

哺乳動物 卵胞卵의 玻璃化凍結後 FDA-test에 의한 生存性 判定

金重桂, 梁柄哲, 康珉秀, 高敬來, 高赫辰,

張德支

濟州大學校 農科大學

Survival of Mammal follicular oocytes after vitrification tested by FDA

Kim, J.K., B.C. Yang, Kang, M.S., G.R. Ko, H.J. Ko and

D.J. Chang

College of Agriculture, Cheju National Univ.

ABSTRACT

This experiment was carried out to study the determination of survival of vitrified and thawed mammal follicular oocytes by FDA-test. Oocytes were divided into 3 groups according to attachment of cumulus cell. Group A oocytes were tightly surrounded by cumulus cell, group B oocytes were partially surrounded by cumulus cell, and group C oocytes were poorly surrounded by cumulus cell. Vitrification solution developed by our previous study (Kim et al, 1992) which consisted of permeable agent (20 % glycerol + 10 % ethylene glycol) and nonpermeable agent (30 % Ficoll + 10 % sucrose). Oocytes (7-10) loaded into 0.25 ml straw after 10 min equilibration were plunged into liquid nitrogen (-196°C) directly.

The FDA-score of vitrified and thawed group A oocytes was higher in rat (4.2) than in rabbit (3.9), cow(3.8), mouse (3.4) and porcine(2.4), however that of cumulus cell was higher in rabbit (4.7) than in rat (4.1), cow(2.9), porcine(2.6) and mouse (1.4).

The FDA-score of vitrified and thawed group B oocytes were 3.1(cow), 2.9 (rabbit), 2.9 (mouse), 2.6 (rat) and 2.5(porcine), respectively. However that of cumulus

cell was higher in rabbit (3.7) than in porcine(2.6), rat (2.3), cow(1.7) and mouse(0.3). The FDA-score of vitrified and thawed group C oocytes was higher in mouse (4.1) than in cow(2.9), rabbit(2.6), rat(1.3) and porcine(1.1).

As shown in the above results, The survival rates of oocytes were higher in group A than in group B and C except in mouse and cow. These results suggest that the survival of cumulus cell as well as follicular oocytes can be reliably judged by their fluorescence with FDA-test.

Key words: Vitrification solution, oocyte, cumulus cell, FDA-test, mouse, rat, rabbit, porcine, cow.

本 研究는 1994년도 韓國科學 技術 研究費 지원에 의하여 수행되었음.

I. 緒論

1949년에 精子細胞의 成功的인 凍結保存 技術이 보고된 이후 보다 복잡한 細胞와 組織에 이르는 광범위한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 cell banking 기술은 세포의 체외배양 연구에 없어서는 안 될 중요한 과정으로 인식되어져 오고 있다. 한편 우리나라에서도 가축에서 수정란을 동결보존하였다가 용해하여 다른 수란숙에게 이식하는 일련의 과정들이 필드에서 일상화되어 가는 추세여 놓여있다. 수정란 凍結保存의 성공적인 성과에 비하면 아직까지도 미수정란의 凍結保存은 아직 미미한 수준에 있다. 포유동물 미성숙 卵胞卵의 凍結保存은 유기적인 체외수정란 생산 시스템 및 다양한 수정란 연구에 있어 대량의 난자를 공급하며 시간에 구애받지 않는 다양한 실험을 할 수 있다는 커다란 장점을 가지고 있다. 排卵이 되기 전의 난자는 제2감수분열 중기상태에 놓여 있으며 염색체는 미세소관 방추사에 배열된 상태이다. 미세소관의 방추사는 temperature shock 및 내동제에 민감하며 凍結과정중 이들은 방추사의 解重合 (spindle depolymerization)을 야기시킬지 모른다. 이러한 解重合은 수정후 염색분체의 분리를 손상시켜 수정후 異配體의 수정란을 유도할수 있다고 보고하였다(Shevach 등, 1988,

Josiane 등, 1992). 동결융해후 卵胞卵의 생존판정은 성숙과정을 거쳐, 체외수정 후 난자의 분할상태를 확인하므로서 그 생존성을 판단할 수 있다. 培養方法은 CO₂ 배양기에서 5% CO₂ 調節과 일정한 濕度, 溫度에서 배양 후에 發育段階를 觀察하여 판정하는 方法으로서, 培養技術과 施設이 필요하며, 많은 時間이 所要되고, 判定에 誤差가 隨伴된다 (Looney 등, 1981; Shilling 등, 1982). 핵 염색 등에 의한 난자의 生事 판정법이 있으나 판정 후 그 이상의 난자로서 발육시키거나 사용할 수 없기 때문에 사용에 제한을 받고 있다.

