

肉牛의 過排卵 誘起와 凍結方法이 卵자의 生存率에 미치는 影響

文星豪, 金重桂

濟州大學校 農科大學 畜産學科

Effect of Superovulation and Freezing Methods on the Survival of Bovine Embryos

S.H. Moon and J.K. Kim

Department of Animal Science, College of Agriculture

Cheju National University

SUMMARY

The effect of superovulation (PMSG, FSH) on the ovarian response of matured cows were tested. The survival rates of bovine embryos and ovarian oocytes frozen by slow, rapid freezing and vitrification were investigated.

A total of 15 heads of cow were divided into 3 groups by injection dose of GTH (PSMG, FSH). Each group was superovulated with injections of 2500, 3000IU PMSG and 40mg FSH followed by injection of 30mg PGF_{2α}. Embryos were non-surgically recovered from superovulated cows 6~7days after estrus. The recovered embryos were frozen in 10% glycerol+10% sucrose by slow and rapid freezing. Ovarian oocytes were frozen in 20% glycerol+10% ethylene glycerol+30% Ficoll+10% sucrose by vitrification and the survival of frozen embryos and ovarian oocytes were judged by FDA-test. The results are summarized as follows:

1. Estrus after the injection of 2500, 3000 IU PMSG and 40mg FSH were 32.8, 35.0 and 43.4 and the duration of estrus were 18.6, 18.8 and 22.4 hours, respectively.
2. The average sizes of the left ovaries were 5.4cm (2,500 IU PMSG), 5.1cm (3,000IU PMSG) and 6.4cm (FSH), and the right were 6.2cm (2,500IU PMSG), 5.7cm (3,000IU PMSG) and 7.8cm (FSH), respectively. There were significant differences in the right ovaries among treatments ($P < 0.05$).

이 논문은 한국수정란 이식 학회지(1996) 11권 3호에 게재되었음.

Cheju App. Rad. Res. Inst. Ann. Report Vol. 10(1996)

3. The average number of ovarian follicles in the left ovaries were 4.8 (2,500 IU PMSG), 5.2 (3,000 IU PMSG) and 7.8 (FSH), respectively. There were significant differences in the right ovaries among treatments ($P < 0.05$).
4. In the average numbers of ovulation points in the left ovaries were 3.0 (2,500IU PMSG), 3.2 (3,000IU PMSG) and 4.4 (FSH), respectively, and the right were 7.2 (2,500IU PMSG), 7.8 (3,000IU PMSG) and 11.4 (FSH). There were significant differences in the right ovaries among treatments ($P < 0.05$).
5. The numbers of the recovered embryos were 20 (2,500IU PMSG), 19 (3,000 IU PMSG) and 21 (FSH), respectively, and oocytes and degenerated oocytes were 6.5 and 11.0. Estrus periods of post parturition were 52.4 days (2,500IU PMSG), 69.8 days (3,000IU PMSG) and 62.4 days (FSH), respectively.
6. The FDA score of cow morulae frozen by slow freezing, semi-rapid freezing and vitrified freezing was higher in slow (3.1) and vitrified freezing (3.0) than that in semirapid freezing (1.28). The FDA-scores of cow, pig and rabbit ovarian oocytes frozen in 20% glycerol+10% ethylene glycol+30% Ficoll+10% sucrose by vitrification were higher in cows (3.3) than both in pigs (2.6) and rabbits (2.3).

結 論

소 受精卵의 凍結은 1973년 Wimut와 Rowson이 凍結受精卵을 이용 仔畜을 생산한 보고 이후 受精卵 凍結에 대한 研究가 급속도로 進進되었다.

우리나라의 受精卵移植에 관한 研究는 1970년대부터 시작되어 mouse, rabbit, goat에 대한 初步的인 실험이 試圖되었고, 1980년대에 이르러 大家畜에서 본격적인 研究가 進行되어 다수의 研究결과가 보고되고 있다.

非外科的 採卵方法에 의한 受精卵 移植시에는 供卵畜이 우수한 遺傳能力을 갖고 있어야 하며(Elsden, Seidel등, 1982), 年齡과 産次(金등, 1985; Greeve등, 1979; Mogaugh 등, 1974), 品種(金과 鄭, 1985; Olive등, 1984; Greeve, 1982), 體重(金등, 1985; Schilling등, 1982) 등이 성적에 영향을 미칠 수 있다고 하였다.

過排卵 誘起에 있어서 hormone은 대체로 PMSG(金 등, 1985; 南, 1984; 高橋, 1983, 丘와 鄭, 1982; 高 등, 1981 a, b; Grave, 1976)를 사용하여 왔으며, 최근에 이르러 FSH(Donaldson, 1984; Halley 등, 1979; Elsdén 등, 1978)가 이용되었고,

PMSG와 FSH 比較試驗이 試圖 되었다(青柳 등, 1987; Becker와 Pinheiro, 1986; Fahning, 1986; 金 등, 1985; 鄭 등, 1983; 鈴木 등, 1983).

受精卵의 回收方法으로서 子宮角 基部에 固定시키는 方法으로 2원(2 way) 또는 3원식(Sugie 등, 1972)으로 非外科的 方法이 各광 받아 왔으나 근래에는 간편한 2元式 子宮體 固定方法(Nash, 1981)으로 採卵率 향상을 발표하였고(金 등, 1985 a, b; 任 등, 1983), 더욱이 鈴木 등(1984, 1986)은 자동 관류기 이용과 catheter 개량으로 간편하고 쉽게 受精卵 回收率을 증진 시켰다고 보고 하였다. bovine embryos의 凍結過程중에서는 대부분 programable freezer로 凍結하고 있으나 簡易凍結 方法으로서 two-step freezing(Frank 등, 1986; Kenndy 등, 1983; Bouyssou와 Chupin, 1982)이 試圖 되었으며, 液體窒素 container내에서의 凍結方法은 mouse에서 수편이 보고 되었 으나(宮木 등, 1986; Willim과 John, 1985), 소에서는 Frank 등 (1985)만이 같은 凍結速度로 凍結할 때 卵子 凍結機보다 약간 生存率이 떨어졌으나 有意性 없이 container내 凍結이 경제적 으로 사용 가능성을 제시하였다.

