

토끼 受精卵의 凍結保存

任京淳

서울대학교 農科大學 畜産學科

Storage of Frozen Rabbit Embryos

Im, Kyung Soon

Dept. Animal Sciences, Agricultural College, Seoul National University

I. 緒 論

受精卵의 凍結保存은 遺傳能力이 뛰어난 種牝畜의 活用度를 높이고, 수정란중에 잠재하고 있는 遺傳物質을 장기간 보존하여 필요시 활용하며, 受精卵의 국제간에 무역을 가능케하며, 受精卵移植의 효율을 높이고, 體外에서 受精卵 發生生理를 구명하는데 크게 기여하여 왔다.

Table 1. Live offspring produced from frozen-thawed embryos of mammalian species.

Species	Year	First observation
Mouse	1972	Whittingham et al.
Cow	1973	Wilmut and Rowson
Rabbit	1974	Bank and Maurer
Sheep	1974	Willadsen et al.
Rat	1975	Whittingham
Goat	1976	Bilton and Moore
Horse	1982	Yamamoto et al.
Antelope	1983	Kramer et al.
Human	1983	Trounson and Mohr
Baboon	1984	Pope et al.

Table 1에서 보여주는 바와 같이 실험동물, 가축, 野生動物 및 사람을 포함한 9個種의 哺乳動物에서 凍結受精卵으로 新生仔가 태어났는데 凍結受精卵으로 新生仔가 처음으로 태어난 것은 생쥐였으며 1972년 Whittingham 등과 Wilmut가 보고하였다. 凍結受精卵에 의하여 생쥐에서 新生仔가 태어나는 것을 계기로 數種의 동물에서 수정란의 凍結에 관

한 연구가 진행되었으며 토끼에서는 1974년 Bank등이 처음으로 凍結受精卵에 의한 新生仔의 출생을 보고하기에 이르렀다. 凍結受精卵에 의하여 토끼에서 1974년 新生仔가 출생한 이래 13년의 세월이 지나는 동안 受精卵의 凍結方法은 實用化를 전제로 많은 發展을 가져왔으며 토끼 受精卵의 凍結方法도 많은 發展을 가져왔으나 소의 凍結受精卵과 같이 實用化에는 미치지 못하고 있다. 본 綜說에서는 토끼 受精卵의 凍結의 發展과정을 技術과 理論의 측면에서 다른 動物의 그것과 比較 考察하여 앞으로 토끼 受精卵 凍結에 관한 研究에 基礎資料를 제공코자 한다.

II. 受精卵의 採卵

1. 多排卵處理

암토끼에서 受精卵을 採卵하려면 암토끼에 多排卵處理를 實施해야 한다. 凍結受精卵으로 최초로 新生仔를 분만케한 Bank 등(1974)은 多排卵處理方法으로 FSH(follicle stimulating hormone) 0.4mg을 4일간 피하주사하고 4일째 오후에 2.5mg PLH(pituitary luteinizing hormone)를 정맥주사하고 즉시 인공수정을 하였다. Hughes 등(1982)은 FSH를 1일 2회 3일간 투여한후 LH를 주사하고 교배하여 多排卵을 유기하였다. 최근 Kane(1983)은 FSH 0.5mg을 1일 2회 3일간 계속 피하주사하고 하루후에 LH 0.5mg을 정맥내 주사하고 인공수정하여 多排卵을 유기하였다. FSH와 LH를 사용하는 다배란 처리 방법은 Kennelly 등(1965)의 방법을 기본으로 하고 있으며 FSH와 LH의 투여량은 이 두 호르몬의 제조원과 力價 그리고 암토끼의 성숙속도,

체중 및 반복 사용에 따라 달라질 수 있다.

2. 卵자의 回收

回收한 난자의 발육단계는 交配후 또는 LH 주사 후 언제 採卵하느냐에 따라 다르다. 또 採卵部位도 交配 또는 LH 주사후 경과 시간에 따라 다르다. 2細胞의 卵자의 大部分이 교배후 25시간(Chang, 1948), 18~25시간(Smith, 1952)에 卵管에서 採卵되었으며, 2 또는 4-細胞의 卵자는 교배후 28~30시간(Kane 등, 1970), 28~32시간(Mauer 등, 1970)에 採卵되고 있다. 한편 8~16細胞의 卵자는 교배후 45시간(Tsunoda 등, 1977a)에 採卵되었으며 桑實胚는 LH 주사후 66~70시간(Maurer 등, 1976), 후기 상실배는 교배후 65시간(Tsunoda 등, 1977b; Hughes 등, 1982)에 採卵되었다.

III. 卵자의 凍結融解過程

卵자의 凍結融解過程은 동물 품종에 따라서 조금씩 방법을 달리하고 있으나 그 기본은 거의 같으며 이를 모식으로 표현하면 Fig 1 과 같다. 卵자를 凍

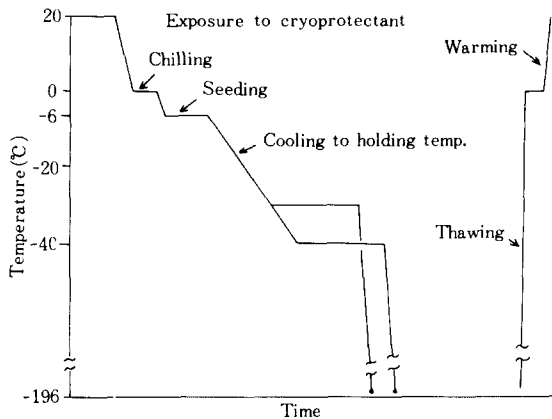


Fig. 1. Diagram of the steps of embryo freezing.

害로부터 보호하기 위하여 凍害防止物質을 함유한 培養液에 浮遊한다. 凍害防止物質을 添加하지 않은 상태에서는 卵자는 凍結에서 살아남을 수 없다. 凍害防止物質에 노출된 난자는 0°C 이하의 溫度로서 서서히 냉각한다. 凍害防止物質이 첨가된 大部分의 培養液의 氷點은 0°C 이하이므로 0°C 이하의 온도에서도 結氷이 일어나지 않는다. 더 낮은 溫度에서

結氷이 일어나지 않도록 植氷(seeding)을 하여 結氷을 유도한다. 植氷은 -6~-7°C에서 液體窒素에 浸漬했던 집게나 핀셋으로 冷却중인 小試驗管이나 스트로를 짚어 주므로 結氷을 유인하게 된다. 일단 結氷이 형성되면 매분 0.3~0.5°C의 속도로 -20~-40°C까지 천천히 冷却한다. -20~-40°C에 도달한 시점에서 10~20분 시간을 두어 卵자가 外部의 滲透壓과 반응토록 한다. -20~-40°C에서 바로 -196°C의 액체질소에 浸漬하여 장기보존 한다. 凍結한 卵자의 融解方法은 凍結方法에 따라 달라진다. 卵자를 -60°C까지 氷凍凍결하였을 때는 매분 5~50°C로 비교적 완만하게 融해하고 -30°C까지 氷凍凍결하여 -196°C에 浸漬하였을 때는 매분 200°C로 비교적 빨리 融해하는 방법이 일반화 되어 있다.