FDA-test는 Rotman과 Papermaster (1966)에 의해 受精卵에서 in vitro 배양세포의 生存성을 測定하는데 처음으로 사용되었다. FDA는 실제로 非螢光物質로서 살아 있는 세포의 内部에만 존재하는 加水分解 酵素인 esterases와 반응하여 螢光을 發散 한다고 하였다. McGrth 등(1975)은 凍結前에 FDA에 露出했던 세포는 凍結 融解후 螢光이 消失되었으며 이것은 세포 내부의 氷晶形成으로 인한 細胞膜 破壞와 관련이 있다고 하였다. 한편, Leibo와 Mazur(1978a,b)는 凍結 融解後 mouse수정난의 生存性 판정에 FDA를 이용했으며, Schilling 등(1979a)은 소와 토끼 受精卵에서 DAPI(4'-6' diamidino phenylindole)와 FDA를 혼합 사용한 보고가 있다. 이렇듯FDA-test에 의해 간단하면서 경제적으로 짧은 시간내에 정확한 판정을 할 수 있다는 장점을 가지므로서 이 기술이 난자의 凍結 및 체외조작에 이용되어질 가치를 앞으로 더 많은 연구를 통하여 증명해야 할 것으로 사료된다. 따라서 本 研究에서 1992년도 mouse 수정란의 琉璃化 凍結 실험에서 가장 좋은 凍結液(G20 E10)을 이용하여 포유동물중 porcine, cow, rabbit, mouse와 rat의

卵胞卵과 卵丘細胞의 凍結상태와 融解후 난자의 生存性 판정에 FDA-test의 이용 가능성을 검토하기 위하여 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 卵子 採取

ICR mouse, 家兔의 卵胞卵은 각 試驗畜을 屠殺한 後 30分 以內에, 한편 돼지와 소의 경우는 도살장에서 도살후 20分 以內에 난소를 채취하여 생리식염수(0.9% NaCl, penicillin GK:0.075g/l, streptomycin sulfate:0.05g/l)가 들어 있는 보온병(37±2℃)에 옮겨 1시간 以內에 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다. 각 卵巢의 卵胞에서 18-26 gage주사침으로 卵胞卵을 採卵 하였으며, PBS로 3회 washing 한 후 모아진 난자들을 다음과 같이 난구세포의 부착상태에 따라 3 group으로 분류하여 동결하였다.

group A ; 卵丘細胞가 密着되어 부착된 것(tight oocytes).

group B ; 卵丘細胞가 部分的으로 부착된 것(partial oocytes).

group C ; 卵丘細胞가 부착되지 않은 것(poor oocytes).

2. 凍結 . 融解

凍結保存液(Vitrification solution)의 조성은 Ficoll 30%, glycerol 20%, ethylen glycol 10%, sucrose 10% + PBS으로 이루어 졌으며 凍結液은 1ml 주사기를 연결시킨 0.25 ml straw에 난자를 주입하기 전에 미리 PS(50μl), air bubble(20μl), PS(30μl), air bubble(20μl), 50μl의 凍結液순으로 注入하였다(Fig 1A).

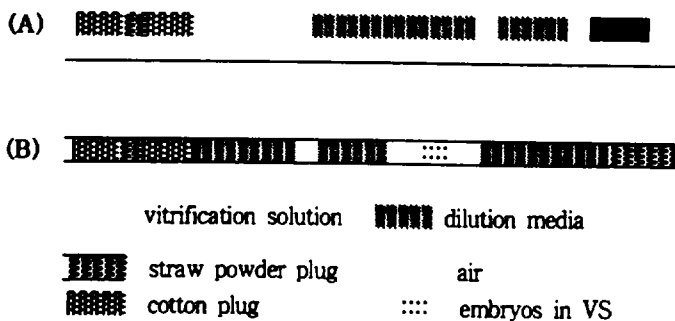


Figure 1. Configuration of vitrification solution, dilution medium and air in 0.25 ml straw, just before loading embryos (A) and after sealing with straw powder (B)

