

돼지 미성숙난포난의 체외수정과 동결에 관한 연구

김 중 계

제주대학교 농과대학 동물자원학과

제1장 서론

과학이 발달함에 따라 과거의 공상과학소설에나 등장하던 가축개량이 현실화 되고 있다. 이러한 가축개량의 효율적인 발전을 위해서는 우수한 유전적 자질을 가진 개체에 대한 활용이 필요하다. 인공수정기술의 발전과 지속적인 보급에 의해 우량개체의 정자는 상당한 수준까지 이용되고 있다. 그러나 암가축의 경우는 1회의 배란으로 얻어지는 난자수가 정자에 비해 극히 적기 때문에 우수난자의 공란수를 확보하기 위해, 도축장에서 얻어지는 난소로부터 다수의 난포난(卵母細胞)을 채취해서 이것을 체외에서 배양, 성숙시켜 체외수정 후 이식배(移植胚)로서 이용하는 방법이 고안되었다. 위와 같은 개발은 가축의 효율적 증식을 가능하게 할 뿐 아니라, 유전적 개량을 목적으로한 전핵기란(前核期卵)의 DNA 도입에 의한 트랜스제닉동물(transgenic animal)의 작성 및 핵이식(核移植)에 의한 클론동물(clone animal) 작성에까지 응용되고 있다. 그러나 이들 연구를 수행하기 위한 기본은 난포난의 유효이용을 가능하게 하는 것이며, 유전자 도입, 핵이식 연구를 위한 재료의 제공, 또는 배의 다수생산을 위해서라도 난포난의 체외성숙 및 수정의 기술을 확립하는 일이 중요하며 반드시 필요하다.

난포난의 체외성숙에 관한 연구는 Pincus와 Enzmann(1935)에 의해 난포에서 채취한 토끼 난포난을 체외에서 배양하면 성숙분열이 재개된다는 보고에서 비롯되었다. 그 이후 실

험동물, 대가축의 다수동물종에서 난포난의 체외성숙, 수정의 연구가 행해져, 배이식(胚移植)에 의한 산자를 얻는데까지 성공하였으며, 이미 소에서는 실용화 단계에까지 진행되고 있다. 그러나 돼지에 있어서는 체외성숙, 수정에 의해 산자를 얻은 예(Mattioli 등, 1989; Yoshida 등, 1993)는 타 동물종에 비해 극히 적은 편이다. 돼지의 체외수정에는 소에 비해 다정자수정(polyspermy)이 빈번히 일어나고(Yoshida 등, 1989; Mattioli 등, 1989), 난자 내에서 정자의 응성전핵에의 발달이 불완전하기 때문에 그 후의 수정란의 발생단계에서 4-cell block이 일어나는 등, 난분할도 정상으로 진행되지 않는다. 이들 제문제는 난포난의 성숙과정에서 무언가 불충분한 점이 존재하기 때문에 발생한다고 생각되어 진다. 그 중 몇 가지 시사되고 있는 문제점 또는 고려해야 할 점에 대해 예를 들면 다음과 같다. ①배양액의 종류, ②적정배양시간 및 온도, ③생체내의 환경에 근접한 배양방법(생식기 체세포와의 공배양 또는 난포액 등의 첨가), ④호르몬 또는 성장인자로부터 유래하는 제 2의 물질 등이 성숙과정에 관여하는 시기(cAMP, Ca²⁺, DAG, steroids), ⑤난포난 개체간의 차를 최소화(재현성) 등, 이외에도 난포로부터 난포난을 흡인(aspiration)할 때 주사기, 바늘의 크기라든가 또는 배양소적(培養少滴)의 양 및 배양소적의 작성시의 파라핀오일(paraffin oil)등 검토해야 될 점이 너무나 많으나 위에 기술한 5가지 점을 충분히 검토함으로써 타가축과 거의 동일한 성적을 얻을 수 있다고 생각한다. 만일 돼

지의 체외성숙, 수정 방법이 확립되어 어느 연구자가 실험을 수행해도 동일한 성적을 얻을 수 있는, 즉 재현성이 확고히 된다면 채란 직후의 미성숙 난포난(卵母細胞)을 동결 보존해 줌으로써 시간에 구애를 안받고 돼지 체외성숙, 수정에 관한 연구가 더욱 활성화되리라 본다. 또한 타가축에서 해결되지 않은 부분을 검토하는데 있어서도 돼지 난포난의 체외성숙, 수정 및 동결보존(凍結保存) 기술이 응용되리라 본다. 그만큼 돼지의 체외성숙, 수정은 타가축에 비해서 용이하지 않다고 봐도 과언이 아니다. 본고에서는 돼지 난포난의 생존성(동결보존), 체외성숙, 배양과정에 있어서 영향을 미치는 주요인과 호르몬 및 타인자의 관련성과 작용시기 등을 중심으로, 여기에 제시되는 Table들은 아직 학회에 미발표된 박사, 석사논문(강승률, 1997; 고희진, 1997)을 중심으로 발취하여 기술하였다.

제2장 돼지 난자의 체외수정

일반적으로 포유동물은 생체 내에서 수정이 이루어지고, 생식세포계열의 영속성을 유지하고 있지만 생애에 걸쳐 생식세포, 특히 난세포의 이용효율은 아직 낮다. 따라서 체외성숙 및 체외수정 기술을 비롯한 발생 공학적 수법을 이용해서, 포유동물의 생식세포 자원을 효율적으로 유용할 수 있는 시스템(system)이 구축된다면 생명과학의 분야에 많은 기초적 정보를 제공할 뿐만 아니라, 경제적인 동물의 개량·증식 및 효과적인 불임치료(不妊治療)의 확립 또는 인구폭발문제 해결을 위한 안전한 피임약의 개발에 적용할 수 있다.

1980년대에 들어와서 주요 가축에서 체외수정 유래의 산자가 탄생하게 되었다. 돼지에 있어서도 체내 성숙란(Cheng, 1985; Yoshida,

1987, 1989) 및 체외 성숙란(Mattioli, 1989; Yoshida, 1993)을 체외 수정해서 산자를 얻는데 성공하고 있다. 본장에서는 필자가 수행하고 있는 돼지 난자의 체외수정 기술에 관한 개요와 연구분야의 이용에 관해 최근의 지견을 참고하면서 기술하고자 한다.

1. 돼지 난자의 체외수정 과정

돼지 난자의 체외수정 기술은 마우스 등의 실험 소동물과 똑같이 1)난자의 채취와 성숙, 2)정자의 채취와 전 처리, 3)체외 수정과 체외 수정란의 배양 및 4)체외 수정란 이식 등으로 구성된다.