Renard 등(1983, 1982), Leibo(1983) 등은 one-step straw 移 植方法을 簡便화시켜 受胎率을 향상시키고 있으며(鈴木 등, 1983, 1986; 松崎 등, 1986; Bielanski, 1985, 1986), 내동제 제 거가 필요없는 direct transfer(Cseh 등, 1994; Voelkel와 Hu, 1992)에 의한 이식방법의 簡便화와 난황을 첨가한 vitrification solution으로 배반포기 단계의 소체와 수정란을 동결하여 높은 성적을 보고 하였다(Kuwayama 등, 1994). 특히 최근에 이르러 mouse에서 vitrification solution에 대한 많은 試驗이 수행되고 있는 바(Kasai 등, 1990; Kim 등, 1990; Kono 등, 1987; Rall과 Fahy, 1985) 소에 있어서는 供試卵 獲得이 어려움으로 현재 까지는 약간의 실험들만이 이루어지고 있는 실정이다(Osamu Douchi, 199; Massip 등, 1986, 1987). 그러므로 本 實驗은 肉牛 受精卵 簡易凍結 및 超急速凍結(Vitrification)의 可能性을 검 토하기 위하여 mouse에서 얻은 새 vitrification solution(20E, 10G, Ficol 30%)으로 液體窒素 container에서 超急速 凍結(220 °C/sec)시킨 受精卵을 FDA-test 또는 CO₂ incubator에 培養시켜 다른 凍結 方法과 生死判定을 比較한 結果는 다음과 같다.

材料 및 方法

1. 試驗 期間 및 公試 動物

本 研究는 1988~1990년 濟州 試驗場, 1991~1992년 濟州

畜産 事業所, 個人牧場(동일목장, 농원목장)에서 實施 되었으 며 供試動物은 NRC 飼養標準에 준해서 濟州韓牛 交雜種 14頭 (예비 시험용 5두 포함, 홀스타인 5두)를 供試畜으로 사용하 였다.

飼養管理는 放牧期인 5~10月은 放牧草地에서 放牧하여 自 由菜食시켰으며, 舍飼期인 11~4月은 Italian ryegrass 乾草와 Italian ryegrass silage 및 corn silage를 위주로 사양하였고 濃 厚飼料는 舍飼基에 한하여 體重의 0.8~1%를 급여하였다.

2. 過排卵 誘起

發情週期 9~14日에 直腸檢査를 實施하여 黃體 開花期에 있는 供卵牛를 選拔하고 2,500~3,000IU의 PMSG(日本, 三供 社)를 筋肉注射하고 48時間 後 25mg의 PGF_{2α}를 筋肉注射하여 過排卵을 誘起하거나 FSH(sigma, F8001, L9510)처리는 40mg을 減量投與 方法으로 4日間 投與하고 3日後 PGF_{2α}를 30mg 筋肉 注射하여 過排卵을 誘起시킨 後 發情이 發現되면 standing-est- rus를 보정하여 1次 人工授精을 實施하고, 12~15時間 間隔으로 2次 및 3次 人工授精을 追加로 實施하였다

3. 受精卵의 採卵 및 選別

受精卵은 人工授精後 6~7日째에 非外科的으로 回收하였으 며 2% lidocaine 6~8ml를 第1과 第2 尾椎 사이에 注射하여 後軀麻酔를 실시하였으며 擴張棒으로 子宮頸管을 擴張한 後 2way foley catheter를 子宮角 또는 子宮體에 固定하였다. cath- eter 固定後 PBS액 800~1,000ml를 重力에 의하여 流入되게 장치하여 流入이 中止되면 回收하는 反復回收 方法에 의하여 500ml mess cylinder 및 1,000ml 회수병에 회수하였다. 回收된 採卵液은 常溫에서 30分間 放置한 後 상층액을 제거하고 10ml pipette을 사용하여 petridish에 分株한 後 30~40배의 實體顯 微鏡 下에서 受精卵을 檢索하였다. 採卵된 受精卵은 신선한 PBS로 2回 이상 洗滌하여 受精卵의 이상여부를 확인하였으며 未受精卵 및 退化된 受精卵은 凍結에서 제외시켰다.

4. 凍結液 製造 및 凍結

受精卵의 凍結에 있어 緩慢 또는 超急速 凍結液은 mouse 試驗에서 사용된 것과 같이 10% glycerol과 10% sucrose 및 20% FCS을 PBS에 첨가하여 製造하였으며 사용전 0.2m filter paper로 濾過 하였다. 製造된 凍結液에 受精卵을 직접 옮기는 one-step 方法에 의하여 5分間 平衡시킨 後 0.25 straw에 封入 하였다. 주입순서는 Fig.1과 같다.

