

과배란처리 한우에서 초음파 유도에 의한 난자채란에 관한 연구

이효종 · 강태영 · 조성근* · 박준규* · 손우진 · 최민철 · 최상용 · 박충생*

경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소

Transvaginal Ultrasound-guided Oocytes Collection in Superovulated Korean Native Cows

**H. J. Lee, T. Y. Kang, S. K. Cho*, J. K. Park*, W. J. Son, M. C. Choi,
S. Y. Choe and C. S. Park***

College of Veterinary Medicine, Institute of Animal Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

The present study was carried out to evaluate the effect of superovulation treatments on ovarian responses, oocyte recovery rates and grades of collected oocytes using an ultrasound-guided transvaginal approach in Korean native cows.

Superovulation in cows was induced with two different regimens: 1) FSH-decreasing dose(n=8); the cows were received twice per day for three days of the total dose of 400 mg of FSH-p, 2) FSH-single dose(n=9); the cows were administrated a single dose of 400 mg of FSH-p in 25% PVP. The Observation of visible follicles and collection of oocytes were performed 12 hours following the last FSH in FSH-decreasing dose group and 48 hours after the FSH-single dose injection. All visible follicles larger than 6 mm were punctured and aspirated with a 6.5 MHz convex-array ultrasound transducer designed for intravaginal use.

The mean number of visible follicles(> 6 mm) was significantly($P<0.05$) higher in the FSH-decreasing dose treatment(22.8 ± 1.9) and FSH-single dose treatment(20.6 ± 2.0) groups than the non-treatment group(7.0 ± 0.8). The mean recovery rate of oocytes was not significantly($P<0.05$) different between the treatment and control groups, but the mean number of collected oocytes was significantly($P<0.05$) higher in the FSH-decreasing dose treatment(12.6 ± 1.5) and FSH-single dose treatment(11.8 ± 3.6) groups than the non-treatment group(3.7 ± 0.5).

In conclusion, the FSH-single dose treatment at superovulation in cows for ultrasound-guided aspiration might increase the number of aspiratable follicles and the recovery rate of follicular oocytes as the FSH-decreasing dose treatment.

(Key words : ultrasound, follicle aspiration, FSH, cow)

본 연구는 1996~1997년 농림수산부 첨단기술개발과제 연구비에 의하여 연구되었음.

* 경상대학교 축산학과(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

서 론

근래에 수정란 이식기술이 실용화 단계에 이르렀고, 보조생식기술이 눈부시게 발전함으로써 동물의 증식과 개량효과가 향상되고 형질전환동물 및 복제동물의 생산이 가능하게 되었다. 동물의 증식과 개량효과를 향상시키기 위한 한 방법으로서 저립하고 양질의 체외수정란 생산기술 개발이 매우 유익하다. 이러한 견지에서 우수한 암소로부터 가급적 저렴하게 많은 수의 난포란을 채취하여 체외수정란을 생산 이용해 보려는 연구를 활발히 수행해 오고 있다. 소의 체외수정란 생산과 이식 기술은 주로 도축된 난소에서 난포절개(Moor와 Trounson, 1977)와 needle aspiration(Stubbings 등, 1990)으로 다수의 수정란을 저렴하게 생산하여 왔으며, Sirad 등(1985)은 생체 소로부터 laparoscopy 방법으로 배란 직전의 난포란을 채란하는데 성공하였다고 한다. 이와 같은 방법들로 체외성숙과 체외수정으로 산자를 생산하였으며, 국내에서도 이에 관한 연구가 활발하게 진행되어 체외수정란 유래의 송아지가 생산된 바 있다(황 등, 1993; 박 등, 1994). 그러나 도축난소로부터 난포란을 채란하는 것은 반복적인 채란이 불가능하며, 종빈우의 유전적 형질이 모호하여 유전적 개량효과를 기대할 수가 없다. Laparoscopy에 의한 난포란 채란은 계속적인 수술과 마취로 인한 동물의 stress와 수술부위의 창상과 유착으로 반복성의 기회가 제한되고 양질의 수정란을 얻기가 힘들다고 한다(Holland 등, 1981).

