

碩士學位論文

FDA-TEST 生死判定法이 超急速 凍結된 MOUSE  
受精卵의 培養과 移植後 着床에 미치는 影響

濟州大學校 大學院

畜産學科



1992年 12月

FDA-TEST 生死判定法이 超急速 凍結된 MOUSE 受精卵의  
培養과 移植後 着床에 미치는 影響

指導教授 金 重 桂

梁 炳 哲

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1992年 12月

梁 炳 哲의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

1992年 12月

---

EFFECTS OF FDA-TEST ON THE SURVIVAL AFTER CULTURE  
AND CONCEPTION RATE IN VITRIFIED MOUSE EMBRYOS

Byoung-Chul, Yang

(Under the Supervision of 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

1992. 12

# 目 次

Summary	1
I. 緒 論	3
II. 研 究 史	6
1 玻璃化凍結(Vitrification)	6
2 卵자의 生死判定(FDA - test)	8
3 受精卵의 移植	11
III. 材料 및 方法	14
1. 試驗期間 및 場所	14
2. 供試 動物	14
3. 試驗方法	14
4. 統計分析	19
IV. 結果 및 考察	23
V. 摘 要	39
參 考 文 獻	41
謝 辭	50

## SUMMARY

This study was carried out to test the effects of fluorescein diacetate(FDA 0 $\mu$ l/ml, 0.5 $\mu$ l/ml, 5 $\mu$ l/ml, 10 $\mu$ l/ml or 0 $\mu$ l/ml, 5 $\mu$ l/ml in PBS) treated before culture on the survival of vitrified mouse morulae in vitrification solution(20% Glycerol + 10% Ethylene glycol + 30% Ficoll + 10% sucrose) in culture or transfer after FDA-test and the possibility of using FDA-test to oocytes.

The results were summarized as follows;

1. The rate of the cultured mouse morulae development in TCM-199, Ham's F-10 and M16 culture media after vitrification in 20G10E30F was 82, 89 and 92% (expanded blastocyst), and 0, 36 and 17% (hatched blastocyst) respectively.

2. The survival of the FDA-tested fresh mouse morulae after 24 hours culture was over 96%(P4.8) in the control or treatment with various levels of FDA. As the rate of mouse morulae developed to hatched blastocysts was higher in the various levels of FDA treatment(67%) than control(50%), it was considered that toxicity of FDA did not affect the survival of mouse morulae.

3. When mouse morulae were FDA-tested in FDA 0(control), 0.5, 5, and 10  $\mu$ l/ml treatment after vitrification the development rate to expanded blastocyst were 66, 82, 64 and 76%, and FDA score were P4.2(84%), P4.7(94%), P4.2(84%) and P3.9(78%), respectively. There were no significant differences between control and FDA treatment, but were significant differences between 0.5 $\mu$ l/ml(94%) and 10 $\mu$ l/ml(78%) treatment(P<0.01).

4. The survival rates of cultured mouse morulae according to FDA-score (P0 = non-fluorescence; P1 - P5 = according to their fluorescence) after vitrification were P5:92%, P4:67%, P3:42% and P2-P0:0%, respectively.

5. The development rates of vitrified mouse morulae after FDA-test were 94% (Control) and 88% (FDA treatment). There were no significant differences between control and FDA treatment ( $P > 0.05$ ).

6. The FDA-score of the frozen-thawed mouse ovarian oocytes in vitrification solution were 68% (P3.4), 58% (P2.9) and 82% (P4.1) for cumulus-tight (A), cumulus partial (B) and cumulus-free (C) oocytes, respectively. There were significant differences between B and C ( $P < 0.05$ ). There were many survival oocytes with degenerated cumulus cell in A and B. It was suggested that the survival of ovarian oocytes and cumulus cell can be judged by FDA test without the complex methods of in vitro maturation and fertilization.

7. Implantation rates of morulae stage embryos cultured into early blastocysts and implanted into uterine horns after vitrification were 14 and 11% embryos treated control (0  $\mu$ l/ml) and FDA 5  $\mu$ l/ml and the normal fetus development was 2% embryos for both treatment.

Results of this present study indicated that toxicity of FDA does not affect not only the survival of fresh and vitrified mouse morulae but also the development rate and implantation of fetus after transfer as well. The development rates of mouse morulae with the FDA score of P5, P4 and P3 were 92%, 67% and 42% it was considered that FDA-test was fit for the judge of survival.

# I. 緒 論

近年에 이르러 家畜 受精卵移植 技術의 發達은 優秀家畜의 改良 增殖 事業에 있어서 많은 寄與를 하고 있다. 그러나 受精卵의 凍結·融解後 培養 및 移植 過程은 이들의 生存能力에 달려 있고 아직 그 成績은 低調한 實情이다.

凍結 融解卵을 移植한 後 受胎成績이 아직 低調한 이유는 受精卵의 凍結 融解後 生存率이 낮은 이유도 있겠지만, 受卵牛의 良否, 子宮의 環境要因, 移植 技術, 그리고 受精卵의 精確한 生死判定 等 많은 어려움이 뒤따르기 때문에 思料된다. 一般的으로 凍結 및 融解後 受精卵을 顯微鏡으로 觀察 했을 때 外觀狀으로는 割球의 破壞나 變形이 없었을지라도 이미 發育能力이 消失되거나 代謝作用의 停止, 또는 쇠약한 상태의 受精卵이 存在하게 되므로 生存性과 發育能力을 精確히 判定하여 移植하는 것이 重要하다.

이러한 受精卵의 生存性을 判定하는 方法으로서는 다음과 같은 것들이 이용되고 있다. 즉, (1) 顯微鏡에 의한 外貌의 形態的인 判定方法, (2) CO<sub>2</sub> incubator에 의한 培養方法 (3) FDA - test(3',6'-diacetyl- fluoresceine), (4) DAPI - test (4',6'-diamino-2-phenyl-indole) 그리고 직접 移植하는 方法 等이다.

形態學的인 判定方法에 있어서는 未受精卵, 受精卵의 異狀 및 破壞등의 구별이 가능하나 生存 與否는 판단하기 어려울 뿐만 아니라 많은 熟練이 要求되며, 桑實胚期 이후의 胚 分割球의 부분적인 生死 및 退化卵의 精確한 生死判定은 거의 不可能하다. 또한 培養方法은 5% CO<sub>2</sub> 調節과 濕度, 溫度, 培養液의 種類, 그리고 24-48時間 이상의 培養이 必要하고, 桑實胚期, 胚盤胞期 이후의 受精卵 培養은 배양후 生死 判定의 問題, 培養技術 그리고 培養器 조작과 같은 環境的 要

인등의 短點을 들 수 있다.

그러나 FDA-test는 그 處理가 간단하고, 螢光顯微鏡만 있으면 短時間(2-5分)에 生死判斷이 可能하다. 그리고 一部分割球의 죽은 部分까지도 精確히 判定이 되어 等級別로도 區分 할 수 있을 뿐만 아니라 一般 顯微鏡으로는 生死 判定이 불가능한 卵胞卵(follicular oocyte), 排卵된 成熟 卵子(oocyte), 胚盤胞期胚(blastocyst), 裸化胚(hatched blastocyst) 등도 明確하게 判定 할 수 있다. 더 우기 卵子 發育에 害가 없으며 一般 顯微鏡 아래서의 外觀判定보다 正確性を 10% 程度 增加 시킬수 있으므로(Schilling & Dopke, 1978; Shilling 等, 1982), 處理別 比較 試驗에서도 正確性を 기대 할 수 있고 같은 時間에 많은 試驗을 遂行 할 수 있다.

FDA-test 와 비슷한 螢光染色法은 Acridinorange, Primulin, FITC, 그리고 DAPI 방법 등이 있다. Acridinorange 방법은 核에대한 染色성이 좋으나 細胞毒素(cytotoxic)가 있고, 受精卵은 培養後 發達을 보이지 않았다고 하였다. Primulin에 의한 染色法은 螢光이 아주 弱하였으며, FITC 染色은 주로 透明帶와 약간의 割球 또는 營養胚葉細胞에만 染色 되었다(Schilling 等, 1979b). FDA에 의하여 살아있는 細胞들이 螢光染色이 되는 것과는 반대로 DAPI(4'6'-diamidino-2-phenyindole)는 죽은 세포들이 螢光을 發한다(Dann 等, 1971).

FDA-test는 Rotman 과 Papermaster (1966)에 의해 體外培養 受精卵의 生存性を 測定하는데 最初로 사용 되었다. 그 이후 이 試驗法을 受精卵 生死判定에 이용한 報告는 bovine(Schilling & Dopke, 1978. Schilling 等, 1979ab, 1982. Schmidt 等, 1985; Frank 等, 1986. Bielanski 等, 1986), mouse(Leibo & Mazur, 1978. Linda & Trounson, 1980). rabbit(Schilling & Dopke, 1978. Schilling 等, 1979a), pig oocyte(Didion 等, 1990)에서 있었으며, 우리나라에서는 最近 mouse受精卵에서 Kim 等(1988a), Kang 等(1989 a.b), 고(1991), 돼지

受精卵에서 Lee 等(1992), Kim 等(1992)이 凍結 融解後 이 方法에 의해 生存性 判定을 한 例가 있다.

앞으로 FDA가 超急速 凍結後 受精卵의 生死 判定基準에 適合하다는 것이 本 試驗에서 再確認 된다면 많은 家畜 受精卵의 應用 比較 試驗에서 CO<sub>2</sub> incubator 가 없더라도 많은 比較 實驗이 可能하며, FDA-score 에서 P4-P5(80-100% 發光 하는 것) 等級의 優良 受精卵을 移植 시키므로서 家畜 受精卵의 凍結 融解 後 移植 成功率을 向上시킬 수 있을 것으로 思料된다.

그러므로, 本 實驗에서는 FDA 生死判定法이 琉璃化 凍結된 受精卵의 發育에 有害與否를 判定하기 위하여 凍結前 後에 각각 FDA添加水準을 달리 處理하여 培養 및 移植한 後 生存性和 着床여부를 確認하였고, 未成熟 卵胞卵의 凍結融解 後 生存判定可能性도 檢討하였다.



## Ⅱ. 研究史

家畜受精卵移植 기술은 最初로 1890년 Heape(1890)가 Angora 種 토끼에서 採  
取된 受精卵를 Persian 種의 輸卵管에 移植하여 子兔가 생산되는 것을 立證했  
다. 그 이후 持續的인 實驗을 통해 Mutter 等(1964)은 受精卵를 移植하여 송아  
지를 生産하였고, Rowson 等(1971)은 外科的 方法을 통해서 72-73%의 良好한 受  
胎成績을 얻었다(金, 1987). 그리고 受精卵의 凍結은 Whittingham(1972)에 의하  
여 最初로 mouse 受精卵를 凍結融解後 이식하여 65%의 受胎率을 보고하였다.  
1972년에는 最初로 Canada의 Alberta州에 受精卵移植會社가 설립되고, Wilmut &  
Rowson(1973)에 의하여 소의 凍結受精卵이 移植되므로서 受精卵 移植 産業化의  
첫발을 내딛기 시작 했다.



### 1. 玻璃化 凍結(Vitrification)

哺乳動物의 초기의 凍結은 緩慢凍結(0.3-1°C/min)로서 DMSO(Wilmut, 1972;  
Leibo 等, 1974; Whittingham 等, 1972, 1975), glycerol(Bilton & Moore, 1976)  
과 같은 透過性耐凍劑에 의해서만이 細胞內의 水分을 脫水할수 있었기 때문에  
時間이 많이 걸리는 번거로움이 있었지만, 細胞內부의 水分을 脫水시키는  
sucrose를 凍結液이나 稀釋液에 添加하였을때 간단한 方法으로 受精卵를 凍結할  
수 있게 되므로서 凍結保存液중 細胞內部를 保護하는 透過性 物質과 細胞外部를

保護하는 非透過性 物質의 種類와 濃度, sucrose 添加水準, 平衡時間에 關한 研究가 활발히 進行되고 있다(Kasai 等., 1980; Renard 等., 1984; Leibo, 1984; Williams & Johnson, 1985; Chupin & Reviere, 1986; 金 等., 1988a,b).