卵胞卵(7-10개/straw)은 凍結液 drop에 침지한 後 같은 凍結액으로 한번 옮겼으며 미리 준비한 straw내의 凍結액에 mouth pipet으로 옮겨 straw powder로 封印하고(Fig 1B), 室溫(26 ± 1 °C)에서 LN₂ container(-196°C)에서 직접 超急速 凍結 시켰으며, 凍結전 平衡時間은 실온에서 10분간 실시하였다. 일정기간동안 보존된 난자는 38°C 溫水에서 10초동안 흔들면서 融解한 後, 卵子內의 耐凍劑를 除去하기 위해 PS液(PBS+10% sucrose)에 5分 동안 定置하여 新鮮한 PBS液에 3회 옮긴 후 FDA-test로 생사 판정하였다.

3. FDA-test

(1) FDA液 製造

FDA 용액은 fluorescein diacetate(Sigma, Cat.No. F-7378) 5mg/ml acetone의 stock solution(Linda & Trounson., 1980)을 1:400,000의 비율로 PBS와 희석하였다. 凍結融解 卵胞卵은 室溫(26±1°C)에서 2-3분동안 FDA 용액에 침지한 후 PBS로 옮겨 位相差螢光顯微鏡의 U.V.light에서 等級을 判定하였다. 螢光顯微鏡은 B460, G520 filter와 Mercury lamp가 附着된 reflected-light fluorescence microscope(OLYMPUS)를 사용했다.

(2) FDA score

FDA-score는 다음과 같은 基準에 의하여 判定하였다.

P5: 卵胞卵 全體가 綠色螢光을 強하게 發散하는것(5점:100% 生存)

P4: 卵胞卵의 80%가 螢光을 띠거나 P5보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는 것(4 점:80%)

P3: 卵胞卵의 60%가 螢光을 띠는 것, 또는 P4보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(3 점:60%)

P2: 卵胞卵의 40%가 螢光을 띠는 것, 또는 P3보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(2 점:40%)

P1: 卵胞卵의 20%가 螢光을 띠는 것, 또는 P2보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(1 점:20%)

P0: 螢光을 전혀 發散하지 않는 것(0점:0%,Negative)

平均 FDA-score는 다음 식에 의하여 計算되었다.

$$\text{Mean score} = [(A \times 5) + (B \times 4) + (C \times 3) + (D \times 2) + (E \times 1)] / N$$

A : No. of P5 B : No. of P4

C : No. of P3 D : No. of P2

E : No. of P1

N : Total of P0 ~ P5

4. 統計分析

統計分析은 FDA-score에 의해 Minitab의 T-test로 하였다.

III. 結果 및 考察

Mouse follicular oocytes의 凍結融解후 體外 成熟과 受精에 의존하지 않고 卵丘細胞와 함께 生存 與否를 FDA判定法으로 판정할 수 있는 可能性을 검토하기 위하여, 卵巢에서 최수한 미성숙 난포난을 난구세포의 부착상태에 따라 3 group으로 분류하였으며, 동결용해 후 FDA-test로 生死判定한 결과는 Table 1과 같다.