보조생식기술에서 성선호르몬을 처리한 다음 난소반응을 초음파상으로 조사하고 측정하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Pierson 등, 1994; Pierson과 Chizen, 1991; DeCherney와 Laufer, 1984). Pierson 등(1995)은 사람에서 호르몬 처리의 양과 종류에 따라 난소반응과 난포성숙 및 개개의 난포의 특성을 초음파 영상을 통하여 파악하고 다시 그 화상을 computer로 분석, 조사한 다음 배란을 유도하고 난포란 채란의 적절한 시점을 결정하는데 이용하였다. Piterse 등(1988)은 소에서 생체 난소의 난포란을 초음파로 채란하여 체외수정란 생산을 보고하여 초음파를 이용한 난포란 채란의 가능성을

시사한 이후, 이에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. Bungartz 등(1995)은 FSH 처리우와 무처리우에서 초음파에 의한 채란으로 FSH 처리우에서 평균 10개 이상의 난자를 채란하여 무처리우보다는 유의적으로 높았으며, 배반포까지의 발달 역시 높았다는 보고를 하였다. 그리고 Meintjes 등(1995)도 임신우와 비임신우에서 FSH를 처리하여 조사한 결과 난포의 성숙과 회수율이 높았다는 보고가 있다. 국내에서도 정 등(1996)은 홀스타인 소에서 FSH로 과배란 유도하여 난포의 형태와 변화를 조사한 보고가 있으며, 이 등(1996)은 한우 송아지에서 초음파 유도에 의한 비성숙 난자를 채취할 때 FSH와 bST를 병용처리하면 FSH 및 PMSG 단독 처리시보다 많은 수의 비성숙난자를 흡인할 수 있다고 하였다. 그러나 이러한 방법들은 FSH를 사용할 때 많은 시간과 노력을 들여 동물에게 심한 stress와 함께 과배란을 유도하여야 하는 문제점을 가지고 있다. Takedomi 등(1994)과 Suzuki 등(1993)은 이러한 문제점을 보완하고자 FSH 제제의 투여횟수를 단순화시키는 연구를 해왔으며, Dattena 등(1994)은 PVP를 이용하여 Lopez-Sebastian 등(1993)은 propylene glycol을 이용하여 FSH를 이들 용매에 녹여 일회 주사함으로써 체내에 흡수를 지연시켜 과배란을 유지시켜 양질의 수정란을 회수하였다고 한다.

한우에서는 FSH의 일회 주사방법에 의한 과배란 유기에 관한 연구가 아직 보고된 바가 없어 본 연구에서는 FSH를 감량분할처리하거나 일회 처리하여 난소반응을 초음파상으로 관찰하고, 난포란을 초음파유도에 의한 방법으로 채란하여 호르몬 투여에 따른 채란율과 채란된 난포란의 등급을 분류함으로써 초음파유도 난포란 채란이 한우의 체외수정란 생산효율향상에 활용될 수 있는지를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 임상적으로 건강하고 번식장애가 없으며 체중 350~400 kg, 연령 14~22개월령인 한우를 사용하였다. 사육은 사양표준에 준하여 위탁

사양관리하였다.

2. 과배란 처리 및 난포발육에 대한 초음파 관찰

공시동물의 과배란유기에는 FSH-p(Folltropin[®]-V, Australia)를 사용하여 다음과 같이 처리하였다.

- 1) FSH-감량분할처리군(n=8): FSH-p 400 mg (20 ml)를 12시간 간격으로 하루 2회씩 3일간 (4.5, 4.5; 3.5, 3.5; 2, 2 ml) 근육주사하였으며, 마지막 주사 후 12시간째에 난소반응을 초음파조사하고,
- 2) FSH-단일처리군(n=9): 400 mg FSH를 25% PVP에 용해하여 1회 근육주사하였으며, 처리 후 48시간에 난소반응을 조사하였고,
- 3) 대조군(n=10): FSH를 처리하지 않고 정상적인 상태에 있는 한우를 조사하였다.