일단 融解한 卵자는 卵자로부터 凍害防止物質을 제거하기 위하여 단계적으로 동해방지물질의 함량이 적은 희석액에 부유한다.

IV. 受精卵凍結에 사용하는 培養液

凍結의 대상이 되는 토끼 受精卵은 2細胞 卵자로부터 胚盤胞에 이므로 受精卵 凍結에 사용하는 培養液은 이들 卵자를 受容할 수 있어야 한다. Kane 등(1970)은 토끼의 2細胞와 4細胞 卵자를 擴張된 胚盤胞(expanding blastocyst)까지 배양할 수 있는 培養液으로 (a) 1.5%의 BSA(Bovine Serum Albumin)을 함유하는 단순한 合成培養液(Table 2) (b) (a)에 補充營養成分을 첨가한 完全合成培養液(Table 2) 및 (c) F 10(DIFCO) 培養液을 사용하였다. 또한 Kane 등(1971)은 1, 2 및 4細胞의 토끼 胚의 培養液으로 포도당, 塩類, 아미노산, 미량원소, 우혈청알부민을 함유한 DM(defined medium)을 사용하였다. Bank 등(1973)은 토끼 受精卵의 凍結保存液으로 Dulbecco사의 mPBS(modified phosphate buffered saline)을 사용하였는데 이후 Maurer 등(1976), Whittingham 등(1976), Tsunoda 등(1977a), Hughes 등(1982), Renard 등(1984a)이 토끼 受精卵의 凍結保存液으로 mPBS를 사용하였다. 이 PBS는 현재 GIBCO Laboratory社에서 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS)로 1ℓ용으로 봉투에 포장되어 市販되고 있다. 별도로 포장된 Cal-

Table 2. Composition of simple synthetic medium and concentrations of supplementing nutrients.

Simple synthetic medium*			
Component	Concentration (g/liter)	Supplementary nutrients (μg/liter)	
NaCl	6,683 .	Amino acids	
KCl	0,356 .	Vitamins	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.251 .	Biotin	24
KH ₂ PO ₄	0.162	Calcium pantothenate	715
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.294	Choline chloride	698
NaHCO ₃	2.106	myo-Inositol	544
Glucose	1.801	Niacinamide	645
BSA	15.000	Lipoic acid	200
		Pyridoxine HCl	206
		Ribollavin	376
		Thiamine HCl	1012
		Folic acid	1320
		Vitamin B ₁₂	1360
		Nucleic acid precursors	
		Hypoxanthine	4080
		Thymidine	727
		Trace elements	
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	834
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	28.8

*Potassium penicillin G, 100,000 IU/liter and streptomycin sulfate 500,000 μg/liter.

cium chloride는 D-PBS를 증류수에 용해후 混合하는 것으로 되어 있다.

卵자의 代謝作用을 원활히 하고, 卵자操作중 난자의 초자기구에 부착을 방지하며 凍結時 卵자의 耐凍性을 증가시키기 위하여 배양액중에 血清알부민을 첨가하고 있다. Chang(1947)은 토끼의 2細胞 胚를 토끼血清에 부유하여 低溫에 보존하였다. 토끼 胚의 培養液에 사용한 血清의 種類와 水準을 살펴 보면 Maurer 등(1970)은 토끼혈청과 소혈청을, Kane 등(1971, 1983)과 Anderson 등(1975)은 1.5%의 BSA를, Bae 등(1975)과 Kane 등(1983)은 0.1 또는 0.4%의 BSA를, 角田等(1976)은 20%의 토끼혈청을, 内海等(1976)은 토끼혈청 1 : 生理食塩水 2를, Tsunoda 등(1977a)은 BSA 4 mg/ml 또는 토끼혈청 50%를, Landa (1981, 1982a)는 송아지 혈청

5~10mg/ml을, Hughes 등(1982)과 Renard 등(1984 b)은 10~20% FCS(fetal calf serum)를 사용하였다. 따라서 토끼 胚의 凍結用 培養液에 첨가하는 혈청으로는 토끼血清, BSA, CS(calf serum) 및 FCS의 어느것이나 사용 가능한 것으로 示唆된다.

V. 凍害防止劑

培養液에 凍害防止劑가 첨가되지 않은 조건에서 토끼의 胚를 凍結하는 경우 胚는 생존할 수가 없다. 즉 凍結融解後 胚가 살아남기 위해서는 培養液중에 동해방지제가 첨가되어야 한다. 동해방지제는 細胞 내에서의 透過性이 강하여 胚가 동해방지제에 노출 되면 直接 胚에 透過하며, 또한 배양액의 滲透壓을 높여 동결전 및 냉각과정중 胚의 脫水를 도와 超低

溫下에서도 胚가 凍結되는 것을 防止한다. Mauer 등(1976), Tsunoda 등(1977a), Landa(1982a), Nguyen 등(1983) 및 Renard 등(1984a)은 토끼胚의 凍害防止劑로서 1.5~3.0M의 DMSO(Dimethyl-sulf-oxide)를 培養液에 첨가하였다. DMSO뿐만 아니라 glycerol도 토끼胚의 동해방지제로 사용되고 있다. Smith(1952)는 토끼胚의 培養液에 glycerol을 2.5~7.5% 첨가하였을 때 胚가 萎縮후 팽창한 것으로 보아 glycerol이 胚내로 滲透한다고 示唆하였다.

Nguyen 등(1983)은 토끼의 2細胞胚를 1.5~ 3.0 M의 glycerol을 함유한 培養液에 부유하여 동결하였다.

최근 非透過性物質인 sucrose를 배양액에 첨가한 高張液에 胚를 노출하여 胚의 동결전 脫水를 誘引하여 胚를 급속동결하고 있다. Renard 등(1984b)은 토끼의 2細胞胚를 0.5~1.0M의 sucrose를 함유한 培養液에 노출하여 胚의 脫水를 誘引후 급속동결을 실시하였다.