卵胞卵의 區分 基準은 卵丘細胞가 卵子의 둘레에 密集해 있는 것(A:cumulus cell tight oocytes)과 部分的으로 附着된 것(B:cumulus cell partial oocytes), 그리고 卵丘細胞가 빈약하게 부착된 것(C:cumulus-poor oocytes)으로 區分하고, A와 B oocytes에서 附着되어 있는 卵丘細胞만을 따로 區分하여 FDA-score 를 測定하였다. Table 1에서 oocytes의 生存率은 vitrification 후 mouse oocytes는 형태적으로 모두 정상이었으나 A, B, C에서 각각 P3.4(68%), P2.9(58%), P4.1(82%)의 FDA-score를 나타내므로서 卵丘細胞가 附着되지 않은 C oocytes는 A oocytes와 有意差가 없었지만 B oocytes에 비해 有意的인 차이를 나타내었다 (P<0.05). 이것은 凍結 融解 過程중 oocytes의 表面에 附着된 卵丘細胞들에 의해 耐凍劑의 卵子 内部 浸透, 水分의 脫水, 그리고 融解시 耐凍劑의 除去와 水分再吸收(rehydration)를 妨害받으므로서 細胞內에 남아 있는 水分이 凍結時 氷晶을 形成하므로서 細胞膜을 破壞한 것으로 생각되며, 따라서 A와 B의 oocytes에서 平衡 時間과 耐凍劑 除去 時間을 充分히 준다면 더 높은 生存率을 얻을 수 있을 것으로 思料된다. Whittingham(1977)은 mouse에서 1.5M-DMSO 로 完만 凍結融解후 생존율은 cumulus cells이 부착된 것과 없는 것(74.6 vs 66.8%)에서 有意的인 차이가 없는 것으로 보고하여 본 실험과는 相異한 차이를 나타내었다. 그리고 Carrol 등(1989)에 의하면 cumulus cells를

Table 1. The survival rate of different kinds vitrified mouse follicular oocyte by FDA-test

Oocyte [•] categories	No. of oocytes recovered(%)	Oocytes & Cumulus	No. of embryos evaluated by FDA test(%)						Mean FDA score
			P5	P4	P3	P2	P1	P0	
A	59	Oocytes	39 (66)	0 (0)	0 (0)	3 (5)	2 (3)	15 (25)	3.4 ^{ab} (68)
		Cumulus	9 (15)	5 (8)	0 (0)	7 (12)	3 (5)	35 (59)	1.4 ^c (28)
B	31	Oocytes	17 (55)	0 (0)	0 (0)	2 (6)	0 (0)	12 (39)	2.9 ^b (58)
		Cumulus	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (10)	2 (6)	26 (84)	0.3 ^d (6)
C	19	Oocytes	15 (79)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	3 (16)	4.1 ^a (82)

[•] A: oocytes tightly surrounded by cumulus cells

B: oocytes partially surrounded by cumulus cells

C: oocytes poorly surrounded by cumulus cell

^{abcd} Means with different superscripts are significantly different (^{a-b}, ^{c-d}, $P < 0.05$, ^{a-c}, ^{a-d}, ^{b-c}, ^{b-d}; $P < 0.01$).

Table 2. The survival rate of different kinds vitrified rat follicular oocyte by FDA-test.

Oocyte [•] categories	No. of oocytes recovered(%)	Oocytes & Cumulus	No. of embryos evaluated by FDA test(%)						Mean FDA score
			P5	P4	P3	P2	P1	P0	
A	33	Oocytes	25 (76)	2 (6)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	4 (12)	4.2 ^a (84)
		Cumulus	20 (61)	6 (18)	4 (12)	0 (0)	0 (0)	3 (9)	4.1 ^a (82)
B	27	Oocytes	8 (30)	0 (0)	6 (22)	5 (18)	1 (4)	7 (26)	2.6 ^b (52)
		Cumulus	6 (22)	3 (11)	2 (7)	5 (18)	3 (11)	8 (30)	2.3 ^b (46)
C	12	Oocytes	3 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (75)	1.3 ^b (26)

^{ab} Means with different superscripts are significantly different ($P < 0.01$).

제거한 mouse oocytes를 1.5M-DMSO로 완만凍結融解후 69%가 형태적으로 정상이었다고 보고 하였다.

미성숙 rat oocytes의凍結融解후 卵丘細胞의 부착 상태에 따른 FDA-score는 Table 2에 나타내었다. A, B, C oocytes에서 각각 84, 52, 26%의 생존율을 보여, 卵丘細胞가 치밀하게 부착되어 있는 난자(A)는 그렇지 않은 B, C oocytes보다 높은 성적을 나타내었다($P < 0.01$). 그리고 卵丘細胞 역시 난자와 비슷한 생존율을 나타내어 (A:84/82, B:52/46) 이들을 제외 배양했을 때, 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 생각된다. Antonio 등(1988)은 未成熟 rat oocytes를 cumulus cell이 부착된 상태에 따라 세 종류로 나누어 DMSO로凍結融解한 결과 cumulus cell층이 많은 것일수록 생존율이 높았다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다(cumulus-tight : 70%, cumulus-partial : 42%, cumulus-free : 17%). 이는 또한 미성숙 rat oocytes에서 cumulus cell층은凍結融解후 생존율과 직접적인 관련이 있다고 하였다. 본 성적으로 mouse에서改良된 본凍結液은 rat의 琉璃化凍結에서도 이용 가능성을 제시하여 주었다. 그러나 cumulus cell의凍結시 mouse에서는 oocytes보다 나빴었는데 rat에서 좋았던 요인에 대해서는 앞으로原因규명이 필요하다고 생각된다.

