

---

碩士學位論文

Mouse 受精卵의 簡易凍結에 의한  
生存率 向上에 관한 研究

濟州大學校 大學院

畜産學科



1989 年 6 月

---

STUDIES ON IMPROVEMENT OF EMBRYOS  
SURVIVAL FOR SIMPLIFIED PROCEDURES  
OF FREEZING IN MOUSE EMBRYOS

Kyoo-Hoon, Lee

(Supervised by Professor Jung-Kye. Kim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE

GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1989

# Mouse 受精卵의 簡易凍結에 의한 生存率 向上에 관한 研究

指導教授 金 重 桂

李 揆 勳

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

1989年 月

李揆勳의 農學 碩士學位 論文을 認准함.



JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

審査委員長	金 承 浩
委 員	康 珉 香
委 員	金 重 桂

濟州大學校 大學院

1989年 月

# 目 次

Summary .....	1
I. 緒 論 .....	3
II. 研 究 史 .....	5
1. 過排卵 誘起 .....	5
2. 耐 凍 劑 .....	6
3. 凍 結 方 法 .....	8
4. 植水(seeding) .....	12
5. 受精卵의 發育段階 .....	13
6. 受精卵의 生死判定 .....	14
III. 材 料  및  方 法 .....	16
1. 試驗期間 및 場所 .....	16
2. 供試動物 및 飼養管理 .....	16
3. 實驗方法 .....	16
4. 統計處理 .....	21
IV. 結 果  및  考 察 .....	22
1. 過排卵 誘起 .....	22
2. 簡易凍結 過程 .....	24
3. 卵자의 形態 및 發育段階別 生存率 .....	32
V. 摘 要 .....	37
Reference .....	38
謝 辭 .....	40

## Summary

This study was carried out to develop a simple freezing procedures for mouse embryos. Effects of the level of treated hormone on the number of follicles, blood follicles and ovulation points in superovulated mice were investigated. Effects of sucrose as a cryoprotetant, various freezing methods(1-F; 0.3 °C/min, 2-F; 3-5 °C/min, 3-F; 15 °C/min, 4-F; liquid nitrogen vapour) using a LN<sub>2</sub> container, cell freezer and seeding methods (pincette, no seeding, liquid nitrogen gas phase and copper wire coiled straw) on embryo survival using the FDA-test were determined

The summarized results are as follows:

1. The number of ovulation points(the recovery rate of embryos, %) in mice injected with 5, 6, 8 and 10IU of PMSG was 22.6(94.2), 19.7(90.4), 20.2(81.7) and 22.2(67.1), respectively. There was significant ( $P < 0.05$ ) differences in the number of ovulation point and the recovery rate of embryos.
2. FDA score was similar( $P > 0.05$ ) between embryos frozen in a glycerol medium with and without sucrose(3.4 vs 3.0).
3. FDA score of embryos frozen in a glycerol medium with sucrose was 3.6, 3.6, 3.3 and 3.0 for Cu-seeding, no-seeding, pincette-seeding and LN<sub>2</sub>-seeding, respectively. This result indicated that seeding was not needed to improve embryo survival during freezing.
4. FDA score of embryos frozen using 1-F, 2-F, 3-F and 4-F was 3.8, 3.2,

- 3.6 and 3.2, respectively. Significant differences ( $P > 0.05$ ) were detected between 1-F and 2-F or 4-F.
5. No difference was found between FDA scores observed in embryos frozen in a cell freezer(4.0) and liquid container(3.7).
  6. Morphologically determined FDA scores of embryos as excellent, good and bad were 4.1, 1.9 and 0.5, respectively and significant differences were found among them( $P < 0.01$ ).
  7. FDA score of embryos frozen and thawed in a medium containing sucrose at morula stage, blastocyst stage and early stage was 3.8, 3.2 and 2.7, respectively. Significant( $P < 0.05$ ) differences were found among them.
  8. Above results indicate that freezing embryos at  $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$  or  $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  is better than freezing at  $3\text{-}5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and liquid nitrogen vapour and liquid nitrogen container was as good as cell freezer in freezing embryos.



## I. 緒 論

家畜의 品種이나 能力을 改良할 目的下에 오늘날 低溫 生物學의 發達과 함께 家畜 人工 授精은 1952年 Polge and Rowson 에 의하여 牛 精液의 凍結 保存 成功 以來 優秀한 種牝畜의 遺傳 形質을 家畜 改良에 活用하는 方法이 普遍化 되어 왔다.

그러나 家畜 改良을 加一層 增大시키기 위해서는 優秀한 種牝畜의 遺傳 形質을 效率的으로 利用할 수 있어야 하는데 이를 위한 方法이 家畜 受精卵 移植 技術로서 이러한 技術을 처음 導入한 사람은 英國의 Heape (1980) 였으나 그후 卵子の 移植에 關한 研究는 별 進展 없이 小康 狀態에 있었다. 그런데 Pineus(1930)가 家兔의 卵子を 試驗管内에서 保存하여 實驗한 以後 本格的으로 遂行되어 왔으며 最近에는 美國, 캐나다, 호주를 비롯한 유럽 各國에서 大家畜의 凍結 受精卵 移植이 産業化 段階에 이르고 있는 實情이나 現在 그 受胎率은 낮은 水準이다.

한편, 우리나라에서 受精卵 移植의 研究는 1970年代에 畜産試驗場에서 家兔, 山羊을 對象으로 試圖되었으며, 大家畜에 대해서는 1980年代에 들어오면서 本格的으로 各 研究 機關과 大學등에서 活發하게 研究가 施行되어 왔으나 受精卵 移植 技術에서 重要視 되고 있는 受精卵 凍結에 관하여서는 初步 段階에 머무르고 있다.

그리고 受精卵의 凍結, 耐凍劑 添加 및 除去 方法등은 複雜하여 確固하게 定立되지 못하였으므로 이에 대한 簡素化와 生存率 및 移植한 後 分娩率 向上은 時急한 課題로 思料된다.

그러므로 本 試驗은 家兔에서 얻어진 結果를 利用하여 受精卵의 凍結에

複雑한 과정을 簡素化 시키기 위해서 mouse 를 供試 動物로 하여 PMSG 處理 水準에 따른 卵巢의 反應과 耐凍劑의 種類, 植氷 및 凍結 方法에 따른 mouse 受精卵이 生存率 向上에 미치는 影響을 究明하는데 그 目的을 두고 實施하였다.



## Ⅱ. 研 究 史

家畜改良을 위한 受精卵 移植 技術에 대한 研究는 英國의 Heape(1890)가 Angora 種의 卵管에서 回收한 4細胞胚를 Belgian 種에 移植하여 新生仔를 分娩케 하므로써 哺乳動物에 대한 受精卵 移植 技術이 成功하게 되었다. 그후 Smith and Engle (1927)은 性腺刺戟 hormone 劑를 投與하여 rat 와 mouse 에서 처음으로 過排卵을 誘起시켰으며 1970年代 初부터는 低溫 生物學의 發展과 더불어 家畜改良, 增殖 그리고 尖端 技術的인 方向에서 受精卵 凍結 研究가 進行되어 왔다. Whittingham et al (1972)이 mouse 의 受精卵을  $-196^{\circ}\text{C}$ 까지 凍結 融解하여 移植한 結果 65.0%의 受胎率을 얻은 後부터 受精卵 移植 技術은 많은 學者들의 關心을 끌기 始作했다.

### 1. 過排卵 誘起

過排卵 誘起를 처음 試圖한 사람은 Smith and Engle (1927)인데 그는 mouse 의 皮下에 腦下垂體 抽出物을 投與하여 19.0~20.0個의 排卵點을 確認하였다. 그후 發情 誘起를 爲해서는 FSH (Takahashi et al, 1981; 金과 鄭, 1985),  $\text{PGF}_2\alpha$  (羅, 1981; 鄭 등, 1983a), PMSG (Shiraishi et al, 1981; 陳 등, 1986a; Kasai et al, 1980; Williams and Johnson, 1986) 등이 研究되고 있는데 이중 FSH와 PMSG를 現在 많이 利用하고 있으며 發情이 誘起된 後 排卵 促進을 위하여는 HCG를 주로 使用하였다.

Ito and Katsuhiko (1974)는 mouse 에 PMSG를 1~10 IU를 注射하고 50時間 後에 HCG를 皮下 注射한 結果 PMSG와 HCG를 1IU 注射

한 處理區에서는 受精卵이 平均  $14.3 \pm 3.9$  個, 5 IU 處理區에서는  $22.0 \pm 11.3$  個, 10 IU 處理區에서는  $41.0 \pm 12.6$  個를 採卵했으며 PMSG 量을 增加시킬수록 回收된 卵자의 數는 增加했고, 曹동 (1987) 은 PMSG 5 IU 와 HCG 5 IU를 48時間 間隔으로 注射하여 左側 卵巢에서 排卵點 21.1 個, 右側 卵巢에서 21.6 個였고 回收率은 79.5% (平均 34.0 個) 였다고 하였다.

Sasamoto and Murakami (1961) 는 어린 mouse (體重 7.0 ~ 10.0 g) 에 PMSG 와 HCG를 1.25 ~ 10 IU를 注射한 바 1.25 IU는 1.0 ~ 5.7 個, 2.5 IU 0.3 ~ 5.7 個, 5 IU 2.7 ~ 9.1 個, 10 IU 15.0 ~ 18.9 個로 成熟한 mouse 에 比하여 낮은 排卵數를 얻었다고 報告하였다.

## 2. 耐 凍 劑

受精卵 凍結에 있어서 耐凍劑로는 細胞膜을 透過하여 内部 細胞를 保護하는 溶質 (DMSO, glycerol, ethylen glycol, erythritol 등) 과 外部 細胞를 保護하는 不透過性 溶質 (sucrose, glucose, raffinose, albumin 등) 로 區分할 수 있다 (Szell and Shelton, 1986 b).

Whittingham et al (1972) 이 DMSO 를 利用하여 mouse 의 受精卵을 凍結하는 方法이 成功한 以來 初期에는 DMSO 를 耐凍劑로 주로 使用하여 왔으나 (Willmut, 1972; Leibo et al, 1974; Miyamoto and Ishibashi, 1978; Kasai et al, 1980), Bilton and Moore (1976) 가 山羊 受精卵의 凍結에서 처음으로 glycerol 이 耐凍劑로 效果가 있음이 確認되므로서 glycerol 에 대한 많은 研究가 遂行되어 왔다. (Miyamoto and Ishibashi, 1977, 1978, 1979; Merry et al, 1983; Miyamoto et al, 1986).

그 후 glycerol 이 受精卵 凍結에서 重要な 耐凍劑로 알려지게 되었으나 研究者들 間에는 一致된 成績을 얻지 못하고 있다. Kasai et al (1981), Schmidt et al (1985), Urano et al (1986), Miyamoto et al (1986) 등은 mouse 受精卵에서 glycerol 이 DMSO보다 優秀하다고 報告했는데 특히 Miyamoto et al (1986)은 glycerol에서 78.0%, DMSO에서 27.0%의 生存率을 各各 얻어 glycerol 이 DMSO보다 顯著히 良好한 耐凍劑라고 報告하였고 Miyamoto and Ishibashi(1979), 陳 등, (1986)은 DMSO와 glycerol 間에는 별 차이가 없다고 報告하고 있다. 그러나 Urano et al (1986)은 mouse 胚에서 glycerol을 耐凍劑로 使用하여 27.6~50.0%, DMSO에서는 60.0~66.7%의 生存率을 얻어 glycerol보다는 DMSO가 良好하다고 報告하였다. 또한 Parkening et al (1976), Miyamoto and Ishibashi (1978), Leibo et al (1978), Takeda and Elsdon (1982), 曹 등 (1987)도 mouse 受精卵 凍結에 있어서 glycerol보다는 DMSO에서 受精卵의 生存率이 良好하다고 報告하였다. 이외의 耐凍劑로서는 ethylene glycol (Miyamoto and Ishibashi, 1977, 1978; Miyamoto et al, 1986; Urano et al, 1986)과 erythritol (Miyamoto et al, 1986; Urano et al, 1986) 등이 實驗되고 있으나 現在 受精卵 凍結에 있어서는 glycerol을 더 많이 利用하고 있는 實情이다.

