韓國受精卵移植學會誌(1998) 第 13 卷 第 3 號
Korean J. Emb. Trans. (1998) Vol. 13, No. 3 pp. 207~212

한우에 있어서 PEG에 용해시킨 Folltropin-V의 1회 피하주사에 의한 다배란 유기

임석기 · 우제석 · 전기준 · 장선식 · 강수원 · 윤상기 · 손동수
축산기술연구소

Superovulation in Korea Cattle with a Single Subcutaneous Injection of Folltropin-V Dissolved in Polyethyleneglycol

S. K. Im, J. S. Woo, G. J. Jean, S. S. Chang, S. W. Kang, S. K. Yun and D. S. Son
National Livestock Research Institute, R.D.A.

SUMMARY

This study was conducted to determined if single subcutaneous (s.c.) injection of Folltropin-V dissolved in polyethyleneglycol (PEG) can replace as the standard multiple intramuscular (i.m.) injection. The results suggest that the s.c. treatment produced more corpora lutea, embryos recovered and transferable embryos as compared to the i.m. treatment ($p<0.05$).

This study indicates that a single s.c. injection of Folltropin-V dissolved in PEG was effective for superovulatory response and embryo yield in Korean cattle.

(Key words : superovulation, single injection, Folltropin-V, polyethyleneglycol)

서 론

소에 있어서 다배란처리의 주요 목적은 유전형질이 우수한 자우를 많이 생산하기 위한 가능성이 높은 정상수정란을 최대한으로 얻기 위함이다.

그러나 수정란이식 기술의 산업화에는 많은 제한요인이 있다(Armstrong, 1993). 다배란처리에 따른 난소반응의 변이성은 발정주기중 호르몬처리 개시일(Nasser 등, 1993), 공란우의 호르몬감수성(Shea 등, 1984) 및 투여호르몬량(Pawlyshyn 등, 1986)에 의하여 좌우된다. 공란우에 대한 다배란처리는 PMSG(pregnancy mare serum gonadotropin)로 1회 근육주사 또는 뇌하수체에서 추출한 FSH(follicle stimulating hormone)를 1일 2회 투여하는 방법을 사용하여 왔으나 성선자극호르몬은 복합당단백질로 sialic acid가 함유되어 반감기를 길게(약 120시간)하므로서 제2차 난포를 발육시켜 estrogen을 분비하여 수정란의 질을 저하(Monnianx 등, 1983)시킨다.

한편 FSH의 반감기는 4.5~5시간으로 짧아(Demoustier 등, 1988) 자주 주사해야 할 필요가 있으며 1일 1회 주사보다는 1일 2회 주사하는 방법이 더 좋은 난소반응성적을 얻었다고 보고하였다(Wolsh 등, 1993).

수정란이식의 효율성에 영향을 주는 요인중 가장 중요한 것은 공란우의 난소반응에 대한 변이성으로, 이는 공란우에 스트레스를 줄 경우 난소반응이 저하되므로(Edwards 등, 1987) 난소반응을 증진시키고 노동력 감소 및 제반 경비를 절약하기 위하여 간단한 다배란처리법이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 다배란처리의 간편한 방법을 개발하기 위하여 LH가 80% 이상 제거된

Table 1. Chemical composition and nutritive value of diets (unit : %)

Feeds	DM	CP	EE	NFE	C.Filber	C.Ash	TDN
Cornsilage	25.20	2.45	0.90	12.21	8.09	1.57	16.51
Grass	19.80	3.00	0.80	8.50	5.60	1.90	12.86
Concentrate	87.80	13.20	4.10	53.40	10.70	6.40	69.0

FSH(Folltropin-V)를 polyethyleneglycol에 용해하여 1회 피하주사후 공란우의 난소반응을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

본 시험에 공시된 공란우는 축산기술연구소 대관령지소에서 사육중인 한우 성빈우중 생식기의 상태가 양호하고 정상 발정주기가 2회 이상 확인된 경산우를 사용하였다.