1)난자의 채취와 성숙

일반적으로 포유동물의 난자는 제 2 성숙 분열 중기의 단계에서 난포로부터 난관에 배란되어 수정에 이른다. 따라서, 공시 난자는 제 2 성숙 분열 중기까지 성숙한 것이 아니면 안된다. 돼지의 성숙란을 얻는 방법에는 생체 내에서 성숙한 난자를 배란전의 성숙난포 및 배란직후의 난관으로부터 회수하는 방법과 미성숙란의 체외배양(體外培養)에 의해 체외 성숙난자를 회수하는 방법이 있다.

가. 체내성숙란 : 성성숙 직전의 암돼지(6-7개월령, 체중 약 100kg)에 1,000-1,500IU의 임마 혈청성 성선 자극 호르몬(HCG)을 72시간 간격으로 근육 내 주사한다. 난자는 HCG투여 후 39~41시간에 성숙난포(직경 7~10mm)의 흡입과 난관관류(卵管灌流)에 의해 채취한다. 이 방법에 의하면 1두당 20개 전후의 성숙난자를 채취하는 것이 가능하고, 봄 또는 초가을에 처리를 행하면 보다 양호한 채란수가 기대될 수 있다(吉田光敏, 1988). 채란 후 난구세포층을 부분적으로 제거해서 세척 후 체외수정에 이용한다.

나. 체외성숙란 : 미성숙난자는 식육센터에서 채취한 돼지난소의 난포(직경 2~5mm)로부터 흡인해서 채취한다. 난자는 난구세포층이 긴밀히 투명대에 부착한 것을 선별하면서, 난자세척용 및 성숙배양액으로 수회 세척하여 10~15개를 1군으로 하여 유동파라핀 오일(paraffin oil) 아래서 성숙배양의 미소적(0.2ml)에 옮겨 40~48시간 동안 탄산가스 배양기내에서 체외성숙배양을 실시한다.

2) 정자의 채취와 전 처리

동일 개체로부터 정액을 반복해서 채취할 수 있어야 하고, 돼지정자의 내동성(耐凍性)이 낮다는 점 및 대규모의 종돈장이 대학부근에 없다는 점 등의 요인 때문에 필자 등은 주로 종돈돼지로부터 수장압법으로 채취한 농후부의 사출정자를 신선 또는 15°C 에서 1~3일 액상 보존한 상태에서 체외수정에 이용하고 있다. 또한, 최근 돼지정자의 액상보존성을 향상시킬 수 있는 희석액이 개발되어, 수정시의 정자농도를 조절함으로써, 1주일 이상 보존한 정자의 사용도 가능하다.

종래, 돼지 사출정자는 난자의 수정전 일정시간의 전 배양을 행하고 있었지만, 최근에는 이 조작을 생략하고 있다. 즉, 정자는 0.1% BSA를 첨가한 생리식염수로 세척 후(550g), 정자수계측 및 수정배양액으로 희석해서 곧바로 난자에 매정(媒精)시키는 것이 가능하다. 한편, 체외수정에 공시하는 정자는 수정능 획득(受精能獲得)과 침체반응을 유기할 수 있는 조건하에서 난자에 매정시킬 필요가 있다.

3) 체외수정과 체외수정란의 배양

난자는 수정배양액에 도입 후, 정자를 매정해서 체외수정을 실시한다. 수정배양액의 양은 실험목적에 따라서 0.1~2.0ml의 범위내에 설정하고 있다. 매정시의 정자수는 1.0×10^4 세포/ml

이상의 농도를 적용하고 있다. 매정시의 정자농도는 공시돈 및 정자의 보존기간을 보고 조절할 필요가 있고, 예비실험을 수회 반복한 후 본 실험에 사용할 정자농도를 결정한다. 그리고, 체외수정에 이용하는 배양 dish의 품질도 매정시의 정자농도(精子濃度)를 결정하는 중요한 요인이며, 표면가공 처리한 dish(Falcon-R 1008 등)를 쓰면, dish의 표면에 부착하는 정자의 수가 증가하기 때문에 매정시의 정자농도를 높게 설정할 필요가 있다. 이 영향을 피하기 위해 표면가공 무처리한 dish를 사용하는 것이 바람직하다.

한편, 체외수정 후, 정자가 난자 투명대를 통과하는 시간은 3시간 전후며, 난세포질내에 정자가 침입하는 것은 6시간 이내에 80%이상의 난자에서 관찰되고, 12시간일 때 자용전핵의 형성이 이루어진다. 발생 배양액(0.1ml)에 수정란을 옮기는 시간은 수정 후 6-8시간에 행한다. 수정란이 2-cell까지 발생하는 시기는 수정 후 24시간부터 관찰되며, 수정 후 27~33시간대에서 2-cell이 가장 많이 출현한다. 4-cell은 수정 후 36~42시간에 많이 관찰된다. 그리고, 체외성숙, 수정후의 2~4세포기란은 동종생식기에 이식 및 회수에 의한 생체내 배양 또는 발생배양액에 의한 체외 배양에 의해 수정 후 5-6일째에 전자의 방법으로 하면 약 10%, 후자의 방법으로 하면 약 6%가 상실배 또는 배반포에 발생된다는 것이 확인되고 있다(Yoshida, 1990).

4) 체외수정란의 이식

돼지의 수정란이식은 생식기의 구조상, 주로 외과적 수법에 의해 행해진다. 수란축 돼지는 미리 호르몬제 등을 투여해서, 이식란(移植卵) 발생단계보다 0.5~1일 정도 늦춰서 성주기를 조절한다. 수란축(受卵畜) 돼지는 마취 후 정중절개해서 생식기를 꺼낸 다음 체외수정란의

이식을 실시한다. 2~4세포기의 체외수정란을 소량의 발생용 배양액과 함께 실리콘 튜브(silicon tube, 직경1.5mm)에 흡인한 후, 난관에 삽입해서 체외수정란의 이식을 행하고 있다. 이 방법에 의해 Yoshida등은 체내성숙, 체외수정 시도 후 자돈 16두(Yoshida, 1987; Yoshida, 1989)와 체외성숙, 체외수정 후 자돈 3두(Yoshida, 1993)를 생산하였다.

2. 돼지 체외성숙과 수정에서의 hormone 효과

생체내에 있어서 난포난의 성장 및 성숙은 난포난을 둘러싸고 있는 난포의 체세포(난구세포, 과립층세포, 난포막세포)의 발육과 불가분의 관계에 있다. 암가축에 발정이 오면, 시상하부로부터 방출된 성선 자극 호르몬 방출호르몬(GnRH)의 자극에 의해 하수체로부터 나

포자극호르몬(FSH) 및 황체형성호르몬(LH)이 대량으로 방출된다. 이 과정에 의해 어느 일정수의 난포에서는 FSH자극에 의해 과립층세포가 증식하고, 또한 이들 과립층세포간에 분비액이 저류해서 난포강을 형성한 후 제 2난포는 포상난포(제 3차 난포)로 발육한다. 과립층세포는 FSH의 수용체를 늘리고 progesterone의 분비를 증대시킨다. 한편, 난포막세포에서는 LH작용에 의해 androgen을 생성한다. 이 androgen이 과립층세포에 이행하면, FSH작용에 의해 estrogen으로 변환되어 대량의 estrogen이 생성된다. Estrogen은 과립층세포에 자기의 수용체를 만들게 하여 난포막세포의 LH-receptor 및 과립층세포의 FSH-receptor를 증가시킨다. 그 결과, 난포난의 성숙과정이 제어되는데, 호르몬이외에 성장인자들이 성숙과정에 관여한다는 것이 시사되고

Table 1. Effects of gonadotropins on the rates of GVBD and M II of oocytes.