最近에는 細胞內에 浸透되지 않고 滲透壓 衝擊을 緩衝시켜 外部 細胞膜을 保護하는 sucrose를 同時에 添加하여 높은 受精卵 生存率이 Kasai et al (1980)에 의해 報告된 以來 mouse를 利用한 研究가 계속적으로 이루어지고 있다. (Miyamoto et al, 1986; Williams and Johnson, 1986), 凍結液에 sucrose를 使用하면 凍結 前 細胞內에 自由水를 脫水시켜 外部

細胞膜을 保護하게 되는데 (Wood and Farrant, 1980), 研究者에 따라서는 耐凍劑와 함께 添加하여 受精卵의 脫水作用에 耐凍劑로 使用하였고 (Miyamoto et al, 1986; Chupin and Reviere, 1986), 耐凍劑 除去液 (Kasai et al, 1980; Chupin and procureur, 1984) 그리고 耐凍劑 添加 및 除去液 (Williams and Johnson, 1985; 1986) 등으로 多樣하게 利用되고 있다. Kasai et al (1980), Chupin and Reviere (1986) 는 sucrose 를 耐凍劑 添加 및 除去液으로 使用하여 82.0 ~ 96.4 %의 높은 生存率을 얻은 바 있다.

따라서 sucrose 를 耐凍劑 除去에 利用하면 滲透壓의 差異에 의하여 受精卵內의 耐凍劑를 瞬間적으로 外部 變化 없이 除去하게 되므로서 one - step 方法이 可能하다고 하였다. (Leibo, 1983, 1984; Renard et al, 1983; Merry et al, 1983). 이러한 one - step 方法은 Kasai et al (1980)이 mouse 受精卵를 融解한 後 sucrose 添加液을 利用하여 簡單한 耐凍劑 除去法이 有效하다고 報告한 後 Leibo (1983), Renard et al (1983) 그리고 鈴木 등 (1984)은 sucrose 를 利用한 one - step straw 를 製造하였으며, Szell and Shelton (1986a, b)은 이 方法을 利用하여 mouse 受精卵에서 80.0 - 92.0 %의 生存率을 얻었고, Williams and Johnson (1986)도 역시 같은 方法으로 86.0 %의 높은 生存率을 얻었으며 現在는 實用化 段階에 접어 들고 있다.

### 3. 凍結 方法

受精卵의 凍結 方法에 있어서 緩慢 凍結 (0.3 ~ 1 °C/min) 과 LN<sub>2</sub> (液體窒素: liquid nitrogen) 上面에서 直接 凍結시키는 急速 凍結이 있는데 요즘은 緩慢 凍結 方法을 變形시킨 two - step 凍結法 (3 ~ 15 °C

1/min)도 施行되고 있다.

그후 受精卵의 緩慢 凍結은 Whittingham (1975)이 rat에서  $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 凍結했을 때 57.0 ~ 65.0 %,  $0.6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서는 73.0 ~ 84.0 %의 生存率을 얻었다고 報告하였다.

또한 Moore and Bilton (1973)은  $0.22\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 緩慢 凍結 方法으로 mouse 受精卵를 凍結시켜 64.7 %의 生存率을 얻었고, Miyamoto and Ishibashi (1979), Massip et al (1984)은  $0.3\sim 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 凍結하여 43.0 ~ 88.0%의 生存率을 얻었다고 發表하였다.

急速 凍結 方法으로는 Massip et al (1984), 柳와 李 (1984) 등이 報告한 바 있으며, Nakagada and Toyoda (1980)는 mouse의 受精卵를  $0.22\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 凍結시켰을 때 85.0 %의 生存率을 얻었고,  $0.67\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 凍結시킬 때는 29.0 %,  $23\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 急速 凍結 時는 0.0 %의 生存率을 얻어 急速한 凍結에서 低調한 成績을 얻었다.

또한 Kasai et al (1982)에 의하면 DMSO를 使用하여  $0.25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 凍結하여  $96.0 \pm 5.7\%$ ,  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서는  $84.0 \pm 6.0\%$ ,  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 은  $76.0 \pm 13.3\%$ ,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  일때는  $31.0 \pm 21.1\%$ 의 生存率을 얻어 빠른 速度로 凍結하면 할수록 生存率은 低下된다고 報告하였다.

이에 대하여 Mazur (1977)는 細胞內 氷晶 形成에 의한 傷害를 防止하기 위하여는 水分의 脫水가 充分히 일어나야 되므로 緩慢 凍結 ( $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下 / min) 法에 의하지 않으면 안된다고 主張하였다.

그러나 最近에는 凍結液에 sucrose를 添加하여 凍結 前 受精卵를 pre-dehydration 시킴으로서 mouse 受精卵에서 急速 凍結의 可能性을 提示하였다 (Williams and Johnson, 1986; Miyamoto et al, 1986).

sucrose 添加의 效果를 알아보기 爲해 凍結 實驗한 金 (1987) 은 10 % 의 glycerol 과 sucrose 를 凍結液으로 使用하여 家兔의 受精卵를 0.3 °C / min 로 -35 °C까지 下降시키고 LN<sub>2</sub> (液體窒素) 에 凍結했을 때 FDA - test 에 의해 76.0 %의 生存率을 얻어 sucrose 의 添加 時에는 凍結 速度가 빨라져도 受精卵 生存率에는 惡影響을 주지 않는다고 報告하였다.

그러나 Kasai et al (1981) 은 sucrose 의 耐凍劑 效果를 알아 보려고 sucrose 만으로 耐凍劑 效果를 알아 보려고 sucrose 를 耐凍劑로 使用했을 때에는 胚의 生存率이 0.0 %였다고 報告하여 sucrose 만으로는 耐凍劑의 效能이 없음을 示唆했다.

Wood and Farrant (1980), Kasai et al (1980)이 mouse 受精卵를 使用하여 two - step 凍結法의 可能性을 提示하여 주었으며, Renard et al (1984) 은 自動 細胞 凍結器 (cell freezer) 로 0.5M sucrose 를 使用하여 -30 °C (12 °C 1 min) 에서 30 分間 靜置 後 -196 °C 의 LN<sub>2</sub> 에 浸漬하여 88.0 ~ 92.0 %의 높은 生存率을 나타냈고, Bouyssou and Chupin (1982) 은 6.6 °C / min 의 速度로 -30 °C까지 冷却시킨 受精卵에서 緩慢 凍結의 成績과 같은 結果를 얻었다고 하였으며 Wood and Farrant (1980) 도 two - step 方法으로 좋은 成績을 얻었다.

凍結 方法으로는 dry ice 凍結法과 cell freezer 凍結法과 LN<sub>2</sub> - container 內 凍結法이 있는데 Miyamoto and Ishibashi (1983) 는 簡便 迅束하며 凍結 時 高價 凍結器의 購入에 대한 부담을 줄이기 爲해 dry ice 凍結法으로 耐凍劑는 1.8 M의 glycerol 을 使用하여 mouse 受精卵에서 62.0 %의 生存率을 얻었으며 cell freezer 凍結法에서 Miyamoto and Ishibashi (1983), Nakagada and Toyoda (1980) 등은 mouse 受精卵에서 82.0~

86.0%의 높은 생존율을 얻었다고 報告하였다.

그러나 Joseph (1985), Franks et al (1986)에 의하면 cell-freezer는 使用時마다 10ℓ 이상의 LN<sub>2</sub>가 必要하며 여러가지 不便한 點이 있음을 指摘하였다.

그리하여 Kasai et al (1981), Williams and Johnson (1985), Krag et al (1985) 등은 sucrose를 利用한 LN<sub>2</sub>-container 凍結法이 簡單하고 經濟적인 凍結法이라고 報告했으며, Miyamoto et al (1986)은 LN<sub>2</sub>-container 凍結法을 利用하여 0.5℃/min로 -75℃까지 下降시켜 -196℃에 浸漬시켰을 때 桑實胚는 88.0%, 胚盤胞는 85.0%의 높은 生存율을 얻어 Cell-freezer 凍結法과 差異가 없었다고 發表하였다.

더우기 Rall and Fahy (1985)는 高濃度 耐凍 保護 物質(vitrification solution)을 製造한 後 LN<sub>2</sub>-container에서 直接 凍結하여 mouse의 受精卵에서 56.0%의 生存율을 얻어 最初로 vitrification solution을 利用한 凍結法이 成功하게 되었다 (Hsu et al, 1986). 그리고 Fahy et al (1984)도 vitrification solution을 利用한 凍結法을 使用할 경우 細胞 內外 氷晶 形成이 防止되기 때문에 高濃度の 凍害 防止劑가 必要하다고 했고 細胞가 脫水되어 收縮된 狀態로 凍結하는 것이 必須 條件이라고 說明했다. 이러한 vitrification solution을 利用하여 Rall et al (1987)은 最高 88.0%의 生存율을 얻었고, Kono and Tsunoda (1987)는 77.0~86.0%의 높은 成績을 얻어 앞으로 vitrification solution 凍結法은 受精卵 凍結 方法에 있어서 劃期的인 發展이 있을 것으로 期待된다.

#### 4. 植 氷

受精卵의 凍結 過程 中 植氷은 Whittingham et al(1972)이 mouse 受精卵 凍結에서 最初로 利用하였다. 卵子는 精子와는 달리 水分 含量이 많고 特殊한 膜構造인 透明帶를 갖고 있기 때문에 植氷하지 않으면 過冷却 狀態로부터 氷晶이 形成되어서 急速한 溫度 上昇 (潛在熱의 發生)이 생겨 細胞에 物理的인 衝擊을 주게 되어 被害를 입게 되므로 꼭 施行되어야 하는 것으로 알려져 왔다 (Leibo and Mazur, 1978).

또한 植氷을 하므로써  $-5^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 에서 細胞에 害를 주는 過冷却을 短縮시키고 straw 內的 氷結晶을 강제로 形成하게 되어 過冷却 中에 脫水가 始作되므로 液狀에서 固體로 轉換될 때 潛在熱 發生에 의한 sample의 溫度 上昇을 防止한다고 하였다 (Leibo and Mazur, 1978).

植氷 方法은 cooled forceps, dry ice, ice crystal, copper-wire, 液體窒素 蒸氣(Kasai et al, 1980, 1981; Miyamoto and Ishibashi, 1978, 1973, 1986; Miyamoto et al, 1986; 尹과 鄭, 1984; Krag et al, 1985; 金등, 1988) 등이 있으며, non-seeding(Miyamoto and Ishibashi, 1983; Krag et al, 1985; Renard et al, 1984; Miyamoto et al, 1986; 金, 1987)으로도 良好한 成績을 얻었다고 報告하고 있다.

