

## 家兔의 受精卵移植에 關한 研究

### — II. 凍結融解卵자의 發育段階別 生存性 —

金正翊 · 梁富根 · 南相憲 · 高光斗  
江原大學校 農科大學

## Studies on Embryo Transfer in Rabbit

### — II. The viability of deep-frozen embryos at different developing stages —

**C.I. Kim, B.K. Yang, S.H. Nam, and K.D. Goh**

College of Agriculture, Kangweon National University

### Summary

Present studies were conducted to investigate the developmental stage and the location of embryos in the reproductive tract at various times after ovulation, the morphologically normal after thawing of embryos preserved in liquid nitrogen, and the survival after transferring frozen-thawed embryos.

The results obtained were as follows:

1. Embryo stage and location in the reproductive tract after hCG administration.

For the investigation of embryo stage and location in the reproductive tract after ovulation, rabbits were laparotomized at 24, 40, 48, 72 and 120 hrs post hCG injection, simultaneously with mating. The oviducts and uteri were flushed out with PBS medium containing 50% rabbit serum, respectively.

1) Most of embryos was remained in the oviduct within 48 hrs, with the lapse of time, embryos were started to move to uterus and shifted in uterus at 72 hrs after hCG injection.

2) The representatives of embryos stage collected at 24, 40, 48, 72 and 120 hrs were 1-cell (60.4%), 8-cell to early morula (52.3, 39.3%), late blastocyst (95.5%) stages, respectively.

2. Morphological normality and survival of the frozen-thawed embryos.

For the evaluation of the quality and viability on the frozen-thawed embryos, immediately after thawing, embryos were assessed by morphologically normal under a dissecting microscope, and a further test of frozen-thawed embryos was made by transferring the morphologically normal embryos to the uteri of recipient rabbit induced pseudopregnancy by the injection of hCG at the time of hCG injection in donor rabbits.

1) The proportions of embryos which appeared morphologically normal was higher when 8-cell (85.7%) and morula (90.5%) were used for freezing than when 4-cell (66.7%) and blastocyst (75.8%) were used.

2) Pregnancies were observed at Day 15 after transfer of frozen-thawed 8-cell (7/13), morula (19/42) and blastocyst (3/19) but not after transfer of embryos at 4-cell stage.

## I. 結 論

受精卵의 移植術은 실시과정에서 이식난자의 수대를 성립시키기 위하여 供卵畜(donor)과 受卵畜(recipient)간에 발정기를 同期化 시키는 기술과정이 포함되나, 수정란을 채취한 상태로 凍結하여 장기간 보존하게 되면 발정동기화과정이 생략된다.

1972年 Whittingham등에 의하여 mouse수정란의 동결보존에 성공한 예가 보고된 후 Bank와 Maurer(1974), Whittingham과 Adams(1974)들은 mouse 수정란의 동결보존법(Whittingham, 1971)을 家兔受精卵에 응용하여 凍結融解後 受胎에 성공하였다. 그러나 토끼의 수정란은 mouse의 경우(Whittingham, 1975)와는 달리 凍結融解後의 발육단계별 생존성에 차이가 존재한다(Tsunoda & Sugie, 1977 角田等, 1979).

본실험은 토끼수정란의 동결보존에 대한 기초자료를 습득하기 위하여 交尾後 시간경과에 따른 수정란의 發育과 移動分布를 조사하고, 발육단계별로 동결보존한 수정란의 耐凍性과 融解卵자의 移植後 生存性을 검토하기 위하여 실시하였다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 受精卵의 採取

HCG투여와 동시에 암토끼를 숫토끼사에 넣어 2시간 간격으로 2회 자연교미를 시키고, 자연교미가 되지 않은 암토끼는 인공수정을 실시하였다.

인공수정에 이용된 정액은 성숙한 숫토끼를 외과적으로 精巢上體頭部의 정자를 채취한 다음, 과당구연산 경액회석액(Fructose-citrate Extender: Roche, Dizk & Lodge, 1968)에 회석하여 精子浮遊液(596×10<sup>6</sup>ml)을 만들어 사용하였다.