2. 공란우 사양관리

공란우의 사양관리는 사사기에는 대관령지소에서 관리하는 방법인 08:00~09:00시와 17:00~18:00시 사이에 옥수수 사일레지(20.0kg/두/일/)와 농후사료(2.5kg/두/일/)를 급여하였으며 물은 자유음수 시켰다. 또한 방목기에는 방목지에서 청초를 자유채식시켰으며 농후사료는 급여하지 않았다. 급여사료의 영양가와 화학적 조성은 Table 1과 같다.

3. 용매제 및 희석방법

본 시험에 사용된 용매제는 polyethyleneglycol (PEG, Fisher Biotech, U.S.A : M.W. 8000)로 Folltropin-V (Vetrepharm, Canada)를 희석하기 위해 동봉된 20㎖ 생리식염수를 이용하여 PEG 30% (w/v) 용액을 만들어 동일 생리식염수 1ml로 희석한 NIH-FSH-Pl Folltropin-V 400 mg과 30% PEG용액 9ml를 주사기로 취하여 여러번 흔들어 잘 섞은 다음 사용하였다.

4. 공란우의 다배란처리 및 인공수정

다배란처리는 발정주기 11일째 400mg NIH-FSH-Pl Folltropin-V를 대조구는 생리식염수에 용해시켜 12시간 간격으로 1일 2회 50mg씩 4일간 근육주사하였으며, 처리구는 PEG 30%용액에 용해시켜 견갑부에 1회 피하주사하였다. 발정유기를 위하여 Folltropin-V 처리 개시후 48시간에 $PGF_{2\alpha}$ 25mg(SANOFI Sante Nutrition Animale, France)을 근육주사하였으며 48시간후 발정을 확인하여 발정이 확인된 개체는 12시간후 12시간 간격으로 2회 2 straw씩 인공수정을 실시하였다. 사용된 동결정액은 축협중앙회 개량사업본부 한우개량부에서 생산된 보증종모우 동결정액을 이용하였다.

5. 수정란 회수

다배란 처리된 공란우의 발정발현 7~8일째에 lidocaine hydrochloride (2% Lidocaine, Jeil Pharm. Co., Korea) 8ml로 경막외 마취를 실시하여 숙분을 제거한 다음 난소를 검사하여 황체의 수를 조사하였다. 수정란회수는 Foley catheter (Agtech, Rusch, U.S.A)를 경관 경유법으로 자궁체에 고정한 다음 Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco. BRL Life Technolgies, U.S.A)이 1% 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Gibco, BRL Life Technolgies, U.S.A)용액을 사용하여 비외과적 방법으로 관류액을 수정란회수기(Embryo Collector, Fujihira Industry Co., Japan)로 회수하였다.

6. 수정란 평가

관류된 채란액을 87×15mm 멸균 petri dish(녹십자, 한국)에 옮겨 11~64배율의 실체현미경(Olympus, Japan)으로 수정란을 회수한 다음 20%의 FBS가 첨가된 D-PBS용액이 들어있는 35×10mm tissue culture dish(Falcon, Becton Dickinson Co., U.S.A)로 옮겨 Linder와 Wright (1983)의 기준에 따라 수정란을 발육단계와 질을

Table 2. Superovulatory responses

Items	Single injection(treatment)	Multiple injection(control)
No. of cows	10	10
No. of cows detected in estrus	10	10
Corpora lutea	24.8[a]	12.6[b]
Embryos recovered	19.5[a]	8.8[b]
Transferable embryos	9.9[a]	5.4[b]

[a,b] Different superscripts with the same column denote significant differences($p<0.05$).

형태학적으로 평가하였다. 수정란의 발육단계는 상실배기(morula), 배반포기(blastocyst) 및 확장배반포기(expanded blastocyst)로 구분하였으며, 수정란의 질은 우수(excellent), 우량(good), 보통(fair) 및 불량(변성란 및 미수정란)으로 구분하였고 이중 우수, 우량 및 보통을 나타내는 수정란을 정상수정란으로 간주하였다.