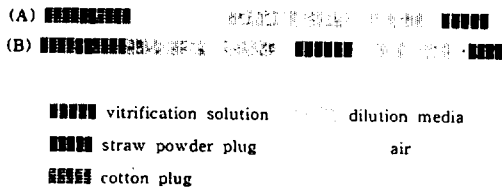


Figure 1. Configuration of vitrification solution, dilution medium and air in 0.25ml straw, just before loading embryos(A) and after sealing with straw powder(B)

1) 基本凍結(緩慢凍結)

Cell Freezer(R 204, Panner)를 이용하여 常溫에서 -7℃까지는 1℃/ml 下降 시킨 後 식빙(Seeding)하고 5分間 정지한 다음 -35℃까지 0.3℃/min로 緩慢凍結 시킨 後 液體窒素에 침적시켰다.

2) 簡易凍結

straw에 주입된 受精卵은 LN₂ container에서 凍結速度를 室溫에서 -7℃에서 식빙 後 5分 定置하였고, 定置 後 -35℃까지는 0.3℃/min으로 凍結한 다음 -35℃에 도달시 바로 液體窒素 container에 침적시켜 저장하였다. 溫度 확인은 凍結液으로 채운 0.5ml straw를 Cell Freezer의 sensor에 끼워서 固定後 straw가 들어있는 container에 넣어 autorecoder로 확인하였다.

3) 超急速 凍結(vitrification)

vitrification solution은 1ml 주사기가 연결된 0.25ml 플라스틱 straw에 PS(PBS+sucrose), air, PS를 주입하여 준비하였다. 本實驗에 사용된 수정란의 발달단계는 morulae이며 petri dish에 50μl의 VS drop에 부유(浮遊)한 후 30μl의 다른 drop에 한번 옮겼다. 수정란을 함유한 drop을 미리 준비된 straw에 주입한 後 air boule, PS순으로 주입하여 straw powder로 封入하였다. 室溫에서 10分동안 平衡後 즉시 LN₂ container에 침적하여 7~15日 동안 저장하였다.

5. 受精卵의 融解 및 生死 判定(FDA-test)

受精卵의 融解는 38℃溫水에 straw내의 氷片이 완전히 녹을

때까지 실시 하였으며 融解後 耐凍劑 첨가와 같은 one-step 方法에 의하여 PBS에 10% sucrose를 첨가한 제거액(PS)에서 耐凍劑를 제거하였다.

耐凍劑 제거후 生死判定은 diacetyl fluorescence(FDA) 1mg을 aceton 1ml에 녹인 다음 이것을 PBS액에 600,000대 1로 稀釋(pH 7.0~7.4)한 FDA액에 受精卵을 넣고 常溫에서 3~5分동안 培養 後 FDA가 없는 PBS액에 옮겨 200倍 位相差 螢光顯微鏡(螢光顯微鏡)하에서 다음과 같은 score로 判定하였으며 이를 平均 점수로 산출하였다.

P-5: 受精卵의 分割球 全體가 綠色 螢光을 強하게 發散 하는 것(5點: 100%).

P-4: 受精卵 分割球 中 80% 以上 綠色 螢光을 띠는 것(4點: 80%).

P-3: 受精卵 分割球 中 60% 以上 綠色 螢光을 띠는 것(3點: 60%).

P-2: 40% 以上 分割球가 綠色螢光을 發散하거나 또는 전반적으로 弱하게 螢光을 發散하는 것(2點: 40%).

P-1: 20%以下 分割球가 綠色螢光을 發하거나 매우 弱하게 螢光을 發散하는 것(1點: 20%)

N-0: 綠色 螢光을 전혀 띠지 않고 어둡게 보이는 것(0點: 0%).

6. 統計處理

統計處理는 分散分析을 하였고, 分散分析後 有意성이 認定된 경우 duncan의 多衆檢定法에 의하여 各 處理間의 有意差를 檢定하였다.

結果 및 考察

1. 過排卵處理와 卵巢反應

供卵牛에 過排卵處理時 發情發現, 發情持續 時間 그리고 直腸檢査에 의한 卵巢反應 狀態를 조사한 것은 Table 1과 같다.

Table 1. Estrus states and ovarian size of cows after PMSG, FSH treatment by palpation

Treatment (unit)	No. of heads	Time of estrus sign after PGF ₂₅ treatment(hr)	Duration of estrus(hr)	Ovarians size before PMSG or FSH treatment(cm)		Ovarian size at estrus(cm)	
				Left (L×W)*	Right (L×W)	Left (L×W)	Right (L×W)
PMSG (2,500IU)	5	32.8± 1.7	18.6± 0.8	2.7± 0.1	3.3± 0.2	5.4± 0.5	6.2± 0.3 ^b
				2.3± 2.2	2.3± 0.3	4.5± 0.4	4.7± 0.6
PMSG (3,000IU)	5	35.0± 2.8	18.8± 2.4	2.8± 0.2	3.1± 0.2	5.1± 1.1	5.7± 0.9 ^a
				2.3± 0.3	2.4± 0.3	4.1± 0.5	4.3± 0.4
FSH (40mg)	5	43.3± 2.9	22.4± 2.9	2.8± 0.4	3.1± 0.6	6.4± 1.5	7.8± 0.6 ^b
				2.2± 0.3	2.4± 0.2	4.5± 0.4	5.9± 1.2

* L : Length, W : Width, * Mean± S.D.

Different superscripts denote significant differences within columns(P < 0.05)

PGF_{2α} 投與後 發情開始時間은 PMSG 2,500IU에서 32.8時間, PMSG 3,000IU에서 35.0時間, 그리고 FSH 40mg는 43.4時間을 나타내었고, 發情持續 時間은 각각 18.6, 18.8, 22.4時間으로 FSH 40mg 處理區가 PMSG처리구 보다 대체로 길었으며, PMSG 2, 500IU와 3,000IU에서는 약간의 差異가 있었으나 有意性은 없었다.