Hormone	%(Mean ± SE)		
	GVBD		M II
	24h culture	32h culture	46h culture
Control	22.7 ± 3.5 ^a	29.2 ± 4.3 ^d	20.4 ± 3.9 ^f
PMSG	72.9 ± 7.3 ^c	71.4 ± 4.6 ^e	45.8 ± 4.0 ^g
hCG	47.9 ± 5.0 ^b	73.0 ± 3.9 ^e	62.0 ± 7.9 ^g

6 replicates (10-20 oocytes/replicate).

a-c, b-e, f-g Means with different letters are significantly from each other(P < 0.05)

Table 2. Effect of inositol added at the various stages of maturation on subsequent fertilization of oocytes

Inositol addition	%(Mean ± SE)		
	Sperm	Monospermy	Male pronuclear formation
	penetration		
Control	80.2 ± 5.0	37.4 ± 3.9	24.4 ± 3.2
0 - 24h	83.7 ± 3.8	46.7 ± 4.7	45.6 ± 4.1*
0 - 32h	74.6 ± 4.7	54.4 ± 4.8*	36.3 ± 4.0*

Oocytes were cultured for the first 24h or 32h in medium containing inositol and for the second 22h or 14h in inositol-free medium, and then inseminated for 6h and further cultured for 12h. 5 replicates(10-20 oocytes/replicate). Asterisks indicate significant difference from its control(P<0.05).

있어, 난포난의 성숙과정은 어느 한 인자의 작용에 의해서만 제어되는 것이 아니라, 복잡하고 특수한 연락체계 또는 자극에 의해서 제어되고 있다고 생각된다. 그런 의미에서 난포난을 둘러싸고 있는 난구세포의 역할이란 무엇보다 중요하다. 즉 난자의 성숙과정에 있어서, 난포난과 난구세포간에는 정보전달체계가 존재하며, 이 전달체계는 수정후의 초기발생단계에 까지 중요한 영향을 미치고(Table 4), 앞서 기술한 바와 같이 주로 호르몬의 작용에 의해 제어된다. 따라서, 난포난을 체외에서 성숙배양 시킬 경우에 호르몬을 비롯한 cAMP (PKA촉진인자), Ca²⁺ 및 DAG(PKC촉진인

자)등의 작용시기와 아울러 배양액에의 첨가시기를 고려해볼 필요가 있다. Kang(1996)의 연구보고에 의하면 Table 1, 2에 나타난 바와 같이, 성숙과정에 있어서 성선자극 호르몬 및 inositol의 작용시기가 각각 다르고 있다.

성선자극호르몬의 경우, 배양시간을 46시간으로 하였을 때, PMSG는 0~24시간 사이에 24~46시간 사이에는 hCG가 난자 성숙을 촉진하고 있다. 그리고 Table 3에 나타난 바와 같이 inositol인 경우는 PMSG와 마찬가지로 성숙배양의 전반에 작용하고 있다는 것을 알 수 있다. 배양액에 inositol을 첨가함으로써 다음과 같은 과정을 통해서 난자 성숙과정에 관

Table 3. Effects of gonadotropins and inositol on the maturation of oocytes

	Culture period		Maturation % (Mean ± SE)
	0 - 24h	24 - 46h	
Control		20.4 ± 3.9 ^a	
PMSG		None	50.4 ± 3.6 ^b
PMSG + Inositol		None	62.2 ± 3.3 ^c
PMSG		hCG	75.4 ± 4.2 ^d
PMSG + Inositol		hCG	85.2 ± 2.0 ^d

Oocytes were cultured in medium containing PMSG or PMSG + inositol for the first 24h and then in medium with or without hCG for the second 22h. 6 replicates(10-20 oocytes).

a, b, c, d Means with different letters are significantly different from each other(P<0.05).

Table 4. Effects of different maturation conditions on the cleavage capacity of zygotes 42h after insemination

Maturation condition	*No. of oocytes	Development (%)		Total No. of Cleaved zygotes	
		2-cell	4-cell		
P+h+E2+FBS+pFF	113	18 (16.3±2.8)	7 (6.1±0.8) ^a	25 (22.4±2.4) ^d	
PMSG	hCG	122	25 (20.5±1.9)	14 (11.6±1.7) ^b	39 (32.1±2.8) ^b
P+Ino	hCG	123	24 (19.5±3.5)	29 (23.6±3.1) ^c	53 (43.1±2.6) ^f

* Number of oocytes used for maturation culture.

a-c, b-f Means with different letters are significantly different from each other(P<0.05)

여한다고 시사되고 있다(Kang,1996; 1997). 즉, PI(phosphatidyl inositol)의 기질인 inositol을 첨가하면 난구세포에서 PI대사활성이 활발히 진행되어 PIP2(phosphatidyl inositol 4, 5-bisphosphate)가 합성된 후, 이 PIP2는 PLC(phospholipase C)에 의해 분해되어 난세포에 최종적으로 관여하는 IP3(diacylglycerol) 및 DAG를 생성한다. IP3는 난세포로 이동한 후 난세포내의 Ca^{2+} 저장고를 자극하여 Ca^{2+} 방출을 촉진하고, DAG는 PKC(protein kinase C)를 활성화 시켜 난자의 성숙을 제어한다. 이미 돼지난포의 과립층세포에서 PI대사활성이 일어나고 있다는 것이 시사되고 있으며(Dimino 등, 1987), Kang(1996)의 연구결과에서 본 바와 같이, 금후 PI대사계를 활용한 실험이 돼지 및 타가축에서 활발히 수행되리라라고 기대된다.

3. 돼지에 있어서 체외수정 기술의 이용

1)분자생물학 분야에의 이용

포유동물에 있어서는 미해명된 점이 많은 난자의 성숙, 수정, 발생의 분자 기작과 정자수정능획득(精子受精能獲得)의 분자기작 등의 해명에 체외수정기술이 광범위하게 이용될 수 있다.

가. 돼지 난포액(pFF)중의 난자성숙분열 촉진 물질(Yoshida, 1990; Yoshida, 1992).