난포란의 초음파 관찰은 SONOACE-1500 및 SONOVET-600(Medison, Co., Korea)을 사용하였으며, 탐촉자는 6.5 MHz convex scanner를 사용하였다. 관찰을 용이하게 하기 위하여 공시동물을 보정틀에 고정시킨 후 직장벽의 이완을 위해서 1 mg / 100 kg의 detomidine hydrochloride(Dormosedan[®], Canada)를 미정맥에 주사하고, 2% lidocaine 용액 4~6 ml을 미근부의 제 1 미추간에 주사하여 경막외 마취를 유도하였다. 직장내의 분을 제거하고 회음부와 외음부의 오물을 세척하고 소독제로 깨끗하게 닦아낸 다음 탐촉자를 질내로 넣고 다른 손은 직장으로 넣어 난소를 견인하여 질내에 있는 탐촉자 위에 올려 초음파의 모니터 상에 나타나는 난포를 조사하였다. 초음파상에 나타난 난포의 크기별로 11 mm 이상인 난포를 대난포로, 10~6 mm인 것을 중난포로 분류하였으며, 본 실험에서는 5 mm 이하인 소 난포는 관찰에서 제외시켰다.

3. 난포란의 채란

초음파 유도에 의한 난포란의 채란은 위와 같은 방법으로 한우를 고정시키고 마취를 유도시킨 후 난포의 발육상태를 조사한 후, needle(55 cm, 17 G, Cook[®], Australia)에 0.2% heparin이 첨가된 PBS로 내강을 채운 다음 needle guide에 장착하였다. 탐촉자를 질을 통해서 질벽 가까이에 위치시킨

후 난소와 탐촉자의 위치를 가능한 한 가까이 밀착시키고 모니터를 통해서 채란가능한 난포가 모니터 상으로 나타나면 puncture line 부위로 난포를 이동시키고 needle의 끝부분이 모니터 상에 약간 비치도록 이동시킨 후 난포내로 needle을 진입시킴과 동시에 vacuum pump의 압력을 75~85 mm Hg(분당 흡입량: 27~29 ml)로 유지하여 조심스럽게 회수하였다(Gibbons 등, 1994). 모니터상에서 난포가 완전히 흡입되는 것을 확인하고 needle 을 다음 난소로 이동시켜 반복적인 방법으로 채란하였다.

4. 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 팽화되었거나 퇴화된 것.

5. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package의 χ^2 -test를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 과배란 처리방법에 따른 난포발육에 대한 초음파 관찰

Folltropin[®]-V 400 mg을 하루에 두 번씩 사흘간 감량분할처리한 한우와 동량의 Folltropin[®]-V를 25% PVP에 용해하여 단일처리한 한우에서 6.5 MHz 초음파로 난소반응을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. FSH 감량분할처리 및 단일처리우에서의 한우 1두당 채란 가능한 가시 난포수는 각각 22.8 ± 1.9 및 20.6 ± 2.0 개로 무처리우군의 7.0 ± 0.8 개보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났으며, 호르몬 처리 방법간의 가시난포수는 유의적

Table 1. Ovarian response in ultrasonography to the superovulation treatments in Korean native cows

Hormonal treatments	Replication No. of cows used	No. of follicles by size /cow		
		Large(>11 mm)	Medium(6~10 mm)	Total
Control	10	2.5±1.0 ^{a*}	4.5±1.1 ^a	7.0±0.8 ^a
FSH-decreasing dose	8	0.1±0.1 ^b	22.6±1.9 ^b	22.8±1.9 ^b
FSH-single dose	9	1.1±0.9 ^a	19.0±2.3 ^b	20.6±2.0 ^b

Control : No hormonal treatment.

FSH-decreasing dose : FSH(Folltropin[®]) 400 mg was given twice a day for three days and observed the follicles 12 hours after the last injection.

FSH-single dose : FSH(Folltropin[®]) 400 mg in 25% PVP was given in single dose and observed the follicles 48 hours after injection.

* (Mean±S.E.)

The values with different superscripts in the same column denote significant difference(P<0.05).