家兔 미성숙 卵胞卵의 琉璃化凍結 후 생존율은 Table 3과 같다. 이들 역시 卵丘細胞가 치밀하게 부착되어 있는 A oocytes에서 다른 종류의 oocytes(B, C)보다 높은 생존율($P < 0.05$)을 나타내어(A:78%, B:58%, C:52%) rat와 유사한 경향을 나타내었다. 그리고 rabbit oocytes의 특징은凍結融解後 생존율이 mouse나 rat 보다 떨어지는 반면 오히려 cumulus cells이 oocytes 보다 생존율이 좋았다는 것이다. 이것은 투명대 주위에서 다른 종의 난자에서 볼 수 없는 mucin층이 존재해 vitrification solution이 난자 내부까지 침투하지 못하였던 것으로 판명되나 좀 더 많은 平衡時間을 주거나 보다 침투력이 강한 내동제를 추가하여야 될 것으로 사료된다. Vincent(1989) 등에 의하면 cumulus cell을 제거하여 Propanediol과 DMSO를 조합한 완만凍結액에서凍結融解후 in vivo 수정에서 39%의 낮은 성공율을 보고 하였다.

포유동물 중 돼지는 정자 또는 난자의 동결이 힘든 품종으로서 돼지 卵胞卵의 琉璃化凍結, 용해후 FDA-test에 의해

조사된 生死判定결과는 Table 4와 같다. 卵丘細胞의 부착상태(group A, B, C)에 따른 동결용해후 조사된 FDA-score는 각각 P2.4(48%), P2.5(50%) 그리고 P1.1(22%)으로서 卵丘細胞가 부착된 난자가 (group A와 B) 卵丘細胞가 빈약한 卵胞卵보다 생존율이 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다($P > 0.05$). Didion 등(1990)은 Pig oocytes에서凍結시키지 아니한 것은 oocytes와 cumulus은 모두 螢光을 발하였으나, 1.5M glycerol + 0.5M sucrose로 programmable freezer를 이용한 緩慢 동결 용해後 螢光을 나타내는 oocytes는 전혀 없었으며 卵丘細胞만이 50% 前後의 螢光을 나타냈다고 報告한것과 比較하여 本實驗의成績은良好한結果를 나타내었는데, 이는凍結液과凍結方法的의差異에 원인이 있는 것으로 思料된다.

소의 未成熟 卵胞卵의凍結融解後 生死判定 성적은 Table 5와 같다. A, B, C oocytes에서 각각 76, 62, 60%의 생존율을 나타내어 卵丘細胞의 부착상태와는 상관없이 모두 vitrification후 양호한 생존율을 보였다($P < 0.05$). 이와 같은 생존율은 공시난자수가 제주에서 획득하기 어려웠지만 앞으로 실험을 계속하여 명확한 성적을 발표할 예정이다. 소의 oocytes에 대한 동결 용해 보고나 oocytes와 FDA를 연관시켜 生存性을 조사한 보고는 찾아볼 수 없는 실정이다. Otai 등(1992)은 미성숙 bovine oocytes를 體外成熟시켜 propanediol로凍結融解한후 體外 수정율이 36 - 37.2%였으며, 이들 중 42.4%가 卵割이 되었고 1.1 - 3.1%만이 blastocysts까지 발달하였다고 했다. 그리고 오 등(1993)에 의하면 oocytes - cumulus complexes를 1.5M DMSO, 1.5M propanediol로 緩慢凍結融解하여 각각 54.2, 63.3%의 생존율과 74.4, 78.9%의 성숙율을 보고한 바 있다.