성숙용 배양액에 pFF또는 pFF획분의 10% (v/v)첨가는 돼지 미성숙 난자의 체외성숙, 수정 및 발생상황에 있어서, 핵성숙율의 증가, 다란핵수정율의 감소, 정상수정율의 증가 및 정상난할율의 증가에 유효하다. 이 pFF(porcine follicular fluid)에 들어있는 유효성분의 물질 성상은 분자량이 1~20만의 비교적 큰 산성물질이 본체인 것이라는 것이 밝혀졌다. 그리고,

최근 pFF중의 이 성분은 체외성숙기간 중의 돼지난자 개체간의 단백질 합성상태의 변이를 축소시키는 작용이 있다고 시사되고 있으며, 본 물질은 pFF중의 초미량성분이고 2개의 subunit로 구성되는 분자량이 62,000의 당단백질(glycoprotein)이라는 것이 판명보고 되었다.

나. Glutathione(GSH)과 돼지난자의 응성전핵 형성능(Yoshida, 1992, 1993).

GSH합성기질인 cystein(CySH)을 성숙배양액에 첨가 또는 고농도의 CySH를 함유하고 있는 Weymouth배양액으로 돼지난자를 성숙배양(成熟培養)한 후 체외수정하면 응성전핵(雄性前核)형성율이 현저하게 증가된다. 한편, 난자의 성숙기간중에 GSH합성을 저해하면 수정 후 정자핵이 응성전핵으로 발달하는 것이 억제된다. 일반적으로 세포내의 환원력은 SH기 화합물인 GSH에 의해 유지되고, 난자에 침입한 정자핵이 팽화해서 응성전핵으로 발달하기 위한 제 1의 조건으로서, 정자핵중의 프로타민(protamin)의 S-S결합이 환원되지 않으면 안된다. 예측하건대, 성숙기간중에 충분한 GSH(glutathione)를 축적한 난자에서는 수정 직후에 GSH의 작용에 의해 정자핵의 프로타민(protamin)의 S-S결합을 환원한 결과, 정자핵의 팽화를 빠르고 완전히 유기함으로써 계속해서 전핵형성을 촉진한다고 생각된다.

다. 돼지난자의 표층과립의 검출과 그의 성상(Yoshida, 1993).

돼지에서는 다정자침입 거부기작(多精子侵入拒否機作)의 발현에 중요한 역할을 하고 있는 표층과립의 검출에 있어서 전자현미경이 이용되어 왔다. 그러나, Yoshida 등(1993)은 돼지의 표층과립을 검출하는데 있어서 광학현미경을 이용한 PNA(peanut agglutinin)가 probe로서 유효하다는 것을 보고하고, PNA를 ligand로 Affinity chromatography법에 의해

표층과립성분의 검출이 가능하다고 시사하고 있다. PNA는 β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc를 구성성분으로 하는 물질이 포함되어 있다는 것이 시사되고 있다.

2) 발생공학연구분야

형질전환돼지(形質轉換豚; transgenic pig) 또는 크론돼지(clonic pig)의 작출기술의 개발에는 방대한 수의 수정란이 필요하다. 체외수정은 거의 동일한 발생단계에 있는 수정란을 저가로 다수 생산할 수 있는 이점이 있다. 따라서 체외수정기술은 이러한 발생공학의 연구분야에 수정란을 공급하는 수단으로서 활용될 수 있다.

3) 산업분야에의 이용

현재 얻어지고 있는 돼지난자는 식육센터에 출하되고 있는 육용교잡종(肉用交雜種)의 난소로부터 획득되고 있기 때문에 소에서 행해지고 있는 것처럼 체외수정란의 산업화에 직접적 이용은 제한되어 있다. 그러나 체외수정은 정자의 수정능력을 객관적 및 신속하게 평가할 수 있기 때문에 정액보존법의 개발과 우수한 종축돈의 번식장애(繁殖障礙)의 진단에 있어서 신뢰성이 높은 평가수단으로써 활용될 수 있다.

이상 현재까지 수행된 연구 및 타 연구자의 보고를 참고로 해서 돼지난자의 체외수정기술에 처한 지견을 소개했다. 돼지난자의 체외수정기술은 현재 다른 가축과 달리 많은 진도가 없다. 금후 많은 연구재료가 풍부하다는 점, 공시난(共試卵) 입수가 용이하다는 점 등이 있기 때문에 분자생물학 및 발생공학연구에 있어서 극히 강력한 전술로 전개될 가능성이 크다고 생각된다.

제3장 돼지난포난의 동결보존

1. 난자의 동결보존

인간에서 동결융해후의 수정란을 이식하여 임신이 성공되기까지는 수많은 실험동물 및 가축 수정란을 이용한 동결기술의 연구개발이 지대한 공헌을 하였다. Whittingham(1977)에 의해 보고된 완만동결보존 기술을 시점으로 하여 동결보호제, 평형시간, 동결속도, 융해온도 및 시간 등을 주축으로 한 동결보존기술이 검토되어 왔다. 최근 Rall과 Fahy(1985)의 vitrification방법에 의한 성공적인 수정란 동결보존기법은 초기배 및 난자에 적용하기 위한 시도가 이루어져 왔으며, 본 연구진도 1992년에 mouse 수정란의 동결보존에 있어 유리화 동결기술을 이용하여 융해 후 92%의 높은 생존율을 얻은바 있어 이 기술의 장점을 재확인한 바 있으며, mouse 2-cell 수정란에도 적용하여 그와 유사한 성적을 보고한 바 있다. 한편 포유동물의 난자 동결보존에 관한 연구는 Whittingham(1977)에 의해 생쥐의 성숙난자를 동결 융해하여 체외수정과 발생에 성공함으로써 타 가축에서도 응용연구가 시도되어 왔다. 일반적으로 난자의 동결도 수정란과 마찬가지로 동결보호제(凍結保護劑)의 처리 및 동결 융해 후 동결보호제를 제거시키는 일련의 과정을 기본 방법으로 이용하고 있으나 수정란의 경우보다 동결에 더 민감하기 때문에 융해(融解)후 생존율이 매우 낮은 실정이다 (Glenistre 등, 1987; Schroeder 등, 1990). 가축에 있어서 난자의 동결은 소(Otoi 등, 1992), 돼지(Didion 등, 1990), 토끼(AL-Hasani 등, 1989), 생쥐와 쥐(Shaw 등, 1992; pellicer 등, 1988), 햄스터(Quinn 등, 1982)를 이용한 연구가 보고되고 있으며, 사람(Trounson, 1986)에서도 보고된 바 있다. 본 연구진에 의한 mouse 수정란의 유리화 동결기술을 토대로

최근 5년간 mouse, rat, porcine 난자의 유리화 동결보존법(凍結保存法)을 연구 개발해 왔다. 그러나 성공적인 수정란의 동결보존에 비해 매우 저조한 성적이 보고되고 있으며, 특히 소와는 달리 돼지인 경우 정자와 수정란에서만 뿐만 아니라 난포난에서도 동결용해 후 생존율이 저조하게 나타났다. 따라서 돼지 난포난의 동결기술에 있어서 매우 신중한 검토가 이루어져야 한다는 사실과 함께 최근에는 완만 동결과 급속동결 비교 등을 비롯하여 다양한 연구들을 진행하고 있다.