受精卵의 急速凍結時 細胞破壞의 主要原因으로서 平衡時間, 水晶形成을 들 수 있는데 凍結과 融解時 細胞內部에 生成되는 水晶形成은 受精卵이 充分히 脫水되지 않았을 때, 그리고 細胞外部의 水晶形成은 凍結保存液의 濃도가 낮을 때 生成되므로써 細胞質에 物理的 壓力을 가하게 되어 細胞質의 破壞로 인해 受精卵이 發育能力을 잃게 된다(Rall & Fahy, 1985; Rall 等, 1987; Kasai, 1990)고 하였다.

平衡時間은 凍結液內의 透過性 物質과 세포내의 水分移動이 끝날때까지 걸리는 시간으로 규정되는데, 凍結前 耐凍劑와 세포내의 水分移動에 걸리는 適切한 時間과 融解 後 세포내의 耐凍劑移動이 凍結融解後의 生存率에 큰 影響을 미친다고 하였다(Mazur, 1977; Kasai, 1980; Wood & Farrant, 1980; Leibo, 1983).

Vitrification은 各種 耐凍劑를 混合, 또는 두가지의 耐凍劑를 混合한 高濃度의 凍結液이 低溫에서 粘性이 強하게 되어 水晶이 形成되지 않는 理論이다. 最近 Rall과 Fahy(1985)는  $-196^{\circ}\text{C}$ 에서 水晶이 形成되지 않는 vitrification 方法으로 mouse 8 細胞期를 凍結融解한 後 良好한 成績을 얻었다고 보고한 바 있다. 그렇지만 Rall 等(1987)은 이 方法 역시 融解時에 水晶이 形成될 수 있다고 보고하였으며, Kasai(1990)는 融解時 水晶形成을 防止하므로써 vitrification을 간편하게 하는 高分子 物質로서 Ficoll을 사용하였으며 30% Ficoll을 40% ethylene glycol에 添加하였을때 ethylene glycol의 毒性을 증가시켰지만, 0.3M sucrose와 함께 첨가하였을 때는 毒性을 감소시켰다고 報告하였다.

初期의 vitrification solution은 DMSO, propylene glycol, acetamide의 混

合溶液이 주로 사용되었다. 즉, 20.5% DMSO, 15.5% acetamide, 10% propylene glycol의 透過性 物質과, 6% polyethylene glycol의 非透過性 物質로 구성되었지만, 高濃度에 의한 높은 滲透壓때문에 4℃에서 조작하여야 하며 낮은 濃度の vitrification solution에서부터 step wise 방법으로 平衡하여야 하는 短點이 있었다((Rall & Fahy, 1985; Rall 等, 1987; Kono & Tsunoda, 1987; Nakagata, 1989).

Mouse에서는 Hsu 等(1986)이 vitrification solution을 사용하여 受精卵에서 53-93%의 生存率을 보고했고, Szell과 Shelton(1986a,b,1987)은 超急速凍結하였을 때 耐凍劑로서 DMSO보다 glycerol이 더욱 效果的이었고, glycerol과 sucrose 混合 耐凍劑에서 80-95%의 높은 生存率을 얻었다고 하였으며, Kono & Tsunoda(1987)는 VS에서 77-86%, Rall 等(1987)은 88%의 生存率과 移植後 30-37%의 分娩率을 얻었다고 報告하였다. 最近 Kasai 等(1990)은 室溫에서 40% ethylene glycol과 非透過性 物質로서 30% Ficoll과 20% sucrose를 사용하여 98%의 生存率을 얻었다고 報告한바 있다.

國內의 研究報告로서는 Kong 等(1991)이 mouse 桑實胚에서 10% glycerol과 20% propylene glycol 混合液에서 10分の 平衡時間으로 81%의 생존율을, 25% glycerol과 25% propylene glycol 混合液에서 63%의 生存率을 報告하였고, Kang 等(1991)은 30% Ficoll과 40% ethylene glycol 混合液에서 sucrose濃度에 따라 93-100%의 生存率을 報告하였다.

## 2. 卵子的 生死判定(FDA - test)

受精卵의 生死判定방법에는 顯微鏡下에서의 形態 觀察에 의한 判定方法, CO<sub>2</sub>

incubator에 의한 培養方法, FDA - test (Schilling & Dopke, 1978; Schilling 等, 1979a,b,1982; Schmidt 等, 1985; Frank 等, 1986; Bielanski 等, 1986; Leibo & Mazur, 1978; Linda & Trounson, 1980; Didion 等, 1990; Kim 等,1988a,b; Kang 等,1989a,b; Kim 等, 1991; Lee 等, 1992), DAPI - test (Russell 等, 1975; Schilling 等, 1979a) 그리고 直接 移植방법 등이있다.

培養方法은 CO<sub>2</sub> 배양기에서 5% CO<sub>2</sub> 調節과 일정한 濕度, 溫度에서 배양후에 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 隋伴되므로 不正確한 판정방법이라고 지적하였다(Looney 等, 1981; Shilling 等,1982). 더우기 培養에서는 發育段階가 2 cell 에서 4 cell , 8 cell 까지 發育하거나(mitotic activity) 또는 形態적으로 뚜렷한 發達 狀態를 보여야 할 것이다. 즉 morulae 에서 blastocysts로 發達하여 blastocole이 形成되거나 또는 透明帶로 부터 受精卵의 孵化(hatching) 등을 들 수 있다.

FDA-test(3',6'-diacetyl-fluoresceine)의 原理는 최초로 미국의 Guilbault 와 Kramer(1964)가 酵素活性을 측정하는 하나의 酵素分析方法으로서 加水分解 酵素인 esterases가 lipase에 의해 nonfluorescent의 fluorescein esters를 分解하는데 基礎한 方法이다. 이 때 Fluorescence solution의 螢光變化率을 測定 하므로써 이 變化率이 酵素活性과 關聯되어 있다고 하였으며, 比較的 간단하고 3-5分 정도의 시간이 分析에 所要된다고 하였다

그 이후 FDA-test는 Rotman 과 Papermaster (1966)에 의해 受精卵에서 in vitro 배양세포의 생존성을 測定하는데 처음으로 사용 되었다. 이들은 살아 있는 哺乳動物 受精卵을 FDA에 露出 시켰을 때 세포 내부에 fluorescein을 蓄積한 다고 보고 했다. FDA는 실제로 非螢光物質로서 살아있는 세포의 内部에만 존재

하는加水分解酵素인 esterases와 반응하여 螢光을 發散 한다고 하였다. 이 방법을 이용한 수정란의 生存性을 判定하는데 所要되는 時間은 1분(Rotman & Papermaster, 1966), 8분(McGrath 等, 1975) 그리고 10분(Persidsky & Baillie, 1977)으로서 報告者마다 약간의 차이가 있었다. McGrath 等(1975)은 凍結前에 FDA에 露出했던 세포는 동결 용해후 螢光이 消失되었으며 이것은 세포내부의 氷晶形成으로 인한 細胞膜 破壞와 관련이 있다고 하였다.

한편, Schilling 等(1979b)이 소 受精卵에서 FDA-score를 4 等級으로 分類하여, Brilliant, Weak, Partly, Negative를 나타낸 受精卵은 24時間 培養後 各各 85, 20, 16, 0%가 有絲分裂(mitotic activity)을 나타내었으며, 移植 했을 때 對照區와 差異가 없었고(74.3 vs 77.2 %), 奇型도 역시 없었으며, 胎兒까지의 發育은 오히려 FDA處理區가 좋았다( 63 vs 46%)고 보고 하였다.

DAPI(4'6'-diamidino-2-phenylindole)방법은 Dann 等 (1971)에 의해 처음으로 사용 되었다. 이것은 DNA에 높은 親和性을 갖고 있기 때문에 mitochondria, viruses, bacteria, yeasts, spermatozoa 등의 cell 또는 DNA 含有物과 核을 染色한다. 이것은 아주 적은 濃度로도 이들 構造들을 染色하는 能力을 가지고 있으며, FDA가 살아있는 세포에서 螢光을 發散하는 반면, DAPI는 죽은 세포의 핵에서 螢光을 發散한다. 이때 FDA 螢光은 綠色, DAPI 螢光은 黃色인데, 이 방법을 이용해서 FDA와 DAPI 를 並行한 對比染色方法에 의해 受精卵의 生死를 判定하는 경우도 있다.

Schilling 等(1982)은 소 受精卵에서, 그리고 Didion等(1990)은 돼지 卵胞卵(pig oocytes)에서 對比染色 방법을 이용 했다. Rotman & Papermaster(1966)는 生存性和 螢光判定과는 1:1의 관계가 있다고 보고했으며, Jackowski(1977)도 FDA와 受精卵의 發育能力間에는 높은 相關關係(0.96)가 있다고 보고 했다. 이

밖에도 Leibo & Mazur(1978a,b)는 凍結 融解後 mouse 수정란의 生存性 판정에 FDA를 이용했으며, Schilling 等(1979a)도 소와 토끼 受精卵에서 DAPI 와 FDA를 같이 사용하여 FDA-score를 3 段階로 分類하여, 소의 positive에서 90%가, partial 에서 25%가 發育되었고, 토끼 에서는 positive 에서 87%가, partial 에서는 20%가 發育 되었으며 처리후 胎兒에 奇型이 없었다고 보고하고 있다. 이 밖에도 Linda & Trounson(1980)이 mouse에서 FDA處理와 無處理에서 각각 45%와 49%의 正常胎兒 着床率을 나타냈다고 보고하였다.

### 3. 受精卵의 移植

受精卵移植 기술은 最初로 1890년 Heape가 家兎에서 受精卵을 移植하여 子兎가 생산되므로서 受精卵을 한 個體로부터 다른 개체에 移植하더라도 發育하여 子畜이 생산되는 것을 立證했다. 그로부터 25년후 Biedl 等(1922)이 같은 토끼를 이용하여 受精卵 移植에 成功하였으며, Pincus 와 Enzmann(1934) 역시 토끼를 이용하여 成功함으로써 이 분야의 研究가 점차 활기를 띠게 되었다. 그리고 1933년 Nicholas가 쥐에서 成功한 後 Warwick 等(1934)이 緬羊의 受精卵 移植에 成功하였다(金. 1987).

1940년대에 들어서면서 mouse에서 Fekete & Little(1942)가, Casida 等(1944)이 山羊에서, Warwick 等(1949)은 緬羊과 山羊에서 각각 受胎例를 보고하였다. Willet 等(1951)이 供卵牛를 屠殺하여 회수한 수정란을 外科的 方法으로 受卵牛에 移植하여 分娩 시킴으로써, 1950年 前後까지 거의 모든 種類의 家畜에서 受精卵 移植에 成功 하였다. 이 시기에는 受胎率이 35% 이하로 낮았으며, 開腹手術에 의한 採卵 및 移植방법이 거의 전부였다(金. 1987).

한편 非外科的으로는 Mutter 等(1964)에 의하여 受精卵을 移植하여 송아지를 생산하였고, 1971년 Rowson 等은 外科的 方法에 의한 소의 수정란 이식에서 受胎率이 72-73%로 양호한 受胎成績을 얻었다(金, 1987).

Wilmut & Rowson(1973)에 의하여 소의 凍結卵 移植으로 송아지를 탄생시킴에 따라 受精卵 移植의 産業化가 시작되었으며, 그 후 Trounson 等(1978)은 소의 동결용해 수정란 이식에서 非外科的의보다 外科的方法이 受胎率이 良好하다고 보고하였고, 1978年 以後 수정란의 性鑑別에 의해 송아지를 생산하기에 이르렀다 (Picard 等, 1985).

1980년대에 들어서 受精卵의 顯微鏡的 微細分離에 의한 雙子生産이 Willadson 等(1981)에 의하여 이루어 졌으며, Brackett 等(1982)은 소에 있어서 體外受精으로 송아지를 처음으로 생산하였다. 더우기 Fehilly 等(1984)은 綿羊과 山羊 受精卵에서 細胞融合의 技法으로 Chimera를 生産하게 되었다.