포유동물에 있어서 mouse를 제외하고는 卵丘細胞가 부착되어 있는 oocytes는 부분적으로 부착되거나 卵丘細胞가 없는 oocytes보다 琉璃化凍結後 높은 생존율을 나타내었다. 또한 rabbit oocytes에서는 mucin층으로 인해 oocytes가 충분히 脫水되지 않아 세포질 있는 부분은 螢光을 나타내지 않고 투명대 바깥 부분인 cumulus cells만 螢光을 발하는 난자들이 많이 발견되었다. 그리고 각기 동물 종에 따라 성적 차이가 많았는데, 이것은 oocytes의凍結融解는 동물 종마다 크게 차이가 있다고 한 Nakagata(1989)의 보고와 유사하였고, 아직 확실한 결과와 보고는 없지만 난자에 있어서도 정

Table 3. The survival rate of different kinds vitrified rabbit follicular oocyte by FDA-test.

Oocyte ^o categories	No. of oocytes recovered(%)	Oocytes & Cumulus	No. of embryos evaluated by FDA test(%)						Mean FDA score
			P5	P4	P3	P2	P1	P0	
A	39	Oocytes	19 (49)	4 (10)	10 (26)	5 (13)	1 (3)	0 (0)	3.9 ^b (78)
		Cumulus	31 (79)	4 (10)	3 (8)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	4.7 ^a (94)
B	26	Oocytes	8 (31)	1 (4)	8 (31)	3 (12)	1 (4)	5 (19)	2.9 ^f (58)
		Cumulus	6 (23)	7 (27)	5 (19)	3 (12)	4 (15)	1 (4)	3.2 ^{bc} (64)
C	49	Oocytes	17 (35)	2 (4)	3 (6)	9 (18)	5 (10)	13 (27)	2.6 ^c (52)

^{abc} Means with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 4. The survival rate of different kinds vitrified porcine follicular oocyte by FDA-test.

Oocyte ^o categories	No. of oocytes recovered(%)	Oocytes & Cumulus	No. of embryos evaluated by FDA test(%)						Mean FDA score	
			P5	P4	P3	P2	P1	P0		
A	89	oocyte		14 (16)	26 (29)	32 (36)	17 (19)		2.4 ^a (48)	
		cumulus		6 (7)	10 (11)	31 (35)	26 (29)	16 (18)		2.6 (52)
B	89	oocyte		7 (8)	5 (6)	28 (32)	30 (34)	18 (20)	1 (0)	2.5 ^a (50)
		cumulus		7 (8)	10 (11)	30 (34)	31 (35)	11 (12)		2.7 (54)
C	85	oocyte			2 (2)	8 (9)	75 (88)		1.1 ^b (22)	

^{ab} Means with different superscripts are significantly different (P<0.01).

Table 5. The survival rate of different kinds vitrified cow follicular oocyte by FDA-test

Oocyte ^o categories	No. of oocytes recovered(%)	Oocytes & Cumulus	No. of embryos evaluated by FDA test(%)						Mean FDA score
			P5	P4	P3	P2	P1	P0	
A	8	Oocytes	4 (50)	1 (13)	1 (13)			2 (25)	3.8 ^a (76)
		Cumulus	2 (25)		3 (38)	2 (25)		1 (13)	2.9 ^a (58)
B	6	Oocytes	3 (50)	1 (17)				2 (33)	3.1 ^a (62)
		Cumulus			2 (33)	1 (17)	2 (33)	1 (17)	1.7 ^b (34)
C	17	Oocytes	6 (35)	5 (29)				6 (35)	3.0 ^a (60)

^{ab} Means with different superscripts are significantly different (P<0.05).

자와 같이 季節, 飼養管理, 年齡, 특히 個體에 따라 차이가 있는 것으로 사료되며 앞으로 이에 대한 실험이 이루어져야 될 것으로 생각된다.