Greve 등(1979)은 經産牛에서 PGF_{2α} 投與後 發情開始는 40時間 以前에 나타나고 48時間 以後는 卵자의 回收率과 生存率이 낮아진다고 하였다. 高橋 등(1983)도 發情開始時間이 길어질수록 平均 排卵率이 有意하게 낮아진다고 보고하였다 (Fahning, 1986; 全川 등, 1976).

Yadav 등(1985)은 Cloprostenol(prostaglandin)을 投與時 41.3 ± 1.25時間에 發情이 開始된다고 하여 本 實驗結果와 比較했을 때 FSH 40mg 處理區는 差異가 없었으나, PMSG 處理區는 發情開始 時間에서 약간 差異가 있었다.

卵巢의 크기에 있어서는 hormone 投與前은 差異가 없었으며, 投與後에 左側卵巢의 길이는 각각 5.4 ± 0.5, 5.1 ± 1.1, 6.4 ± 1.5cm 이고, 폭은 4.5 ± 0.4, 4.1 ± 0.5, 4.5 ± 0.4로 統計的 有意差는 없었다. 그러나 右側卵巢 길이는 각각 6.2 ± 0.3, 5.7 ± 0.9, 7.8 ± 0.6cm

이고, 폭은 4.7 ± 0.6, 4.3 ± 0.4, 5.9 ± 1.2cm로 FSH 40mg은 投與後에 매우 크게 나타나고 있으며, 右側卵巢의 길이는 處理後에 유의적인 차를 보였다(p < 0.05).

이는 過排卵 處理時 FSH 40mg에서는 많은 수의 卵胞가 成長하였으나 정상적인 排卵이 안되고 閉鎖卵胞 또는 estradiol-17β의 濃度가 낮고, 排卵內의 inhibin activity가 變化되지 않아 FSH에 分泌를 抑制시키지 못하여 排卵이 되지 않는 것으로 報告되었다(Padmanabham 등, 1984).

Ireland 등(1982, 1983)은 PGF_{2α} 注射後 6mm 以上 卵胞에서 E-A卵胞(estrogen-active follicle)와 E-I卵胞(estrogen-inactive follicle)가 形成되는데, E-A卵胞는 卵胞液內 estradiol-17β의 濃度가 높고, 顆粒膜細胞에서 ¹²⁵I-HCG의 特異的 結合이 增加하여 排卵卵胞가 되며, E-I卵胞는 排卵液內 estradiol의 濃度가 낮은 반면, progesterone과 androgen은 濃度가 높고, 顆粒膜細胞의 數가 줄어들어서 ¹²⁵I-HCG와의 結合이 低下되므로 閉鎖細胞가 된다고 報告하였다.

過排卵處理後 卵胞數, 排卵數 그리고 受精卵의 回收率에 성적은 Table 2에 提示한 것과 같다.

Table 2. Effects of levels of PMSG, FSH injection on ovulation point and recovery rate of embryos after superovulation by palpation

Dosage (unit)	No. of heads	No. of ovarians follicles			No. of ovulation points			No. of recovery embryos	Recovery rate(%)
		Left	Right	Total	Left	Right	Total		
PMSG (2,500IU)	5	4.8 ± 0.7	5.6 ^a ± 0.4	10.4 ± 1.0	3.0 ± 0.6	4.2 ^a ± 1.1	7.2 ^a ± 1.3	5.2 ± 1.3	72
PMSG (3,000IU)	5	5.2 ± 1.4	6.2 ^b ± 1.3	11.4 ± 2.3	3.2 ± 1.1	4.6 ^a ± 1.8	7.8 ^a ± 2.6	4.8 ± 1.7	61
FSH (40mg)	5	5.6 ± 1.0	7.8 ^b ± 1.1	13.2 ± 1.9	4.4 ± 1.0	7.0 ^b ± 1.4	11.4 ^b ± 1.2	6.4 ± 2.7	56

* Mean ± S.D.

Different superscripts denote significant differences within columns (P < 0.05)

PMSG 2,500IU, 3,000IU 그리고 FSH 40mg 處理區에 있어서 直腸檢査에 의한 卵胞數에 있어서 直腸檢査에 의한 左側卵巢에서 각각 4.8 ± 0.7, 5.2 ± 1.4, 5.6 ± 1.0個로 統計的 有意差는 없었다. 그러나 右側卵巢는 5.6 ± 0.4, 6.2 ± 1.3, 7.8 ± 1.1個로 各 處理區에서 有意性이 있었다(P < 0.05).

排卵數는 左側卵巢에서 各各 3.0 ± 0.6, 3.2 ± 1.1, 4.4 ± 1.0個로 有意差는 없었고, 右側卵巢는 4.2 ± 1.1, 4.6 ± 1.8, 7.0 ± 1.4個로 處理間에 有意的인 差를 보였다(P < 0.05). 이에 反하여 전체 回收卵胞數를 보면 各 hormone 處理別로 5.2개, 4.8개, 6.4개 로서 差異가 없었으며, 특히 回收率은 PMSG 2,500IU에서 72%,

PMSG 3,000IU에서 61%이고, FSH 40mg에서는 56%로 다소 떨어지는 成績을 보였다. FSH 處理區가 回收率이 낮은 原因은 採卵時期가 여름철에 偏重되었고, 방목지에서 遂行하였기 때문인 것으로 思料된다.