國內에서도 凍結 融解 수정란의 移植에 대한 研究가 활발히 진행되어 Rats (成 等, 1987), 돼지(鄭, 1987), 소(李 等, 1986; 石 等, 1983, 1984; 金 等, 1986;)에서, 그리고 소의 雙胎誘起(鄭 等, 1983a, b; 鄭 等, 1989)等 다수의 研究報告가 있다.

Mouse에서는 Rall 等(1987)이 8 細胞期胚를 vitrification 凍結融解後 移植하여 90% vitrification solution에서 26-27%, 100% vitrification solution에서는 3-41%가 正常胎兒로 발달한 보고가 있으며, Minato 等(1983)은 oocytes를 體外受精시켜 移植한 결과 12.3-38.7%가 正常胎兒로 發達하였다고 하였다. 그리고, Massip 等(1984)은 體外受精 oocytes와 1-, 2 細胞期の 卵子를 동결용해후 胚盤胞期까지 培養하여 移植한 것은 生存率이 각각 11.7, 10.7, 9.1%였다고 하였고, 未受精 oocytes를 vitrification으로 동결용해후 體外受精하여 2 細胞期

까지 발달한 것을 移植한 것으로는 45.8%의 正常 産子를 얻었다고 하였다 (Nakagata, 1989). 역시 未成熟 mouse 卵胞卵을 1.5M DMSO에 凍結融解後 體外受精하여 移植했을 때 2개가 着床하여 그 중 1개만이 胎兒로 發達하였다고 하였다 (Carrol 等, 1990). 최근 vitrification 方法으로 受精卵의 凍結融解後 生存率 이 높아지면서, 이 방법을 이용한 未成熟 oocytes의 凍結과 體外受精, 그리고 이를 移植하여 正常 産子까지 발달시키려고 하는 研究가 mouse와 實驗動物에서 활발히 이루어지고 있다.



## Ⅱ. 材料 및 方法

### 1. 試驗期間 및 場所

本 實驗은 1992年 3月 부터 同年 10月 까지 濟州大學校 農科大學 畜產學科 家畜繁殖學 實驗室과 濟州大學校 附設 動物飼育場에서 實施 하였다.

### 2. 供試 動物

供試動物은 4 - 6週齡의 雌性 ICR mouse 와 偽妊娠用으로 7-10週齡 雄性 mouse를 精管切除手術하여 사용하였다. 사양관리는 플라스틱 케이지에서 配合飼料과 물을 自由 菜食시켰으며, 飼育室의 溫度는 20-25℃를 維持하였고, 日照時間은 14/day로 固定하였다.

### 3. 試驗方法



#### 1) 受精卵 採卵

過排卵 誘氣를 위해 PMSG 6IU를 12:00-13:00時 사이에 皮下주사하고 48時間 後에 HCG 6IU를 같은 方法으로 주사하여 同一 系統의 雄性생쥐와 1:1로 合廬, 自然交尾를 誘導하였다. 다음날 아침 陰栓(vaginal plug)이 確認된 것만 實驗에 供試하였다.

陰栓이 확인된 雌性 생쥐는 HCG 주사후 72-75時間에 開腹手術하여 子宮과 卵 巢를 摘出하여 1 ml 주사기를 이용 PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline) + BSA(3 mg/ml, Sigma, Cat.No.A-7906)로 子宮을 灌流하여 watching glass에

morula stage를回收하였다. 이 때의 PBS는 0.22 $\mu$ m의 membrane filter(pore size:0.22 $\mu$ m)로 여과시켰으며, 受精卵은 新鮮한 PBS로 3회 洗滌하고 40배의 實體顯微鏡을 사용하여 形態적으로 正常的인 것만 選別하여 실험에 供試하였다.

## 2) 卵胞卵의 採卵

mouse(ICR, 4-6 週齡)의 卵胞卵은 각 試驗畜을 屠殺한 後 30分 以內에 卵巢의 卵胞에서 18 gage주사침으로 採卵 하였으며, 採卵한 未成熟 卵胞卵은 新鮮한 PBS로 3회 洗滌하여 凍結에 이용하였다.

## 3) 凍結 · 融解

凍結保存液은 Vitrification solution(Ficoll 30%, glycerol 20%, ethylen glycol 10%, sucrose 10% + PBS)을 준비하였다(Ko., 1991). 凍結液은 1ml주사기를 연결시킨 0.25ml straw에 미리 PS(50 $\mu$ l), air bubble(20 $\mu$ l), PS(30 $\mu$ l), air bubble(20 $\mu$ l), 50 $\mu$ l의 凍結液순으로 注入하여 준비하였다(Fig.1.A).

受精卵(7-10개/straw)과 卵胞卵(7-10개/straw)은 凍結液 drop에 침지한 後 같은 동결액으로 한번 옮겼다. 이 때 수정란은 미리 준비한 straw의 凍結液에 micro pipet으로 옮겨 straw powder로 封印하고(Fig.1.B), 室溫(26  $\pm$  1  $^{\circ}$ C)에서 LN<sub>2</sub> container에서 직접 超急速 凍結(220 $^{\circ}$ C/sec)시켰으며, 이때의 平衡時間은 실온에서 10分으로 하였다. 融解는 38 $^{\circ}$ C 溫水에서 10초 동안 흔들면서 融解한 後, PS(PBS+10% sucrose)液에 5分 동안 定置하여 卵子內의 耐凍劑를 除去하고 新鮮한 PBS液에 3회 옮긴후 FDA-test를 하였다.

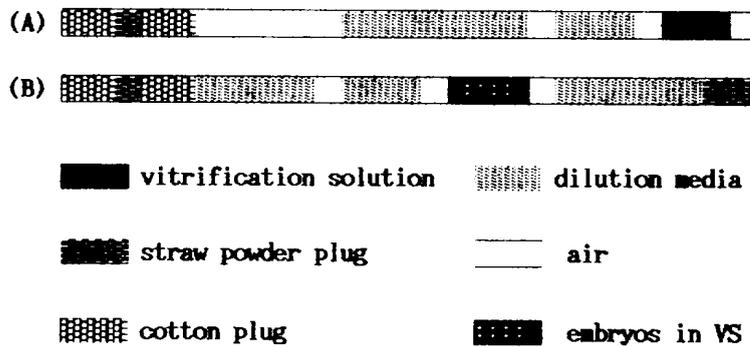


Figure 1. Configuration of vitrification solution, dilution medium and air in 0.25 ml straw, just before loading embryos(A) and after sealing with straw powder(B)

#### 4) FDA-test

##### (1) FDA液 製造

사용한 FDA液은 fluorescein diacetate(Sigma, Cat.No. F-7378) 5mg/ml acetone을 stock solution(Linda & Trounson., 1980)으로 製造하여 使用前에 (1) 0.5 $\mu$ l stock/ml PBS(Standard), (2) 5 $\mu$ l stock/ml PBS(S $\times$ 10倍), (3) 10 $\mu$ l stock/ml PBS(S $\times$ 20倍)로 준비하였고, (4) 對照區는 0 $\mu$ l stock/ml PBS(FDA-free PBS)로 하였다. FDA처리의 有害關係를 조사하기 위하여 凍結融解 mouse morula와 卵胞卵은 各 處理區別로 任意配置하였다.

凍結融解 및 fresh embryos는 4處理區에 各 任意配置하여 室溫(26 $\pm$ °C)에서 10分동안 FDA에 露出하면서 位相差螢光顯微鏡의 U.V.light에서 等級을 判定하였다. 10分後 各 處理의 受精卵은 FDA-free PBS로 옮긴 後 4回 洗滌하였으며, 12時間동안 paraffin oil下에서 前培養한 培養液에 옮겨 5% CO<sub>2</sub> 大氣의 37°C

incubator에서 培養하였다. 螢光顯微鏡은 B460, G520 filter와 Mercury lamp가 附着된 reflected-light fluorescence microscope(OLYMPUS)를 사용했다.

(2) FDA-test score

FDA-score는 다음과 같은 基準에 의하여 判定하였다.

P-5: 수정란의 分割球 全體가 綠色螢光을 強하게 發散하는것(5점;100%生存)

P-4: 수정란의 分割球중 80%가 螢光을 띠거나 positive-5보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는 것(4점;80%)

P-3: 수정란의 分割球중 60%가 螢光을 띠는 것, 또는 positive-4보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(3점;60%)

P-2: 수정란의 分割球중 40%가 螢光을 띠는 것, 또는 positive-3보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(2점;40%)

P-1: 수정란의 分割球중 20%가 螢光을 띠는 것, 또는 positive-2보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(1점;20%)

P-0: 螢光을 전혀 發散하지 않는 것(0점;0%,Nagative)

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 P-5                      B : No. of P-4

C : No. of P-3                      D : No. of P-2

E : No. of P-1

N : Total of P-0 ~ P-5

(3) 未成熟卵胞卵(ovarin oocytes)과 卵丘細胞

卵巢의 卵胞에서 채취된 未成熟 卵胞卵은 卵丘細胞가 부착된 상태에 따라 分類(A, B, C)하여 FDA-test를 前述한 것과 같은 방법으로 P-0에서 P-5까지 실시하였다.

A ; 卵丘細胞가 密着되어 부착된 것(tight oocytes).

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

C ; 卵丘細胞가 부착되지 않은 것(denudation).

#### 5) 受精卵 培養

培養液은 TCM-199(GIBCO, Cat.No.400-1100), Ham's F-10(Sigma, Cat.No.N-6635), M16(Whittingham, 1971)의 基本培養液에 各各 20% FCS(Fetal Calf Serum, GIBCO, Cat.No.200-6170)를 添加하였다. 그리고 pH는 7.2-7.4, Osmolality는 270 -290mOsmol/kg로 調整하였으며 사용전에 0.22 $\mu$ m의 memberane filter로 濾過하였다. 세가지 培養液으로 各各 培養하여 성적이 좋은 것으로 判斷된 Ham's F-10을 FDA test後 培養液으로 選定하였다. 各 培養液의 組成은 Table 1과 같다.

受精卵 培養液은 배양 12時間 前에 petri dish(Corning, 60mm)에 50 $\mu$ l drop의 배양액을 paraffin oil로 被服한 後에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 前培養하였으며, 수정란은 各各 FDA 處理後 PBS에서 2回, 培養液으로 4回 洗滌後 前培養한 배양액 drop으로 옮겨 培養을 實施하였다. 培養 24時間에 形態的인 發達 狀態(Late morula stage)를 확인하고, 48時間에 最終狀態(Blastocysts - Expanded blastocysts stage)를 記錄한 다음 FDA-test 로 生死判定을 다시 實施하여 成績을 記錄했다.

#### 6) 受精卵 移植

#### (1) 受卵 생쥐(recipient mouse)의 준비

受卵 생쥐는 6-8 週齡의 未經産 雌性 mouse로서, 精管切除 手術한 雄性 mouse(7-10 週齡)와 1:1로 合舍하여 膣銜이 확인된 날 아침을 偽妊娠 1日로 하였다.

#### (2) 移植方法

偽妊娠 3日째 오후에 移植하였으며, 이 때 受精卵의 준비는 凍結·融解 後 FDA 處理區와 無處理區로 구분하여 24時間 培養後(early 또는 middle blastocyst stage) 右側 子宮角 上端部에는 FDA 處理卵子, 左側에는 無處理 卵 子를 각각 移植하였다(recipient mouse; -24hrs or donor mouse; +24hrs). 受卵 생쥐는 somnopentyl(sodium pentobarbital) 0.5mg/10g 體重을 腹腔內에 주사하여 麻酔시킨 後, 등의 正中線 2/3부분을 切開하여 卵巢와 子宮을 핀셋으로 고정시키고, 1 ml 주사기로 punching한 後 micro pipet으로 한쪽 子宮角에 5-7개의 受精卵을 外科的으로 移植했다. 移植 確認은 14日 後 開腹手術하여 左·右側 子宮角에 着床 狀態를 記錄하였다.



#### 4. 統計分析

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

Table 1. Basic compositions of culture medium(g/liter).