본 실험에서는 FDA test 후 體外 培養은 실시하지 않았지만, 追後 採외성숙 배양과 體外受精, 그리고 胎兒까지 발달하는데 수정란과 같이 FDA-test가 세포에 해가 없다는 것을 증명한다면 보다 경제적으로 생존율을 높이는데 기여할 것으로 사료된다. FDA생사판정을 할 때 분할이 진행된 受精卵과 달리 조심해야 할 것은 난자의 주위에 卵丘細胞가 tight하게 둘러싸여 있을 때 난자와 卵丘細胞와의 螢光 發散을 주의 깊게 관찰하는 것이 필요하며, 이것이 어려울 때는 凍結 融解하지 않은 난자와 卵丘細胞를 螢光 染色배양하여 살펴보면 그 차이를 쉽게 알 수 있다. Oocytes의 FDA-test에 대한 報告에 의하면 미성숙 난포난에 관한 연구는 없었으며, Shilling 等(1979a)이 rabbit과 cow의 排卵된 未受精卵에서 完滿凍結後 FDA와 DAPI를 혼합 이용하여 소의 oocytes에서는 FDA-score 가 낮았으나, 토끼의 oocytes에서는 높았다고 하였으며, Antonio 等(1988)은 DMSO로 緩慢凍結 融解한 未成熟 rat의 oocytes에서 卵丘細胞層이 붙어 있는 것이 성적이 좋았으며, 成熟 oocytes는

卵丘細胞 附着 정도가 凍結 融解後 生存率에 影響을 주지 않았다고 報告하였다. 融解後 體外受精할 수 있을 程度의 成熟, 體外受精이 되기 위해서는 基本的으로 卵丘細胞가 必要하기 때문에(Cross & Brinster, 1970; Cross, 1973; Erickson & Sorensen, 1974) 본 실험에서 비록 mouse 卵胞卵(제1-2차 卵胞卵)에서 卵丘細胞層이 빈약한 난자에서 FDA score가 높았으나, 體外受精과 胚 발육에 좋은 結果를 얻기 위해서는 제3차 난포난 이상으로 卵丘細胞가 부착되어야 할 것으로 思料된다.

또한, 未受精 mouse oocytes의 凍結 融解에 대한 報告중에서 Whittingham 等(1972)은 緩慢 凍結 融解 方法으로 4-13%의 낮은 생존율 보고와 이와 類似한 方法으로 -196 °C 에서 保存後 65-76 %의 생존율 報告가 있었으나, 本實驗의 結果에 비해 대부분 生存率이 낮았다(Whittingham 等, 1977). 이들 報告者는 대부분 緩慢凍結 融解 後 體外受精에 의한 生存性 判定이었으나, 本實驗은 玻璃化 凍結 融解後 FDA-test에 의한 生存性判定으로서 卵丘細胞의 附着 상태와 卵子生存性과의 關係, 그리고 이들의 凍結에 必要한 條件들을 體外受精과정 없이 쉽게 判定할 수 있는 利點이 있으며, 특히 이에 관한 實驗은 처음으로 試圖되었기 때문

에 앞으로 많은 追加 實驗이 要求될 것으로 사료된다. 그러므로 1993년도까지 본 연구실에서 mouse 수정란(桑實胚)을 위하여 개발된 vitrification solution을 이용한 포유동물의 卵胞卵의 凍結保存에서 FDA-test는 卵胞卵과 卵丘細胞의 생사를 판정할 수 있었으며 대체로 수정란(morula, blastocysts)보다 卵胞卵의 생존율이 대체로 떨어져 이에 관한 vitrification solution 개선이 필요함을 提示하여 주었다.

IV. 摘要

本 實驗은 琉璃化凍結 融解된 포유동물 卵胞卵의 生存性을 FDA-test에 의한 판정을 규명하기 위하여 施行되었으며 Oocytes는 卵丘細胞의 부착 상태에 따라 3 group 분류하였다. A oocyte는 卵丘細胞가 밀착되어 부착된 것(tight oocytes)이며 B oocyte는 卵丘細胞가 部分的으로 부착된 것(partial oocytes) 그리고 C oocyte는 卵丘細胞가 빈약하게 부착된 것(poor oocytes)이다. 琉璃化 凍結液은 1992년 金 등에 의한 연구에서 개발된 것으로서 glycerol 20 %, ethylene glycol, 10 %, Ficoll 30% 와 sucrose 10% 로 구성되어 있다. Oocyte(7-10)는 10분의 평형시간을 경과한 후 0.25 ml straw에 넣어 상온에서 직접 액체질소 container(-196℃)에 침지시켜 동결을 완료시켰다.