排卵數는 過排卵 處理後 채란일에 黃體發育狀態를 直腸檢査에 의해서 조사하였는데, PMSG 2,500IU에서는 大形黃體(5mm 이상)가 均일하게 분포하였으며, PMSG 3,000IU와 FSH 40mg은 小型黃體(5mm 이하)가 出現하였다. 특히 FSH 처리구는 황체 발달이 均일하지 못하였고, 小型黃體와 排卵되지 않는 卵胞가 나타나고 있었다. 小型黃體의 出現에 대하여 명확히 규명되지

않았지만 Elsdén(1982)은 卵巢反應이 나쁜 개체에서 딱딱하고 적은 黃體가 發生한다고 보고하였다. Monniaux 등(1983)은 Charolais 經産牛 28頭に PMSG 2,500IU를 投與하여 8.1 ± 7.4 개의 排卵數를 報告하였고, Vesetinovic 등(1984)도 Holstein 經産牛 12頭에서 PMSG 3,000IU를 注射하여 平均 12.7개의 排卵成續을 얻었다. 그리고 韓牛에서 高 등(1981)은 PMSG 2,000IU를 使用하여 平均 6.5개, 任 등(1984)은 同量의 PMSG로 平均 6.9개를 發表하였다. 本 實驗에서 PMSG 2,500IU와 3,000IU 投與後 排卵數는 各各 7.2, 7.8개로 Sergeev 등(1990)의 11.2개 보다는 떨어지는 成續이었다.

過排卵處理後 FSH投與는 Chupin과 Procureur(1983)가 32mg, 50mg을 利用하여 8.9, 9.7개의 排卵數를 報告하였고, Bugrov 등(1990)은 33mg을 未經産牛에 注射하여 11.3개에 比하여, Sovetkim 등(1989)의 Holstein 經産牛에서 50, 40, 32mg의 FSH를 投與하여 5.8, 6.8, 6.8개의 排卵成續과 비슷하였고, 2.75, 3.35, 3.43개의 受精卵을 回收한것보다는 다소 양호한 成續이었다.

過排卵處理時 個體間的 差異는 各 個體의 營養 또는 遺傳的인 差異에 起因한다고 報告(Dunn, 1980; Steenan 등, 1976)한 바와 같이 本 實驗에서도 같은 結果를 볼 수 있었다. 過排卵處理時 發情週期 6~7일에 採卵한 卵자의 形態는 Table 3과 같이 hormone 處理別 回收卵數는 各各 26, 24, 32개이고, 이중 正常卵은 1, 3, 6개로서 非正常卵이 많이 發見되었다. Greve 등(1979)은 Holstein 經産牛에서 PMSG 2,000IU를 投與하여 平均 6.2개의 受精卵을 回收하였으며, Monniaux 등(1983)은 Charolais 經産牛의 2,500IU의 PMSG를 利用하여 6.0 ± 6.4 개를 採卵하였고, Gorchach 등(1984) PMSG 2,000~3,000IU를 使用하여 平均 7.19개의 受精卵을 回收하였다.

Wubishet 등(1986)은 Holstein 經産牛에서 FSH 50mg의 投與로 8.2개의 受精卵을 投與하여 桑實胚 2.3개, 胚盤胞期 4.2개, 未受精卵 2.3개를 發表했으며, 南 등(1985)은 平均 5.0개의 卵자를 回收하여 桑實胚 1.7개(32.8%), 胚盤胞期 1.8개(35.8%), 退行卵은 1.4개(28.4%)를 報告하였고, 本 實驗에서 卵자의 採

卵은 各 처리別 平均 5.2, 4.8, 6.4개였으며, 正常卵은 各各 4.0, 3.8, 4.2개를 나타내었다. 發育段階別로 볼때 수정란은 PMSG 2,500IU에서 桑實胚는 2.8개(54%), 胚盤胞期 1.2개(23%), 未受精卵과 退行卵 1.2개(23%)였고, PMSG 3,000IU는 桑實胚 2.4개(50%), 胚盤胞期 1.4개(29%), 未受精卵과 退行卵 1.0개(21%)였으며, FSH 40mg은 桑實胚 3.8개(59%), 胚盤胞期 0.4개(6%), 未受精卵과 退行卵 2.3개(34%)를 나타내었다.

正常受精卵이 比率는 PMSG 2,500IU는 77%였고, PMSG 3,000IU에서 79%였으며, FSH 40mg에서는 66%의 成績을 얻었다. Ozil 등(1979)과 Elsdén 등(1976)의 正常受精卵 比率 70%의 보고와 本 實驗의 PMSG 2,500IU, 3,000IU에서는 비슷한 成績을 보였으나, FSH 40mg처리구에서 正常卵 많이 發生한것은 다른 처리구에 비해 發情持續時間도 길었으며, 따라서 排卵時間도 적기에 排卵이 안되어 배란지연에 의해서 退行卵이 多發한것으로 사료된다.

過排卵 處理後에 正常 發情再歸日의 發見狀態는 Table 4와 같이, 過排卵 處理後에 정상적인 發情 증세는 PMSG 2,500IU에서 52.4일, PMSG 3,000IU에서 69.8일 그리고 FSH 40mg에서는 62.4일에 發見되었다. PMSG 2,500IU에서 發情再歸일이 짧은 것은 적은 量의 hormone 투여에 起因한 것으로 생각된다.

그러나 PMSG 3,000IU와 FSH 40mg에서 正常 發情再歸일이 길어지는 것은 過排卵處理時 형성된 黃體가 萎縮되는 상태로 장기간 지속되었고, 또한 閉鎖卵胞도 休止된 狀態로 오랫동안 지속 되고 있었다. Table에는 提示하지 않았지만, 過排卵 處理後에 正常 發情發見時 子宮頸管粘液 pH는 8~10 정도로 높게 나타나고 있으며, 卵巢內 Graafian follicle도 成長이 低調하였으며 排卵時間도 지연되는 현상을 볼 수 있었다. Hormone 처리하여 採卵 후 發情再歸일에 관해서 Lubbadah 등(1980)은 乳牛에 PMSG 3,000IU를 처리한 후 正常 發情再歸日은 29~66일(평균 48일)로 報告 하였으나, 本 實驗에서는 이보다 다소 길게 나타나고 있었다.