Components	TCM-199	Ham's F-10	M16
NaCl	-	-	5.533
KCl	-	-	0.356
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	-	0.252
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	0.162
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	-	0.293
NaHCO <sub>3</sub>	1.100	1.100	2.101
NaOH	0.400	0.400	-
Sodium lactate	0.052	0.052	2.610
Sodium pyruvate	-	-	0.036
Ca-lactate	0.255	0.255	-
Glucose	-	-	1.000
BSA	-	-	4.000
Penicillin G	0.075	0.075	0.060
Streptomycin	0.050	0.050	0.050
Phenol Red	-	-	0.010
HEPES	5.958	5.958	-
TCM-199(powder)	9.900	-	-
Ham's F-10(powder)	-	9.810	-



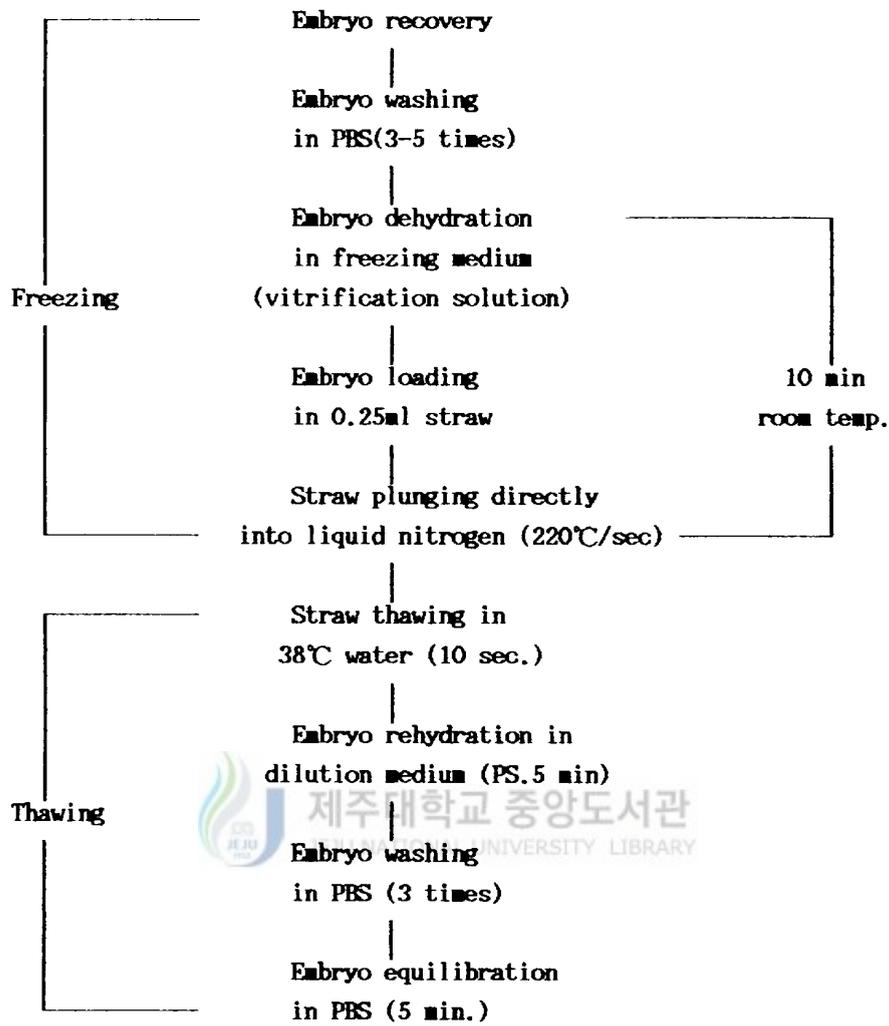


Figure 2. Procedure of ultrarapid freezing(vitrification) and thawing of mouse embryos.

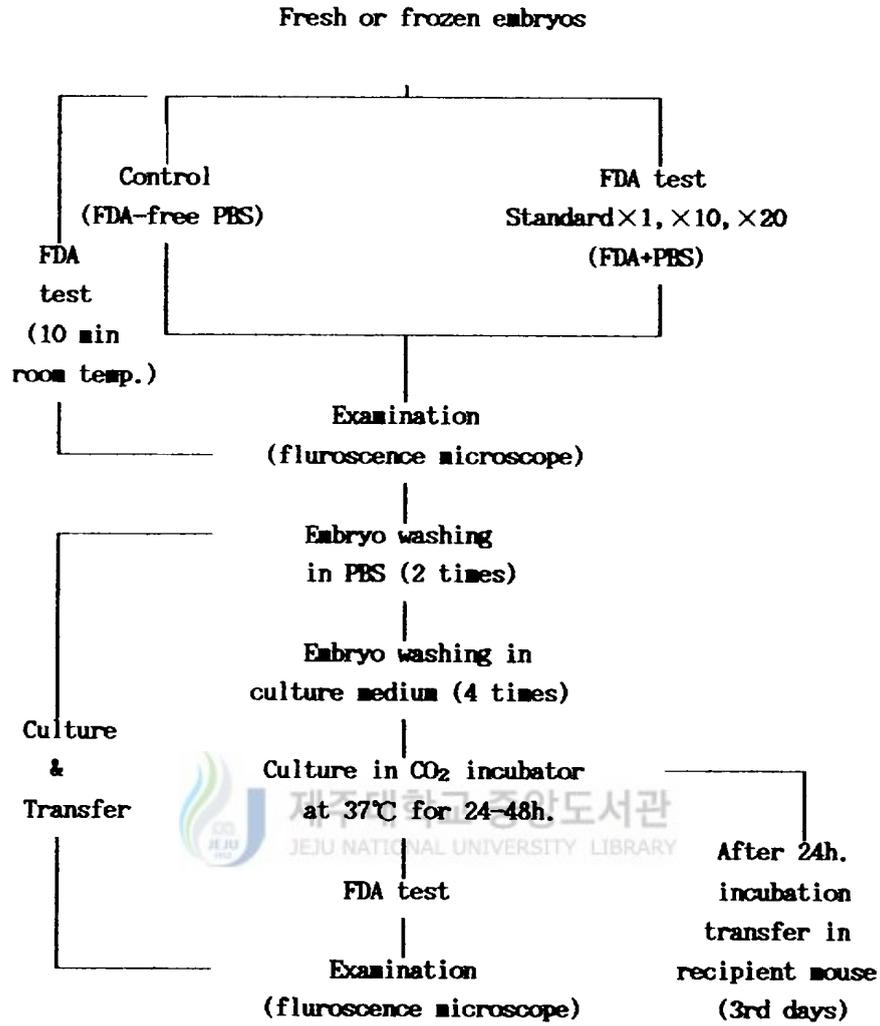


Figure 3. Procedure of the FDA-test, culture and transfer of embryos

## IV. 結果 및 考察

Vitrification solution(Glycerol 20%, Ethylene glycol 10%, Ficoll 30%, sucrose 10%)으로 mouse morulae의 凍結融解後 3가지 培養液을 利用하여 48時間 培養後 發達한 embryos의 成績은 Table 2와 같다.

Table 2. The development rate of mouse morulae cultured in several culture media after vitrification

Treatment <sup>a</sup>	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered(%)	No. (%) of embryos developed to		
			Late morulae - blast. <sup>b</sup>	Expanded blast. <sup>c</sup>	Hatched blast. <sup>c</sup>
TCM-199	45	39(87)	33(85)	32(82)	0(0)
F-10	47	38(81)	35(92)	33(87)	12(36)
M 16	45	38(84)	37(97)	35(92)	6(17)

<sup>a</sup>TCM-199, F-10, M16 ( + 20% fetal calf serum)

<sup>b</sup>Culture for 24hrs

<sup>c</sup>Culture for 48hrs

TCM-199, Ham's F-10 그리고 M16 培養液(各各, + 20% FCS)에서 24時間 培養後 late morulae 또는 early blastocysts까지 發達한 것은 各各 85%(33/39),

92%(35/38), 97%(37/38)로서 M16에서 가장 좋은 成績을 보이고 있으나, 48時間 培養後 expanded blastocysts까지 발달 된 것은 各各 82%, 87%, 92%로서 비슷한 傾向을 나타냈다. 그러나, hatched blastocysts까지 到達한 것이 各各 0%(0/32), 36%(12/33), 17%(6/35)로서 F-10에서 가장 좋은 發達을 보였다.

琉璃化 凍結 방법을 이용한 mouse 胚의 凍結融解는 Rall 等(1987)이 8 細胞 期胚를 20.5% DMSO + 15.5% acetamide + 10% propylene glycol + 6% polyethylene glycol을 組合한 vitrification solution으로 琉璃化 凍結融解後 M16 培養液으로 培養하여 morulae 와 blastocysts까지 88%가 발달하였다고 報告 하여 本 實驗의 結果와 거의 一致하였으며, Kono 等(1989)은 2.62M DMSO + 2.62M acetamide + 1.3M propylene glycol + 6% polyethylene glycol와 glycerol 6.5M + polyethylene glycol 6.0%를 組合한 琉璃化 凍結液으로 凍結 融解한 mouse embryos에서 M16으로 배양후 64-89%가 blastocysts까지 발달하였다고 한 報告와 類似하였다. 그리고 本 培養實驗에서 hatched blastocysts까지 發達한 成績이 Ham's F-10에서 가장 좋았으므로 FDA 有害 與否를 파악하기 위한 배양액으로 Ham's F-10을 選定하였다.



FDA 添加水準에 따라 受精卵 발육의 有害 與否를 파악하기 위해서 凍結 融解 과정을 거치지 않은 新鮮한 mouse morulae의 FDA 處理水準에 따른 배양결과는 Table 3에 나타낸 바와 같다.

Mouse 子宮을 外科적으로 摘出하여 PBS로 flushing한 新鮮한 mouse morulae 는 培養前에 FDA-test에서 모두 P5(100% 生存)를 나타내었으며, 24時間 培養後 Control(FDA - free)에서 90%(18/20)가 expanded blastocysts以上 발달하였고, 이때 39%(7/18)가 hatched blastocysts까지 發達 狀態를 보였다.

Table 3. Effects of FDA concentration on the survival of fresh mouse morulae

Treatment <sup>a</sup> (FDA/PBS)	No. of embryos	No. of embryos developed to		Mean FDA score
		Expanded blastocysts(%)*	Hatched blastocysts(%)*	
Control	20	18(90)	7(39)	5.0
0.5 $\mu$ l/ml	16	16(100)	8(50)	5.0
5 $\mu$ l/ml	14	13(93)	6(46)	5.0
10 $\mu$ l/ml	17	12(71)	6(50)	4.8

<sup>a</sup> Control; FDA-free PBS

0.5 $\mu$ l/ml; Stock(FDA 5 $\mu$ g/ml acetone) 0.5 $\mu$ l/ml PBS (standard)

5 $\mu$ l/ml; Stock(FDA 5 $\mu$ g/ml acetone) 5 $\mu$ l/ml PBS (S $\times$ 10 times)

10 $\mu$ l/ml; Stock(FDA 5 $\mu$ g/ml acetone) 10 $\mu$ l/ml PBS (S $\times$ 20 times)

\* Culture for 24hrs.

0.5 $\mu$ l/ml(standard)에서는 16개의 morulae 모두(16/16) expanded blastocysts 로 발달하였으며, 이 중 hatched blastocysts까지 發育 狀態를 나타낸 것은 50%(8/16)였다. 5 $\mu$ l/ml(S $\times$ 10)에서도 역시 14개의 morulae중에서 93%(13/14)가 發達하였으며, 그 중 46%(6/13)가 hatched blastocysts 狀態를 나타내었다. 10 $\mu$  l/ml(S $\times$ 20)에서도 17개의 morulae중 71%(12/17)가 24時間 培養後 發達하였고, hatched blastocysts 狀態인 것은 59%였다. 이때 각 處理區에서 培養 24時間 後

모든 胚를 FDA test한 결과 Control, 0.5 $\mu$ l/ml, 5 $\mu$ l/ml에서 모두 P5.0의 狀態를 보였고 10 $\mu$ l/ml에서는 P4.8(96%)을 나타내었으나 處理間 有意次는 없었다. 그리고 培養 24時間 後 hatched blastocysts까지 발달한 것은 對照區(FDA-free PBS)에서보다 FDA處理區에서 약간 높은 傾向을 나타내었다. 그러므로 凍結·融解하지 않은 mouse morulae는 FDA濃度を Linda & Trounson(1980)이 발표한 濃度(1:400,000 - 800,000)의 10倍(5 $\mu$ l/ml), 또는 20倍(10 $\mu$ l/ml)까지 높여도 이들의 계속적인 發達에 影響을 주지 않았다.