2. 난자의 발육단계

동결전, 난자의 성숙분열단계(meiotic stage)가 용해후 난자의 생존율에 매우 큰 영향을 미치기 때문에 난자의 발육 및 성숙과정을 정확히 이해하는 것이 동결방법, 동결보호제 선정, 평형시간 등을 결정짓는 선결조건이 된다. 난자의 동결은 성숙(Lim 등, 1991; Leibo, 1977) 또는 미성숙단계(Rubinsky 등, 1991; Van Blerkom, 1989)에서 행하여지고 있으나 이들 난자의 동결성에 대한 연구결과가 보고자간에 차이가 있다. 일반적으로 난자의 동결은 다른 세포와는 달리 큰 세포이기 때문에 동결에 따른 손상이 크며 특히 세포체질(cytoskeleton), 방추사, 난황막, 투명대 및 피층과립의 파괴 등, 난자의 구조적 변화가 일어

나며, 이에 수반해서 분자구조 및 조성에 있어서도 큰 변화가 발생한다(Park과 Ruffing, 1992). 성숙난포란(成熟卵胞卵)의 동결시 Rall (1992), Hamlett 등(1989)은 동결보호제에 노출되고 냉각되는 동안 metaphase I 또는 II 단계에서 microtubules의 파괴는 난자의 polyploid의 발생의 원인이 되고 있으며 피층과립의 파괴로 인해 수정과정에서의 다정자침입을 방지하지 못하거나 수정율이 저하되는 가장 큰 원인이라고 보고하고 있다. 이는 미성숙 난포란의 동결시에는 비정상적인 성상체(aster)의 형성으로 microtubules의 파괴가 일어나는 등, 구조적 변화가 원인이 되어 난자를 용해한 후 성숙배양액을 실시해도 핵분열단계에서 염색체 분리가 정상적으로 일어나지 않아 결국 난자는 성숙되지 않는다(Van Blerkom, 1989).

본 연구진은 microtubules의 동결과정에 대한 상해를 보상해주기 위해 유리화 동결전 cytoskeletal stabilizer로 처리한 돼지 미성숙 난포난을 배양한 결과, 20.4%의 성숙율을 얻었으며, CS 무처리한 돼지 미성숙난포난의 체외 성숙율은 12.0%로써 CS 처리에 의한 난포난의 체외성숙율이 양호한 성적을 보여주었지만 유의차는 없었다(Table 5). 그러나 CS 처리구에서 GVBD 또는 MI 단계까지 핵성숙이 진행되는 것으로 보아 CS 처리가 난포난의 유리화 동결용해 후 체외성숙에 도움을 주는 경향을

Table 5. Effect of cytoskeletal stabilizer(CS) on the in vitro maturation of immature porcine oocytes frozen by vitrification method

Treatment	No. of oocytes		
	Examined	Recovered(%)	Matured(%)
Control	68	51(75.0)	51.4±1.9 ^a
CS/VS	69	49(71.0)	10.0±3.6 ^b
VS	68	40(73.5)	5.9±2.9 ^b

VS: ethylene glycol 25%+propylene glycol 25%+Ficoll 10%+0.5M sucrose+10% FBS+10% pFF

Exposure time: 3 min. Dilution time: 5 min.

Values with different superscripts are significantly different(p<0.01)

보였다.

최근 난자의 성숙단계에 따른 동결성에 대하여 Schroeder 등(1990)은 생쥐에서 난핵포시기(卵核胞時期)와 체외성숙 및 배란된 난자의 동결용해후 생존성과 발생을 비교실험한 보고에서 배란된 난자에서 생존율이 우수하였으며, Mandelbaum 등(1987)은 사람에서 성숙 및 미성숙난자의 동결에서 전자가 후자보다 생존성이 2배정도 높다고 하였다. 본 연구진도 M II단계 난자에서 microtubules의 동결에 대한 상해를 피하기 위해, GV 단계의 난자를 동결 보존 시키려 시도하여 보았으나 오히려 성숙 난자보다 성적이 저조하게 나타났다(Table 5). 미성숙난포난의 난구세포층 형태에 따른 동결용해후 체외성숙율을 조사한 결과, 난구세포층이 많이 부착된 것이 적은 것보다 높은 체외성숙율(22.4% vs 6.2%)을 보여주었다. Pellicer 등(1988)은 rat 미성숙난포난의 동결보존에 관한 연구에서 난포난의 난구세포층은 동결에 대한 해를 보호해 주는 것으로 보고한 바 있다.

본 실험에서 난구세포층이 더 많은 것이 생존율이 높게 나타났다. 하지만 동결하지 않은 난포난(Control B)의 체외성숙율도 대조구에 비해 감소하는 추세를 보여주었다. 한편 체외성숙된 난자(M II)가 미성숙 난포난보다 동결 보존 후 FDA-test에 의해 높은 생존율(35.2% vs 22.4%) 보여주었다. 이런 결과로부터 성숙 난자에 비해 미성숙 난자가 동결에 처한 sensitivity가 높으며 미성숙 단계의 난자에서 구조적 변화 및 파괴가 일어나기 쉽다는 것이 간접적으로 고려된다. 그러나 성숙난자에서도 동결용해 후 투명대의 파괴, 절단된 난자들이 빈번하게 나타나는 것을 볼 수 있어서 성숙난자의 유리화 동결보존을 위한 처리방법의 개선점을 제시하는 것으로 사료된다. 동결용해후 미성숙 난자를 체외성숙 시켜보면 난구세포의 팽창은 이루어지고 있는 반면, 난자의 핵상은

분열정지 상태의 것이 많이 보이며, 이와같이 동결난자의 용해후의 성숙율이 저조한 이유는 난구세포와 난자의 구조적 및 생리적 차이에 기인하는 경우도 있지만 우선은 동결보호제 종류라든가 평형기산 등에 관한 검토가 급선무이다.

또한 소에 비해 돼지의 난포난동결의 결과가 떨어지는 것으로 시사되어 동물종에 따른 耐凍性에 대한 검토도 수반되어야 한다고 생각한다.