인 차이가 없었다. Brogliatti와 Adams(1996)는 미성숙한 송아지에서 FSH를 처리한 것과 무처리한 것에서 6 mm 이상의 난포수는 각각 21.6±0.2개와 2.0±0.4개라고 보고하였고, Meintjes 등(1995)은 임신한 성우와 임신하지 않은 성우에 FSH 각각 투여한 결과 난포의 수는 25.3±11.2개와 31±4.9개로 나타났다고 보고하였다. 이들의 결과와 비교해 볼 때 한우에서도 비슷한 경향을 나타내었다. 난포의 크기별을 비교하면 대난포의 수는 무처리우군과

FSH 단일처리우군과의 차이가 별로 나지 않았다. 본 실험에서는 난포가 대난포까지 성숙하기 전인 FSH 감량분할처리우군은 FSH 마지막 투여 후 12 시간째, FSH 단일처리우군은 처리 후 48시간째에 초음파로 관찰하고 채란하였기에 대난포수가 적은 것으로 생각된다.

2. 과배란 처리방법에 따른 초음파유도 난자채란 호르몬 처리에 따른 초음파 유도에 의한 난포란

Table 2. Recovery of follicular oocytes by ultrasound-guided aspiration from the Korean native cows in different hormonal treatment regimens

Hormonal treatments	Replication No. of cows used	No. of oocytes recovered(%)				Total no. of oocytes recovered /observed follicles(%)
		Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV	
Control	10	9(24) (0.9±0.3) ^{a*}	17(46) (1.7±0.4) ^a	4(11) (0.4±0.2) ^a	7(19) (0.7±0.2) ^a	37 /70(52.8) (3.7±0.5) ^a
FSH-decreasing dose	8	18(18) (2.3±0.6) ^{bc}	22(22) (2.8±1.0) ^a	36(35) (4.5±0.8) ^b	25(25) (3.1±1.5) ^{bc}	101 /182(56.0) (12.6±1.5) ^b
FSH-single dose	9	13(12) (1.4±0.6) ^{ac}	26(25) (2.9±1.2) ^a	60(57) (6.7±2.2) ^b	7(6) (0.8±0.3) ^{ac}	106 /185(57.3) (11.8±3.6) ^b

Control : No hormonal treatment.

FSH-decreasing dose : FSH(Folltropin[®]) 400 mg was given twice a day for three days.

FSH-single dose : FSH(Folltropin[®]) 400 mg in 25% PVP was given in single dose.

* Mean±S.E.

The different superscripts within the column denote significant(P<0.05) difference.

의 채란 결과 및 채란된 난포란의 등급분류는 Table 2와 같다. 난포란의 채란율은 FSH 감량분할 처리우군과 단일처리우군이 각각 56.0과 57.3%로 무처리우군의 52.8%보다 높게 나타났다. Bungartz 등(1995)은 FSH 처리우가 무처리우보다 채란된 난자의 수가 높게 나타났으며, Bols 등(1995)의 채란율은 42%로 보고되었고, 미성숙 송아지에서 무처리우와 FSH 처리우에서는 46과 48%의 채란율을 보고하였다(Brogliatti와 Adams, 1996). 초음파유도에 의한 채란의 성공률은 동물의 안정된 보정과 호르몬처리로 많은 난포수의 확보(Meintjens 등, 1993; Pieterse 등, 1992) 흡입빈도(Gibbons 등, 1994; Van der Schans 등, 1991) 그리고 기술적인 측면에서는 적절한 vacuum pressure, tubing system, needle size 및 예민도와 각도(Watersone와 Parson, 1992; Downing, 1984) 그리고 조작자의 경험(Scott 등, 1994; Van der Schans 등, 1991)에 따라 7%(Scott 등, 1994)에서 69.6%(Looney 등, 1994)까지 차이가 나타난다고 한다. 그리고 호르몬의 처리를 받은 난소의 경우는 난포의 크기와 수가 증가하여 초음파 유도에 의한 채란이 용이하고, 난포의 성숙이 잘 일어난 배란직전의 난포라든지 퇴행하는 난포의 경우, 난포강내 난구세포의 고정 정도가 약하므로 채란이 더 쉬워 채란효율이 무처리한 난소보다 높은 것으로 생각된다고 한다(Pieters와 Kappen, 1988).

본 실험의 결과에서는 다른 연구자들의 채란율과 비슷하게 나타났으며, 박 등(1997)의 연구에서 젖소의 경우는 detomidine HCl과 lidocaine의 마취작용과 직장의 이완이 용이하여 보정이 안정되어 채란율이 상당히 높게 나타난 반면, 한우에서의 마취효과는 용이하지 않아 보정 상태가 불안정하여 채란시 난소의 고정과 puncture가 정확히 일어나지 않아 채란효율이 다소 낮은 것으로 사료되며, 한우에 적절한 마취와 보정을 개선하면 채란효율이 향상될 것으로 기대된다.