이러한 結果는 新鮮한 embryos를 FDA 또는 U.V.light에 露出後 in vitro, in vivo 發育에 影響을 주지 않는다는 Linda & Trounson(1980)의 報告와 一致하며, FDA-test는 無處理區와 거의 비슷한 발달(Bielanski 等, 1986) 또는 오히려 處理區가 더 좋았다는 Schilling 等(1976)의 成績과 一致했다.

以上の 成績을 基礎로 하여 琉璃化 凍結 融解한 embryos에서 같은 방법으로 FDA 濃度別 處理 後 48時間 동안 培養한 結果는 Table 4와 같다.

對照區(FDA-free PBS), 0.5 $\mu$ l stock/ml PBS(Standard 處理), 5 $\mu$ l stock/ml PBS(S $\times$ 10) 그리고 10 $\mu$ l stock/ml PBS(S $\times$ 20)로 處理(Plate 1.(1)) 後 培養하여 24時間에 late morulae-blastocysts로 發達한 成績이 各各 94%(30/32), 100%(22/22), 96%(27/28), 97%(28/29)이었고, 48時間 培養 後 expanded blastocysts까지 발달한 成績은 各各 21(70%), 18(82%), 18(67%), 22(79%)이며 (Plate 1.(2),(3)), 이때의 FDA-score는 各各 P4.2, P4.7, P4.2, P3.9로서 對照區와 各 處理區와는 有意차가 없었으나( $P>0.01$ ), FDA 處理區중 0.5 $\mu$ l/ml 와 이 濃度の 20倍(10 $\mu$ l/ml)處理와는 높은 有意차를 나타내었다( $P<0.01$ ).

따라서 FDA處理 濃度は FDA stock 5 $\mu$ l/ml PBS(S $\times$ 10)까지는 해가 없다고 할 수 있으며 FDA 處理後 螢光을 發光하기까지의 時間은 室溫(26 $^{\circ}$ C)에서 0.5 $\mu$ l/ml 가 5分 以上の 時間을 要했으며, 5 $\mu$ l/ml PBS는 1分 以內에 FDA-score로 分類 가능한 發光狀態를 나타냈다(Plate 2.(3)).

Table 4. Effects of FDA concentration on the survival of vitrified mouse morulae

Treatment* (FDA/PBS)	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered(%)	No. (%) of embryos developed to		Mean FDA score
			Late morulae -blastocyst*	Expanded blastocyst**	
Control	41	32(78)	30(94)	21(66)	4.2 <sup>ab</sup>
0.5 $\mu$ l/ml	26	22(85)	22(100)	18(82)	4.7 <sup>a</sup>
5 $\mu$ l/ml	31	28(90)	27(96)	18(64)	4.2 <sup>ab</sup>
10 $\mu$ l/ml	33	29(88)	28(97)	22(76)	3.9 <sup>b</sup>

\* Control; FDA-free PBS

0.5 $\mu$ l/ml; Stock(FDA 5 $\mu$ g/ml acetone) 0.5 $\mu$ l/ml PBS (Standard)

5 $\mu$ l/ml; Stock(FDA 5 $\mu$ g/ml acetone) 5 $\mu$ l/ml PBS (S $\times$ 10 times)

10 $\mu$ l/ml; Stock(FDA 5 $\mu$ g/ml acetone) 10 $\mu$ l/ml PBS (S $\times$ 20 times)

\* Culture for 24hrs.

\*\* Culture for 48hrs.

<sup>ab</sup> Means with different superscripts are significantly different(P<0.01).

本實驗은 共히 10分씩 FDA 와 U.V.light에 露出시켰으므로 FDA-score를 빨리 決定하여 凍結, 培養 또는 移植에 이용하는데 不必要한 in vitro 操作 時間을 줄이는 것이 必要하다고 思料된다. Table 3에서 凍結融解 과정을 거치지 않

은 新鮮한 卵子는 Standard의 20倍(非公式 50倍)까지 受精卵의 發育에 전혀 害가 없었는데 비하여 凍結 融解한 受精卵에서 FDA 20倍 添加時 發達이 약간 떨어져 있다는 것은 아직 밝혀진 報告는 없으나 凍結 融解 과정에서 있을 수 있는 胚의 發育遲延과 活力 低下, 또는 FDA의 溶媒로서 aceton을 이용하는데 FDA의 濃度가 높아질수록 aceton의 濃度도 또한 높아지므로, 凍結 融解時 活力이 低下된 胚에서는 negative로서 作用 했을것으로 思料된다.

凍結融解 胚의 發育遲延은 Table 3과 比較했을 때 FDA處理와는 상관없이 新鮮한 胚는 24時間 培養時 90%(control)以上이 expanded blastocysts로 발달 (Control:90%)하였으나, 凍結融解 胚(Table 4)에서는 48時間까지 培養한 後 비로소 이와 비슷한 發育狀態(Control:94%)를 보인 것으로 充分히 推定할 수 있다. 現在까지 本 實驗의 凍結 融解 卵子에서 FDA 標準區와 10倍 까지의 添加는 害가 없는 것으로 判斷되었으며, 이러한 成績은 Bielanski 等(1986)이 bovine embryos의 FDA-test와 培養에서 對照區와 거의 같은 成績(33 vs 20)을 보인 것과 一致하며, 凍結·融解 cattle embryos에서 FDA와 DAPI를 사용해 生存性 判定後 培養한 것은 發育에 支障이 없었다는 Shilling 等(1982)의 報告와도 一致한다.

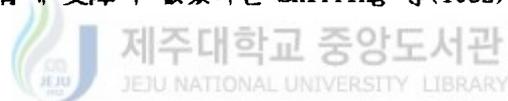


Table 5는 凍結·融解 mouse morulae의 FDA 等級別(P5 - P0) 48時間 培養 後 發達된 生存率을 調査한 것이다.

凍結·融解後 FDA test에서 P5(100% 生存)를 나타낸 72個의 mouse morulae는 F-10에서 48時間 培養後 late morulae 와 expanded blastocysts 까지 92%(66/72)로 發達이 良好 하였으며, 退化된 것이 8%(6/72)이다. 그리고 P4(80% 生存)에서는 67%(20/30)가 late morulae에서 expanded blastocysts까지 發達狀態를 보였으며, P3(60% 生存)에서는 12個중 3個(35%)만이 late morulae 까지 發達했으며 더 이상은 발달하지 못하였다. P2에서 6個의 卵子는 전혀 發達하지 않

고 發育停止 또는 退化狀態를 나타냈으며, P1(20% 生存) 과 P0(0% 生存)에서도 48時間 培養後 전혀 發達을 나타내지 않았다. 全體的으로 P3 以下에서는 48時間 培養後 blastocysts까지의 發達은 전혀 나타나지 않았다.

Table 5. The development rate of mouse morulae cultured according to FDA-score after vitrification

FDA score	No. of embryos recovered	No. of developed to		Total survived embryos(%)	No. of degenerated embryos(%)
		late morula* - early blast.	expanded* blastocysts		
P5	72	29	37	66(92)	6(8)
P4	30	18	2	20(67)	10(33)
P3	12	5	0	5(42)	7(58)
P2	6	0	0	0(0)	6(100)
P1	7	0	0	0(0)	7(100)
P0	7	0	0	0(0)	7(100)

\* Culture for 48hrs.

이것은 Schilling 等(1979 ab)이 受精卵 FDA-score를 4 等級으로 分類하여 Brilliant 85%, Week 20%, Partly 16%, Negative 0%로 발달을 보인 것보다 더 높은 成績이었으나, 各 等級別로는 비슷한 傾向値를 나타냈으며, 凍結 融解 後

培養에서發育 할 수 있는 能力과 FDA 等級間에는 높은 相關(0.96)이 있다는 報告와 一致하였다(Leibo & Mazur, 1978).

FDA-score에 따라 螢光의 狀態를 보면 P5는 全體적으로 아주 밝은 螢光을 發散하므로 쉽게 區別할수 있으며, P4는 P5와 같이 割球의 全體가 螢光을 發하기는 하나 弱하며 分割球 全體中에서 1-2個의 割球만이 螢光을 發하지 않는 程度이다. P4를 blastocysts까지 培養했을 때 P5에서 發達한 blastocysts와 比較하면, 全體 割球數가 P4에서 약간 적었으며 正常的인 blastocysts로 判斷하기가 어려웠다. 그리고 P3에서는 全體 割球의 1/3程度가 螢光을 發하지 않았으며, P2는 단지 몇개의 割球가 螢光을 發하며 P1은 1-2個의 割球만이 螢光을 發한다. P0에서는 전혀 螢光을 發하지 않으며, P4-P5에서 이들 割球와 割球 사이에는 빛을 發하지 않으며, 透明帶 역시 빛을 發하지 않는다.

Table 6. Effect of FDA-test before vitrification on the survival of vitrified mouse morulae

Treatment*	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered(%)	No. of embryos evaluated by FDA-test(%)						Mean FDA score
			P5	P4	P3	P2	P1	P0	
Control	49	40 (82)	31 (78)	5 (13)	3 (8)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	4.7 (94)
FDA	41	38 (93)	27 (71)	6 (16)	2 (5)	1 (3)	0 (0)	2 (5)	4.4 (88)

\* Control; FDA-free PBS,

FDA; FDA stock 5μl/ml PBS (S×10 times)

琉璃化凍結前 FDA를 處理한것(FDA)과 處理하지 않은것(Control)을凍結融解한後, 이들의生存率은 Table 6에 나타내었다.

이들은 Control(FDA-free PBS)과 FDA(5 $\mu$ l/ml PBS, S $\times$ 10)處理區로 나눠 處理를 하였다. 超急速 동결 용해후 螢光顯微鏡으로 이들의生存性を判定한結果 Control; 94%(P4.7), FDA; 88%(P4.4)로서 FDA區에서 약간 낮은傾向을 나타냈으나 處理間 有意次는 없었다(P<0.01) 그러나, FDA處理區에서는 融解後 FDA再添加없이 螢光判定이 可能했으며, 살아있는 割球들은凍結前 FDA判定때 보다 더욱 밝은 螢光을 發했다. Mc Grath 等(1975)에 의하면凍結前 FDA에 露出했던胚는凍結融解後 細胞內 水晶形成으로 인한 割球의 破壞로 螢光을 消失하였다고 하였으나, 本實驗은 水晶形成이 없는 琉璃化凍結이었기 때문에凍結融解後生存率이 좋았던 것으로 思料된다. 하지만,凍結融解後 Control에서는 培養하여 正常的으로 發達이 되었으나, FDA處理區에서는 培養後 發育이 停止되었으며 割球들은 收縮되어 P5를 나타내는 것에서도 發育停止 狀態를 나타내었다. 이들은凍結時 細胞內 FDA가 細胞밖으로 완전히 빠져나가지 않은 狀態에서凍結을 實施하였기 때문에凍結液과 FDA間에 어떤 相互作用이 있었는지, 아니면 FDA가凍結에 의해 化學的 變化를 일으켰는지는 아직 原因이 糾明되지 않았으며, 이에 대해서 아직 알려진 報告는 없으나 此後에 原因을 糾明하여야 할 것으로 思料된다. 그러나凍結前에 FDA處理는 實際 利用에서는 不必要 한 것이며 이를 實施하였더라도 細胞內의 螢光이 밖으로 완전히 빠져나갈때까지 培養하여凍結에 이용한다면 이러한 現狀은 피할 수 있을것으로 思料된다.