Table 3. Development stages of embryos recovered on 6~7 days after estrus.

Treatment (unit)	No. of eggs recovered	No. of normal embryos			No. of atypical embryos		
		Morulae	Blast-ocysts	Total(%)	UF*eggs	Deg**embryos	Total(%)
PMSG (2,500IU)	26	14	6	20 (77)	5	1	6 (23)
PMSG (3,000IU)	24	12	7	19 (79)	2	3	5 (21)
FSH (400mg)	32	19	2	21 (66)	5	6	11 (34)

* Unfertilized eggs, ** Degenerated embryos

Table 4. Effects of PMSG and FSH administration on interval of spontaneous estrus.

Treatment	No. of heads	Spontaneous	
		Range(day)	Mean± S.D.
PMSG 2,500 IU	5	32~70	52.4± 14.1
PMSG 3,000 IU	5	42~92	69.8± 16.6
FSH 40mg	5	41~73	62.4± 11.5

Table 5. Effects of slow and rapid freezing procedures with freezing media containing 1.4 M glycerol on the survival rate(evaluated by FDA-test) after freezing and thawing.

Method of freezing	No. of recovered embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA Score
		P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	N	
Slow freezing (Cell Freezer)	25	5	9	4	2	1	4	3.1
Rapid freezing (LN ₂ container)	27	-	6	3	7	2	9	1.2
Vitrification	10	2	1	3	3	1	-	3.0

The composition of slow & rapid freezing media was both 10% glycerol+10% sucrose with PBS

한편, 발정再歸 發現日의 길이와 頻도가 不規則적으로 變化하는 데 있어서 Spilman 등(1973)과 Booth 등(1975)은 발정再歸가 延長 되는 現狀은 progesterone 水準의 間歇적으로 上昇된데 起因한다고 보았으며, progesterone 水準의 上昇은 過排卵 處理後에 形成된 黃體로부터 由來하여 部分的으로 閉鎖卵胞에서도 起因한다고 하였다. 따라서 progesterone 水準은 過排卵 處理後 形成된 黃體數와 正의 相關關係가 있다고 報告하고 있다(Brand 등, 1977; Both, 1975).

2. 受精卵과 卵胞卵의 凍結

牛 受精卵의 緩慢凍結과 急速凍結時 生存率(FDA-score)에 미치는 影響을 比較 調査한 結果는 Table 5와 같다.

牛 受精卵의 凍結融解後 FDA-score는 緩慢凍結이 3.1(62%), 유리화 동결이 3.0(60%)로서 急速凍結의 1.2(24%)보다 높게 나타나고 있으며, 緩慢凍結에서 P₅와 P₃의 FDA score는 72%로 良好한 生存率을, 유리화 동결에서는 60%로서 완만 동결보다 낮은 반면, 急速凍結은 P₅와 P₃에서 33%로 낮은 生存率을 보여주고 있다. 이러한 結果는 凍結液에 添加된 glycerol 濃度を 1.4M로 同一한 處理方法과 凍結用器具(cell freezer와 LN₂ container)의 差異로 原因을 들 수 있으나 내동제 농도가 높은 유리화 동결도 대가축에서 유리화 동결 가능성을 제시하여 주었다. 일반적으로 受精卵의 凍結處理에 있어서 細胞死滅에 主要原因은 脫水狀態, 氷晶形成, 平衡時間등을 들 수 있는데 凍結과 融解시 細胞内外에서 生成되는 적당한 脫水, 氷晶形

成은 細胞質에 物理的 壓力을 가하게 되므로서 細胞質이 死滅하게 된다. 그리고 平衡時間도 凍結液内도 透過性 物質과 細布内의 水分移動時에 적절한 시간과 融解後 細胞内의 耐凍劑 이동이 細胞의 생존에 影響을 미쳐서, 生存率이 저하되는 것이다(Leibo, 1984; Wood & Farrant, 1980). 특히 本 實驗의 急速凍結 處理區에서 受精卵의 透明帶 손상은 없었으나 割球 細胞가 파괴되어 死滅한 것을 볼 수 있었는데, 이러한 현상은 耐凍劑 添加水準(glycerol 1.4M)이 낮아 凍結前 수정란 내부의 수분이 脫水되지 않은 상태에서 LN₂(-196°C)에 급속히 침지함에 따라 형성된 氷晶이 細胞膜을 파괴시킨 것으로 사료된다.

Bilton 등(1981)은 glycerol 1.0M로 牛 受精卵을 緩慢凍結과 急速凍結時 各各 28.8%, 47.7%로 生存率에서 急速凍結이 優秀하다고 發表했으나, Lehn-Jensen(1983)은 glycerol 1.4M로 胚盤胞期에 牛 受精卵을 緩慢凍結하여 57%의 受胎率을 報告하였다.

새로운 vitrification solution(glycerol 20%, ethylene glycol 10%, Ficoll 305, sucrose 10%)으로 牛, 돼지 및 家兔 등의 未成熟卵자를 超急速凍結後 融解한 生存率(FDA-score)비교는 Table 6과 같다. Table 6에서 나타난 바와 같이 牛, 돼지, 토끼 등의 卵胞卵의 生存率(FDA-score)은 각각 3.3(66%), 2.6(52%), 2.3(46%)로 牛 準急速凍結(Table 5) 보다 약간 높을 뿐이고 거의 비슷한 生存率을 보여주었다.

Table 6. The comparison of the survival of vitrified cow, pig and rabbit ovarian oocytes by FDA test.