胚의 凍結에 있어서 새로운 凍害防止劑로서 propanediol이 사용되기 시작하고 있다. Nguyen 등(1983)은 토끼胚의 凍結用 培養液에 1.5~3.0M의 propanediol을 동해방지제로서 사용하였다. 또한 propanediol과 sucrose를 배양액에 함께 첨가하므로서 二重의 凍害防止 효과를 얻으려는 시험도 실시되고 있다. Renard 등(1984b)는 2.2M의 propanediol과 0.5M의 sucrose를 함유한 배양액에 토끼의 2細胞胚를 노출하여 실온에서 부분적인 脫水를 유인후 2 단계법에 의한 동결을 실시하였다. 이 1,2-propanediol(propylene glycol, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$)은 胚에 대하여 毒性이 적고 液狀에서 不定形狀의 安定度가 glycerol, DMSO, ethylene glycol 및 ethanol보다 높기 때문에 胚의 새로운 凍害防止劑로 有望시된다. Boutron 등(1979)은 精子的 동해 방지제로서 propanediol이 glycerol에 대치 사용될 것을 示唆한 바 있다. propanediol은 소(Renard 등, 1981)와 생쥐(Renard 등, 1984b)胚의 凍害防止劑로 사용된 바 있다.

VI. 凍結速度

凍結速度는 胚의 동결과과정중에서 가장 중요한 부분이며 따라서 胚의 동결에 관한 論文중에는 동결

속도에 관한 논문이 많은 比重을 차지한다. 胚의 동결에서 최초로 성공한 Whittingham 등(1972)은 생쥐의 胚로 동결을 시도하였는데 이때 -79°C 까지 每分 0.3°C 의 速度로 凍結하였으며 이를 계기로 緩慢凍結은 胚 동결의 필수조건으로 생각되어 왔다. 토끼胚를 -79°C 에 凍結하여 受胎케 하는데 성공한 Ferdows 등(1958)은 2°C 에서 -15°C 까지는 每分 0.1°C 씩 냉각하고, -15°C 에서 -35°C 까지는 每分 0.2°C 씩, -35°C 에서 -79°C 까지는 每分 0.4°C 씩 凍結하였다. Bank 등(1973)은 토끼의 8細胞胚를 -196°C 에 성공적으로 凍結하였는데 -5°C 에서 植水을 하였으며 每分 1°C 씩 凍結하여 每分 15°C 에 融解하였다. Bank 등(1974)은 또한 토끼 着床前胚를 -196°C 까지 성공적으로 동결하였는데 -5°C 에서 植水을 하고 -5°C 에서 -10°C 까지는 每分 0.4°C 씩 냉각하고 -10°C 에서 -60°C 까지는 每分 1°C 씩, -60°C 에서 -80°C 까지는 좀더 서서히 凍結하여 液體窒素(Liquid Nitrogen, LN)에 침지하는 凍結方法을 사용하였다. 한편 Whittingham 등(1974)은 토끼의 4 및 8細胞胚와 桑實胚를 -5°C 에서 植水한후 -80°C 혹은 $-110\sim-120^{\circ}\text{C}$ 까지 每分 $0.18\sim 0.9^{\circ}\text{C}$ 로 동결한 후 LN에 넣었다. Maurer 등(1976)은 토끼의 桑實胚를 -7°C 에서 -100°C 까지 每分 1.1°C 로 동결후 액체질소에 침지하는 완만동결 방법을 사용하였으며 또한 Tsunoda 등(1977a)은 토끼胚를 -7°C 에서 -76°C 까지 每分 1°C 로 동결후 액체질소에 침지하였다. 이후 凍結速度에 관한 생쥐와 소의 胚를 사용한 多角的 연구에서 LN에 침지 開始하는 溫度가 -76°C 보다 높은 溫度에서도 融解후 胚 生存이 가능하다는 結論을 얻어 토끼 胚의 凍結에도 응용하기에 이르렀다. Landa(1982b)는 토끼의 桑實胚를 室溫에서 -7°C 에 浸漬한 후 -7°C 에서 植水을 실시하여 -25°C 까지 每分 $0.2\sim 0.5^{\circ}\text{C}$ 씩 냉각하고 -25°C 에서 바로 LN에 浸漬하는 凍結方法을 사용하였다. 이후 凍害防止劑로서 propanediol이 이용되고 sucrose를 함유한 培養液내에서 胚의 凍結前 脫水를 조작하므로서 植水을 하지 않고 2段階로 급속동결하는 方法이 사용되기에 이르렀다. Nguyen 등(1983)은 토끼의 2細胞胚를 실온에서 部分 脫水시킨후 바로 -28°C 에 침적후 結水을 기다려 LN에 침지하는 方法을 사용하였으며 Renard 등(1984b)도 토끼의 2細胞胚를 실온에서 부분 脫水후 바로 $-$

30°C에 30~240분 靜直한후 LN에 浸漬하여 凍結하였다. 한편 Vincent 등(1985)은 토끼의 2細胞胚를 1.5M의 propanediol(PrOH)에 노출후 다시 PrOH 2M+Sucrose 0.5M 나 PrOH 1.0M+Sucrose 0.1M에 5분간 노출시킨후 -25~-30°C에 1.5시간 靜置하였다가 LN에 침지하였다. Kojima 등(1986)은 토끼에 桑實胚를 凍結할 때 沃化銀을 함유한 培養液을 스트로 上端一部에 注入하여 스트로를 실온에서 -7°C까지 每分 1°C 냉각하고 -7°C에서 10분간 靜置하여 자연스럽게 結氷을 유인한후 -30°C까지 每分 1°C씩 냉각하여 LN에 침지하는 새로운 凍結方法을 考案하였다. 이상의 言及한바와 같이 토끼胚의 凍結은 생쥐, 흰쥐, 소의 胚와 같이 緩慢長時間 凍結法에서 2段階 短時間凍結法으로 轉換되어 簡便 實用化할 수 있는 方法으로 改善되었다.