未成熟 mouse oocytes의 동결·용해후 體外成熟과 受精에 의하지 않고 卵丘細胞와 함께 生存與否를 FDA 判定法으로 정확히 할 수 있는 可能性을 알아보기 위하여, 卵巢에서 採卵한 卵丘細胞가 附着되어 있는 卵子를凍結融解後 卵丘細胞의 附着상태에 따라 分類하여 FDA-test로 生死判定한 것은 Table 7과 같다.

Table 7. The comparison of the survival of vitrified mouse oocyte categories by FDA-test

Oocyte <sup>o</sup> 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 <sup>a,b</sup> (68)
		Cumulus	9 (15)	5 (8)	0 (0)	7 (12)	3 (5)	35 (59)	1.4 <sup>c</sup> (28)
B	31	Oocytes	17 (55)	0 (0)	0 (0)	2 (6)	0 (0)	12 (39)	2.9 <sup>b</sup> (58)
		Cumulus	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (10)	2 (6)	26 (84)	0.3 <sup>d</sup> (6)
C	19	Oocytes	15 (79)	0 (0)	0 (0)	0 (5)	0 (0)	3 (16)	4.1 <sup>a</sup> (82)

<sup>o</sup> A; cumulus cell tight oocytes, B; cumulus cell partial oocytes,  
C; cumulus-free oocytes(denuclation)

<sup>a,b,c,d</sup> Means with different superscripts are significantly  
different(<sup>a-b</sup>, <sup>c-d</sup>; P<0.05, <sup>a-c</sup>, <sup>a-d</sup>, <sup>b-c</sup>, <sup>b-d</sup>; P<0.01).

卵胞卵의 區分 基準은 卵丘細胞가 卵子の 둘레에 密集해 있는것(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 없는 것(C; cumulus-free oocytes; denudation)으로 區分하고, A와 B oocytes에서 附着되어있는 卵丘細胞만을 따로 區分하여 FDA-score를 測定하였다(Plate 2.(1),(2)). Oocytes의 生存率은 A, B, C에서 각각 FDA-score P3.4(68%), P2.9(58%), P4.1(82%)로서 卵丘細胞가 附着되지 않은 것(C)은 A oocytes와는 有意差가 없었지만 B oocytes에 비해 有意的인 FDA-score를 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가 卵子內部로 浸透, 內部水分의 脫水, 그리고 융해시 耐凍劑의 除去와 水分再吸收(rehydration)를 妨害하여 細胞內에 남아있는 水分이 凍結時 水晶을 形成하므로써 細胞膜을 破壞한것으로 생각되며, 따라서 A와 B의 oocytes에서 平衡時間과 耐凍劑 除去時間을 充分히 주었을 때 더 높은 生存率을 얻을 수 있을 것으로 思料된다.

Oocytes는 凍結融解後 生存率이 높은 반면, 이들에 附着된 卵丘細胞의 生存與否는 처음 試圖된것으로서 大部分 낮은 FDA-score를 나타내었다(A; 68 vs 28%, B; 58 vs 6%,  $P < 0.01$ ). 이것은 oocytes에 비해 細胞의 크기가 아주 적은 卵丘細胞들이 높은 濃度の vitrification solution에서 10分동안의 平衡시간에 細胞의 크기에 비해 과도한 滲透壓과 긴 平衡時間으로 인한 毒性이 있었던것으로 思料되며, 이것은 또한 初期 琉璃化 凍結 방법에서 높은 滲透壓 때문에 일어나는 細胞質의 破壞(Rall & Fahy, 1985)와 類似한 것으로서, Szell 과 Shelton(1986ab)의 報告에 의하면 細胞內部에 透過한 耐凍劑의 水準 增加는 急速凍結된 受精卵의 生存率에 좋았지만 過多한 透過는 必要치 않았다고 하여 이와 같은 理由인 것으로 思料된다.

Oocytes의 FDA에 대한 報告에 의하면, Shilling 等(1979a)이 rabbit 과 cow의 未受精卵에서 FDA 와 DAPI를 같이 이용하여 소의 oocytes에서는 FDA-score가 낮았으나, 토끼의 oocytes에서는 높았다고 하였으며, Didion 等(1990)은 Pig

oocytes에서凍結融解하지 않은 것은 oocytes 와 cumulus 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의 差異에 原因이 있는 것으로 思料된다.

Antonio 等(1988)은 DMSO로 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하여, 本 實驗에서 未成熟 oocytes를 凍結融解 後 卵丘細胞層이 없는것이 生存率이 좋은것(82%,  $P < 0.05$ )으로 나타나 이의 報告와는 相異한 結果를 나타냈으나, 融解後 體外受精할 수 있을 程度의 段階(Metaphase II)까지 成熟시키기 위해서는 基本的으로 卵丘細胞가 必要하기 때문(Cross & Brinster, 1970; Cross, 1973; Erickson & Sorensen, 1974)에 비록 卵丘細胞層이 없는 것이 FDA score는 높았으나, 성숙과정에서 必須的인 卵丘細胞가 生存 可能한 方法으로 凍結 融解 하였을때 體外受精과 胚로 의 발육에 좋은 結果를 얻을 수 있을 것으로 思料된다.

또한, 未受精 mouse oocytes의 동결 용해에 대한 報告중에서 Whittingham 等 (1972)은 緩慢 동결 용해 方法으로 生存率 4-13%의 낮은 보고에 비해 이와 類似한 方法으로  $-196^{\circ}\text{C}$ 에 保存後 正常 oocytes의 比率이 65-76%의 報告가 있었으며 本 實驗의 결과에 비해 대부분 生存性이 낮았다(Whittingham 等, 1977). 이들 報告者는 대부분 凍結融解 後 體外受精에 의한 生存性 判定이었으나, 本 實驗은 琉璃化 凍結 融解後 FDA-test에 의한 生存性判定으로서 卵丘細胞의 附着상 태와 卵子生存性과의 關係, 그리고 이들의 동결에 必要한 條件들을 體外受精과 정 없이 쉽게 判定할수 있는 利點이 있으며 특히 이에 관한 實驗은 처음으로 試圖되었기 때문에 앞으로 많은 追加實驗이 要求된다.

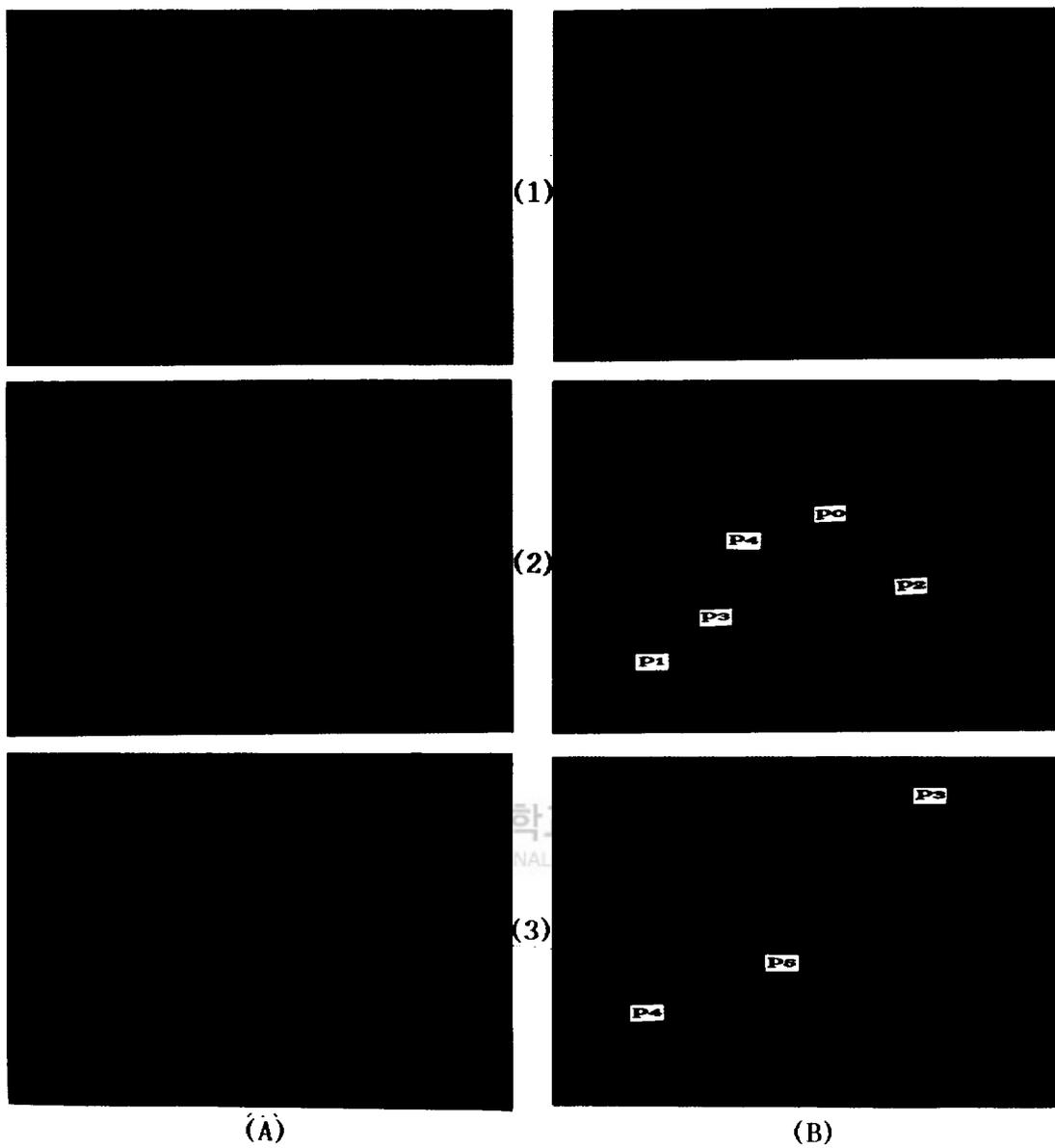


Plate 1. A photomicroscope(A), observing with fluorescence microscope(B) photograph( $\times 100$ )

- (1) Frozen-thawed morulae.
- (2) Blastocysts(P<sub>5</sub> P<sub>4</sub> P<sub>3</sub> P<sub>2</sub> P<sub>1</sub> P<sub>0</sub>).
- (3) Expanded and hatching blastocysts.