Animal	No. of oocytes frozen	No. of oocytes evaluated by FDA test					FDA test	
		P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁		P ₀
Cow	31	-	17	10	1	0	3	3.3
Pig	42	-	19	3	8	7	5	2.6
Rabbit	34	-	10	1	13	6	4	2.3

The composition of vitrification solution was 20% glycerol+10% ethylene glycol+30% Ficoll+10% sucrose with PBS.

超急速凍結(琉璃化)에 사용된 Ficoll은高分子物質(分子量 70,000)로서凍結時琉璃화를促進시키는非透過性物質인 반면, sucrose는低分子物質(分子量 342)로內部細胞의수분이나,融解性內部細胞에투과되어있던동결액을脫水시키는역할을하므로서(Kasai 등, 1980; Mazur, 1970)生存率을向上시킬수있다고하였다.과거이러한vitrification방법은4℃에서受精卵을平衡하기전100%vitrification solution의毒性을제거하기위해서5℃에서낮은濃度에서부터높은농도의vitrification solution로여러번平衡시켜야만하였다(Rall 등, 1987; Rall과 Fahy, 1985).姜 등(1990)은mouse 2-cell受精卵을超急速凍結하여89.9%의生存率을發表하였고,ethylene glycol과dimethyl sulfoxide를이용한vitrification solution으로소수정란을동결하여73~90%의생존율을보고한(Ishimori 등, 1993)것에비해서는낮은성적이었으나,Massip 등(1986)은牛受精卵을vitrification solution로凍結時各各42.8%와53.8%의生存率을報告한것과Mahmoudzadeh 등(1995)이ethylene glycol, ficoll, sucrose를이용하여소수정란을동결하였을때morulae 54%와blastocysts 52%보다는다소높은생존율을보여주었다.

최근에鄭 등(1990)은1~2cell의mouse卵子에서20% HCS+3.5M DMSO+0.25M sucrose를제조하여동결속도5℃/sec와200℃/sec로동결하였을때생존율은각각94.6%, 75.4%로성적을발표하였다.그리고金 등(1991)은牛的體外受精卵을超急速凍結20% FCS+2.0M glycerol+0.25M sucrose를이용하여75%의생존율을발표하였다.그러므로本實驗에서牛卵子(卵胞卵)로vitrification solution을이용할때난자의直徑(150-160μ)이크더라도동결가능성을보이고있어今後vitrification solution를利用한超急速凍結에서採卵된受精卵의發育段階에따른좀더깊이있는研究의必要性을提示해주고있다.그리고돼지와家的卵胞卵이牛成績보다떨어진것은家は卵子周圍에mucin層이있고,돼지의卵子는脂肪이많이함유되어있어凍結이어렵다고보고한것으로서Bank 등(1974)보다높은生存率을보였으며,앞으로이에관한보다많은공시관과계속실험이요구되었으며체외수정과관련

됨으로追加實驗이要望된다.더욱이중요시생각되는것은오래동안수정란의동결실험에서얻은結論으로난자의耐凍性は精자의경우와같이가축품종뿐만아니라개체,계절난자의상태등에따라크게영향을미치는것으로추측할수있으며앞으로이에관한실험이수행되어야한다고사료된다.결론적으로本實驗은새로운vitrification 과정을室溫에서간단한방법으로遂行할수있고,凍結方法이예비동결없이동결전탈수시킴으로서常溫에서超急速으로직접液體窒素에침지하여凍結시키는데意義가있었으며,특히FDA 판정으로mouse는물론大家畜受精卵 및卵胞卵에서도凍結可能性여부를提示해주었으며동결시킨난자의여러가지처리방법에따른생존율시험이계속수행되어야한다고사료된다.

摘要

本研究는過排卵處理호르몬인PMSG, FSH處理가肉牛의卵巢反應에미치는影響과緩慢,急速凍結 및超急速凍結(vitrification)이採取卵(morulae)과卵胞卵(ovarian oocytes)의생존율에미치는영향을조사하기위하여실행되었다.總15頭의肉牛를3처리구(2,500 IU; 3,000IU, 40mg FSH)로분류하여PMSG 또는FSH 처리후PGF_{2α} 30mg으로발정을유도하였다.採卵된受精卵은10% glycerol+10% sucrose凍結液에서緩慢과急速凍結方法으로卵胞卵은20% glycerol+10% ethylene glycerol+30% Ficoll+10% sucrose로조성된vitrification solution에서超急速凍結로동결, 저장후FDA-test를이용하여生存率을判定한중간보고를要約된結果는다음과같다.

1. PMSG와 FSH 處理區에서 2,500IU, 3,000IU, PMSG와 FSH 40mg을투여한후發情이發現되는시간은각각32.8, 35.0, 43.4시간제發情徵候를보였으며,發情持續時間은각각18.6, 18.8, 22.4시간이었다.
2. 2,500IU와 3,000IU PMSG, FSH 40mg 처리구에서의卵巢크기는좌측난소가각각5.4, 5.1, 6.4cm로서有意성이없었으나,우측난소에서는6.2, 5.7, 7.8cm로서有意성이있었다(P < 0.05).