초음파유도로 채란된 난포란을 등급별로 구분하였을 때, 무처리우군에서는 두 당 평균 난포란이 1등급이 0.9, 2등급이 1.7, 3등급이 0.4 및 4등급이 0.7개가 회수되었다. FSH 감량분할처리우군에서는 두 당 평균 난포란은 1등급이 2.3, 2등급이 2.8, 3등

급이 4.5 및 4등급이 3.1개 회수되었다. 그리고 FSH 단일처리우군에서의 두 당 평균 난포란은 1등급이 1.4, 2등급이 2.9, 3등급이 6.7 및 4등급이 0.8개가 회수되었다. 초음파유도로 채란된 난포란에 있어서 무처리우군에서는 두 당 평균 난포란이 3.7개였고, 그 중 1 및 2등급란이 0.9 및 1.7개로서 24 및 46%를 차지하였다. FSH 감량분할처리우군에서는 두 당 평균 난포란이 12.6개였고, 그 중 1 및 2등급란이 2.3 및 2.8개로서 18 및 22%를 차지하였다. 그리고 FSH 단일처리우군에서는 두 당 평균 난포란이 11.8개였고, 그 중 1 및 2등급란이 1.4 및 2.9개로서 12 및 25%를 차지하였다. FSH 처리방법에 따른 등급간의 유의성은 없는 것으로 나타났으며, FSH 감량분할처리방법보다는 단일처리방법이 동물에게 stress를 덜 주고 실험자의 수고를 덜어 주므로 단일처리방법이 더 효과적이라 사료된다. 이는 Brogliatti와 Adams(1996)의 결과에서처럼 무처리우군에서는 난구세포가 1에서 2층인 난포란이 33%나화된 난포란이 16%였으며, 호르몬처리군은 53과 16%로 나타난 것과 비슷한 경향을 보였다. 호르몬을 처리한 한우에서 초음파 유도에 의한 난포란의 채란에는 난포가 과잉 발육으로 인한 노화가 일어나기 전인 미성숙시기에 채란을 하거나 호르몬의 양을 조절하여 적당한 발육과 수가 존재할 때 채란하는 것이 양질의 난포란을 회수하는데 효과적인 것으로 기대된다.

적 요

한우에서 FSH-p를 감량분할처리하거나 단일처리한 후 초음파를 이용하여 난소반응 관찰과 아울러 채란된 난포란의 수와 등급을 분류하였을 때 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. FSH 감량분할처리군과 단일처리군에서 난소반응은 채란 가능한 난포란의 평균수는 각각 22.8 ± 1.9 개, 20.6 ± 2.0 개로 두 방법간에 유의적 차이는 없었다. 그러나 FSH 처리우에서 무처리우에서의 평균수 7.0 ± 0.8 개보다는 유의적 ($P < 0.05$)으로 난포란 수가 많았다.
2. FSH 감량분할처리군과 단일처리군에서 6 mm 이상의 가시난포의 채란율은 각각 56.9와

57.3%로 유의적 차이가 없었다. 그리고 마리당 평균 채란수는 각각 12.6 및 11.8개로서 무처리우에서의 3.7개에 비하여 유의적($P < 0.05$)으로 많았다. 채란된 난포란의 등급별 분류에서도 FSH 감량분할처리군과 단일처리군간에 유의적 차이는 없었으며, grade I, II에 해당하는 난포란이 각 처리군에서 5.1(40%) 및 4.3(37%)개였다.