VII. 融解速度

냉각속도가 脫氷過程의 胚의 生存에 중요한것 같이 融해속도도 復氷過程의 胚의 生存에 중요한 요인이 되고 있다. 融해속도는 동결방법과 동결속도에 따라 달라진다. 토끼 凍結胚의 融해방법의 變遷 과정을 살펴보면 Ferdows 등(1958)은 -79°C까지 동결한 토끼 胚를 바로 室溫에 融해하여 移植하였다. 이 때만 하더라도 融解 속도와 온도에 대한 考慮가 없었던 것으로 추측된다. 그러나 Bank 등(1973)은 1.6M DMSO를 함유한 mPBS 媒液에 노출한 토끼의 8細胞胚를 0°C에서 15분간 靜置후 다시 -5°C에 옮겨 植氷을 하고 每分 1°C씩 동결한후 -6°C까지는 每分 15°C씩 融해후 -6°C에서 바로 37°C로 옮기는 2段階 融解法을 도입하였다. Whittingham 등(1974)은 -196°C에 동결한 토끼의 4~8細胞胚를 每分 4~22°C의 비율로 融해하였다. Mauer 등(1976)도 Bank 등(1973, 1974)과 거의 같은 방법으로 -196°C에 동결한 토끼의 桑實胚를 -60°C에서 -10°C까지 每分 1.3~50°C로 融해후 -5°C에 도달했을 때 37°C의 媒液을 첨가하였다. Tsunoda 등(1977b)은 -196°C에 동결한 토끼의 2, 8~16細胞胚를 -80°C에서 0°C까지 每分 4°C로 融解하였다. Yuhara 등(1978)은 4×100mm의 스트로에 分注하여 -196°C에 凍結한 토끼의 2細胞胚, 후기桑實胚 및 胚盤胞를 20°C의 공기중에서 2분간 두어 融解

하는 1段階 急速融解法을 채택하였다. Landa(1981)는 -196°C에 凍結한 토끼 2細胞胚와 桑實胚를 每分 7~9°C로 融해하였으며, 1만용해시는 -5°C까지 融해후 -5°C에서 실온으로 급속 融해하였다. Tsunoda 등(1981)은 -196°C에 동결한 토끼의 桑實胚를 37°C의 水槽중에서 투입하여 급속融해할 경우 -30°C~-50°C에서 LN에 浸漬하여 급속동결한 처리에서 높은 생존율이 얻어졌다고 하였다. Landa (1982, a)는 -25°C에서 바로 -196°C로 옮겨 급속 동결한 토끼의 桑實胚를 每分 25~1,550°C로 融해했을 때 每分 650°C로 融해(40°C의 水槽에 옮김)한 경우 가장 좋은 生存率을 얻었다. Nguyen 등(1983)과 Renard 등(1983)은 -28~-30°C에서 예비 동결하여 -196°C의 NL에 침지하여 凍結한 토끼 2細胞胚를 37°C의 水槽에서 급속 融해하였다. 이상에서 고찰한바와 같이 토끼 胚의 融解方法은 胚의 동결전 部分脫氷, 동해방지제로서 propanediol의 사용, 단계별 적절한 동결속도의 開發등에 힘입어 數段階 1만용해법에서 1段階 급속融해법으로 發展하였음을 알 수 있다.

VIII. 凍結過程과 胚의 萎縮

胚는 이미 언급한바와 같이 DMSO, glycerol 및 propanediol과 같은 透過性이 강한 동해방지제가 포함된 培養液내에서 凍結하게 된다. 즉 胚는 透過性이 강하고 삼투압이 높은 媒液에 노출하면 脫氷가 일어나 萎縮된다. 일단 脫氷가 되면 胚내 삼투압이 외부액보다 높아져 胚내외의 삼투압의 平衡이 일어날때까지 凍結防止劑와 水分이 胚내로 들어가며 胚는 容積이 증가된다. DMSO와 glycerol에 노출되었을 때의 소胚의 반응은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 노출후 2분 내외에 相對容積이 30% 전후 감소하였다가 노출후 6분내외에 原容積으로 복귀한다. 소胚는 DMSO보다는 glycerol에 노출했을 때 萎縮率이 적고 原容積으로 복귀하는 時間이 짧다(Leibo, 1983).

凍害防止劑에 대한 胚의 투과성은 동물종과 胚의 발육단계에 따라 차이가 있다. 또 다른 흥미있는 현상은 胚가 冷却중 容積이 줄어든다는 事實이다. 슬라이드 冷却裝置를 현미경에 부착하여 冷却중의 胚의 容積을 측정할 수 있다. 0°C에서 -60°C까지

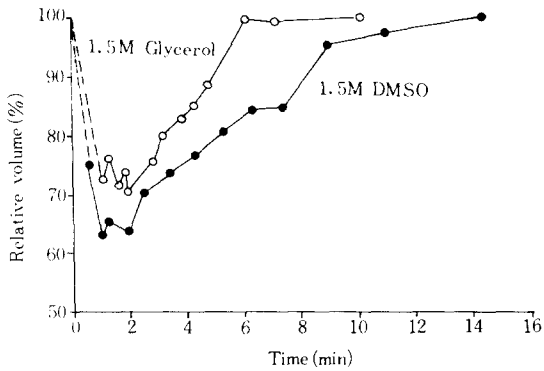


Fig. 2. The change in volume of bovine blastocysts, relative to their isotonic volume, when suspended in each of the indicated solutions at 24°C. Leibo (1983)

每分 1°C 씩 냉각하였을 때의 냉각중의 소와 생쥐胚의 容積의 변화는 Fig. 3.과 같다. 소의 桑實胚는 1.5M의 glycerol을 함유한 媒液에서 생쥐胚는 1.0 M의 DMSO를 함유한 媒液에서 冷却되었는데 두

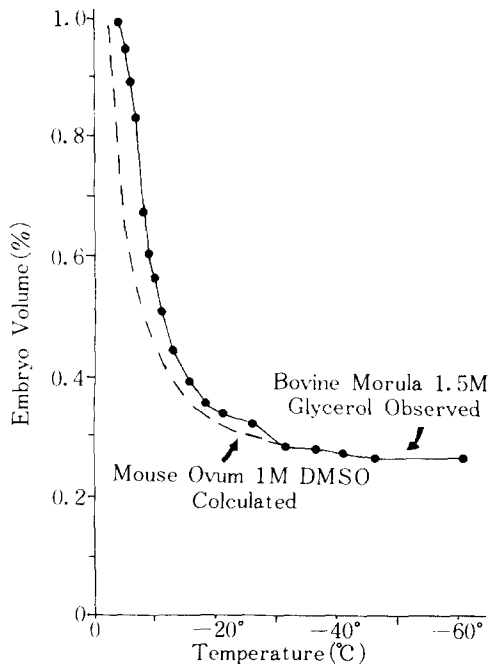


Fig. 3. Comparison of the calculated change in the volume of a mouse ovum in 1M dimethyl sulfoxide (DMSO) with the observed change of a bovine morula in 1.5M glycerol being cooled at 1°C/min. (Leibo et al. 1984.)