자연교미 또는 인공수정을 실시한 供卵兔는 일정시간별로 개복수술하여 수정란을 회수하였다.

### 2. 受精卵의 凍結과 融解後 檢査

가토수정란의 동결에 사용한 보존액은 Whittingham (1971)이 mouse의 동결보존에 사용한 수정 Dulbecco's phosphate buffered saline(m-PBS)에 50%의 가토혈청

을 첨가하였다(Whittingham & Adams, 1976).

본실험에 사용된 가토혈청은 채혈후 실온에 2시간 정치한 후 2,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층부분을 채취, 56°C에서 30분간 일처리하여 -20°C에 보존한 非動化血清을 사용하였다.

동해보호제로는 Dimethyl Sulphoxide(DMSO)를 사용하였고, 위의 보존액에 DMSO를 0.5M, 1.0M 첨가한 액내에서 10분간씩 1.5M의 최종농도에서 15분간 배양한 후 정액주입용의 0.5ml plastic straw내로 옮겨 봉입하였다. 수정란이 봉입된 straw는 ethanol bath내로 옮겨, 소련의 Dry Ice 첨가량을 조절하여 분당 1°C의 속도로 실온에서 -5°C까지 각각시켜 植氷(seeding)하고 -5°C에서 5분간 방치한 후에 동일냉각속도로 -50°C~-70°C까지 냉각시켰다. 계속해서 -100°C의 액체질소 gas(LN<sub>2</sub> gas) 층으로 straw를 옮겨 5분간 정치한 후에 -196°C의 액체질소(LN<sub>2</sub>) 층에 침저(角田等, 1978)하여 1주에서 1개월간 보관하였다. 植氷은 LN<sub>2</sub> gas로 予冷시킨 핀셋으로 난자가 들어있는 straw의 외부를 접촉하여 실시하였다(Elsden & Seidel, 1982).

LN<sub>2</sub>내에 보존된 Sample은 일정기간 보존한 후에 -50°C~-70°C로 냉각시킨 30ml의 ethanal bath에서 분당 4~5°C의 속도로 0°C까지 용해한 후에 37°C의 水槽로 옮겨 DMSO가 첨가되지 않은 보존액을 3회에 나누어 1분 간격으로 첨가하여 동해방지제의 平衡時와는 逆順으로 세도질내의 DMSO를 제거하였다. 용해한 수정란은 신선한 보존액이 들어있는 Watching glass로 2회이상 옮겨 난자주위의 DMSO를 제거하고, 37°C에서 30분간 정치한후에 실험현미경하에서 形態學的인 正常性을 검사하였다. 형태가 정상으로 판정된 난자의 일부는 성주기를 동기화시킨 수란토에 이식, 2주후에 開腹하여 着床胎兒數를 조사하여 동결융해란의 생존성을 검토하였다(Tsunoda et al, 1982).

### 3. 凍結融解卵의 移植

발정동기화는 수란토를 공란토와 동일한 시기에 PM-SG와 HCG를 주사하고 동결융해난자의 발육단계에 따라 48시간에서 120시간에 개복수술하여 자궁에 이식한 후에 개복부위를 봉합하여 분간실로 옮겨 격리사육하였다.

Table 1. Stage of embryos collected at various times after hCG injection.

Stage	Hour				
	24	40	48	72	120
1-cell	29+0	3 <sup>1)</sup> +0	4 <sup>1)</sup> +0	0+1 <sup>1)</sup>	
2-cell	14+0		2+0		
4-cell	5+0	18+0	3+0		
8-cell		67+0	56+0	0+2	
morula			41+1	0+101	0+1
blastocyst				0+30	0+21
Total	48	88	107	134	22

Table 2. Morphology and in vivo development of frozen rabbit embryos after thawing or transfer to recipients.