Miyamoto et al (1986)은 mouse의 受精卵을 ice crystal 植氷으로 73.0%의 生存率을 얻었고,  $\text{LN}_2$  vapour에 의한 植氷 方法으로는 57.0~61.0%, non-seeding으로는 68.0%의 生存率을 얻어 ice crystal에 의한 植氷으로도 좋은 成績을 얻었다고 發表하였고, Miyamoto and Ishibashi (1986)는 mouse 受精卵 凍結時 ice crystal로 植氷하여 80.0~85.0%



의 높은 生存率을, non - seeding 에서 80.0 - 84.0 %의 높은 生存率을 얻어 두 植氷 方法에 의한 生存率의 差異는 없었다고 하였다

또한 Miyamoto and Ishibashi (1983)는 mouse 의 受精卵을 凍結 할 때 dry ice 로 植氷하여 40.0 %의 生存率을, non - seeding 일 경우는 41.0 %의 生存率을 얻어 dry ice 植氷 方法이 non - seeding 보다 低調하였음을 報告하였다.

그러나 Miyamoto et al (1986)은 non - seeding 方法으로 69.0 %를 얻었고 LN<sub>2</sub> - seeding 에서는 76.3 %의 生存率을 얻어 LN<sub>2</sub> - seeding 에 의한 方法이 조금 優秀했으나 差異는 없었다고 報告하였다. Bui - Xuan - Nguyen et al (1984)은 凍結液에 sucrose 를 添加하면 受精卵이 凍結 하기 前에 脫水되기 때문에 植氷하지 않고 急速 凍結하더라도 受精卵은 높은 生存率을 얻을 수 있다고 報告하였다.

##### 5. 受精卵의 發育 段階

受精卵의 生存率은 耐凍劑의 種類, 凍結, 植氷, 融解 方法 및 發育 段階에 따라 差異가 있으며, Urano et al (1986)은 mouse 에서 glycerol 를 耐凍劑로 使用하고 sucrose 를 除去液으로 하여 8 - cell 은 80.6 %, morula 는 73.0 %, blastocyst 에서 64.4 %의 生存率을 얻었으며, PBS 로 除去液을 달리했을 때는 各各 52.2 %, 46.2 %, 30.6 %의 成績을 얻어 細胞 分割이 進行될수록 낮았으며, 尹과 鄭 (1984)도 1, 2, 4, 8 - Cell 에서 各各 26.7 %, 76.4 %, 70.0 %, 83.9%를 얻어 8 - Cell 에서 가장 優秀한 生存率을 얻었다. 이에 대해 曺 (1987)는 glycerol 最終 濃도가 1.4 M일 때 three - step 으로 耐凍劑를 平衡시켜 8 - Cell 에서 68.3 %, 桑

實胚에서는 73.1%의 生存率을 얻었다.

그러나 陳 등 (1986)은 DMSO와 glycerol을 添加했을 때 8-cell의 mouse 受精卵에서 70.6 ~ 80.8%를, 桑實胚에서는 70.4 ~ 81.6%의 生存率을 얻어 8-cell과 桑實胚 間에는 差異가 없었다고 하였다. morula와 blastocyst 사이에 대한 研究는 Krag et al (1985)이 morula에서 71.0 ~ 92.0%를 얻었고 early blastocyst에서는 68.0 ~ 85.0%, late blastocyst에서는 27.0 ~ 61.0%로 morula stage가 좋았으며, Miyamoto et al (1986)은 역시 morula에서 80.0%, blastocyst에서 72.0%를 얻어 blastocyst stage 보다는 morula stage가 優秀하였다.

#### 6. 受精卵의 生死 判定

受精卵의 生死 判定에는 一般的으로 培養에 의한 方法과 形態學的인 判定 方法, FDA-test (fluorescence diacetate)에 의한 方法 등이 있는데, 이중 培養에 관한 方法은 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37℃로 유지시켜 一定 時間 培養 後 發育 段階를 觀察하여 判定하는 方法으로 Shiraishi et al (1981), 南直 등 (1984)이 研究 報告한 바 있으나 培養 技術 및 施設 등이 必要하고 時間이 많이 所要되며 잘못 判定하기 쉽고 偏見이 있을 수 있어서 正確한 判定 方法이라고는 할 수 없다고 指摘하였다 (Looney et al, 1981). 그런데 Donaldson (1984)에 의하면 FDA-test와 形態學的 方法에 의한 生死 判定 間에는 높은 相關 關係가 있다고 報告하였으며, Shiraishi et al (1981)은 DMSO를 耐凍劑로 하여 凍結 融解 後 形態學的인 判定 方法으로 A급은 58.0% B급은 32.2%, C급은 9.7% 였다고 했으며, 曹 (1987)도 A급 mouse 卵子를 凍結하여 excellent는 41.2%, good

34.0%, fair 15.5%, poor 는 9.3%의 生存率을 얻었다고 報告하였다

그리고 Nelson and Nelson (1985) 등도 形態學的으로 良好한 受精卵이 生存性도 優秀하다고 하였고, Burks et al (1965) 은 形態的으로 優秀한 A級 卵子를 移植하여 63.0%가 受胎하였고, B級은 58.0%, C級은 31.0%, D級은 12.1%의 受胎率을 얻었다고 報告하였다.

한편 FDA - test 는 非螢光 物質을 利用하여 生存하고 있는 細胞에만 存在하는 加水分解 酵素와 反應하여 螢光을 發하게 되는데 이 螢光을 確認하므로서 卵子の 生死를 判定하는 方法으로 Leibo and Mazur (1978), Linda and Trounson (1980) 등은 mouse 의 受精卵에서, Schilling et al (1982) 과 Schmidt et al (1985) 은 牛 受精卵 研究에서 FDA - test 는 優秀한 評價 方法이라고 報告하였다.



## Ⅲ. 材 料 및 方 法

### 1. 實 驗 期 間 및 場 所

本 實 驗 은 1987 年 1 月 부터 1988 年 5 月 까지 本 大 學 畜 産 學 科 家 畜 繁 殖 學 實 驗 室 과 本 大 學 校 附 設 放 射 能 利 用 研 究 所 에 서 實 施 하 였 다.

### 2. 供 試 動 物 및 飼 養 管 理

#### 1) 供 試 動 物

供 試 動 物 은 6 週 ( 體 重 : 25 ~ 40 g ) 以 上 의 雌 性 ICR 系 의 未 經 産 및 經 産 mouse 를 使 用 하 였 다.

#### 2) 飼 養 管 理

飼 育 室 의 溫 度 는 16 ~ 28 ℃ 로 維 持 시 켜 고 日 照 時 間 은 14 h / day 로 調 節 하 였 다. 그 리 고 飼 料 은 pellet 飼 料 을 물 과 함 께 自 由 採 食 시 켜 다.

#### 3) 供 試 Hormone 劑

過 排 卵 誘 起 에 使 用 한 hormone 劑 는 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, 三 共 社, 日 本 ) 와 HCG (human chorionic gonadotropin, 三 共 社, 日 本 ) 를 使 用 하 였 다.

### 3. 實 驗 方 法

#### 1) 過 排 卵 誘 起

過 排 卵 誘 起 를 위 해 서 腹 腔 內 PMSG 를 5 ~ 10 IU 를 投 與 한 다음 48 時 間 後 에 HCG 를 5 ~ 10 IU 注 射 함 과 同 時 에 同 一 系 의 雄 性 mouse 를

1 : 1 로 合飼시켜 自然 交尾를 誘導한 後 다음 날 아침과 저녁에 腔栓을 確認하였으며 確認되지 않은 個體는 實驗에서 除外시켰다.

## 2) 受精卵의 採卵

受精卵의 採卵은 HCG 注射 後 48 ~ 80時間 사이에 開腹 手術하여 卵管과 子宮을 切取한 後 0.22  $\mu$ m millipore filter 로 濾過시켜 高壓 殺菌한 m - PBS (modified Dulbecco's phosphate saline) 灌流液을 1 ml 注射器를 使用하여 卵子를 watching glass 內로 回收하였다.

回收된 受精卵은 40 ~ 80 倍의 實體 顯微鏡下에서 形態적으로 正常 卵子만을 選拔하여 凍結에 使用했고, 未受精卵 및 異常 分割卵은 實驗에서 除外시켰다.

## 3) 灌流液 및 凍結液의 製造

卵子 回收用 灌流液의 組成은 Table 1 에 提示된 바와 같이 m - PBS를 調製하여 使用하였다.

凍結液은 m - PBS 에 10.0 % glycerol 과 10.0 % sucrose, 그리고 20.0 % mouse donor serum 을 添加한 것과, m - PBS 에 20.0 % mouse donor serum 을 添加한 것을 使用하였다.

血清은 donor mouse 에서 採血한 後 2,500 r.p.m 으로 10 分間 遠心分離하여 얻은 血清을 56  $^{\circ}$ C 의 恒溫器에서 30 分間 非動化시킨 後 - 20  $^{\circ}$ C 의 冷凍室에 保管했다가 使用하였다.

Table 1. Composition of modified Dulbecco's phosphate buffered saline (m-PBS)

Component	Concentration
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1 g
Glucose	1.0 g
Na pyruvate	0.036 g
Bovine serum albumin	3.0 g
Streptomycin	0.05 g
Penicillin	0.075 g
Triple - distilled water	1,000 ml

4) 凍結液의 添加 및 除去

凍結液은 PBS 溶液에 10.0% glycerol 과 10.0% sucrose 그리고 20.0% 血清을 混合한 것과 PBS 溶液에 20.0% 血清과 10.0% glyce-

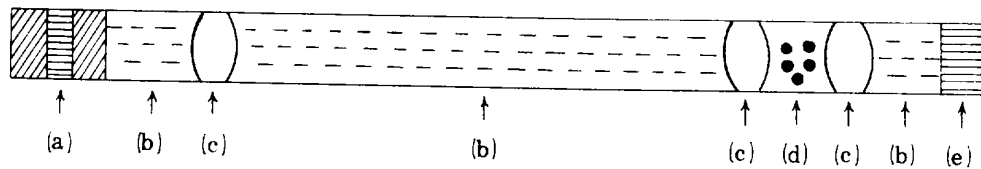


Fig 1. Freezing apparatus with straw loaded as indicated

- a) Cotton plug
- b) Dilution medium
- c) Air bubble
- d) Freezing medium + embryos
- e) Straw powder plug

rol 을 혼합한 溶液을 0.22  $\mu$ m membrane filter 로 濾過한 後 卵子를 直接 凍結液에 옮겨 5分間 平衡시키는 one - step 方法을 使用하였으며 凍結液으로 平衡이 끝난 受精卵은 0.5 ml 와 0.25 ml plastic straw 內에 5 ~ 15 個의 受精卵을 Figure 1과 같이 注入하여 封印하였다.

#### 5) 凍結 方法

卵子를 straw 에 注入한 後 straw powder 로 封印하여 곧 凍結을 實施하였는데 受精卵의 凍結은 LN<sub>2</sub> 를 使用하였으며, 自動 細胞 凍結器 (R - 204; cell freezer, planer products, England)와 LN<sub>2</sub> - container (Union Carbide, U.S.A) 內에서 實施하였다.

凍結 溫度는 sensor 에 耐凍劑로 채운 0.5 ml straw 를 끼워서 固定시킨 後 auto - recorder 로 確認했고 凍結 時 straw 의 位置는 straw powder plug 가 위로 向하도록 했다.

