현재의 과배란법에 의한 수정란생산 기술에 비하여 초음파유도 채란 기법으로는 고능력 젖소 두당 연간 이식 가능한 수정란 생산비를 30% 이하로 절감시킬 수 있다.

나. 산유능력검정으로 선발되는 고능력 젖소에서 초음파유도로 난포란을 채취하여 우수 검정 종모우 정자와의 체외수정란을 대량생산, 수정란 이식을 조기에 실용화함으로써 젖소의 개량 속도를 극대화 할 수 있고 따라서 낙농업의 경쟁력을 신속하게 제고시킬 수 있다.

다. 생산되는 숫송아지는 축협중앙회 유우개량사업소에서 검정후보모우로 이용함으로써 현재 종모우나 정액의 수입에 소요되고 있는 많은 외화를 절약할 수 있다.

라. 현재 국내 젓소의 1두당 평균 산유량은 6,000kg 미만으로서 선진국의 9,000kg 수준으로 향상시킨다면 두당 연간 120만원 이상의 유대지수 향상을 기할 수 있다.