Stage of embryos	No. of embryos		Embryo quality		No. of embryos transferred	Site of transfer	No. of implantation
	frozen	thawed	Normal(%)	Abnormal(%)			
4-cell	6	6	4(66.7)	2(33.3)	—	—	—
8-cell	49	49	42(85.7)	7(14.3)	13	uterus	7(53.8)
morula	128	128	94(90.5)	11(9.5)	42	uterus	19(45.2)
blastocyst	37	33	25(75.8)	8(24.2)	19	uterus	3(15.8)
Total	220	193	165(85.5)	28(14.5)	74		29(39.2)

### III. 結果 및 考察

#### 1. 排卵後 時間別 受精卵의 發育段階

HCG를 투여한 후에 자연교미 또는 인공수정하여 일정시간별로 개복하여 회수한 수정란의 발육상태를 조사한 성적은 표 1과 같다.

24시간에 회수된 난자의 발육단계는 1세포기에서 4세포기까지의 발육분포를 나타내고 있으나 1세포기의 난자가 60.4%(29/48)로 가장 많았다. 40~48시간은 1세포기에서 초기상실배기까지 다양한 발육분포를 보이고 있으나, 주로 8세포기(63.1%)의 난자가 난관에 머물면서 초기상실배기(21.5%)로 수정란의 발육이 진전되었다. 72시간의 대표적인 발육단계는 후기상실배기가 75.4%(101/134)로 가장 많았으며 일부가 초기배반포기(22.4%)까지 발육이 진행되어 120시간에는 대부분의 수정란이 후기배반포기(expanded blastocyst)로 발육되었다.

한편, HCG주사후 시간별 수정란의 이동분포는 48시간 이내에는 대부분 난관에 머물고 (242/243), 48시간 이후에는 일부가 난관에서 자궁으로 이동을 시작하여 72시간 이후에는 대부분의 난자(95.5%)가 자궁으로 이전되었다.

이상의 결과는 Maurer(1978)의 hormone처리에 의한 수정란의 발육상태와 발육단계에 따른 생식기도내의 이동분포와 대체적으로 일치하고 있으며, 교미후 67시간에 수정란이 난관에서 자궁으로 이동하기 시작하였다는 角田等(1977)의 실험보고에서도 입증되고 있다 따라서 8세포기 이전의 수정란을 채취할 때에는 HCG 주사후 48시간 이전에 난관을 관류하거나, 상실배기 이후의 경우는 HCG주사후 72시간 이후에 자궁을 관류하여 회수하는 것이 안전한 회수방법으로 생각된다.

#### 2. 受精卵의 凍結融解後 生存性

수정란의 내동성과 생존성을 검토하기 위하여 동결 융해난자의 形態와 移植後 發生態을 조사한 성적은 표 2와 같다.

융해후 회수한 193개의 수정란중 형태적으로 정상인 난자의 수는 165개로써 정상난자가 85.5%였다. 한편, 발육단계별 성적을 살펴보면 8세포기와 상실배기의 난자가 각각 85.7%와 90.5%로써 4세포기의 66.7%보다 우수하였다.

이와같은 성적은 8~16세포기의 가토수정란을 -196°C에서 장기 보존하여 융해한 난자의 정상비율이 72~83%였다는 角田等(1978)의 성적보다 다소 상회하고 있으나, 가토는 발육단계에 따른 동결융해후 생존성에 차이가 존재(Tsunoda & Sugie, 1977)하며, 8세포~상

실패(71.3%~88.9%)가 다 발육단계보다 동결응해후에 정상난자의 비율이 높다(角田等, 1979) 사실이 입증되었다.

동결보존난의 생존성을 조사하기 위하여 응해후 형태가 정상으로 판정된 수정란 74개를 수란토의 자궁에 이식하고 2주후에 開腹하여 배아의 착상성적을 조사한 결과 29개(39.2%)의 태아착상이 확인되었다(표 2).

발육단계별 이식후 착상율 성적에서는 4세포기의 경우는 착상이 확인되지 않았으나 8세포~상실배기의 수정란은 45~54%의 높은 착상율을 보이고 있으며 배반포기의 이식후 착상율은 15.8%로 떨어지는 경향을 나타냈다. 角田等(1979)도 발육상태별 동결응해 후 생존성을 조사하여, 후기배반포기는 난자생존율이 현격히 떨어져지고, 8세포~상실배기에서 21.9~33.3%의 난자생존율을 얻고 있다.