3. 평형시간(平衡時間)

Mazur(1970)는 동결과정에서 세포내 빙정형성(氷晶形成)과 용액의 영향이 세포치사의 주된 요인이 되기 때문에 적정 평형시간이 필요함을 보고하였고, Willadsen 등(1976)은 삼투압 영향과 화학적 독성의 영향을 최소화하기 위하여 단계적인 첨가 및 희석방법을 사용하였다. 그 후 Renard 등(1984)은 비투과성 동결보호제인 sucrose를 첨가함으로써 세포내외의 급속한 삼투압 변화를 줄이고 단시간 평형으로 동결이 가능한 2단계 첨가법 및 희석방법을 개발하였다. Szell과 Shellton(1986)은 sucrose로 탈수 한 수정란을 급속동결할 경우 완만동결보다 훨씬 높은 glycerol 농도가 요구된다고 하였으며, Takahashi와 Kanagawa(1990)는 동결보존액에 수정란을 평형할때 최소용적에 도달하는 시기가 최적 평형시간이며 평형시간(平衡時間)이 생존성에 중요 요인이 됨을 보고하였다. 그러나 妹尾 등(1981)은 동결보호제를 첨가할 때 온도 및 최적 평형시간은 동물종에 따라 다르다고 하였다. 한편 Leibo 등(1974)은 8세포기의 수정란 동결에서 평형시간과 평형시 동결보존액의 온도가 수정란의 생존에 영향을 미치지 않았다고 하였다. 난자 동결시의 평형시간(平衡時間)에 관해서 Taha와 Schellander(1992)는 소에서 미성숙

난포란과 체외성숙난포란을 비교하였을 때, 20~60초동안의 평형시간에서는 난할율(卵割率)과 배반포형성율에 차이가 없었으나, 5-10분 평형시 미성숙난포란의 경우 전혀 난할되지 않음으로써 평형시간은 짧아야 하는 것으로 보고하였다. 미성숙 난자는 세포막이 불안정하기 때문에 유리화 동결시 고삼투압의 동결액에 직접 노출시키는 것보다는 저농도에서 고농도의 step에 의한 평형방법이 요구된다.

본 연구진의 실험(Table 6)에서 회석기간도 평형시간만큼 중요하다는 사실을 알 수 있었다. 회석기간에 따른 FDA-test에 의한 생존율을 보면 각각 43.1, 48.9, 66.8%로서 5분에서 가장 좋은 성적을 볼 수 있었다. 핵 성숙율에

서 5분 처리구가 1분과 3분에 비해 가장 높은 생존율(53.4% vs 22.2%, 34.%)을 보여주었으며 대조구(55.1%)와 비슷한 생존율을 보여주었다. Sucrose를 동결액(凍結液) 또는 희석액(稀釋液)에 첨가했을 때 크게 2가지 역할을 한다고 보고되어지고 있다(Szell 등, 1985). 첫째는 세포내 탈수를 촉진시킴으로써 동결시 빙정의 형성을 방지하고 seeding 없이 급속하게 동결할 수 있다는 장점이 있다(Mazur 1979; Nguyen 등, 1984; Renard 등, 1984; Takeda 등, 1984). 둘째는 세포내에 침투해 있는 동결보호제를 제거하기 위해 회석기간동안 세포의 팽창을 조절한다는 것이다(Leibo, 1984; Schneider 등, 1984). Table 7에 제시

Table 6. In vitro maturation of vitrified mature or immature porcine follicular oocytes.

Group	Examined	No. of oocytes	
		Fluorescenced	Matured(%)
Control #	25	N.T.	47.7±6.1
A	69	18.9±1.9 ^b	10.0±2.9 ^b
B	70	5.7±2.7 ^c	1.4±1.4 ^c
Control B #	28	N.T.	27.9±2.9
IVM	52	37.2±5.3 ^a	21.4±2.5 ^a

A: cumulus cells 1-3 layer groups, B: cumulus cell > 3 layer groups

IVM: In vitro matured oocytes.

Exposure time: 3 min. Dilution time: 5 min.

3 replicates, N.T.: Not tested.

Values with different superscripts are significantly different(p<0.01).

Table 7. Effect of dilution periods in vitrification solution on the in vitro maturation of immature porcine follicular oocytes

Dilution period(min)	No. of oocytes		
	Examined	Fluorescenced	Matured(%)
Control	58	71.9±3.3	55.1±2.2 ^a
1	58	43.1±3.2	22.2±3.5 ^b
3	58	48.9±3.5	34.5±2.8 ^c
5	58	66.8±3.2	53.4±1.5 ^a

VS: ethylene glycol 25% + propylene glycol 25% + Ficoll 10% + 0.5M sucrose + 10% FBS.

Values with different superscripts are significantly different(p<0.01).

된 바와같이 1분과 3분에서는 불충분한 세포내 동결보호제의 제거로 인해 독성 내지는 삼투압 변화에 저항성을 갖는데 회색시간이 충분치 못했다고 사료된다. 회색액에서의 불충분한 회색은 세포내의 동결보호제의 잔존을 허락하고 결과적으로 삼투압 손상을 유발하게 된다고 알려지고 있다. 따라서, 회색과정에서 삼투압 손상을 최소한 줄이는 것이 무엇보다 중요하며, 왜냐하면 회색과정에서 수분의 지속적인 유입으로 세포질이 본래의 크기보다 더 커지거나 심지어 난포난과괴라는 심각한 상태가 발생하기 때문이다. 특히 미성숙 난포난인 경우에는 불충분한 회색과정에서 난구세포의 이탈현상이 이를 증명하는 것으로 사료되어진다. 한편 유리화 동결액에 3분의 노출에 따르는 0.5M의 sucrose 용액에서의 회색은 5분 정도 충분하게 부여하는 것이 양호한 생존율을 가져다 줄 것이라고 사료되며, Ficoll의 존재가 sucrose와 함께 삼투압 변화를 조절하는 데 효과적인 회색을 도와주는 것으로 사료된다.

4. 동결보호제(凍結保護劑)

포유동물 생식세포의 동결에 사용되는 동결보호제(凍結保護劑)는 분자량이 적은 투과성 동결보호제와 분자량이 큰 비투과성(非透過性) 동결보호제로 구분되어 있다(Leibo와 Loskutoff, 1993; Friedler 등, 1988). Johnson과 Pickering(1987)은 생쥐난자의 동결에서 DMSO는 tubulin polymerization를 촉진시키고 비정상적인 성상체형성(星狀體形成)을 야기시킨다고 하였으며, Shaw와 Trounson(1989)은 생쥐난포란의 동결에서 propylene glycol(PG)은 단위발생과 연관이 있다고 하였다. Vincent 등(1989)은 토끼에서 DMSO와 PG 모두가 tubulin에 영향을 미치지만 PG가 filamentous actin의 cortical band를 이완시

켜 삼투압 영향을 줄이는데 다소 유리하다고 하였다.

미성숙 난포난동결후 체외수정과 발생에서 아직까지 소, 돼지에서의 산자생산이 성공된 예가 없으나 소에서는 동결 성숙난자로부터 체외수정후 17.6-22.4% 정도의 난할율을 얻었으며 배반포까지 발생율은 극히 저조한 실정이다(Lim 등, 1991; Otoi 등, 1993). 돼지에서는 동결 미성숙난포란으로부터 체외성숙후 겨우 25%만이 metaphase I 또는 II에 도달하였다는 보고가 있다(Rubinsky 등, 1991). Table 8에 보여진 바와 같이 돼지인 경우 glycerol과 ethylene glycol 보다는 DMSO와 PROH가 더 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 현재 사용되고 있는 몇 가지 동결보호제만으로 동결보존시키는 데에는 한계가 있으며 앞으로 보다 나은 동결보호제 개발이 시급하다고 생각된다.