凍結 方法은 다음과 같다.

(1) I - F 常溫에서  $-7^{\circ}\text{C}$ 까지는  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 下降시킨 後 植氷하고 5分 동안 靜置한 다음  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로  $-35^{\circ}\text{C}$ 까지 凍結하여 LN<sub>2</sub> - container 內에 浸漬 保存하였다.

(2) II - F : 植氷 後 5分間 靜置한 後  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로  $-35^{\circ}\text{C}$ 까지 下降시킨 다음  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로  $-80^{\circ}\text{C}$ 까지 凍結하여 浸漬 保存하였다.

(3) III - F : 植氷 後 5分間 靜置한 다음  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로  $-80^{\circ}\text{C}$ 까지는 凍結하여 LN<sub>2</sub> 에 浸漬 保存하였다.

(4) IV - F : 植氷 後 5分間 靜置한 다음 LN<sub>2</sub> 表面 3~5 mm까지 接近시켜 LN<sub>2</sub> - vapour 에 5分間 靜置시켰다가  $-196^{\circ}\text{C}$ 에 浸漬 保存하였다.

## 6) 植 水

植水 方法은 P - seeding (pincette - seeding), N - seeding (non - seeding), LN<sub>2</sub> - seeding (liquid nitrogen vapour - seeding), Cu - seeding (copper - seeding) 으로 區分하여 實施 하였는데, P - seeding 은 Pincette를 利用하여 受精卵이 들어있는 straw 上層部를 미리 LN<sub>2</sub> 에 浸漬시켰던 핀셋으로 접촉시켜 3 ~ 5 秒間 氷結晶이 나타날 때까지 實施하였으며 LN<sub>2</sub> - seeding 은 - 7 °C일때 LN<sub>2</sub> 表面에서 2 ~ 5 mm까지 瞬間적으로 下降시켰다가 올렸는데 이때의 溫度는 약 - 15 °C 전후였으며, Cu - seeding 은 1mm 銅線을 straw 밑에서부터 2mm간격으로 卵子가 들어있는 部分까지 감은 後 凍結하는 方法으로 植水을 試圖했고, N - seeding 은 植水을 하지 않은 것이다.

## 7) 融 解

LN<sub>2</sub> - container 에 저장되었던 straw 의 融解는 straw를 38.0 °C 수조에서 천천히 흔들어 氷結晶이 사라질 때까지 約 8 ~ 10 秒間 實施하였다.

## 8) 受精卵의 生死 判定

受精卵의 生死 判定에 쓰인 FDA 3', 6' - diacetyl fluorescence 1mg을 acetone 1 ml에 融解하여 이것을 m - PBS 液에 600,000 : 1 로 稀釋시켰으며 이때의 pH는 7.0 ~ 7.4 였다. 受精卵의 生死 判定은 FDA 液에 耐凍劑가 除去된 受精卵을 넣고 常溫에서 3 ~ 5 分 동안 培養한 後 FDA가 들어있지 않은 m - PBS 液에 옮겨 位相差螢光顯微鏡 (Nikon, TMO - diaphat Japan) 100 ~ 200 倍 下에서 觀察하여 다음과 같은 score 를 算出하였다.

P (positive) - 5 : 受精卵, 分割球 全體가 綠色 螢光을 發散하는것 ( 5 點 ; 100 % ).



- P - 4 : 受精卵 分割球 中에서 80 % 以上이 綠色 螢光을 띠는것 ( 4 點 ; 80% ).
- P - 3 : 受精卵 分割球의 50 ~ 70 %가 綠色 螢光을 띠는것 ( 3 點 ; 60%)
- P - 2 : 30 ~ 50 %의 分割球가 綠色 螢光을 發散하거나 또는 分割球가 全般的으로 弱하게 螢光을 나타나는 것 ( 2 點 ; 40 % ).
- P - 1 : 20 % 以下の 分割球가 綠色 螢光을 發散하거나 또는 分割球가 매우 弱하게 螢光을 發하는 것 ( 1 點 ; 20 % ).
- N (Negative) - 0 : 綠色 螢光을 전혀 띠지 않고 어둡게 보이는 것 ( 0 點 ; 0 % ).

#### 4. 統計 處理

統計 處理는 t 檢定,  $x^2$  檢定과 分散 分析에 의하였고, 有意性이 認定된 경우에는 LSD 檢定과 duncan의 多重 檢定法에 의하여 各 處理間의 有意性을 檢定하였다.



## Ⅳ. 結 果 및 考 察

### 1. 過排卵 誘起

PMSG 投與 水準에 따른 卵巢의 크기, 血胞數 및 卵胞數에 대한 卵巢 反應의 成績은 Table 2 와 같다.

Table 2. Effect of dose levels of PMSG treatment on ovarian size, number of blood follicles and follicles following superovulation.

Dosages (IU)		No. of mice	No. of donors mated (%)	Ovarian size (mm)		No. of blood follicles	No. of follicles
PMSG	HCG			Length	width		
5	5	95	70 (73.7)	3.9±0.5 <sup>1)</sup>	2.9±0.4	3.7±1.3	8.8±3.3 <sup>a</sup>
6	6	252	172 (68.3)	3.8±0.5	2.8±0.4	3.1±1.1	10.7±5.4 <sup>ab</sup>
8	8	54	45 (83.3)	3.8±0.3	2.9±0.3	4.0±1.9	11.3±3.8 <sup>ab</sup>
10	10	240	147 (61.3)	4.0±0.7	3.1±0.6	3.3±1.6	11.7±7.8 <sup>b</sup>

1) Mean ± S.E.

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

卵巢의 길이에 있어서는 PMSG 5 IU와 10 IU 投與區에서 各各 平均 3.9±0.5 mm와 4.0±0.7 mm로 比較的 長었고, 6 IU와 8 IU 投與區에서는 平均 3.8mm로 5 IU와 10 IU 投與區보다 짧았으나 有意性은 없었다. 또한 卵巢의 폭에 있어서는 10 IU 投與區에서 平均 3.1±0.6 mm로 가장 컸으며, 6 IU 投與區에서는 平均 2.8±0.4 mm로 가장 작았으나 卵巢의 크기에 있어서는 差異가 없었다.

血胞數에 있어서는 8 IU 投與區에서 平均 4.0±1.9 個로 第一 많았으며,

6 IU에서는  $3.1 \pm 1.1$  個로 6 IU 投與區가 8 IU 投與區보다는  $0.9 \text{ mm}$ 가 작았으나 全 處理區間에 有意性은 없었다. 또한 卵胞數에 있어서 10 IU 投與時에는 平均  $11.7 \pm 7.8$  個로 많았고, 5 IU 投與時에는 平均  $8.8 \pm 3.3$  個로 가장 적은 數值를 나타냈으며 hormone의 投與量을 增加시키면 卵胞數도 增加하였다 ( $P < 0.05$ ).

PMSG 投與量에 따른 排卵點의 數와 回收率은 Table 3과 같다.

Table 3. Effect of dose levels of PMSG treatment on ovulation point and recovery rate following superovulation.

Dosages(IU)	No. of PMSG HCG mice	No. of ovulation point		No. of recovered embryos	Recovery rate (%)	
		Left ovary	Right ovary			
5	5	30	$11.3 \pm 4.8$ <sup>1)</sup>	$10.5 \pm 2.9$ <sup>a</sup>	$20.3 \pm 11.9$	$92.8$ <sup>b</sup>
6	6	60	$10.8 \pm 6.1$	$11.1 \pm 6.5$ <sup>a</sup>	$19.2 \pm 11.3$	$87.7$ <sup>b</sup>
8	8	15	$12.3 \pm 5.8$	$12.8 \pm 6.6$ <sup>b</sup>	$18.4 \pm 13.0$	$73.4$ <sup>a</sup>
10	10	40	$16.1 \pm 6.7$	$16.6 \pm 6.8$ <sup>c</sup>	$21.4 \pm 14.5$	$65.4$ <sup>a</sup>

1) Mean  $\pm$  S.E.

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

排卵點에 있어서는 全 處理區에서 左右 卵巢에 대한 差異는 거의 없었으며, 排卵點의 數가 가장 적은 區는 5 IU, 6 IU 投與區로 左右 卵巢에서 各各 21.8, 21.9 個로 비슷한 成績을 나타냈고, 8 IU 投與區는 全體 排卵數가 25.6 個로 다음 順位였으며, 10 IU 投與區는 全體 排卵點이 32.7 個로서 全處理區에서 가장 많았다. 特히 PMSG의 量을 增加시키면 排卵點의 數도 增加했으나 5 IU와 6 IU 投與區間을 除外한 모든 處理區에서 有意性이 있었다 ( $P < 0.05$ ).

受精卵의 回收率에 있어서는 5 IU, 6 IU 投與區가 各各 92.8%, 87.7%로 他處理區 보다는 높은 回收率을 보였으며, 8 IU 投與區에서는 73.4%로 약간 낮은 數値를 나타냈다. 그러나 投與量이 가장 많았던 10 IU 處理區에서는 回收率에 있어서 65.4%로 낮았는데, 以上の 結果는 Ito and Katsuhiko (1974)가 PMSG 1 IU를 注射하여 平均  $14.3 \pm 3.9$ 個, 5 IU는  $22.0 \pm 11.3$ 個, 10 IU에서는  $41.0 \pm 12.6$ 個의 受精卵을 採卵했고 PMSG의 量을 增加시킬수록 回收된 卵子數가 增加했다고 報告하여 本 成績과는 差異가 있었으나, 排卵點에 있어서는 南 등 (1985)의 報告와 類似한 成績이었다. 崔 등 (1987)은 PMSG 5 IU를 注射하여 左右 卵巢에서 排卵點이 42.7個, 回收率은 79.5%였다고 하였으며, 이 成績은 左右 卵巢에서 排卵點에 差異가 없게 나타난 本 成績과 同一하였고, 回收率과 採卵된 卵子數에 있어서는 本 實驗 成績이 낮았다. 또한 回收率에 있어서 金 등 (1988a)이 家兔에서 PMSG 投與量을 增加시키면 回收率이 減少했다는 報告와 類似한 成績이었다.

以上 Table 2와 3의 結果를 綜合해 보면 hormone의 投與量이 卵巢의 크기에 미치는 影響은 없었으며, PMSG의 投與量을 增加시킴에 따라 卵胞와 排卵點의 數는 增加했으나 回收率에 있어서는 減少하는 結果를 나타냈는데 이에 대한 研究가 좀더 具體的으로 實施하여야 될 것으로 思料된다.

## 2. 受精卵의 凍結

凍結液과 除去液에 sucrose 添加에 따른 液體 窒素 container에서 凍結後 FDA-test에 대한 mouse 受精卵의 生存率을 比較한 것은 Table 4에 提示한 바와 같다.

Table 4. Effects of freezing and removing media on mouse embryo survival evaluated by FDA-test.

Treatment	Freezing medium <sup>1)</sup>	Removing medium <sup>2)</sup>	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival embryos evaluated by FDA test				Score
				P-5 (%)	P-3 (%)	P-1 (%)	N-0 (%)	
A	PG	S	143	58 (40.6)	41 (28.7)	10 (6.9)	34 (23.8)	3.0
B	PG	PS	103	43 (41.7)	36 (35.0)	9 (8.7)	15 (14.6)	3.2
C	PGS	S	276	141 (51.1)	74 (26.8)	17 (6.2)	44 (15.9)	3.4
D	PGS	PS	389	197 (50.6)	101 (26.0)	44 (11.3)	47 (12.1)	3.4

- 1) PG: PBS + 10% glycerol, PGS: PBS + 10% glycerol + 10% sucrose.  
 2) S: 10% sucrose, PS: PBS + 10% sucrose.