種의 胚 모두 冷却이 진행됨에 따라 容積이 서서히 감소하였으며 減少率은 -20~-40°C에서 최고에 달하여 -40°C 이후는 용적의 변화가 없으며 萎縮된 胚의 용적은 처음 容積의 30%에 이르고 있음을 알 수 있다 (Leibo 등 1984, Mazur 등 1984). 凍結速度에서 언급한 바와 같이 최근 대부분의 研究者들은 冷却중의 胚를 -25~-30°C에서 LN에 浸漬하고 있는데 이는 冷却過程중 脫水가 거의 完了되는 (萎縮이 中止되는) 時期(溫度)에 LN에 浸漬되는 것으로 脫水理論과 부합한 것이라고 할 수 있다.

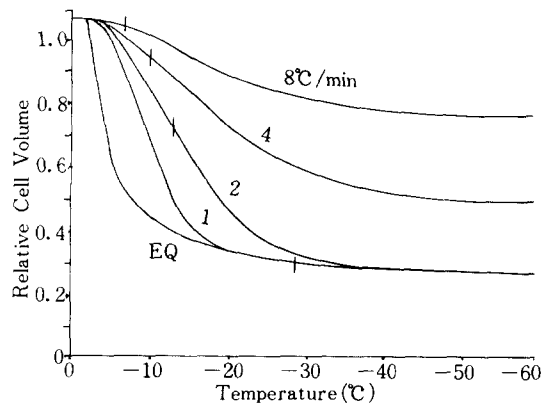


Fig. 4. Calculated change in volume of mouse ova in 1M dimethyl sulfoxide (DMSO) during freezing at each of the indicated rates. Mazur et al. (1984)

또한 냉각중의 胚의 萎縮率은 -25~-30°C까지의 冷却速度에 따라 差異가 있다는 것이 밝혀졌다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 생쥐胚를 DMSO 1M를 함유한 媒液에서 每分 1°, 2°, 3°, 4° 및 8°C로 -60°C까지 冷却했을 때 胚의 萎縮率은 냉각속도가 빠를수록 적고 늦을수록 많았다. 이같은 현상은 冷却速度가 빠른 경우는 늦은 경우보다 비교적 높은 溫度에서 媒液에 水晶이 형성되어 胚細胞膜의 透過性에 障害를 초래하여 凍害防止物質의 胚細胞內 透過가 困難하게 되어 脫水가 제대로 이루어 지지 못함때 起因한 것으로 생각된다. 따라서 受精卵 凍結時는 -25~-30°C까지 冷却速度를 每分 1°C이하로 하여 脫水가 잘되게 하는 한편 胚를 最大한으로 萎縮케 하므로 溶해후 높은 生存率이 얻어질 것이다.

胚의 萎縮은 冷却過程 외에도 室溫에서도 誘引이

가능하다. Fig. 5와 같이 1.36M glycerol이나 1.36 M glycerol-0.25M sucrose를 함유한 媒液에 후기 桑實胚를 2분이상 室温에서 露出하면 胚는 萎縮한

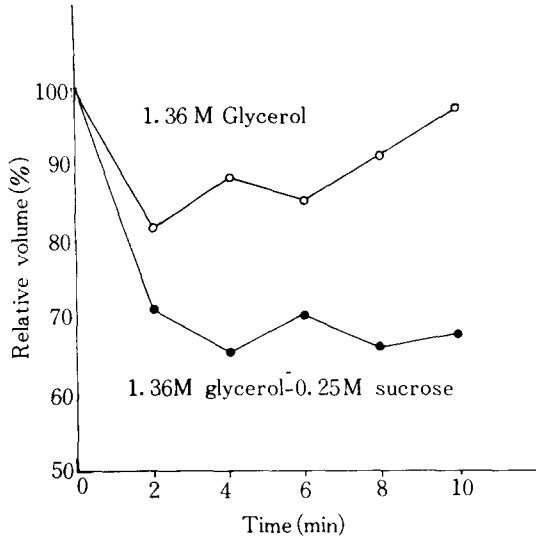


Fig. 5. Changes in volume of two late morulae, relative to their isotonic volume, when suspended in each of the indicated solutions at room temperature

다. 이때 1.36M glycerol 媒液에 露出한 胚는 2분 이후부터 다시 용적을 회복하여 10분후 처음의 容積으로 돌아가나 1.36M glycerol-0.25M sucrose 媒液에 노출한 胚는 4분 이후 줄곧 萎縮한 상태를 維持한다. 이와 같이 室温에서 위축된 卵子는 冷却速度에서 언급한 바와 같이 室温에서 바로 $-28 \sim -30^{\circ}\text{C}$ 의 低温에 침지가 가능하며 또한 受精卵의 凍結過程중 필수조작인 植水을 생략할 수 있으며 $-28 \sim -30^{\circ}\text{C}$ 에서 바로 LN에 침지하는 2段階 凍結이 可能하게 된다.

IX. 受精卵의 스트로내 분注

Averill 등(1959)은 緬羊胚를 -79°C 까지 凍結하는 시험에서 凍結 容器로 두꺼가 두꺼운 유리용기를 사용하였는데 凍結融解후 生存胚를 얻지 못하였다. 이로부터 10年후 Whittingham 등(1969)은 생쥐 2細胞胚를 5°C 에 저장하는 실험에서 保存容器로 유리배양시험관을 사용하였다. 哺乳動物의 胚를 -79°C 에