침투성 동결보호제의 독성실험 결과 glycerol은 돼지 미성숙 난포난에 매우 해로운 동결보호제라고 사료된다. 특히 glycerol에 노출된 난포난들은 현미경하에서 관찰하면 다른 침투성 동결보호제에서 관찰할 수 없는 세포질내에 지질구에 의한 편광상태를 띠고 있는 경우를 볼 수 있었다. 이는 농도가 높아지면서 더 심해지는 것을 알 수 있었다. 확실하지는 않지만 이는 glycerol에 의한 지질구의 변성을 초래하거나 또는 간접적으로 지방산 변성을 초래하는 효소 등을 활성화시킴으로써 난포난의 성숙에 영향을 미쳤다고 사료된다. 미성숙 난포난의 동결보존에 관한 최초의 연구에서 Didion 등(1988)은 1.5M의 glycerol를 사용하여 완만동결, 융해 후 생존율이 0%였다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 동결은 하지 않았지만 이미 노출과정에서 상당한 해를 입은 난자가 생존하기에는 역부족이었지 않나 사료된다.

Table 8. Effect of cryoprotectant on the in vitro maturation of immature porcine follicular oocytes

CPA* % (v/v)	No. of oocytes examined	Nucleic stages after in vitro maturation				
		Deg	GV	GVBD	M I	%* of M II
Control	58	-	6	5	4	56.7±2.7 ^a
G 10	55	5	21	5	5	14.4±2.8 ^e
G 20	55	7	28	1	3	7.5±3.2 ^{ef}
G 30	55	6	28	5	2	3.6±3.6 ^{ef}
G 40	53	14	26	-	-	4.2±2.4 ^{ef}
D 10	57	-	8	3	3	59.0±2.1 ^a
D 20	57	1	5	2	6	60.8±5.2 ^a
D 30	57	4	9	2	4	52.9±5.0 ^{ab}
D 40	58	6	16	4	4	28.2±6.8 ^d
E 10	58	2	5	7	5	50.3±2.1 ^{ab}
E 20	56	-	8	3	14	43.6±4.4 ^{bc}
E 30	58	4	19	4	6	35.1±3.2 ^{cd}
E 40	56	12	27	4	-	11.1±2.6 ^e
P 10	58	-	4	6	5	54.9±3.0 ^a
P 20	55	-	6	5	5	56.4±2.4 ^a
P 30	56	4	8	2	3	55.6±3.4 ^a
P 40	58	7	17	5	6	28.6±2.5 ^a

*CPA: cryoprotectants, G: glycerol, D: dimethyl sulfoxide, E: ethylene glycol, P: propylene glycol
Exposure time: 3 min. Dilution time: 3 min.

values with different superscripts are significantly different (p < 0.01).

한편 ethylene glycol도 마찬가지로 농도가 증가하면서 생존율의 감소추세를 보여 돼지 난포난의 동결보호제로서 사용이 제고되어야 할 것으로 사료되어졌다. ethylene glycol은 지금까지 알려진 바로는 DMSO나 PROH보다 더 빠르게 세포내부로 침투하는 것으로 알려져 있다.

이런 급속한 침투로 인해 다른 내동제보다 세포에 독성을 줄 수 있는 기회가 더 길어짐에 따라 생존율 저하에 기여하지 않았나 생각된다. DMSO는 최근에 mouse 난자의 유리화 동결에 성공적으로 쓰인 동결보호제이다. 6.0M의 DMSO를 단용으로 쓰일만큼 독성이 없는 것으로 알려져 있다. 하지만 본 실험에서는

40%의 DMSO에서 생존율의 감소를 보여 주었다. 이는 개체 차이에 따른 난자의 특성으로 사료되어진다. 최근에 PROH의 동결보호제로서 사용이 늘어가고 있으며 본 실험에서도 DMSO에서 보여준 것처럼 양호한 성적을 보여주었다. 돼지 미성숙난포난의 유리화 동결을 위한 동결액 조성에 DMSO와 PROH는 효과적인 동결보호제가 될 것이라고 사료되어진다.

한편 난자 또는 수정란의 융해 후 생존성 판정의 방법으로 FDA (fluorescein diacetate)가 사용되어 왔으며 (Kim 등, 1988; Noto 등, 1991), 돼지에서 Didion 등 (1990)은 FDA 검사와 tripan blue (drcein) 검사를 동시에 이용하여 세포질 및 난구세포의 염색 정도와 밝기에

Table 9. The fertilization In Vitro of immature porcine follicle oocytes exposed various cryoprotectants after maturation In Vitro.

CPA* % (v/v)	No. of oocytes		No. of eggs		No. of embryos	
	examined		fluorescenced (%)		2 - 4 cell (%)	
Control	35		88.5±0.4		32.2±3.2 ^a	
G 10	30		31.1±2.7		13.9±5.9 ^{bcd}	
G 20	30		29.0±7.8		9.4±3.1 ^{cdef}	
G 30	30		7.3±4.3		6.3±3.6 ^{cdef}	
G 40	35		8.3±2.8		0 ^f	
D 10	35		43.0±3.5		25.5±6.0 ^{ba}	
D 20	35		48.6±2.7		15.6±5.1 ^{bcd}	
D 30	35		23.3±5.4		12.5±3.6 ^{ab}	
D 40	35		34.0±4.0		6.3±5.1 ^{cdef}	
E 10	35		34.7±5.7		12.5±3.6 ^{cde}	
E 20	35		28.8±3.9		6.3±3.6 ^{cdef}	
E 30	35		28.5±5.4		3.6±3.1 ^{def}	
E 40	35		22.6±4.3		3.1±3.1 ^{ef}	
P 10	30		65.3±3.8		15.6±6.0 ^{bcd}	
P 20	30		72.6±7.5		16.5±6.5 ^{bc}	
P 30	30		56.4±7.8		6.3±3.6 ^{cd}	
P 40	30		42.6±8.3		0 ^f	

*CPA: cryoprotectants, G:glycerol, D:dimethyl sulfoxide, E:ethylene glycol, P: propylene glycol
values with different superscripts are significantly different(p < 0.01).

따라 난자의 생존성을 판정하기도 하였다. 본 연구진은 국내에서 1988년도부터 최초로 mouse 수정란의 유리화 동결보존후 생존율(FDA-test)분석에 매우 유용한 방법과 장점을 발표하였고(김 등, 1992: 1994), 최근에 이르러 소 난포난에서도 여러 검증을 시도하여 적당한 농도에서 독성이 없음을 보여주었고, 여러가지 냉동제 중 여러 조합이 단일조합보다 우수하였음을 제8회 아세아-태평양축산학회(일본 1996.10)에서 발표한 바 있다.