7. 혈액채취 및 혈청분리

공란우의 혈액은 발정일, 다배란처리전일, 다배란처리일, 채란일에 각각 경정맥으로부터 채취하여 실온에서 2시간 보관후 원심분리(2,500rpm, 15분)하여 혈청을 분리한 후 호르몬분석전까지 -20℃이하에서 보존하였다.

8. 혈중 progesterone농도 분석

혈청중 progesterone농도는 Immuchen direct progesterone RIA kit(ICN Biomedicals, Inc. U.S.A)를 이용한 radioimmunoassay(RIA)법으로 반응시킨 다음 y-counter(Cobra, U.S.A)로 측정하여 계산하였다.

9. 통계분석

본 실험결과의 통계분석은 Chi-sequare 검정에 의하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 공란우 난소반응 및 수정란회수

Table 2는 다배란유기 처리에 따른 공란우의 난소반응 및 수정란회수 성적을 나타내었다.

Table 2에서 보는 바와 같이 발정유기율은 대조구에서는 10두를 다배란유기하여 100% 발정이 유기되었으며 처리구인 1회 피하주사에도 역시 100% 발정이 유기되어 다배란유기시 공란우의 발정유기에는 전혀 문제가 없었다. 이와 같은 결과는 Bo 등(1994)이 1회처리 및 다회처리에서 각각 100% 및 77.8%의 발정유기율을 나타냈다는 보고와 비교할 때 1회 처리에서는 일치된 성적을 나타냈으나 4일간 다회처리시는 본 시험에서 높은 발정 유기율을 나타냈으며 또한 Takedomi 등(1993)이 25% PVP 용액에 p-FSH를 용해후 1회 주사에 의하여 100% 발정이 유기되었다는 보고와 일치하는 경향이었다.

그러나 Walsh 등(1993)이 p-FSH를 이용하여 4일간 호르몬처리후 81.3%의 발정유기율을 나타냈다는 보고보다 높은 발정유기율을 나타내었다. 이는 처리호르몬 종류 및 공란우의 호르몬에 대한 감수성의 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

한편 수정란 회수성적을 살펴보면 1회 피하주사구 및 1일 2회 4일간 다회주사구에서 황체수, 총회수란수 및 정상수정란수는 각각 24.8, 19.5, 9.9개 및 12.6, 8.8, 5.4개로 처리구간의 유의차($p<0.05$)가 인정되었다.

이와 같은 결과는 Hockley 등(1992)은 생리식염수에 Folltropin을 용해하여 견갑부 1회 피하주사에 의하여 황체수, 총회수란수 및 정상수정란수가 각각 23.3, 15.2 및 9.5개였다고 보고하였으며, Walsh 등(1993)은 p-FSH를 이용하여 1회 주사시 7.7, 4.9 및 3.4개 1일 2회 4일간 주사시 16.4, 9.6 및 6.0개를 얻었다고 보고하였으며 Tribulo 등(1993)은 400mg Folltropin-V를 1회 피하주사시

황체수가 44.1개 1일 2회 4일간 주사시 36.3개로 1회 피하주사 방법이 좋은성적을 나타냈다고 하였으며 Kasiraj 등(1992)은 52.5mg Folltropin-V을 1회 피하주사시 황체수 총회수란수 및 정상수정란수가 5.2, 2.7 및 1.7개였으며 4일간 점감투여시 6.2, 2.0 및 1.0개였다고 보고하였고 Dattena 등(1994)은 16mg p-FSH을 PVP 30% 용액에 용해후 1회주사시 황체수는 8.6개, 4일간 다회투여시 7.8개였고 정상수정란율은 각각 84% 및 68.2%로 1회 주사방법이 좋은 성적을 나타냈으며 Yamamoto 등(1994)은 30mg FSH-R을 PVP 30% 용액에 용해후 1회 근육주사에 의하여 황체수, 총 회수란수 및 정상수정란수가 각각 10.7, 8.3 및 6.2개, 28mg FSH-R 다회주사에 의하여 각각 12.3, 10.1 및 5.8개의 성적을 얻었다고 보고하여 처리구간에 비슷한 성적을 나타냈으며 Bo 등(1994)은 400mg Folltropin-V를 1회 주사시 황체수, 총회수란수 및 정상수정란수가 각각 26.8, 9.0 및 2.5개였고 4일간 다회주사시 20.7, 11.3 및 4.8개를 얻었다고 보고하여 연구자간에 다소의 차이를 나타냈으나 이는 처리시기, 주사부위, 투여호르몬 종류, 공시축 품종 등의 차이에서 기인된 것으로 오히려 본 연구에서 정상수정란의 생산이 훨씬 좋은 것으로 나타났다.