가트수정란의 동결보존시 내동성은 HCG주사후 48~72시간에 회수한 8~상실배 늦어도 초기배반포기의 수정란이 우수한 것으로 보인다.

#### IV. 要 約

토끼수정란의 이식에 대한 기초자료를 습득하기 위하여 교미 또는 인공수정후의 시간경과에 따른 수정란의 발육단계와 生殖器道內의 移動分布를 조사하였고, 토끼수정난자의 耐凍性과 凍結融解後 生存性を 검토하기 위하여 凍結融解卵子の 形態의 正常性과 移植後 胎兒着床率을 조사하였다. 本試驗에 의하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

##### 1. 排卵後 時間別 受精卵의 發育段階 및 移動分布

HCG주사와 동시에 자연교미 또는 인공수정을 실시하고 24, 40, 48, 72, 120시간별로 수정란을 회수하여 발육단계를 검사하여 다음의 결과를 얻었다.

1) 수정란의 이동분포는 HCG주사후 48시간 이내는 난관내에 머물고 시간이 경과됨에 따라 자궁으로 이동을 시작하여 72시간 이후에는 대부분의 난자가 자궁으로 이전되었다.

2) 회수시간별 수정란의 대표적 발육단계는 24시간에 1세포기(60.4%), 40시간에 8세포기(76.1%), 48시간은 8세포기(52.3%)에서 초기상실배기(39.3%), 72시간에 후기상실배기(75.4%) 그리고 120시간에는 후기배반포기(95.5%)였다.

##### 2. 受精卵의 凍結融解後 生存性

Dulbecco's m-PBS 용액에 DMSO를 1.5M 첨가한 보

존액을 사용하여 냉동보존한 후에 응해한 수정란의 형태 및 이식후 생존성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1) 동결응해 후 회수된 난자중 형태적으로 정상인난자의 비율은 평균 85.5%였으며, 8세포(85.7%)와 상실배(90.5%)기가 4세포(66.7%)와 배반포(75.8%)기의 난자보다 우수하였다.

2) 동결응해후 정상수정란을 자궁에 이식하여 평균 39.2(29/74)의 태아착상율을 얻었다.

#### 參 考 文 獻

1. Bank, H. and R.R. Maurer(1974) Survival of frozen rabbit embryos. *Exp. Cell. Res.* 88 : 188196.
2. Elsdon, R.P. and G.E. Seidel, Jr(1982) Embryo transfer procedures for cattle.
3. Maurer, R.R. (1978) Advances in rabbit embryo culture. In: *Method in mammalian reproduction.* (ed. Danial, J.C. Jr) Academic press, N.Y. pp. 259-272.
4. Tsunoda, Y. and T. Sugie(1977) Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen. *J. Reprod. Fert.* 49 : 173-174.
5. Tsunoda, Y., T. Soma and T. Sugie(1982) Effect of post-ovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morulae. *J. Reprod. Fert.* 65 : 483-487.
6. Whittingham, D.G. (1971) Susvival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature, Lond.* 233 : 125-126.
7. Whittingham, D.G. (1975) Proceeding of the workshop on basic aspects of freeze preservation of mouse strains. p.45, Gustau. Fisher Verlag, Stuttgart.
8. Whittingham, D.G. and C.E. Adams(1974) Low temperature preservation of rabbit embryos. *Cryobiology* 11 : 560-561. Abstr.
9. Whittingham, D.G. and C.E. Adams(1976) Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 47 : 269-274.
10. Whittingham, D.G. and S.P. Leibo and P. Mazur(1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science* 178 : 411-414.
11. 角田幸生, 入谷明, 西川義正(1978) 家兎の過排卵ならびに反復過排卵誘起に關する研究, 日畜會報

49(2) : 89—95.

12. 角田幸生, 相馬 正, 杉江 信(1978) 家兔 受精卵の長期保存. 日本家畜 繁殖誌 24(4) : 157—160.
13. 角田幸生, 下洞義之, 和泉邦昭, 相馬 正, 杉江信

(1979) 家兔卵子の凍結保存試験, 發育ステージ別  
にみた凍結融解後の生存性, 家畜繁殖誌 25(4) : 18  
9—193.