5. 돼지 미성숙난포난의 동결보존을 위한 앞으로의 과제

일반적으로 돼지와 소 난자는 다른 가축과는 달리 세포내에 지질구(脂質球)를 다량함

유하고 있다. 돼지의 경우 소보다 더 많다. 특히 이러한 지방구가 동결융해시에 세포내 불규칙한 빙정의 형성을 초래하므로서 동결융해 후 생존율에 저하를 가져온다고 보고되고 있으며 이를 극복하기 위해 고속원심분리를 통한 지질구의 단일화를 유도한 후 지질구를 제거한 난자를 유리화 동결시킨 후 미세조작현미경(micromanipulator)을 이용하여 SUZI(subzonal insemination) 또는 ICSI(intracytoplasmic sperm injection)를 통한 체외수정에서 44%의 생존율을 보고하였다(Nagashima 등, 1996). 그러나 한편으로는 일부 중요한 지질이 난자의 세포분열에 관여한다는 보고가 있기 때문에 이는 더 신중하게 생각해 보아야 한다. 그러나 아직 난포난에 대한 동결시험의

보고는 적은 편이며, 성적이 저조하므로 이에 관한 실험이 요구되며, 한편 본 연구에서도 알 수 있듯이 돼지 난자 동결보존시 여러가지 cytoskeletal stabilizer의 사용도 적극 검토해 보아야 할 것이며, 난포난을 채취하여 체외성숙후 동결과 체외수정 또는 ICSI후 분할 상태에 따른 동결방법도 연구되어야 한다. 아울러 새로운 동결보호제 연구도 더욱 진행되지 않으면 안될 것이다. 또한 동결방법에 있어서 완만동결(slow freezing)과 급속동결(vitrified freezing)을 이용한 동결을 시도해 봄으로써(현재 시험 중에 있음) 앞으로 소의 경우와 같이 매우 양호한 성적을 얻을 수 있으리라고 기대하여 본다.

Reference

- 1) Cheng, W.T.K. Ph. D. Thesis, Council for Natl. Acad. Award, UK, 1985.
- 2) Yoshida, M. Jpn. J. Vet. Res., 49:711~718, 1987.
- 3) Yoshida, M. Jpn. J. Anim. Reprod., 35: 34~37, 1989.
- 4) Mattioli, M, et al. Theriogenology, 31: 1201~1207, 1989.
- 5) Yoshida, M. et al. Theriogenology, in press, 1993.
- 6) 吉田光敏, 日本静岡縣獸醫師會會報, 16:16~19, 1988.
- 7) Yoshida, M. et al. J. Reprod. Fertil. 88:1~8, 1990.
- 8) Yoshida, M. et al. J. Reprod. Fertil. 95: 481~488, 1992.
- 9) Yoshida, M. et al. Mol. Reprod. Dev. 31: 68~71, 1992.
- 10) Yoshida, M. Mol. Reprod. Dev. in press, 1983.
- 11) Yoshida, M. et al. Biol. Reprod. 47, in press, 1993.
- 12) Yoshida, M. et al. Mol. Reprod. Dev. in press, 1993.
- 13) Yoshida, M. et al. J. Reprod. Dev. 39 (Suppl), 83~84, 1993.
- 14) Whittingham, D. G. Journal of reproduction and fertility. 49, 395~402, 1977.
- 15) Rall, W.F. and G.M.Fahy. Nature 313: 573~575, 1985.
- 16) Glenister, P. H. et al. Gamete Res. 16, 205~216, 1987.
- 17) Schroeder, A. C. et al. J. Repr-od. Fertil. 89:43~50, 1990.
- 18) Otoi, T. et al. Cryobiology. 31, 334~348, 1994.
- 19) Al-Hasani, S. et al. Hum. Reprod. 1: 309~312, 1989.
- 20) Shaw, P. W. et al. Mol. Reprod. Dev. 33, 210~214, 1992.
- 21) Pellicer, A. et al. Fertility and Sterility. 50, 5, 805~810, 1988.
- 22) Quinn, P. et al. J. Reprod. Fertil. 66, 161~168, 1982.
- 23) Trounson, A. Fertil. Steril. 46, 1~12, 1986.
- 24) Lim, J. M. et al. Theriogenology. 35, 1225~1235, 1991.
- 25) Leibo, S. P. et al. Cryobiology. 15:257~271, 1978.
- 26) Van Blerkom, J. Theriogenology. 33:365, 1989.
- 27) Parks, J. E., and N. A. Ruffing. Theriogenology 37, 59~73, 1992.

- 28) Rall, W. F. Anim. Reprod. Sci. 28:237 ~245. 1992.
- 29) Hamlett, D.K. et al. Androl., 23:27. 1989.
- 30) Van Blerkom, J. Theriogenol., 33:365. 1989.
- 31) Mandelbaum, J. et al. Human Reprod., 3:117. 1987.
- 32) Pellicer, A. et al. Fertility and Sterility. 50. 5. 805~810. 1988.
- 33) Mazur, P. Science 168:939. 1970.
- 34) Willadsen, S. M. et al. Commission of the European Community Publications, Luxemburg. pp117~124. 1976.
- 35) Renard, J. P. et al. J. Reprod. Fert., 70:487~492. 1984.
- 36) Takahashi, Y. and H. Kanagawa. Mol. Reprod. Dev., 26:105~110. 1990.
- 37) Leibo S. P. et al. Exp Cell Res. 89:79. 1974.
- 38) Taha, T. A. and K.Schellander. Theriogenology. 37:307. 1992.
- 39) Renard, J. P. et al. J. Reprod. Fert., 70:487~492. 1984.
- 40) Friedler, S. et al. Fertility and sterility. 49. 743~764. 1988.
- 41) Johnson, M. H. et al. Hum. Reprod. 3. 383~387. 1988.
- 42) Shaw, J. M. and A. O. Trounson. Gamete Res. 24. 269~279. 1989.
- 43) Vincent, C. et al. J. Reprod. Fert. 87. 809~820. 1989.
- 44) Nagashima et al. absrt. Theriogenology. 100. 1996.
- 45) 김중계, 강만종, 김영훈, 문성호. 1989. 한국가축번식학회지 13(3):134~140.
- 46) 강만종, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광. 1990. 한국가축번식학회지 14(1):9~16.
- 47) 김중계, 강민수, 장덕지, 고경래, 양병철. 1992. 한국가축번식학회지 16(3):269~276.
- 48) 김중계, 강민수, 장덕지, 고경래, 양병철. 1992. 한국가축번식학회지 16(4):317~323.
- 49) 김중계, 양병철, 문성호, 고경래, 강민수, 장덕지. 1994. 한국가축번식학회지 18(1):55~62.
- 50) 강승울. 1997. 일본 신슈대학 생물생산학과 대학원 박사학위논문
- 51) 고혁진. 1997. 제주대학교 농과대학 축산학과 대학원 석사학위논문.