凍結하여 最初로 生存胚를 얻은 Whittingham(1971)은 생쥐의 胚를 유리 시험관내에서 凍結하였다. 다시 Whittingham 등(1972)은 생쥐의 胚를 -196° 와 -269°C 에 凍結하여 凍結胚로는 最初로 新生仔를 分娩케 하였는데 이때에도 胚를 유리시험관내에서 凍結하였다. 소에서도 凍結胚에 의하여 송아지가 분만되었는데 (Wilmot 등, 1973) 0.2ml PBS에 부유한 胚를 유리시험관(50×6mm)내에서 동결용해하였다. 토끼의 8細胞胚를 -196°C 에 凍結하여 體外培養에서 50%가 胚盤胞로 發達하고 移植하여 胎兒로 發達한것을 確認한 Bank 등(1973)은 토끼의 8細胞胚를 유리시험관(10×75mm)내에서 凍結하였다. 胚의 시험관내 동결은 試驗을 目的으로 凍結融解할 경우는 便利하나 胚의 一律인 凍結과 融解, 凍結한 胚의 長期保存 및 輸送 그리고 供卵畜에로의 移植을 위한 실용화 방안으로는 凍結精子和 마찬가지로 胚를 스트로내에서 동결하는 것이 바람직하다. 胚의 첫 스트로내에서의 동결의 施圖로 Utsumi와 Yuhana(1975)는 흰쥐의 胚를 스트로내에서 凍結 融解하였다. 이어서 内海 등(1976)은 흰쥐의 胚를, 角田(1976)와 内海 등(1976)은 토끼의 8~16細胞胚를 스트로내에서 凍結하였다. 또한 Tsunoda 등(1977b)은 토끼의 2, 8~16 및 後期桑實胚를 1ml 스트로(4×125mm; Fujihara Co., Japan)에서 凍結融解하여 2細胞胚에서 新生仔를 얻었다. 1975年을 始發點으로 胚의 凍結保存容器는 유리관에서 스트로로 轉換되었으며 이후 스트로의 굵기, 容量 및 分注方法에 관한 研究를 하기에 이르렀다. Grave 등(1979), Greve(1980), Curtis 등(1981) 및 Tervit(1981)등은 受精卵의 凍結容器로 0.25ml 스트로를 사용하였다. Landa(1981)은 토끼의 8細胞胚와 桑實胚를 1ml 스트로를 반 자른 0.5ml 스트로(60mm)에서 凍結하였다. 그후 Landa(1982a)는 토끼의 受精卵을 0.25ml 스트로에서 凍結하였다. 또한 Nguyen 등(1983)은 토끼의 2細胞胚를 0.20ml 스트로에서 凍結하였다. 이상과 같이 凍結容器는 硝子試驗管에서 스트로로 바뀌었으며 스트로의 크기는 1ml에서 0.2ml로 줄어들면서 가늘어졌다.

스트로내 卵子의 分注方法도 동결과 용해방법에 따라 그 方法을 달리하고 있다. Renard 등(1984b)은 토끼의 2細胞胚를 Fig. 6과 같이 스트로에 分注하여 2段階로 凍結하였다. B와 A液은 融解후

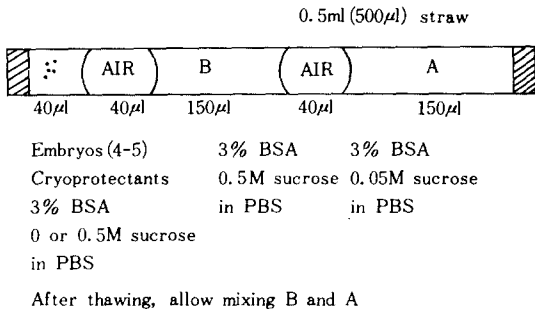


Fig. 6. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos in straw after partial dehydration at room temperature

胚의 脱글리세롤과 復水를 목적으로 分注한 浮遊液으로 空氣에 의하여 차단되고 있으며, 胚는 左側端에 凍害防止劑를 含有한 培養液에 浮遊되고 있다. 融解後 스트로를 體溫計의 水銀을 下降시키는 方法으로 흔들어 胚를 B液을 거쳐 A液으로 移動시킨다.

X. 融解後 凍害防止劑의 除去

融解한 胚는 고농도의 동해방지제에 노출이 되며 이 상태에서 오래 지속되면 胚는 滲透壓 충격을 받아 生存性이 저해된다. 融解後 胚내 동해방지제를 제거하기 위한 방법으로 ① 融解한 胚를 凍害防止劑의 농도가 점차적으로 낮은 培養液에 3~5段階로 옮기거나 ② 0.5~1.0M의 sucrose를 함유한 滲透壓이 높은 培養液에 노출한후 sucrose와 凍害防止劑를 함유하지 않는 배양액에 옮기는 것이다. 이 두 방법에 의한 融解後 시간경과에 따른 소 胚의 相對容積은 Fig. 7 과 같다. ① 방법에서는 동해방지제의 함량이 낮은 培養液에 옮길때 마다 胚에서 glycerol이 나오면서 수분이 들어감에 따라 용적이 증가하였다가 胚内外의 평형이 유지되어 容積이 점차적으로 줄어든다. ② 방법에서는 融解된 배가 sucrose를 함유한 培養液에 노출되면 胚주위의 높은 滲透壓과 sucrose의 非透過性으로 胚로부터 glycerol과 水分이 누출되어 胚는 급격히 容積이 줄어들며 10분후 sucrose와 glycerol을 함유하지 않은 培養液에 옮김으로 胚내로 水分이 들어가 胚의 容積은 원상태로 회복된다. 이상은 소 胚에서 관찰한 현상이나 토끼 胚의 경우도 정도의 차는 있으나 같을

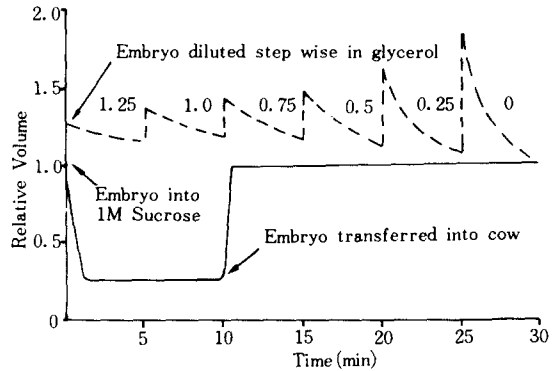


Fig. 7. Calculated volumes of bovine blastocysts diluted by the two methods shown after thawing (Schneider & Mazur, 1984).

것으로 생각된다.