凍結液에 PBS + glycerol, 除去液에는 sucrose 만을 添加시킨 A 處理區 (PG:S) 는 P-5 가 40.6%, N-0 ; 23.3%, 平均 score 3.0 (60.0%) 으로 全 處理區 가운데 가장 不良하였고, 同一한 凍結液에 除去液만을 달리한 B 處理區 (PG:PS) 에서는 P-5 ; 41.7%, N-0 ; 14.6%를 나타내어 平均 score 3.2(64.0%) 로서 順次로 좋지 않은 生存率을 보여 주었으나 有意性은 없었다.

그리고 凍結液에 sucrose 를 添加한 C 處理區 (PGS:S) 의 生存率은 P-5 ; 51.1%, N-0 ; 5.9%로 平均 score 는 3.4(68.0%) 였으며, D 處理區 (PGS:PS) 에서 P-5 ; 50.6%, P-3 ; 26.0%, N-0 ; 12.1%를 나타내고 있고 平均 score 는 3.4(68.0%) 로 C 處理區와 類似한 成績이었다 ( $P < 0.05$ ).

glycerol 除去液에서도 sucrose 를 單用 使用한 것보다 PS液 (PBS + sucrose) 으로 平衡하였을 때 가장 좋은 結果는 凍結液에서나 除去液에서도

sucrose 添加가 良好한 것으로 認定되었다. 이에 관하여 Leibo (1984)는 mouse 受精卵에서 sucrose로 glycerol을 除去할 때 64.0%의 生存率과 Merry et al (1983)이 1.0 M glycerol을 凍結液으로 使用하여 1.0 M sucrose로 除去했을 때 60.5%의 生存率을 報告한 것과 類似하였으나 Kasai et al (1980)에 의하여 PBS와 0.5 M의 sucrose를 除去液으로 使用하여 82.0%의 生存率을 얻은 것보다는 낮았다. 그리고 凍結液과 耐凍劑 除去液에 各各 sucrose를 添加하였을 때 Williams and Johnson (1985, 1986)이 70.0 ~ 82.0% 生存率을 얻어 本 成績에 비해 優秀한 成績이었다.

한편, Schilling and Döpke (1978), Schilling et al (1979)에 의하면 FDA-test에서 3~4等級으로 分類했을 때 brilliant에서 85.0 ~ 90.0%, partly ; 16.0 ~ 21.0%, Weak ; 20.0%의 生存率이었으며 CO<sub>2</sub> incubator에 培養했을 때에 發育하였다고 報告하였는데, 本 成績의 P-3과 P-1에서도 發育할 可能性이 있을 것으로 推定된다.

結果적으로, 耐凍劑의 除去液에만 sucrose를 添加시킨 것보다는 凍結液과 除去液에 각각 10.0% sucrose를 添加하면 mouse 受精卵의 生存率을 向上시킬 수 있을 것으로 생각된다.

液體 窒素 container에서 凍結할 때 여러가지 植氷 方法을 相互 檢討하여 얻은 結果는 Table 5에서 보여주는 바와 같이 植氷하지 않은 N-seeding에서는 P-5가 54.2%, N-0 ; 10.5%로 平均 3.6(72.0%)의 score를 나타내고 있으며, P-seeding에 있어서 P-5가 44.6%, N-0 ; 16.8%로 平均 score 3.3(66.0%)을 보여주고 있고, LN<sub>2</sub>-seeding에서는 P-5가 42.9%, N-0 ; 19.4%, 平均 score 3.1(62.0%)로 生存率이 不良하였다. 그리고 Cu-seeding에서는 P-5가 56.0%, N-0 ; 9.5%이며 平均

Table 5. Effects of seeding procedures on mouse embryos survival evaluated by FDA-test

Method of seeding <sup>1)</sup>	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival embryos evaluated by FDA-test				Score
		P - 5	P - 3	P - 1	N - 0	
N-S	275	149 (54.2)	69 (25.1)	28 (10.2)	29 (10.5)	3.6
P-S	316	141 (44.6)	106 (33.5)	16 (5.1)	53 (16.8)	3.3
LN <sub>2</sub> -S	191	82 (42.9)	48 (25.1)	24 (12.6)	37 (19.4)	3.1
Cu-S	116	64 (56.0)	27 (23.3)	13 (11.2)	11 (9.5)	3.6

1) N-S; Not seeded. P-S; Pincette seeded.  
LN<sub>2</sub>-S; Liquid nitrogen vapour seeded. Cu-S; Copper wire seeded.

score 는 3.6(72.0%) 으로 優秀하였으나 處理間 有意性은 없었다. 여기서 N - seeding 이 P - seeding 보다 良好한 것은 金등 (1988 b) 이 家呑에게도 같은 結果를 提示하여 주었다.

本 研究를 綜合的으로 考察하여 보면 Whittingham et al (1972) 이 mouse 에서 -3.5 ~ -4.5 °C 사이에 植氷하여 좋은 成績을 얻은 이후 반드시 實行하여야 하는 것으로 認識되어 이제까지 大部分 Elsdon et al (1982)의 方法 (cooled forcep) 으로 植氷하여 왔다.

그런데, 이러한 過程은 複雜하고, 自動式이 아닌 경우에는 항상 straw를 空氣에 露出시켜야 하므로 경우에 따라서는 오히려 sample 의 溫度 上昇을 초래할 可能性이 있음을 지적한 報告도 있다 (井上등, 1982).

또한 Leibo and Mazur (1978) 에 따르면 植氷을 하므로서 氷結晶을 誘導시켜 過冷却 時間을 짧게 하고 sample 溫度 上昇 (plateau) 에 의한 被害를 막을수 있다고 하였다.

그리고 Miyamoto and Ishibashi (1983) 는 mouse 受精卵에 dry ice 로

凍結할 境遇 seeding 하지 않을 때는 step wise 方法으로 漸次 glycerol 을 添加하면 生存率이 向上된다는 報告와 本 成績이 類似한 傾向이었으며, Miyamoto and Ishibashi (1986)는 液體 窒素 蒸氣로 凍結할 境遇, 植氷한 區와 植氷하지 않은 區와는 耐凍劑 (glycerol 2.0M) 平衡 時間이 5分 以後부터 대부분 80.0 ~ 85.0 %로 높은 生存率을 報告하였다.

Miyamoto et al (1986)은 mouse 受精卵을 얼음 (氷)으로 植氷할 때 生存率이 73.0 ~ 82.0 %, 植氷하지 않은 것은 57.0 ~ 61.0 %로서 本 成績과 相反되는 傾向이 나타났다.

그러므로 前述한 바와 같이 10.0 % sucrose를 添加할 때 植氷하지 않아도 크게 影響을 미치지 않는다는 것을 本 研究의 結果에서도 再確認되었다. 그러나 動物種에 따른 受精卵의 크기, 耐凍劑의 種類 및 濃度, 卵子 發育 段階, 凍結 速度와 凍結 器具, 植氷 方法 등에 따라서 生存率에 많은 差異가 있을 것으로 思料된다.

凍結液에 sucrose를 添加하고 LN<sub>2</sub>-container에서 凍結을 實施한 mouse 受精卵의 生死를 FDA-test로 比較한 것은 Table 6과 같다.

1 - F 凍結 方法은 P - 5가 62.7%로 他處理區보다 優秀하였으며, N - 0 : 6.9%, 平均 score 3.8(76.0%)로 가장 좋은 成績을 보여 주었다.

2 - F 凍結 方法에서는 P - 5 : 48.3%, N - 0 : 21.8%의 成績으로서 N - 0에서는 他處理區에 比하여 低調한 成績을 나타내었으며 平均 score는 3.2(64.0%)였다.

3 - F 凍結 方法은 P - 5 : 49.4%, N - 0 : 11.7%로 平均 score 3.6(72.0%)을 나타내어 1 - F 보다는 약간 低調하나 2 - F와 4 - F 보다는 良好하였다.



Table 6. Effects of various freezing procedures by liquid nitrogen vapour (container) on mouse embryo survival evaluated by FDA - test in mice.

Freezing procedure <sup>1)</sup>	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival embryos evaluated by FDA-test				Score
		P - 5	P - 3	P - 1	N - 0	
1 - F	217	136 (62.7)	44 (20.3)	22 (10.1)	15 (6.9)	3.8 <sup>b</sup>
2 - F	344	166 (48.3)	76 (22.1)	27 (7.8)	75 (21.8)	3.2 <sup>a</sup>
3 - F	231	114 (49.4)	81 (35.1)	9 (3.9)	27 (11.7)	3.6 <sup>ab</sup>
4 - F	166	68 (40.9)	54 (32.5)	23 (13.9)	21 (12.7)	3.2 <sup>a</sup>

- 1) 1 - F : Room temp. → -7°C (1°C/min)  $\xrightarrow{5 \text{ min seeding}}$  -35°C (0.3°C/min) → -196°C  
 2 - F : Room temp. → -7°C (1°C/min)  $\xrightarrow{5 \text{ min seeding}}$  -35°C (3°C/min) → -80°C (5°C/min) → -196°C  
 3 - F : Room temp. → -7°C (1°C/min)  $\xrightarrow{5 \text{ min seeding}}$  -80°C (15°C/min) → -196°C  
 4 - F : Room temp. → -7°C (1°C/min)  $\xrightarrow{5 \text{ min seeding}}$  Rapid freezing LN<sub>2</sub> vapour for 5 min → -196°C

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

4 - F 凍結 方法은 P - 5가 40.9%로 全 處理區 中 가장 낮았으며, N - 0 ; 12.7%, 平均 score 는 2 - F 方法과 同一한 3.2 (64.0%) 를 나타냈다. ( P < 0.05 ). 1 - F와 3 - F 凍結 方法은 2 - F와 4 - F보다 優秀하였으나 2 - F가 3 - F보다 若干 떨어진 것에 대해서는 再檢討해야 할 것이다.

本 研究의 結果는 Massip et al (1984) 이 緩慢 凍結時 mouse 受精 卵에서 sucrose 를 添加하여 分當 0.3°C로 凍結한 後 融解시켜 85.7%의

높은 생존율을 報告한 것보다는 若干 낮은 成績이었고 Bank and Maurer (1974)가 sucrose 를 使用하지 않고 3℃ / min 로 凍結하여 家兔 受精卵에서 47.0 ~ 67.0 %의 生存율을 얻어 本 研究 成績과 類似하였다. 그리고 mouse 受精卵에서도 Willmut(1972), 柳와 李 (1984) 등과도 거의 一致된 傾向을 나타냈다. 또한, 金등 (1988 b) 家兔에서 sucrose 를 添加하여 凍結한 成績 (score ; 3.2) 과 거의 同一한 結果를 보였다. 그리고 本 實驗의 全 處理區 中 2 - F 成績에 關한 原因에 대해서는 좀더 檢討되어야 할 것으로 생각된다. 한편 Kasai et al (1980)이 mouse 에서 sucrose 를 添加하여 17℃ / min 로 凍結, 融解하여 82.0 %의 生存율을 얻었다는 報告 보다는 낮았다.