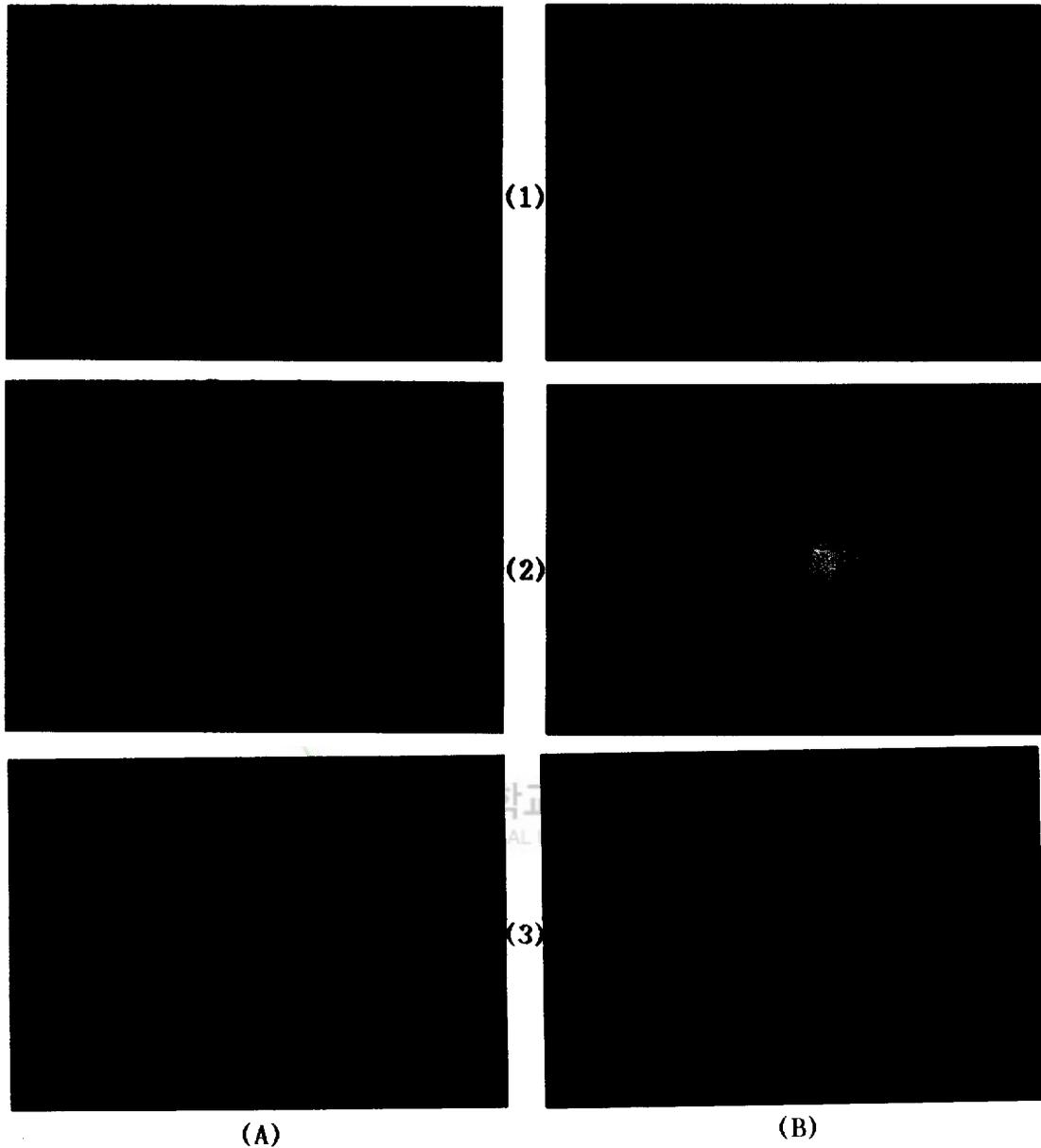


Plate 2. A photomicroscope(A), observing with fluorescence microscope(B) photograph

- (1) Mouse oocytes and cumulus cell( $\times 100$ ).
- (2) Mouse oocytes and cumulus cell( $\times 200$ ).
- (3) Hatching blastocysts after frozen-thawed mouse morulae 48 hrs incubation( $\times 200$ ).

Morulae stage의 mouse 受精卵을 超急速 동결 용해한 後 FDA 處理區와 無處理區(control)로 區分하여 移植한 結果는 Table 8에 나타낸 바와 같다.

Table 8. Effect of FDA-test and non FDA-test on the implantation rate of cultured(24hrs) mouse morulae after vitrification

Treatment*	No. of embryos recovered	No. of embryos transferred after 24h culture(%)	No. (%) of		
			pregnants /recipients	resorption sites	normal fetuses
Control	71	56(79)	3/11	8(14)	1(2)
FDA	70	57(81)	3/11	6(11)	1(2)

\* Control; FDA-free PBS,

FDA; FDA stock 5 $\mu$ l/ml PBS (S $\times$ 10 times)

超急速 동결용해 mouse morulae는 FDA(S $\times$ 10)處理, 또는 처리를 하지않고 (Control) Ham's F-10에 24時間 동안 培養시켜 late morulae에서 middle blastocysts로 발달한것을 偽妊娠 3日의 同一種 受與 mouse 子宮角 上端으로 移植하였다. 이때 左側은 對照區, 右側은 FDA處理區로 하여 同一 個體에 두 처리를 移植하였으며, 移植 確認은 14日째에 開腹手術을 하여 胎兒發育 상태를 確認하였다. 總 11마리의 recipients에 Non FDA; 56 embryos, FDA; 57 embryos을 移植하여 3/11(27.3%)마리가 妊娠되었으며, 着床後 退化되고 있는 胎兒는

Control;14%(8), FDA;11%(6)이었으며, 正常 胎兒로 發育하고 있는것은 各各 2%(1), 2%(1)이었다. 이들은 FDA處理區와 無處理區간 크기와 外觀狀 形態的 差異가 없었다. 移植後 妊娠率이 低調한것은 처음 移植 實驗을 하므로 인해 技術的, 그리고 계절적으로 여름에 移植을 하여 이에 대한 環境的 要因 問題인 것으로 推測된다.

Linda 等(1980)은 mouse embryos를 FDA 處理後 移植하여 45%가, 無處理區에서 49%의 正常胎兒가 確認되었으며 이들간에 有意差는 없었다고 하였다. 그리고 Schilling 等(1976b)은 FDA-treat에서 産子로 더 많이 發育되었고 奇型 또한 나타나지 않았다고 報告한 바 있다(FDA-treat;22/35, Control;16/35).

綜合的으로 FDA를 이용한 生死判定은 上記 培養試驗과 移植 成績으로 볼때 發育과 胎兒의 着床에 害가 없었음을 알 수 있었으나, 과도한 濃度의FDA 사용은 害가 있었음을 알 수 있었다.



## V. 摘 要

本實驗은 vitrification solution(20% Glycerol + 10% Ethylene glycol + 30% Ficoll + 10% sucrose)으로 超急速凍結한 mouse morulae와 ovarian oocytes를 FDA 添加水準別(FDA 0 $\mu$ l/ml, 0.5 $\mu$ l/ml, 5 $\mu$ l/ml, 10 $\mu$ l/ml or 0 $\mu$ l/ml, 5 $\mu$ l/ml in PBS)로 生死判定後 CO<sub>2</sub> incubator에서 培養, 또는 recipients에 移植하였을때 生存率에 미치는 影響을 究明하기 위해서 實施하였고, oocytes에서도 利用可能性을 檢討하여 要約된 結果는 다음과 같다.

1. VS(20G10E30F)에 超急速凍結後 TCM-199, Ham's F-10, M16 培養液에서 48時間 培養한 mouse morulae의 生存率은 各各 82, 89, 92%가 expanded blastocysts까지 發達하였고(P>0.05), hatched blastocysts까지 發達된 것은 各各 0, 36, 17%이었다.

2. FDA 處理後 24時間 동안 培養한 新鮮卵의 發達상태는 FDA 添加水準에 關係없이 96%(P4.8)이상 生存率을 나타내었으며, 이 중 對照區에서 50%, FDA 處理區에서 67%以上이 hatched blastocysts로 發達하여 對照區보다 發達成績이 좋은 것으로 나타나 FDA 處理가 新鮮卵의 발달에서 전혀 害가 없는것으로 나타났다.

3. Mouse morulae를 超急速凍結後 FDA 濃度 0(對照區), 0.5, 5, 10 $\mu$ l/ml 에서 FDA-test와 培養 하였을때 expanded blastocysts까지 發達한 것은 各各, 66, 82, 64, 76% 이었다. 이 때의 FDA score는 各各 P4.2(84%), P4.7(94%), P4.2(84%), P3.9(78%)로서 對照區와 FDA 處理區 사이에는 有意差가 없었으나, 0.5 $\mu$ l/ml 處理區와 10 $\mu$ l/ml 處理區 에서는 有意差가 있었다(P<0.01).

4. FDA-score(P0 = non-fluorescence; P1, P2, P3, P4, P5)別로 分類하여 凍結融解 受精卵을 48時間 동안 培養한 後 發育成績은 各各 P5;92%, P4;67%, P3;42%로 發達하였으나, P2以下에서는 모두 退化했다.

5. FDA 處理를 한 後 凍結融解한 mouse morulae의 生存率은 對照區(FDA

0 $\mu$ l/ml)에서 94%(P4.7), 處理區(FDA 5 $\mu$ l/ml PBS)에서 88%(P4.4)로 나타났으며 有意差는 없었다(P>0.05).

6. Vitrification solution으로 超急速凍結融解한 mouse ovarian oocytes의 生存率은 卵丘細胞의 附着程度(A;cumulus-tight, B;cumulus partial, C;cumulus-free oocytes)에 따라서 A:68%(P3.4), B:58%(P2.9), C: 82%(P4.1)로 B와 C간에 有意差가 있었다(P<0.05). 그리고 卵子는 生存해 있지만 卵丘細胞가 退化되어 있는 것이 A, B oocytes 에서 많이 있었다(P<0.01). ovarian oocytes와 卵丘細胞의 凍結融解後 FDA生死判定은 體外成熟과 體外受精으로 生存性を 判定하여야 하는 어렵고 복잡한 過程을 거치지 않고 簡便한 生死判定 可能性을 提示해 주었다.

7. 凍結 融解한 mouse morulae를 24時間 동안 培養한 後 對照區(FDA 0 $\mu$ l/ml)와 FDA 處理區(5 $\mu$ l/ml)에서 各各 56, 57個의 early blastocysts를 移植하여 14日 後 着床率은 對照區와 FDA 處理區에서 各各, 14%(8), 11%(6) 이었고, 이 중 正常的인 發達을 보인 것은 두 處理에서 各各 2%(1) 이었다.

以上の 結果에서 알 수 있듯이 FDA-test는 新鮮卵과 凍結卵의 生存性判定에 害가 없는 것으로 나타났으며, 또한 移植後의 着床率과 胎兒의 發育에도 影響을 미치지 않았으며 超急速凍結後 FDA-test에서 P5:92%, P4:67%, P3:42%가 培養後 生存率을 보이므로서 FDA test는 標準區의 10倍까지 害가 없었을뿐 아니라 卵子의 生死判定에 適合함을 提示해 주었다.

## 參考文獻

1. Antonio. P., L. Abraham. G. P. Toni. R. B. Harold. and H. D. C. Alan., 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertility and Sterility*. 50(5):805-810.
2. Biedl, A. et al. 1922. Experimentelle studiem uber die einnistung und weiterent-wicklung des eies im uterus. *J.Geburtshilfe Gynak.* 84:59-130.
3. Bielanski, A. V., V. P. Schneider and R. J. Maoletoft. 1986. Fractors affecting survivl of deep frozen bovine embryos in vitro : The effect of freezing container and method of removing cryprotectant. *Theriogenology*, 25:429-437.
4. Bilton, R. J. and N. W. Moore. 1976. Effect of ice seeding and of freezing and thawing rate on the developmnet of sheep embryos stored at -196°C. *Theriogenology*. 6:635(Abstr).
5. Brackett, B. G., Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans and M. A. Dressel. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27:147-158.
6. Carrol, J., D. G. Whittingham, M. J. Wood, E. Telfer and R. G. Gosden. 1990. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J. Reprod. Fert.*, 321-327.
7. Chupin, D and M. M. De Reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*. 26:157-166.
8. Cross, P. G and R. L. Brinster., 1970. In vitro development of mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 3:298-307.
9. Cross, P. G. 1973. The role of cumulus cells and serum in mouse oocyte matured in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 34:241-245.
10. Dann. O., E. Bergen. Damaut and G. Volz., 1971. Trypanocide Diamidine

des 2 Phenyl-benzofurans, 2 Phenyl-indens und 2 Phenyl-indols.  
Ann.Chem. 749.68.

11. 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.
12. Erickson, G. F and R. A. Sorensen. 1974. In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late, middle and preantral graffian follicles. J. Exp. Zool. 190:123-127.
13. Fahy, G. H., D. R. MacFarlane, C. A. Angell, H. T. Meryman, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology, 21:407-426.
14. Fehilly, C. B., S. M. Willadsen and E. M. Tucker. 1984. Interspecific chimaerism between sheep and goat. Nature. 307:634-638.
15. Frank, 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, 26:134-144.
16. Guilbault, G. G and D. N. Kramer. 1964. Fluorimetric determination of lipase, acylase, alpa- and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. Analytical Chemistry. 36(2):409-412.
17. Heape. W, 1890. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. Proc. R. Soc. Lond., 48:457-458.
18. Hsu, T. T., H. Yamakawa, J. Yamanoi and S. Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method. Japan. J. Anim. Reprod., 32:29-32.
19. Jackowski, S. C. 1977. Physiological differences between fertilized and unfertilized mouse ova; glycerol permeability and freezing sensitivity. Ph. D dissertation, University of Tennessee, Knoxville.