XI. 토끼 凍結胚의 移植成績

토끼 뿐만 아니라 모든 家畜胚의 凍結의 궁극적 목적은 동결융해한 胚를 移植하여 新生仔를 생산하는 것이다. 凍結한 胚를 移植하여 多數의 新生仔를 생산하기 위하여는 凍結融解한 胚의 生存性이 높아야 하며 移植한 胚의 妊娠率이 높아야 한다. Bank 등(1974)은 토끼의 着床前段階의 胚를 凍結하는 경우 동결속도, 융해속도, 융해과정, DMSO의 농도 및 胚의 發育단계가 적절하면 凍結胚의 65%가 體外培養에서 胚盤胞까지 發育하며 이들 胚를 受卵兔에 이식하여 着床이 가능하였다고 보고하였다. Whittingham 등(1974)은 동결융해한 토끼의 8細胞胚 22個를 受卵兔의 卵管에 이식하여 4마리의 新生仔(17%)를 생산하였으나 48시간 배양하여 子宮에 이식한 34個의 胚에서는 新生仔가 태어나지 못하였다. Maurer 등(1976)은 凍結融解한 토끼의 桑實胚는 體外培養에서 83%가 胚盤胞로 發育하였으며 移植하였을 때 26%가 發育에 장애가 없이 生存 胎兒로 發育하였다고 보고하였다. 角田等(1976)은 토끼의 16細胞胚를 凍結融解하여 體外배양액에 토끼혈청을 첨가하지 않은 구는 36%가 胚盤胞로 발육하였는데 토끼혈청을 첨가한 구는 70% 이상이 胚盤胞로 발육하였다고 하였다. Tsunoda (1977)는 토끼의 胚를 凍結融解하여 이식했을 때 新生仔로 태어나는 비율

은 2細胞胚 13%, 8~16세포배 37%, 桑實胚가 64%로 胚의 발육단계에 따라 差異가 있다고 보고하였다. 角田等(1978)은 토끼의 8~16細胞胚를 동결하여 49~64일과 360~463일 보존후 융해하여 이식했을 때 新生仔로 태어나는 比率은 18.5%와 17.9%였다고 보고하였다. 한편 Yuhara 등(1978)은 토끼의 桑實胚를 동결융해하여 이식했을 때 新生仔로 태어나는 비율은 日本白色種에서는 40%였는데 다른 種에서는 이보다 낮았다고 보고하였다. 角田(1979)등은 토끼의 受精卵을 동결융해하여 이식했을 때 임신율과 産子生産率은 桑實胚가 88.3과 33.3%, 8~16細胞胚 75와 21.9% 및 2細胞胚 40과 15.4%로 역시 桑實胚가 높은 경향을 보여 주었다고 보고하였다. Landa(1981)는 -196°C 에 2~200일간 보존한 토끼 8細胞胚와 桑實胚를 융해하였을 때 生存率은 in vitro에서 62.5와 81.4%였으며, 着床率은 桑實胚와 胚盤胞를 卵管에 移植한 것이 31.3%와 42.9%이고 胚盤胞를 子宮角에 이식한 것은 47.6%였다. Landa(1982a)는 -20°C 까지 緩慢凍結하여 -196°C 에 浸漬한 토끼의 桑實胚를 $650^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 융해했을 때 in vitro에서 정상 발생율은 81.7%였고 이식후의 着床率은 凍結胚가 68.3%, 新鮮胚가 95%였으며, 융해후 체외 배양으로 桑實胚에서 胚盤胞로 발달한 것 37個를 5頭에 移植하여 21頭(56.8%)의 新生仔를 생산하였다고 보고하였다. Tsunoda 등(1982)은 동결융해한 토끼의 桑實胚를 수란토의 卵管에 이식하는 경우 排卵 同期化가 됐거나 일찍 排卵한 수란토보다는 공란토보다 늦게 排卵한 수란토에 移植하였을 때 産子生産率이 높았다고 보고하였다. Renard 등(1984)은 토끼의 2細胞胚를 非透過性 溶媒인 sucrose로 前處理하여 -30°C 에 30~240분 靜置한후 LN_2 에 침지하였을 때 융해후 배양한 胚의 生存率은 77~88%였고 産子生産率은 新鮮胚와 凍結胚가 32와 26%였다고 보고하였다.

XII. 結 論

토끼 受精卵의 凍結에 관한 研究는 소, 생쥐 및 흰쥐에 비하여 적은 편이나 이들 동물들의 凍結技術과 함께 꾸준히 발전하여 二段階 急速凍結 一段階 急速融解로도 好適한 生存率(80~90%)과 産子生産率(25~65%)을 얻기에 이르렀다.

大部分의 研究者들은 토끼胚의 浮遊液(保存液 或

은 培養液)으로 PBS(Phosphate Buffered Saline)를 사용하고 있으며 凍害防止物質로 glycerol과 DMSO가 주로 사용되어 오다가 최근 sucrose와 propandiol을 사용하면서 凍結方法이 더욱 簡便해지고 있다. PBS液에 Bovine Serum Albumin 혹은 토끼의 血清을 添加하므로써 融解후 生存性과 産子生産率이 높아지며 특히 토끼의 血清을 添加하는 경우보다 效果가 있는 것으로 報告되고 있다. 凍結한 토끼 胚의 融解速度는 凍結方法에 따라 相異 하나 37°C 물에 急速融解하는 方法이 一般化되고 있으며 凍結融解過程에 있어서 受精卵의 體積變化에 관한 研究는 토끼胚에서는 찾아볼 수 없으나 소나 생쥐胚에 관한 理論이 適用될 것으로 생각된다. 今後 토끼 切斷 및 融合胚의 凍結保存에 관한 研究는 새로운 研究分野가 될 것이다.

XIII. LITERATURE CITED

1. Anderson, G.A. and R.H. Foots. 1975. Development of rabbit embryos after storage at 10°C . J. Anim. Sci., 40(5):900-904.
2. Averill, R.L.W. and L.Z.A. Rowson. 1959. Attempts of storage of sheep ova at low temperature. J. Agric. Sci., 52:392-395.
3. Bae, I.H. and R.H. Foote. 1975. Effects of hormones on the maturation of rabbit oocytes recovered from follicles of various sizes. J. Reprod. Fert. 42:357-360.
4. Bank, H. and R.H. Maurer. 1973. Survival of frozen rabbit embryos. Cryobiology 10:508. Abst.
5. Bank, H. and R.R. Maurer. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. Expl. Cell Res. 89:188-196.
6. Bilton, R.J. and N.W. Moore. 1976. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. Aust. J. Biol. Sci. 29:125-129.
7. Boutron, P. and A. Kaufman. 1979. Stability of the amorphous state in the system water-1, 2-propanediol, Cryobiology 16:557-568.