Table 3은 PEG 30% 용액에 희석한 Folltropin-V의 1회 투여시 개체차에 의한 호르몬의 감수성의 차이에 의해 성적차가 있었는지를 알아보기 위하여 동일 공란우에 첫번째 다배란유기는 다회주사방법을 사용했고 60~100일 정도의 간격을 두고 두번째는 1회 다배란유기 방법을 사용하여 얻은 성적을 비교한 결과이다.

Table 3에서 보는 바와 같이 PEG 30% 용액에 희석하여 1회 주사구는 황체수, 총회수란수 및 정상수정란수가 33.0, 26.3 및 11.5개였고 saline에 희석하여 다회 주사한 구는 14.3, 10.3 및 5.7개로 유의차 ($p<0.05$)가 인정되었다. Gordon(1982)은 호르몬 반복처리시 난소반응이 저하된다고 하였고 Almeida (1987)도 반복처리에 의하여 황체수와 채란수에 유의성은 없으나 감소한다고 하였으며 정 등 (1983)은 반복처리의 총 회수란수는 2차와 3차처리간에 통계적 유의차가 있었다고 하였고 김 등 (1997)은 FSH-P로 반복처리의 경우 3회째에서 현저히 감소되어 통계적 유의성이 있었다고 하였으나 Moor 등 (1984)은 반복처리가 배란율, 이식가능 수정란수 및 수정란의 질에 영향을 미치지 않는다고 하였고 양 (1994)도 반복처리에서 총 회수란수 및 이식가능 수정란수에 있어서 큰 차이가 없다고 보고하였다.

따라서 본 연구결과는 위의 보고자들과 상반된 결과를 나타내고 있는데 그 원인은 다배란처리 방법에 따른 공란우의 호르몬에 대한 반응차, 즉 PEG가 Folltropin의 체내 흡수시간을 연장시켜 일정한 수준을 유지해 주기 때문인 것으로 생각한다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 한우에 있어서 Folltropin-V로 다배란처리시 PEG 30% 용액에 희석후 견갑부 1회 피하주사하는 방법이 체내 정상수정란의 생산효율을 극대화 할 것으로 생각한다.

적 요

본 연구는 한우에 있어서 다배란처리에 의한

Table 3. Embryo yield in the same donor

Items	Single injection(second time)	Multiple injection(first time)
No. of cows	4	4
No. of detected in estrus	4	3
Corpora lutea	33.0[a]	14.3[b]
Embryos recovered	26.3[a]	10.3[b]
Transferable embryos	11.5[a]	5.7[b]

[a,b] Different superscripts with the same column denote significant differences($p<0.05$).

체내 정상수정란의 생산효율을 극대화하기 위하여 PEG에 용해한 FSH의 1회 피하주사 방법이 현재 사용하고 있는 1일 2회 4일간 근육 주사방법을 대체할 수 있는지를 결정하기 위하여 실시하였다.

연구결과 다회 근육주사 방법과 비교하여 1회 피하주사 방법이 황체수, 총 회수란수 및 이식가능 수정란수에 있어서 현저히 증가($p<0.05$)하였다. 따라서 한우에 있어서 PEG에 용해시킨 Folltropin-V의 1회 피하주사 방법이 효과적이라고 사료된다.