凍結融解한 A 그룹 난자의 FDA-score는 rat(4.2)에서 rabbit(3.9), cow(3.8), mouse(3.4)와 porcine(2.4)보다 높았지만 cumulus cell의 경우는 rabbit(4.7)에서 rat(4.1), cow(2.9), porcine(2.6)과 mouse(1.4)보다 높았다. 凍結融解한 B 그룹 난자들의 FDA-score는 각각 3.1(cow), 2.9(rabbit), 2.9(mouse), 2.6(rat) 그리고 2.5(porcine)이었다. 하지만 cumulus cell의 경우는 rabbit(3.7)에서 porcine(2.6), rat(2.3), cow(1.7) and mouse(0.3)보다 높았다. 凍結融解한 C 그룹 난자의 FDA-score는 mouse(4.1)에서 cow(2.9), rabbit(2.6), rat(1.3)과 porcine(1.1)에서 보다 높았다.

以上の 結果에서 mouse를 제외하고 일반적으로 난포난의 琉璃化 凍結融解 후 group A의 난자가 group B와 C에서 난자보다 生存率이 높았으며 FDA-test를 하였을 때 oocytes는 물론 cumulus cell에서도 발광을 나타내어 卵丘細胞의 생존판정여부를 확인할 수 있는 가능성을 제시하였

다.

V. 인용문헌

1. Antonio, P., Harold. R. B., Abraham. L., Alan. H. De. C., Toni. G. P. 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 50:805-810.
2. Carrol, J., G. M. Warnes and C. D. Matthews. 1989. Increase in digyny explains polyploidy after in-vitro fertilization of frozen - thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 85:489-494.
3. Cross, P. G. 1973. The role of cumulus cells and serum in mouse oocyte matured in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 34:241-245.
4. Didion, B. A., D. Pomp, M. J. Martin, G. E. Homanics and C. L. Markert., 1990. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.* 68:2803-2810.
5. Josiane Van Der Elst, Etienne Van Den Abbeel, Sigrid Nerinckx and Andre Van Steirteghem. 1992. Parthenogenetic activation patten and Microtubular organization of the mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. *cryobiology* 29, 549-562.
6. Goto, K., Y. Kajihara, S. Koba, Y. Nakanish, K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83:753-758.
7. Moor, R. M. and A. O. Trounson. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.*, 49:101-109.
8. Niwa, K., M. Kasai. and Iritani. A. 1979. Fertilization in vitro of rat eggs after freezing and thawing. *Jap. J. Zotech. Sci.*, 50:747-752.
9. Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 87:479-483.

10. 오강택, 이중환, 박기상, 최승철, 유형진, 이상호. 1993.凍結保存 소 卵胞卵의 체외성숙 및 처녀발생. 韓國受精卵移植學會誌. 8:133-138.
11. Otai, T., S. Tachikawa, S. Kondo and T. Suzuki. 1992. Development capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation in vitro and of frozen - thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes. *Theriogenology.*, 38:711-719.
12. Shevach Friedler, M.D, Linda C. Giudice, M.D., Ph.D. Emmet J. Lamb, M.D, 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertility and Sterility* vol. 49, No. 5, 743-764.
13. Shioya, Y., M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwaski and A. Hanada. 1988. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*, 30:489-496.
14. Vincent, C., V. Garnier, Y. Heyman and J. P. Renard. 1989. Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 87:809-820.
15. Whittingham, D. G. 1977. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. *J. Reprod. Fert.*, 49:89-94.
16. Wood, M.L. 1986. Recent progress in animal embryos cryopreservation (Abstr. 27). Presented at the Fert world congress on in vitro fertilization, Melbourne, November 1985. *J. in vitro Fert embryo, transfer* 3:183.
17. 김중계, 강민수, 고경래, 양병철. 1992. 初急速 동결에 있어서 Vitrification Solution 개발에 관한 연구 (한국 과학재단)
1. Vitrification Solution 내의 내동제조합이 初急速 동결 용해후 mouse morulea 의 생존에 미치는 영향 韓國繁殖學會誌 16(3). 2. Vitrification solution 내의 비투과성 물질 (Ficoll, sucrose) 과 평형시간이 初急速 동결 용해후 mouse morulae의 생존율에 미치는 영향 韓國繁殖學會誌 16(4)