4 - F 凍結 方法에서는 Williams and Johnson (1985, 1986)이 mouse 實驗에서 報告한 70.0 ~ 86.0 %의 生存율과, Szell and Shelton (1987)이 5.0 M glycerol 에 0.5 M sucrose 를 添加한 PBS 를 凍結液으로 使用하여 直接 液體 窒素에 넣고 凍結시켜 95.0 %의 生存율을 얻은 것 보다는 큰 隔差를 보여 주었다.

이러한 傾向을 綜合적으로 考察하여 보면, 上記 研究者들은 1, 3 - F 方法에서 本 研究의 成績보다 높았던 것은 諸 要因이 있겠으나, Williams and Johnson (1986)은 2.0 M glycerol 과 0.5 M sucrose 를, Szell and Shelton (1987)은 glycerol 이 4.0 ~ 5.0M에서 sucrose 가 0.25 ~ 0.5 M 인 凍結液으로 急速凍結하여 良好한 成績을 얻은 반면 本 實驗 成績이 낮은 要因은 緩慢 凍結 方法으로 0.9 M glycerol 과 3.4 M sucrose 를 耐凍劑로 使用한 方法的 差異 때문으로 思料된다.

sucrose 를 添加한 後 緩慢 凍結法에 의한 細胞 自動凍結器와 LN<sub>2</sub>

container에서의 凍結法을 比較한 成績은 Table 7에 提示된 바와 같다.

Table 7. Effect of freezing procedures between cell freezer and LN<sub>2</sub> container on mouse embryos survival evaluated by FDA-test

Method of freezing <sup>1)</sup>	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival embryos evaluated by FDA-test						Score
		P-5	P-4	P-3	P-2	P-1	N-0	
Cell freezer	167	95 (57)	29 (17)	23 (14)	6 (4)	1 (1)	12 (7)	4.0
LN <sub>2</sub> container	142	79 (56)	5 (4)	31 (22)	3 (2)	13 (9)	11 (8)	3.7

1) Room temp → -7℃(1℃/min)  $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$  → -35℃(0.3℃/min) → -196℃

細胞 自動凍結器에서 緩慢 凍結하였을 때는 P-5 : 57.0%, N-0 : 7.0%로 平均 4.0(80.0%)의 score를 나타냈으며, LN<sub>2</sub>-container 內의 凍結에서는 P-5가 56.0%, N-0 : 0.0%, 平均 score는 3.7(74.0%)로 細胞 凍結器에 의한 凍結法과는 若干 差異가 있었으나 有意性을 없었다.

本 成績의 結果에 있어서 Franks et al (1985)은 細胞 凍結器의 凍結時에 27.4%, LN<sub>2</sub>-container에서 凍結할 때 26.6%와는 有意性이 없었다고 報告한 것과 一致하고 있으며, 細胞 凍結器의 凍結과 LN<sub>2</sub>-container의 凍結에 있어서 같은 凍結 速度로 凍結을 遂行한다면 LN<sub>2</sub>-container에 直接 凍結하는 方法이 效果的으로 利用될 수 있는 可能性을 提示해 주었다.

또한, Williams and Johnson (1985)도 LN<sub>2</sub>-container를 利用하여 mouse 受精卵을 凍結 融解한 後 85.0%의 높은 生存率을 報告하였으며,

또 container 凍結 方法이 빠르고 經濟的인 利點이 있어서 凍結이 簡單한 野外 方法을 開發하여 家畜에 適用할 수 있다고 지적하였다. 그리고 Miyamoto et al (1986)도 0.5 M sucrose 를 添加한 凍結液을 利用하여 mouse 胚에서 67.0~89.0%의 生存率을 報告하였고, 또한 LN<sub>2</sub>-container 凍結 可能性을 提示하였다.

이러한 結果를 綜合的으로 考察하여 보면, 本 實驗에서 LN<sub>2</sub>-container 에서의 凍結 可能性을 充分히 提示하여 주고 있으므로 앞으로 解決되어야 할 것은 凍結 前 受精卵의 合理的인 Predehydration 과 sucrose dilution 이 開發되어야 할 것으로 생각된다.

### 3. 卵子の 形態 및 發育 段階別 生存率

mouse 受精卵이 LN<sub>2</sub>-container 에서 凍結할 때 凍結 方法에 따른 形態學的인 側面에서 受精卵의 損傷 程度를 比較한 것은 Table 8과 같다.

生存한 受精卵으로 認定되는 A級 卵자는 3-F 凍結에서 72.6%로 많았고 4-F 凍結에서 損傷이 甚해서 44.1%만이 A級 判定을 받을 수 있었다. 損傷 程度가 심한 C級 卵자도 3-F 凍結이 2.9%로 가장 良好했고 4-F는 8.3%로 不良하였다. 그리고 1-F 凍結은 A級 卵자가 66.2%, C級은 5.3%로 보편적으로 良好한 成績을 보여 주었다.

凍結 後 形態가 良好하고 分割 狀態가 優秀한 割球를 가진 受精卵을 移植할 때 受胎率을 높일 수 있는데, 曹 (1987)은 1-F 凍結法과 同一한 方法으로 凍結하여 卵자 形態가 A級이 41.2%였으며 C級 卵자도 9.3%를 얻었다고 했는데, 이에 比해 本 實驗 成績이 良好했으나, 金등 (1985)의 卵자 77.5% 보다는 不良했다.

Table 8. Classification of morphological embryos after freezing and thawing according to freezing procedure.

Freezing procedure <sup>1)</sup>	No. of embryos frozen	No. and (%) of recovered embryos post-thaw	Classification of morphological embryos <sup>2)</sup>		
			A	B	C
1 - F	455	382 (84.0)	253 (66.2)	109 (28.5)	20 (5.3)
2 - F	456	430 (94.3)	263 (61.2)	147 (34.2)	20 (4.6)
3 - F	272	241 (88.6)	175 (72.6)	59 (24.5)	7 (2.9)
4 - F	353	313 (88.7)	138 (44.1)	149 (47.6)	26 (8.3)

- 1) 1 - F : Room temp.  $\rightarrow -7^{\circ}\text{C}$  (1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )  $\xrightarrow[5\text{ min seeding}]{} 35^{\circ}\text{C}$  (0.3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )  
 $\rightarrow -196^{\circ}\text{C}$   
 2 - F : Room temp.  $\rightarrow -7^{\circ}\text{C}$  (1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )  $\xrightarrow[5\text{ min seeding}]{} -35^{\circ}\text{C}$  (3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )  
 $\rightarrow -80^{\circ}\text{C}$  (5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )  $\rightarrow -196^{\circ}\text{C}$   
 3 - F : Room temp.  $\rightarrow -7^{\circ}\text{C}$  (1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )  $\xrightarrow[5\text{ min seeding}]{} -80^{\circ}\text{C}$  (15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )  
 $\rightarrow -196^{\circ}\text{C}$   
 4 - F : Room temp.  $\rightarrow -7^{\circ}\text{C}$  (1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )  $\xrightarrow[5\text{ min seeding}]{} \text{Rapid freezing by LN}_2 \text{ vapour for 5min}$   
 2): A : Intact      B : Partial damaged      C : Complete damaged

以上の結果를 綜合해 보면 3 - F 가 卵子の 損傷 程度가 가장 적었으며 4 - F 凍結은 卵子の 損傷이 심했는데, 이는 本 實驗의 glycerol 濃度가 緩慢 凍結 方法에 適合했기 때문이며 急速한 溫度 變化 때에는 卵子の 細胞內에 物理的 衝擊 때문에 卵子の 損傷이 甚한 것으로 思料된다.

LN<sub>2</sub> - container 에서 mouse 受精卵의 凍結 融解 後 損傷 狀態 等級에 따라 FDA - test 에 의한 生存率을 比較한 것은 Table 9 와 같다.

形態적으로 正常이라고 認定되는 A 等級의 受精卵은 FDA - test 에 의하면 P - 5 가 66.2%, P - 3 ; 24.3%, P - 1 ; 5.3%, 平均 score 4.1 (82.0%) 의 生存率을 나타냈다. 또한 分割球가 異常 分割을 했거나 形態

Table 9. Effect of morphological appearances on embryo survival by FDA-test after freezing and thawing.

Morphological rank <sup>1)</sup>	No. of recovered embryos post-thaw	No. of (%) of survival embryos evaluated FDA-test <sup>2)</sup>				Score
		P-5 (%)	P-3 (%)	P-1 (%)	N-0 (%)	
A	829	549 (66.2)	201 (24.3)	44 (5.3)	35 (4.2)	4.1 <sup>c</sup>
B	464	54 (11.6)	163 (35.1)	100 (21.6)	147 (31.7)	1.9 <sup>b</sup>
C	73	1 (1.4)	8 (10.9)	11 (15.1)	53 (72.5)	0.5 <sup>a</sup>

1): A; Intact B; Partial damaged C; Complete damaged

2): P-5; Positive (score: 5) P-3; Partial (score: 3)

P-1; Partial (score: 1) N-0; Negative (score: 0)

Different superscripts denote significant differences within columns (P < 0.01).

의므로 非正常이고, 部分 損傷을 입은 B級 受精卵도 P-5에서 11.6%, P-3; 31.1%, P-1; 21.6%, 平均 score 1.9 (38.0%)로 낮은 生存率을 보여주고 있다.

形態적으로 受精卵의 透明帶가 完全히 除去되었거나 損傷이 크다고 認定된 C級 卵子 中에서도 P-5가 1.4%, P-3; 10.9%, P-1; 15.1%, 平均 score 0.5 (10.0%)로 生存率이 아주 낮았다.

以上の 結果로 보면 光學顯微鏡으로 形態的인 側面에서의 判斷과 螢光顯微鏡에 의한 FDA-test의 生存率과는 높은 相關 關係가 推測되었으나 많은 差異가 있음을 알수 있는데 A級 受精卵도 FDA-test와 比較할때 誤差가 많이 나타났다.

또한 完全히 形態적으로 死滅된 것으로 認定되는 C級 卵子에서도 約 10.0%의 生存率을 얻을 수 있었다. 이와같은 結果로 Kennedy et al

(1983), 曹 (1987) 등은 凍結 前 受精卵의 外貌 狀態가 좋을수록 凍結 融解 後 높은 受胎率을 얻음으로서 受精卵 移植時 凍結 前의 外貌 狀態가 重要하다고 報告한 바 있고, Donaldson(1984)은 FDA-test 에 의한 方法과 morphological appearance 判定 方法에는 높은 相關 關係가 있다고 報告했다. Jacobsen and Peyg (1983)도 受精卵을 FDA-test 한 後 24~30 時間을 培養하여 生死 判定을 하였더니 거의 같은 成績이 發表되었으며, Greve et al (1979) 역시 mouse의 受精卵을 통해 FDA-test 와 培養 成績間에는 높은 相關 關係가 있다고 報告했다.

以上の 結果를 綜合하여 보면 外貌 形態的으로 A, B, C級의 卵子 生存性에는 顯著한 有意性이 있었고 受精卵 移植을 위해서는 形態的인 判定法과 FDA-test를 併行하면 좋은 結果를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

Table 10은 液體 窒素 container에서 凍結할 때 卵子 發育 狀態에 따른 生存率을 FDA-test로 比較한 것으로서 early stage에서는 P-5가 33.0

Table 10 . Effect developmental stage of embryo on embryo survival evaluated by FDA-test after freezing and thawing.