20. 정병현.여선후.이상진.이동희.정태영.정길생. 1989. 牛 受精卵의 Bisection 과 移植에 관한 研究. 한국번식지. 13(3):164-170.
21. 정길생.이훈택.정병현.유승환.라진수. 1983a. 受精卵 移植에 의한 소의 쌍 태유기에 관한 연구. (1) : 성선자극 호르몬의 투여에 대한 난소반응에 미치는 요인. 한축지.25;205-209.
22. 정길생.윤종삼.이훈택.유승환.김정익.1983b. 수정난이식에 의한 소의 쌍태 유기에 관한 연구. (4) : 비외과적으로 이식한 신선 및 동결 수정난의 분 만성적. 한축지.24;425-429.
23. 정진관. 1987. 돼지의 수정란 이식. 한국번식지. 11(2):93-97.
24. Kang, M. J., Y. H. Kim, S. H. Moon and J. K. Kim, 1989a. Studies on the rapid the rapid freezing of mouse embryos : I. Effects of cryoprotectants concentration on the mouse embryo survival of the rapid freezing. Korean J. Anim. Repord., 13(3) : 134-140.
25. Kang, M. J., Y. H. Kim, S. H. Moon and J. K. Kim, 1989b. Studies on the rapid freezing of mouse embryos : I . Effects of development stage and seeding on mouse embryo survival of rapid freezing. Korean J. Anim. Repord., 13(3):141-148.
26. Kang, M. S., S. H. Sohn and M. Kasai, 1991. Vitrification of mouse morulae. Korean J. Anim. Reprod., 15(3):173-177.
27. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Repord. Fert., 59:51-56.
28. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1982. Survival of rat embryos after freezing. J. Repord. Fert., 66:367 -370.
29. Kasai, M., J. H. Komi, A. Takakamo, H. Tsudera, T. Sakuai and T. Machida, 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J. Reprod. Fert., 89:91-97
30. Kenndy, L. G., M. P. Boland and I. Gordon. 1983. The effect of embryos

- quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology*, 19:823-832.
31. 김희석. 오성종. 양보석. 이근상. 유승환. 김종국. 1986. 소에 있어서 이식 수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. *한축지*. 28(9):578-583.
  32. Kim., J. K., C. K. Kim. M. J. Kang. D. J. Chang and S. H. Kim., 1988a. Studies on simplified procedures for freezing and thawing of bovine embryos : IV . Effect of simplified procedures of freezing and seeding using a cryoprotectant containing sucrose on the rabbit embryo survival rate determined with the FDA test. *Korean J. Anim. Sci.*, 30(10):583-589.
  33. Kim., J. K., C. K. Kim. M. J. Kang. D. J. Chang and S. H. Kim., 1988b. Studies on simplified procedures for freezing and thawing of bovine embryos : V . Effect of glycerol cryoprotectants containing sucrose on the mouse embryo survival rate determined by FDA test. *Korean J. Anim. Sci.*, 12(2):65-71.
  34. Kim., S. K, B. K. Lee and K. S. Lee., 1991. Studies on the ultrarapid freezing of in vitro fertilized bovine embryos : I. Studies on the survival rates after slow and ultrarapid frozen-thawing of in vitro fertilized bovine embryos. *Korean J. Anim. Reprod.*, 15(2):133-139.
  35. Kim. S. K and B. K. Lee. 1992. Studies on the survival rates after ultrarapid frozen-thawing of porcine embryos. *Korean J. Anim. Reprod.* 116(2)125-131.
  36. 김상근. 1987. 家畜受精卵移植要論. 14-15
  37. 고경래. 1991. Vitrification solution의 耐凍劑 組合이 凍結融解後 생쥐 受精卵의 生存率에 미치는 影響. 濟州大學校 碩士學位 論文.
  38. Kong. I. K., E. B. Lee, D. J. Kang and C. S. Park., 1991. Effects of equilibration time, precooling and straw loading method on survival of mouse embryos frozen by vitrification. *Korean J. Anim. Reprod.*

- 15(1):49-57.
39. Kono, T. and Y. Tsunoda, 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 33:77-81.
  40. Lee, B. K., S. K. Kim and K. S. Lee, 1992. Studies on the survival rates after slow and ultrarapid frozen-thawing of porcine embryos. *Korean J. Anim. Reprod.*, 116(2):117-123.
  41. 이정호. 박항균. 조민희. 1986. 수정란 이식에 있어서 수란우와 수정란의 상호작용이 수태율에 미치는 영향. *한국수정란이식연구회지*. (1);76-80.
  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. and P. Mazur, 1978a. Preservation of mammalian embryos by freezing. Academic Press, New York:179-197.
  44. Leibo, S. P., and P. Mazur, 1978b. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In *Methods in Mammalian Reproduction*. 179-201.
  45. Leibo, S. P., P. Mazur and S. C. Jackowski, 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exptl. Cell. Res.*, 89:79-88.
  46. Linda, R. M. and A. O. Trounson., 1980. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 58:189-196.
  47. Looney, C. R., B. W. Boutte, L. F. Archbald and R. A. Godke. 1981. Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology*. 15:13-23.
  48. 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.

49. Mc Grath, J. J., E. G. Cravalho and C. E. Huggins, 1975. An experimental comparison of intracellular ice formation and freeze-thaw survival of hela s -3 cells. *Cryobiology*. 12:540-550.
50. Mazur, R. R. 1977. Sole freezing injury in mammalian embryos : In the freezing of mammals embryos(Ellott k & Whelan eds) Ciba Fndn symp. No. 52. 19, Elsevier/North Holland Amsterdam.
51. Minato. Y and Y. Toyoda, 1983. Development to normal young of mouse oocytes matured and fertilized in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 54(6):387-391.
52. Mutter, L. R., A. P. Graden and D. Olds. 1964. Successful non-surgical bovine embryo transfer. *A.I.Digest*. 12:3.
53. Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 87:479 - 483.
54. Persidsky, M. D and G. S. Baillie. 1977. Fluorometric test of cell membrane integrity, *Cryobiology*. 14:322-331.
55. Picard. L., King. W. A and Betteridge, 1985. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Veterinary Record*. 117:603-608.
56. Pincus, G and E. V. Enzmann. 1934. Can mammalian eggs undergo normal development in vitro. *Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.*, 20:121.
57. Rall, W. F. and G. M. Fahy, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification. *Nature Vol.* 313:573-575.
58. 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.
59. Renard, J. P., B. X. Nguyent and V. Garnier, 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J.Reprod. Fert.*,71:573-580.
60. Rotman. B., and B. W. Papermaster., 1966. Membrane properties of

- living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. Proc. natn. Acad. Sci. USA 55:134-141.
61. Russell. W. C., C. Newman. and D. H. Williamson., 1975. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasma and viruses. Nature(Lond.). 253:461-462.
  62. Schilling. E. and H. H. Dopke., 1978. A rapid diagnostic test for the viability of early cattle and rabbit embryos using diacetyl-fluorescin. Naturwissenschaften. 65:658-659.
  63. Schilling. E., H. Niemann, S. P. Cheng. and H. H. Doepke., 1979a. DAPI - a further fluorescence test for diagnosing the viability of early cow and rabbit embryos. Zuchthyg. 14:170-172.
  64. Schilling. E., D. Smidt, B. Sacher, D. Petac, S. E. Kaschab., 1979b. Diagnosis of the viability of early bovine embryos by fluorescence microscopy. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19(5):1625-1629.
  65. Schilling. E., H. Niemann. and D. Smidt., 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. 349-355.
  66. Schmidt, P. M. C. Schiewe and D. E. Wildt. 1985. Variables influencing post-thaw embryo survival rates in mice. Theriogenology. 23:229.
  67. 석호봉. 이광원. 오성종. 윤충근. 김호중. 조운형. 오대균. 지설하. 임경순 & G. D. Mahon, 1984. 소의 동결수정란이 수태에 미치는 영향. (3) ; 5단계부유에 의한 glycerol 제거란의 외과적 이식의 영향. 한축지. 26(5);429-434.
  68. 석호봉. 이광원. 신용식. 김호중. 조운형. 지설하. 임경순. 알. 티. 베이커. 1983. 소의 동결수정란이 수태에 미치는 영향. (2) ; 서당 부유액에 의한 2단계 평형의 영향. 한축지. 25(5);430-437.
  69. 성환후. 윤창현. 1987. 성숙 미경산 원취의 수정란 이식에 관한 연구. (2) ; 외과적으로 이식한 수정란의 수태율. 한축지. 29(3);118-124.
  70. Szell, A. and J. N. Shelton, 1986a. Sucrose dilution of glycerol from

- mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J. Reprod. Fert., 76:401-408.
71. Szell, A. and J. N. Shelton, 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78:699-703.
  72. Szell, A. and J. N. Shelton, 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol - sucrose solutions Day - 3 mouse embryos. J. Reprod. Fert., 80:309-316.
  73. Trounson, A. O., A. Brand and M. H. Aarats, 1978. Non-surgical transfer of deep-frozen bovine embryos. Theriogenology., 10:111-115
  74. Warwick, B. L. et al. 1934. Results of mating rams to Angora female goats. Proc. Am. Soc. Anim. Prod. 27th Ann.Meet. 225-227.
  75. Whittingham, D. G., 1971. Culture of mouse ova. J. Reprod. Fert., (suppl.)14:7-21.
  76. Whittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur, 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -296. Science,178:411-414.
  77. Whittingham, D. G., 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. J. Reprod. Fert., 47:269-274.
  78. Whittingham, D. G., 1977. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196. J. Reprod. Fertil., 49:89
  79. Willadsen, S. M., H. Len-Jensen, C. G. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected percentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. Theriogenology. 15:23-29.
  80. Williams, T. J and S. E. Johason, 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. Theriogenology. 23(1):235.
  81. Wilmut, I and L. E. A. Rowson. 1973. Experiments of the low temperature preservation of cow embryos. Vet.Rec. 92:686-690.

- 
82. Wilmut, I., 1972. The effects of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Sci., 11:1071-1079.
  83. Wittingham, D. G, M. J. Wood, E. Telfer and R. G. Gosden. 1990. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. J.Reprod. Fert, 321-327.
  84. Wood, M and J. Farrant. 1980. preservation of mouse embryos by two-step freezing. Cryobiology. 17:178-180.



## 謝 辭

本 論 文 이 完 成 되 기 까 지 많 은 성 인 과 배 려 를 하 여 주 신 많 은 분 들 께 이 글 을 빌 어 심 심 한 感 謝 를 드 립 니 다.

특 히 學 部 에 서 부 터 大 學 院 에 이 르 기 까 지 仔 詳 하 게 보 살 펴 주 시 고 不 足 함 이 없 도 록 많 은 心 血 을 기 울 여 주 신 金 重 桂 博 士 님 께 眞 心 으 로 感 謝 를 드 립 니 다.

아 울 러 바 뻐 신 가 운 데 도 좋 은 論 文 이 되 도 록 審 査 하 여 주 신 梁 奇 千 博 士 님, 康 珉 秀 博 士 님 을 비 롯 한 畜 産 學 科 여 러 教 授 님 들 께 感 謝 를 드 립 니 다.

論 文 實 驗 遂 行 過 程 중 에 많 은 도 움 을 주 신 姜 萬 鐘, 金 瑩 勳, 高 敬 來 先 輩 님, 그 리 고 家 畜 繁 殖 學 實 驗 室 의 高 赫 辰 學 兄 과 文 星 豪 兄 님 을 비 롯 한 畜 産 學 科 모 든 院 友 와 親 友 에 게 感 謝 드 립 니 다.

그 리 고 어 려 운 與 件 에 서 도 物 心 兩 面 으 로 지 원 과 사 랑 을 아 께 지 않 으 신 父 母 님 께 이 기쁨 을 드 리 오 며, 사 랑 하 는 동 생 들 과 이 작 은 기쁨 을 함 께 하 고 자 합 니 다.