이상과 같은 결과로 보아 한우에서 초음파를 이용하여 난자를 채란할 때는 FSH-단일처리 방법이 양질의 난포란을 많이 회수하는데 실용적일 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bols PEJ, Vandenheeds JMM, Van Soom A and de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick-up(OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43:677-687.
- Brogliatti GM and Adams GP. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, 45: 1163-1176.
- Bungartz L, Lucas-Hahn D, Rath D and Niemann H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and different reproductive stages. *Theriogenology*, 43:667-675.
- Dattena M, Vespignani S, Branca A, Gallus M, Ledda S, Naitana S and Cappai P. 1994. Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrous ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 42:235-239.
- DeCherney AH and Laufer N. 1984. The monitoring of ovulation induction using ultrasound and estrogen. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 27:993-1002.
- Downing B. 1984. Oocyte pick-up In: Wood C, Trounson A (eds). *Clinical In Vitro Fertilization*. Berlin: Springer Verlag, 2-81.
- Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE and Gwazdauskas FC. 1994. Effect of one versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 2:405-419.
- Holland EJ, Bindon BM, Piper LR, Thimonier J, Cornish KA and Radford HM. 1981. Endoscopy in cattle: techniques for ovarian examination by the paralumbar and mid-ventral routes. *Anim. Reprod. Sci.*, 4:127-135.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization(IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
- Lopez-Sebastian A, Gomez-Brunet A, Lishman AW, Johnson SK and Inskeep. 1993. Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH. *J. Reprod. Fertil.*, 99:437-442.
- Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB and Godke RA. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.*, 73:967-974.
- Moor RM and Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fertil.*, 49:101-109.
- Pierson RA and Adams GP. 1995. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction : Strange bedfellows. *Theriogenology*, 43:105-112.
- Pierson RA and Chizen DR. 1991. Transvaginal ultrasonography in the evaluation and management of infertility. *J. Soc. Ob. Gyn. Canada.*, 13:37-49.

- Pierson RA, Chizen DR and Olatunbosun OA. 1994. Ultrasonographic assessment of ovulation induction. In imaging in reproductive endocrinology and infertility. Jaffe R, Pierson RA, Abramowicz JS(Eds). Lippincott, Philadelphia, P.A., 55-166.
- Pieterse MC and Kappen EA. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip AM and Wurth YA. 1991. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG treated cows. *Theriogenology*, 35:19-24.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip AM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willmense AH and Taverne MAM. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows. *Theriogenology*, 37:273 abstr.
- Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Paterson C and Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet. Rec.*, 134:440-443.
- Sirard MA, Lambert RD, Beland R and Bernard C. 1985. The effects of repeated laparoscopic surgery used for ovarian examination and follicular aspiration in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 9:25-30.
- Stubbings RB, Liptrap RM, Betteridge KJ, Walton JS, Armstrong DT and Basrur PK. 1990. Requirements for bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reprod. Dom. Anim.*, 25:158-166.
- Stubbings RB and Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 43:705-712.
- Suzuki T. 1993. Bovine embryo transfer an related techniques. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:236-237.
- Walton JS, Christie KA and Stubbings RB. 1993. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on ovarian dynamics. *Theriogenology*, 39:336.
- Takedomi T, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Taya K, Watanabe G and Sasamoto S. 1994. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 42:1259-1268.
- Van der Schans A, Van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, Eyestone WH and de Boer HA. 1991. Ultrasound guided transvaginal collection in the cow. *Theriogenology*, 35:288. abstr.
- Watersone JW and Parson JH. 1992. A prospective study to investigate the value of flushing follicles during transvaginal ultrasound-directed follicle aspiration. *Fertil. Steril.*, 57:221-223.
- 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 광대오, 이효중, 최상용. 1994. 체외성숙, 수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유유이식에 의한 산자생산. *한국가축번식학회지*, 18:47-54.
- 박충생, 조성근, 강태영, 최창용, 손우진, 박성재, 공일근, 이정규, 최민철, 이효중, 최상용. 1997. 젖소의 초음파 유도 채란율에 대한 FSH 전처리 효과의 비교. *한국가축번식학회지 (논문게재 중)*.
- 이병천, 이강남, 김남렬, 황우석. 1996. 송아지 난소에서 초음파유도에 의한 한우의 미성숙난자 채취시에 bST-FSH 처리효과에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 11:103-109.
- 정연승, 권오경, 이병천, 황우석, 中尾, 森好, 中田. 1996. Ultrasonic characteristics of morphological structure on bovine ovaries. *한국수정란이식학회지*, 11:51-69.
- 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기,

전병준, 이강남, 신인익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 8:143-149.

(접수일자: 1997. 7. 28 / 채택일자: 1997. 8. 19)