참고문헌

Almeida AP. 1987. Superovulatory responses in dairy cows repeatedly treated with PMSG. Theriogenology, 27:205(Abstr.).

Armstrong DT. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. Theriogenology, 39:7-24.

Bo GA, Hockley DK, Nasser LF and Mapletoft RJ. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. Theriogenology, 42:963-975.

Dattena M, Vespignani S, Branca A, Gallus M, Ledda S, Naitana S and Cappai P. 1994. Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. Theriogenology, 42: 235-239.

Demoustier MM, Becker J-F, Van Der Zwalmen P, Clossect J, Gillard J-L and Ectors F. 1998. Determination of procine plasma folltropin levels during superovulation treatment in cows. Theriogenology, 30:379-386.

Edwards LM, Rahe CH, Griffin JL, Wolfe DF, Marple DN, Cummings KA and Pitchett JF. 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers, Theriogenology, 28:291-299.

Gordon I. 1982. Synchronization of estrus and superovulation in cattle. In : Mammalian Egg Transfer. ed. C.E. Adams. CRC Press Inc., Bosa Raton, Florida, pp. 63-80.

Hockley DK, Bo GA, Palasz AT, Del campo MR and Mapletoft RJ. 1992. Superovulation with a single subcataneous injection of Folltropin in the cow : Effect of dose and site of injection. Theriogenology, 37:224 (Abstr.).

Kasiraj R, Mutha Rao M, Rangareddi NS and Misra AK. 1992. Superovulatory response in buffaloes following single subcutaneous or multiple intramuscular FSH administration. Theriogenology, 37:234(Abstr.).

Linder GM and Wright RW, Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology, 20:407-416.

Monniaux D, Chupin D and Saumande J. 1983. Superovulatory responses of cattle. Theriogenology, 19:55-81.

Moor RM, Kruip Th AM and Green D. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation. Theriogenology, 21:103-116.

Nasser LF, Adams GP, Bo GA and Del Campo MR. 1992. The effect of LH content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers. Proc. 12th International Congress on Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands, 1:237-239.

Pawlyshyn V, Lindsell CE, Braithwaite M and Mapletoft RJ. 1986. Superovulation of beef cows with FSH-P : a dose response trial. Theriogenology, 25:179 (Abstr.).

Shea BF, Janzen RE and McDermand DF. 1984. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. Therio-

genology, 21:186-195.

Takedomi T, Aogagi Y, Konish M, Kishi H, Taya K, Watanabe G and Sasamoto S. 1993. Superovulation in Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. Theriogenology, 39:327 (Abstr.).

Tribulo H, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Tribulo R and Bo GA. 1993. Superovulation in bos indicus cattle with a single subcataneous injection of commercial pituitary extracts. Theriogenology, 39:331(Abstr.).

Walsh JH, Mantovani R, Duby RT, Overstram EW, Dobrinsky JR, Enright WJ, Roche JF and Boland MP. 1996. The effects of once or twice daily injection of p-FSH on superovulatory response in heifers. Theriogenology, 40:313-321.

Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M and Suzuki T. 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. Theriogenology, 41:747-755.

김홍률, 김덕임, 박노형, 김창근, 정영재, 윤종택, 전광주. 1997. 한우에서 FSH-P와 SUPER-ov에 의한 체내수정란 생산에 관한연구. Ⅰ. 다배란처리 조건에 따른 체내수정란 생산에 영향을 미치는 요인. 한국수정란이식학회지, 12(1):37-48.

양보석. 1994. 체내 및 체외 소 수정란의 임신율에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문.

정길생, 박흠대, 노환철, Richard A. Carmichael. 1983. 수정란이식에 의한 우의 쌍태 유기에 관한 연구. Ⅱ. 다배란처리의 반복이 난소반응과 수정란의 발달에 미치는 영향. 한국축산학회지, 25(4) : 267-271.

(접수일자 : 1998. 8. 31/채택일자 : 1998. 12. 21)