Stage	No. of recovered embryos post-thaw	No. of (%) of survival embryos evaluated FDA-test <sup>2)</sup>				Score
		P-5	P-3	P-1	N-0	
Early <sup>1)</sup>	118	39 (33.0)	37 (31.4)	9 (7.6)	33 (28.0)	2.7 <sup>a</sup>
Morula	338	200 (59.2)	81 (24.0)	25 (7.3)	32 (9.5)	3.8 <sup>c</sup>
Blastocyst	475	200 (42.1)	154 (32.4)	77 (16.2)	44 (9.2)	3.2 <sup>b</sup>
Total	931	439 (47.2)	272 (29.2)	111 (11.9)	109 (11.7)	3.4

1): 2 - 16 cell

2): P-5 : Positive (score : 5)    P-3 : Partial (score : 3)

     P-1 : Partial (score : 1)    N-0 : Negative (score : 0)

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

%로 全 處理區 中에서 제일 낮은 數值를 나타냈으며, N-O는 28.0%, 平均 score 2.7(54.0%)을 얻었다. 이는 桑實胚나 胚盤胞胚의 生存率보다 顯著히 낮은 成績이었으며, N-O가 28.0%로 桑實胚와 胚盤胞胚 보다 높은 生存率을 나타냈다. 桑實胚에서는 P-5가 59.2%로 全 處理區 中에서 第一 優秀한 成績을 보여 주었고 平均 score 는 3.8(76.0%)로 early stage 나 胚盤胞期 보다는 優秀한 成績이었다. 胚盤胞期 生存率은 P-5가 42.1%, N-O; 9.3%, 平均 score 는 3.2(64.0%)를 얻어 全 處理區間에는 有意性이 있었다.

上記 成績의 結果는 Kasai et al(1982)이 報告한 緩慢 凍結 時 桑實胚 期에서 64.0~70.0%의 生存率을 얻었다는 것과 本 研究와 類似한 成績이었으나 急速 凍結 時의 20.0~39.0% 生存率 보다는 優秀했다. 陳 등 (1985)은 mouse에서 桑實胚가 early stage 보다 優秀하였으나 有意差는 없었다고 했으며, Miyamoto et al (1986)도 mouse 桑實胚에서 71.0~92.0%, 胚盤胞에서는 62.0~85.0%의 生存率을 얻어 本 研究와 類似하였다.

한편 最近에 Szell and Shelton (1987)에 의하면 mouse의 early stage (8~16 cell)에서 高濃度의 5.0 M glycerol 凍結液에 0.5 M sucrose를 添加하였을 때 95.0%의 높은 生存率을 얻었다고 發表한 바 있다. 以上の 結果로 볼 때 卵子 凍結液, 除去液, 處理 過程, 凍結 方法, 凍結 前 卵子의 狀態에 따라 生存率에 많은 差異가 있음을 알 수 있으며 이를 위해 앞으로 더 많은 研究가 遂行되어 現在 問題로 提示되고 있는 여러 課題가 解決되어져야 할 것으로 思料된다.



## V. 摘 要

本 試 驗 은 mouse 受 精 卵 의 複 雜 한 凍 結 過 程 을 簡 易 化 시 키 기 위 해 서 施 行 되 었 다. mouse 의 過 排 卵 處 理 에 있 어 서 hormone 處 理 水 準 에 따 른 卵 巢 反 應 에 대 한 影 響 을 調 查 하 였 고, 耐 凍 劑 로 서 10 % sucrose 의 添 加 效 果, LN<sub>2</sub> - container 內 에 여 러 가 지 凍 結 方 法 ( 1 - F ; 0.3 °C / min, 2 - F ; 3 ~ 5 °C / min, 3 - F ; 15 °C / min, 4 - F ; LN<sub>2</sub> container 內 凍 結 ), 受 精 卵 의 凍 結 器 및 植 氷 方 法 ( Pincette 植 氷, copper 植 氷, 液 體, 窒 素 蒸 氣 植 氷 ), 受 精 卵 의 發 育 段 階 別 mouse embryo 의 生 存 率 ( FDA - test ) 에 미 치 는 影 響 을 究 明 하 기 위 하 여 實 施 하 였 다. 이 의 結 果 를 要 約 하 면 다 음 과 같 다.

1. 過 排 卵 誘 起 에 있 어 mouse 의 處 理 水 準 을 PMSG 5 IU, 6 IU, 8 IU 10 IU 로 처 리 했 을 때 排 卵 點 ( 回 收 率 ) 은 各 各 21.8 個 ( 92.8 % ), 21.9 個 ( 87.7 % ), 25.1 個 ( 73.4 % ), 32.7 個 ( 65.4 % ) 로 서 排 卵 點 과 回 收 率 에 있 어 서 有 意 性 이 있 었 다 (  $P < 0.05$  ).

2. 液 體 窒 素 container 에 서 凍 結 시 키 려 時 glycerol 과 sucrose 를 添 加 했 을 때 와 添 加 하 지 않 았 을 때 FDA - test 에 의 한 平 均 score 는 各 各 3.4 와 3.0 으 로 sucrose 를 添 加 한 것 이 약 간 良 好 하 였 다 (  $P > 0.05$  ).

3. sucrose 를 添 加 한 耐 凍 劑 에 서 LN<sub>2</sub> - container 에 서 凍 結, 植 氷 方 法 에 따 른 FDA - test score 는 Cu - seeding 3.6, N - seeding 3.6, P - seeding 3.3, 그 리 고 LN<sub>2</sub> - seeding 3.0 順 位 로 서 seeding 을 하 지 않 아 도 된 다 는 것 을 提 示 하 였 다.

4. glycerol 添 加 液 과 除 去 液 에 sucrose 를 添 加 하 고 LN<sub>2</sub> - container

에서 凍結했을 때 凍結 速度에 따른 FDA-test score의 順位는 1-F (3.8), 3-F (3.6), 2-F (3.2) 그리고 4-F (3.2)였으며 處理間 有意性이 나타났다 ( $P < 0.05$ ).

5. 10% sucrose 를 glycerol 添加液과 除去液에 添加하여 卵子 自動 凍結器와 LN<sub>2</sub> - container 에서 凍結할 때 score 는 各各 4.0, 3.7 이었다 ( $P > 0.05$ ).

6. 受精卵의 形態에 따라 凍結後 FDA-test 의 score 는 各各 A: 4.1 B: 1.9, C: 0.5 로서 A等級이 매우 優秀하였다 ( $P < 0.01$ ).

7. 受精卵의 發育 段階別 凍結後 生存率을 보면 early stage, morula stage, blastocyst stage 등이 FDA-test 에 의한 score 는 2.7, 3.8, 3.2 를 보여 morula stage 에서 가장 優秀하였다 ( $P < 0.05$ ).



## Reference

1. Bank, H. and R.R. Maurer. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Expl. Cell. Res.*, 89:188-196.
2. Bilton, R. J. and N.W. Moor. 1976. Effect of ice seeding and of freezing and thawing rate on the development of sheep embryos stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Theriogenology*, 6:635 -(Abstr).
3. Bouysson, B. and D. Chupin. 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethyl sulfoxide(DMSO) or glycerol. *Theriogenology*, 17:159-166
4. Bui-Xuan-Nguyen, N., Y. Heyman and J.P. Renard. 1984. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. *Theriogenology*, 22:389-400
5. Burks James, I. M. D., M. Edward Davis, M. D., Aimee H. Bakken, A. B. and Jerry J. Tomasovic. B. S. 1965. Morphologic evaluation of frozen rabbit and human ova. *Fert. Stert.*, 16:638-641.
6. 崔善昊, 李揆丞, 朴昌植, 徐吉雄. 1987. 생쥐 8細胞期 受精卵의 凍結保存에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 11(3):155~160.
7. 鄭吉生, 李勳澤, 鄭柄鉉, 柳承煥, 羅鎮洙. 1983 a. 受精卵 移植에 의한 牛의 雙胎誘起에 관한 研究 I. 性腺刺戟 호르몬의 投與에 대한 卵巢 反應에 影響을 미치는 要因. 韓畜誌, 25(3): 205-209.
8. 鄭吉生, 李勳澤, 朴欽大, 鄭柄鉉, 柳承煥. 1983 b. 受精卵 移植에 의한 牛의 雙胎誘起에 관한 연구Ⅲ. 受精卵의 非外科的 回收. 韓畜誌, 25(5):408-412.
9. Chupin, D. and M.M. De Reviere. 1986. Quick freezing of rat embryos.

- Theriogenology, 26:157-166.
10. Chupin, D. and R. Procureur. 1984. Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts: Effect of number of steps and of total duration. *Theriogenology*, 21:230.
  11. Donaldson, L. E..1984. A comparison of croprosteno~~l~~ and dinoprost tromethmine for the control of estrus in bovine embryo transfer. *Rio. Vista. International Inc.*, Vol.21. No.6:1019-1022.
  12. Elsdon, R. P., Seidel, G.E. Jr., T. Taketa and G. D. Farrand. 1982. Field experiments with frozen- thawed bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology*, 17:1-10.
  13. Fahy, C. H., D. R. Macfarlane, C. A. Angell and H. T. Meryman. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21:407-426.
  14. Franks, G.C., S.L. Coley, B. Betterbed and R.D. Page. 1985. The effects of cryoprotective agents, dilution rates, freezing rates, and freezing units on the survival of bovine embryos. *Therogenology*, 23:194-194.
  15. Franks, 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*, 26:135-144.
  16. Greve, T., H.L. Jensen and N.O. Rasbech. 1979. Morphological evaluation of bovine embryos recovered non-surgically from superovulation dairy cows on days  $6\frac{1}{2}$  to  $7\frac{1}{2}$ : A field study. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19(5):1599-1611.
  17. Heape, W.. 1890. Preliminary note on the transplantation and growth

- of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Pros. R. Soc.*,  
48:457-458.
18. Hsu, Teng-Tsal., Yamakawa, Yamanoi and Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 32:29-32.
  19. 井上忠怒, 吉田光敏, 金川弘司, 坂尾伸夫, 倉岡泰郎. 1982. 受精卵凍結裝置の開発とウシ受精卵への應用. *家畜繁殖誌*, 28:150-153.
  20. 石島芳郎. 1978. 過排卵處理 スウスの排卵反應. *家畜繁殖誌*, 24:16-18.
  21. Ito, M. and H. Katsuhiko. 1974. Relationships between numbers of ovulated ova and implantation sites in mice following superovulation treatment. *Jap. J. Animal Reprod.*, 19(4):153-159.
  22. Jacobsen, I. and D. E. Peyg. 1983. Abstracts of papers presented at the 20th animal meeting of the society for cryobiology. *Cryobiology*, 20: 698-752.
  23. 陳東日·任京淳·吳鳳國·李用斌·鄭鎮官·金熙錫. 1986 a. 凍結過程中 臨界溫度의 推定과 凍結 融解한 생쥐初期胚의 移植후 生存性. *韓畜誌*, 28(11):714~719.
  24. 陳東日·任京淳·吳鳳國·李用斌. 1986 b. 凍害防止劑, 植氷, 凍結 速度 및 保存期間이 생쥐初期胚의 生存에 미치는 影響. *韓畜誌*, 99:474~479.
  25. 曹南基. 1987. 생쥐에 있어서 glycerol 平衡段階 및 凍結前 受精卵 狀態가 融解後 狀態에 미치는 影響. *韓國家畜繁殖學會誌*, 11(2):122 ~ 126.
  26. Josph, M. W.. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology*, 23(1):17-29.
  27. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos

- frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59:51-56.
28. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 63:175-180.
29. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1982. Survival of rat embryos after freezing. *J. Reprod. Fert.*, 66:367-370.
30. Kasai, M. K. Niwa and A. Iritani. 1982. Effects of freezing rate, storage temperature and duration of storage on the survival of frozen-thawed mouse morulae. *J. Anim. Report.*, 28(1):24-29.
31. Kennedy, L. G., M. P. Boland I. Gordon. 1983. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology*, 19:823-832.
32. 金哲均. 1987. 家兔 受精卵의 凍結 및 融解方法 改善에 關한 研究. 濟州大學 校 碩士學位論文. 제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY
33. 金熙錫·鄭吉生. 1985. 소의 多排卵 誘起에 影響을 미치는 要因에 關한 研究. 農事試驗研究論文集(畜産·家畜篇), 27(2): 1-15.
34. 金重桂, 金哲均, 李揆勳, 金東哲, 康珉秀. 1988 a. 肉牛 受精卵의 簡易 凍結 및 融解方法에 關한 研究 I. PMSG, HCG 投與가 家兔 過排卵 誘起에 미치는 影響. 韓畜誌, 30(9):519 ~ 524.
35. 金重桂, 金哲均, 姜萬鍾, 張德支, 金承浩. 1988 b. 肉牛 受精卵의 簡易 凍結方法의 關한 研究 IV. 耐凍劑에 sucrose 添加時 簡易 凍結과 植氷方法이 FDA-test에 의한 家兔 受精卵 生存率에 미치는 影響. 韓國誌, 30(10):583~589.
36. 金正翊, 梁富根, 南相憲, 李相榮, 任石基. 1985. 牛 受精卵의 凍結保存에 關한 研

- 究 II.凍結保存 後 融解卵子の 生存性. 韓國家畜繁殖研究會報, 9(1):36~39.
37. Krag, K. T., I.M. Koebler and R.W. wright Jr..1985. Trehalose; A non-peremable cryoprotectant for direct freezing of early stage embryos. *Theriogenology*, 23:200.
38. Kono, T. and Y. Tsunoda. 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 33:77~81.
39. Leibo, S.P., P. Mazur and S.C.Jackowski.1974. Factores affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exptl. Cell. Res.*, 89:79-88.
40. Leibo, S.P. and P. Mazur. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. A Cademoicpress New York, 179-197.
41. Leibo, S.P., I. T. Megrnvi and F.G. Crnnalh.1978. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology*, 15:257-271.
42. Leibo, S.P.. 1983. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. *Cryo-Letters.*, 4:387 ~ 400.
43. Leibo, S.P.. 1984. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21:767-790.
44. Linda, R. M. and A. O. Trounson. 1980. The use of fluoresce in diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 58:189-196.
45. Looney, C.R., B.W. Boutte, L.F.Archbald and R.A. Godke . 1981. Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superov-

- ulating beef cattle. *Theriogenology*, 15:13-23.
46. 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.*, 71:107-111.
47. 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.
48. Mazur, P. 1977. Slow freezing injury in mammalian cell in the freezing of mammalian embryo. *Ciba. Fudu. Symp.*, 52:9.
49. Merry, D.A., R.L. Allen, K. Krag and R.W. Wright Jr. 1983. Sucrose dilution of frozen mouse embryos: interaction of glycerol and sucrose concentrations. *Theriogenology*, 20:325-332.
50. 南直治郎, 細井美彦, 葛西孫三郎, 丹羽皓二, 入谷明. 1984. 耐凍劑および凍結融解法が  $-196^{\circ}\text{C}$  に保存された 家兎桑眞胚の生存性に及ぼす影響. *家畜繁殖誌*, 30(1):46~49.
51. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fert.*, 50:373-375.
52. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1978. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J. Reprod. Fert.*, 54:427-432.



53. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1979. Effects of low temperatures on survival of frozen-thawed mouse embryos. *Experientia* 35: Birkhauser Verlag, Basel (Schweiz). 1505-1506.
54. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Solid CO<sub>2</sub> freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 67:107-111.
55. Miyamoto, H., Y. Miyamoto and T. Ishibashi. 1980. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Japan. J. Zootech. Sci.*, 57(3): 250-256.
56. Miyamoto, H., Y. Miyamoto and T. Ishibashi. 1986. Some factors affecting the survival of mouse embryos frozen rapidly by liquid nitrogen vapour. *Japan. J. Anim. Report.*, 32(1):36-41.
57. 羅鎮洙. 1985. 牛受精卵移植의 最近進展. *韓畜誌*, 27:257~264.
58. Moore, N.W. and R.J. Bilton. 1973. The storage of fertilized sheep ova at 5°C. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26:1421-7.
59. Nakagata, N. and Y. Toyoda. 1980. Normal young after transfer of frozen-thawed 2-cell mouse embryos obtained by fertilization in vitro. *Japan. J. Zootech. Sci.*, 51:740-744.
60. 南相憲, 梁富根, 成洪龍, 高光斗, 金正翹. 1985. 牛受精卵의 凍結保存에 관한 研究 I. 性腺刺戟 ฮอร์โมน과 PGF<sub>2</sub>α 의 투여에 따른 卵巢反應. *韓國家畜繁殖研究會報*, 9(1): 31-35.
61. Nelson, L.D. and C.F. Nelson. 1985. Effect of estrus detection and corpus luteum development on pregnancy rates in bovine embryo recipients. *Theriogenology*, 23:212.

62. Parkening, T.A., Y. Tsunoda and M.C. Chang. 1976. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Exp. Zool.*, 197:369-374.
63. Pincus, G.. 1930. Observations on the living egg of the rabbit. *Proc. R. Soc. B.*, 107:132-167.
64. Rall, W.F. and G.M. Fahy. 1985. Vitrification; A new approach to embryos cryopreservation. *Theriogenology*, 23:220-221.
65. Rall, W. F., M. J. Wood, C. Kirby and D. C. Whittingham. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 80:499-504.
66. Renard, J. P., B. X. Nguyen and V. Garnier. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.*, 71:373-380.
67. Renard, J. P., Y. Heyman, P. Leymonie and J. C. Plat. 1983. Sucrose dilution; A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 19:145.
68. Sasamoto, S. and K. Murakami. 1961. Bioassay of gonadotropins by induced ovulatory response in immature female mice(II) On the optimum interval between PMS-priming and HCG administration. *Jap. J. Animal Reprod.*, 7(1):17-19.
69. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy.

In vitro fertilization and embryos transfer. Hefez and Emm. MTP  
Lancaster, 349-355.

70. Schilling, E., D. Smid, B. Sacher and S.E. Ksschab. 1979 b.  
Diagnosis of the viability of early bovine embryos by fluorescence  
microscopy. Ann. Biol. Bioch. Biophys., 19:1625-1629.
71. Schilling, E and H. H. Döpke. 1978. A rapid diagnostic test for the  
viability of early cattle and rabbit embryos using diacetyl fluorescein.  
Naturwissenschaften, 65:658-659.
72. Schmidt, P.M, M.C. Schiewe and D. E. Wildt. 1985, Variables influence  
post-Thaw embryo survival rates in mice. Theriogenology, 23:229.
73. Shiraishi, T., S. Niimura and K. Ishide. 1981. Studies on the  
morphology of frozen - thawed mouse 8-cell embryos and on their  
development in vitro. Japan. J. Anim. Reprod., 27(3.4):133-136.
74. Smith, P. E. and E. T. Engle. 1927. Experimental evidence reporting  
the role of the anterior pituitary in the development and regulation of  
the genital system. Am. J. Anat, 40:159-217.
75. 成煥厚, 尹昌鉉. 1987. 성숙 未經産 흰쥐의 受精卵 移植에 관한 연구 I.  
PMSG 및 HCG 投與에 의한 성숙 未經産 흰쥐의 過剩排卵誘起. 韓畜誌,  
29(3):112-117.
76. 鈴木達行, 鈴木軸彦, 下平こ夫, 藤山雅照. 1984. ウシ受精卵の自動灌流器具  
について. 家畜繁殖誌, 30(3): 194 ~ 197.
77. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986 a. Sucrose dilution of glycerol

- from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J. Reprod. Fert., 76:401-408.
78. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986 b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78:699-703.
79. Szell, A. and J. N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol sucrose solutions on day-3 mouse embryos. J. Reprod. Fert., 80:309-316.
80. Takahashi, Y. Tsuzuki and N. Saito. 1981. Cervial bovine embryo transfer with ensheated metal AI instrument. Japan. J. Anim. Report., 27(1):54-55.
81. Takeda, T. and R. P. Elsdon. 1982. Comparison of cryoprotectants for freezing mouse embryos. Theriogenology, 17:109.
82. Urano, K. Talahashi and H. Kanagawa. 1986. Effect of various cryoprotectants on the survival of frozen-thawed mouse embryos. Japan. J. Anim. Report., 32(3):130-133.
83. Whittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . Science, 178:411-414.
84. Whittingham, D. G., 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. J. Reprod. Fert., 43:575-578.
85. Whittingham, D. G. and C. E. Adams. 1976. Low temperature preservation of rabbit embryos. J. Reprod. Fert., 47:269-274.
86. Williams, T. J. and S. E. Johnson. 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. Theriogenology, 23:235-234.

87. Williams, T. J. and S. E. Johnson. 1986. A method for one - step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 26:125-133.
88. Willmut, U.. 1972. The effect of cooling rate warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sic.*, 11:1071-1079.
89. Wood, M. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two - step freezing. *Cryobiology*, 17:178-180.
90. Wright, J. M.. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology*, 23(1):17-30.
91. 柳俊熙, 李在根. 1984. Rat 受精卵의 凍結保存에 있어 凍結速度 및 凍害防止劑에 관한 研究. *韓國家畜繁殖研究會報*, 8 (1):22 - 28.
92. 尹文錫, 鄭吉生. 1984. 생쥐 胚의 凍結保存. *韓國家畜繁殖研究會報*, 8(2):116 - 121.



## 謝 辭

本 研究를 終結함에 있어서 始終一貫 激勵와 忠告를 아끼지 않으시고 本 研究의 遂行 過程에 모든 與件 造成에 心血을 기울여 주신 金重桂 博士님께 感謝의 마음 잊을 수 없습니다.

그리고 拙稿를 일일이 批評과 稿正를 해 주시며 審査해 주신 金承浩 博士님, 康珉秀博士님을 비롯하여 모든 教授님들께 深甚한 感謝를 드립니다. 또한 實驗遂行부터 原稿 整理에 이르기까지 協助해 준 繁殖學實驗室의 金瑩勳, 康承律 完友와 畜産學科의 모든 院友들에게 感謝의 뜻을 表하며 原稿 整理를 協助해 준 朴興奎, 金正一, 金成坤, 朴弘載, 吳尙奎 先生님과 康守哲 學兄도 내게는 有益했습니다.

끝으로 論文 作成 中에 하나 님께로 男便과 하나 뿐인 孫女까지 보낸 슬픔을 달고 온갖 어려운 與件 속에서 祈禱로 뒷바라지 해 주신 나의 사랑하는 어머님께 이 기쁨을 드리며 딸 유미를 잃고도 내게 勇氣를 준 누님과 妹兄 그리고 同生 明姬, 明恩 僉享과도 이 기쁨을 나눕니다.

또한 本 論文이 結實되기까지 祈禱로 끝까지 激勵해준 나의 同伴者가 될 사랑하는 成基玉 先生님에게도 이 고마움을 간직합니다.