3. 2,500IU, 3,000IU PMSG 및 FSH 40mg 처리구에서의 卵胞發育數는 좌측난소에서 4.8, 5.2, 5.6개로 有意性이 없었으나, 우측난소에서는 5.6, 6.2, 7.8개로 有意性이 있었다($P<0.05$).
4. 2,500IU, 3,000IU PMSG, FSH 40mg 처리구에서는 排卵數는 좌측난소에서 3.0, 3.2, 4.4개로 有意性이 없었으며, 우측난소에서 7.2, 7.8, 11.4개로 有意性이 있었다($P<0.05$).
5. 2,500IU, 3,000IU PMSG, FSH 40mg 처리구에서 채란된 정상난자수는 20, 19, 25개 이었으며, 未受精卵과 退行卵은 각각 6, 5, 11개였다. PMSG 2,500IU, 3,000IU, FSH 40mg 처리구에서 過排卵處理後 發情發現 日數는 각각 52.4, 69.8, 62.4일로 PMSG 2,500IU 처리구가 가장 좋은 것으로 나타났다.
6. 緩慢凍結과 準急速凍結 그리고 琉璃化凍結을 실시하여 兪해後 FDA-test를 兪용 生存率을 判定하였을때 FDA-score는 각각 3.1(62%), 1.2(24%), 3.0(60%)로서 緩慢凍結과 琉璃化凍結에서 급속동결 1.2(24%) 보다 더 높은 成績을 얻었으며, 20% glycerol+10% ethylene glycol+30% Ficoll+10% sucrose로 造成된 vitrification solution(VS)에서 소, 돼지 및 토끼의 卵胞卵을 超急速 凍結한 後의 生存率은 돼지(2.6) 보다 토끼(3.1)와 소(3.3)에서 더 높은 성적을 보여주었다.

參考文獻

- Bielanski, A.V., V.P. Schneider and R. J. Maoletoft. 1986. Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos in vitro : The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. *Theriogenology*, 25 : 429-437
- Bilton, R. J. and Moore, N.W. 1977. Successful transport of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. *J. Reprod. Fert.*, 5, 363.
- Bouyssou, B. and D. Chupin. 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts in french-straws. *Theriogenology*, 17(1) : 80(Abstr).
- Bugrov, A.D. and N.A. Nevinny, 1990. Embryo transfer at a large dairy farm. *Zootehniya.*, No.5, 67-69.
- Cseh, S., J. Seregi and L.Solti. 1994. Practical experiences with direct transferred frozen embryos. *Theriogenology*, 41 : 185.
- Frank, G. C., S. L. Coley, B. Betterbed and R. D. Page. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology*, 26:134-144.
- Greve, T., H. Lehn-Jensen and N. O. Rasbech. 1979. Morphological evaluation of bovine embryos recovered non-surgically from superovulation dairy cows on days 6 1/2, 7 1/2 : A field study. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 19(5) : 1599-1611.
- Ishimori, H., K. Saeki, M. Inai, Y. Nagao, J. Itasaka, Y. Miki, N. Seike and H. Kainuma. 1993. Vitrification of bovine in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, 40 : 427-433
- Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Anim. Repord. Fert.*, 59 : 51-56.
- Kuwayama, M. Tasaka and S. Hamano. 1994. In straw dilution of bovine IVF-blastocysts cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 41 : 231.
- Lubbadeh, W.F., C. N. Graves and S. L. Spahr. 1980. Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 50(1) : 124-127.
- Massip, A., P. Van der Zwalmen, F. Puissant, M. Camus and F. Leroy, 1984. Effects of *in vitro* fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. *J. Reprod. Fert.*, 71 : 199-204.
- Mazur, R. R. 1977. Slow freezing injury in mammalian embryos : In the freezing of mammals embryos(Ellott k & Whelan eds) *Ciba Fndn symp.* No. 52. 19, Elsevier/North Hollan Amsterdam.
- Mahmoudzadeh, A.R., A. VanSoon, P. Bols, M. T. Ysebaert and A. de Kruif. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro* : Effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *J. Repord. Fert.*, 103 : 33-39.
- Monniaux, D., D. Chupin and J. Saumande. 1983. Superovulated responses in cattle. *Theriogenology*, 19(1) : 55-81.
- Rall, W. F. and G. M. Fahy, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification. *Nature Vol.* 313 : 573-575.

- Sreenan, J. M. and D. Beehan. 1976. Method of induction of superovulation in the cow and transfer results. In "Egg transfer in cattle" (L.E.A. Rowson, ed, Commission for the European Communities, Luxemburg, EUR 5491. 19-34.
- Voelkel, S.A. and Y. X. Hu. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37 : 687-697
- Voelkel, S.A. and Y. X. Hu. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37 : 23-37.
- Williams, T. J. and S. E. Johnson, 1985. Quick-Freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23 : 235.
- Wilmot, I and L. E. A. Rowson. 1973. Experiments of the low temperature preservation of cow embryos. *Vet.REC.* 92 : 686-690.
- Wubishet, A.C.N. Greaves, S.L. Spahr D.J. Kesler and Favero. 1986. Effects of treatment on superovulatory responses of dairy cows. *Theriogenology*, 25 : 423-427.
- Yadav, M. C., K. E. Leslie and J. S. Walton. 1985. The onset and duration of ovulation in superovulated beef heifers. *Theriogenology*, 23(1) : 237. Abstr.
- 김상근 · 이봉구 · 이규승. 1991. 소체외수정란의 초급속동결에 관한 연구 : 1. 소 체외수정란의 초급속동결 용해후의 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회보*, 15(2) : 133-139.
- 김중계 · 양병철 · 강민수 · 고경래 · 고혁진 · 장덕지. 1995. 소, 돼지 미성숙 난포난의 유리화 동결. 용해 후 FDA처리가 체외수정과 배발육에 미치는 영향 : 1. 포유동물 난포난의 유리화 동결 후 FDA-TEST 에 의한 생존성 판정. *한국수정난이식학회지*. 10(3) : 183-191.
- 정구민. 1990. 소와 생쥐 초기난자의 체외발생 능력과 초급속동결에 영향하는 생리적, 물리적 요인에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문