8. Chang, M.C. 1947. Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days *Nature* 159:602.
9. Chang, M.C. 1948. Transplantation of fertilized rabbit ova: the effect on viability of age, in vitro storage period, and storage temperature, *Nature (London)* 161:978-979.
10. Curtis, J.L., R.P. Elsdon and G.E. Seidel, Jr. 1981. Nonsurgical transfer of bovine embryo. *Theriogenology* 15:124 Abstr.
11. Fedrows, M., C.L. Moore, and A.E. Dracy. 1958. Survival of rabbit ova stored at 79C. *J. Dairy Sci.*, 41:739 Abstr.
12. Greve, T. and N. Lehn-Jenson. 1979. Embryo transplantation in cattle. *Acta. Vet. Scand.* 20:135.
13. Greve, T. 1980. Bovine egg transplantation. *Nord. Vet. Med.* 32:513.
14. Hughes, M.A. and G.B. Anderson. 1982. Short-term storage of rabbit embryos at 4C *Theriogenology* 18(3):275-282.
15. Kane, M.T. and R.H. Foote. 1970. Culture of two-and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media. *Proced. Soci. Exp. Biol. Med.* 133: 921-925.
16. Kane, M.T. and R.H. Foote. 1971. Factors affecting blastocyst expansion of rabbit zygotes and young embryos in defined media. *biol. Reprod.* 444:41-47.
17. Kane, M.T. 1983. Variability in different lots of commercial bovine serum albumin affects cell multiplication and hatching of rabbit blastocysts in culture. *J. Reprod. Fert.* 69:555-558.
18. Kennelly, J.J. and R.H. Foot. 1965. Superovulatory response of pre-and post-puberal rabbits to commercially available gonadotropins. *J. Reprod. Fertil.* 9:177-188.
19. Kojima, T., T. Soma and N. Oguri. 1986. Effect of silver iodide as an ice inducer on viability of frozen-thawed rabbit morulae. *Theriogenology* 26(3):341-352.
20. Kramer, L., B.L. Dresser, C.E. Pope, R.D. Dalhausen, and R.D. Baker. 1983. The nonsurgical transfer of frozen-thawed eland embryos. *Proc. Am. Assoc. zoo Veterinarians:* 104-105.
21. Landa, V. 1981. Factors influencing the results of transfers of rabbit embryos stored at 196C. *Folia biologica (Praha)* 27:265-272.
22. Landa, V. 1982a. Rapid thawing of rabbit embryos after storage at-196C. *Folia biologica (Praha)* 28:67-73.
23. Landa, V., 1982b. Protection of non-cellular investments of rabbit morulae stored at 196C. *Folia biologica (Praha)* 28:350-358.
24. Leibo, S.P. 1983. A one-step in situ dilution method for frozen thawed bovine embryos. *Cry. Letters* 4:387-400.
25. Leibo, S.P., M.F. Dowgert, and P. Steponkus. 1984. Observation of intracellular ice formation and melting in bovine embryos cooled at various rates. *Cryobiology* 21:711.
26. Mauer, R.R., H. Onuma, and R.H. Foote. 1970. Viability of cultured and transferred rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 21:417-422.
27. Maurer, R.R., and J.K. Haseman. 1976. Freezing morula stage rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 14:256-263.
28. Mazur, P., W.F. Rall, and S.P. Leibo. 1984. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. *Cell Biophys.* 6:197-213.

29. Nguyen. B.X., J.P. Renard, and V. Garnier. 1983. Rapid freezing and thawing of 2-cell-stage rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *Cryobiology* 20:742 Abst.
30. Pope, C.E., V.Z. Pope, and L.R. Beck. 1984. Live birth following cryopreservation and transfer of baboon embryo. *Fetil, Steril.* 42:143-145.
31. Renard, J.P., Y. Heymdn and J, P. Ozil. 1981. Freezing bovine blastocysts with 1,2-propanediol as cryoprotectant. *Theriogenology* 15:113 Abst.
32. Renard, J.P., and C. Babinet. 1984a. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *J. Exp. Zool.* 230:443-448.
33. Renard, J.P., B.X. Nugyen and V. Ganier. 1984.b. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.* 71:573-580.
34. Schneider, U. and P. Mazur. 1984. Osmotic consequence of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21: 68-79.
35. Smith, H.U. 1952. Behavior of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and low temperatures. *Nature (Lond)* 170:374-375.
36. Tervit, H.R. and R.P. Elsdon. 1981. Development and viability of frozen thawed cattle embryo. *Theriogenology* 15:395.
37. Trouson, A.O., and L. Mohr. 1983. Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature (London)* 305:707-709.
38. Tsunoda, Y. and T. Sugie. 1977a. Effect of the freezing medium on the survival of rabbit eggs after deep freezing. *J. Reprod.* 50:123-124.
39. Tsunoda, Y., and T. Sugie. 1977b. Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen. *J. Reprod. Fert.* 49: 173-174.
40. 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.
41. Utsumi, K. and M. Yudhara. 1975. Survival of rat eggs after freezing and thawing. *Jap. J. Fert. Steril.* 20:102. Abstr.
42. Vincent. C., Y. Meyman, V. Ganier, Z. Smorag and J. P. Renard. 1985. In vitro survival of early stage rabbit and cow embryos directly frozen to intermediate temperature (-25. to-35C) before pulling liquid nitrogen. *Theriogenology* 23(1):234-235.
43. Whittingham, D.G. and R.G. Wales. 1969. storage of two-cell mouse embryos in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22:1065-1068.
44. Whittingom, D.G., 1971. Suruival of mouse after freezing and thawing. *Nature (Lond)* 233:125-126.
45. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to-196C and -269C. *Science* 178: 411-414.
46. Whittingham, D.G. and C.E. Adams. 1974. Low temperature preservation of rabbit embryos. *Cryobtology* 11:560.
47. Whittingham, D.G. 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.* 43:575-578.
48. Whittingham, D.G. and C.E. Adams. 1976. Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 47:269-274.
49. Willadsen, S.M., C. Polge, L.E.A. Rowson and R.M. Moor. 1974. Preservation of

- sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology* 11:560.
50. Wilmut, I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprprotective agent, and stage of development on survival of embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* 11:1071-1079.
51. Wilmut, I. and L.E.A. Rowson. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.
52. Yamamoto, Y., N. Oguri, Y. Tsutsumi, and Y. Hashinohe 1982. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32:399-403.
53. Yuhara, M., K. Nishimura, and K. Utsumi, 1978. Viability of frozen rabbit embryos with reference to egg stage and rabbit strain. *Cryobiology* 15(6):689-690 Abst.
54. 角田幸生, 杉江 信. 1976. 家兎受精卵の凍結保存後の生存性におよぼす保存液の影響.
55. 角田幸生. 1976. 受精卵の凍結保存に関する研究 1. 家兎卵の凍結保存後の生存性に及ぼすDM SO の添加並びに希釈温度の影響. *日本畜試報*: 68.
56. 角田幸生, 相馬 正, 杉江 信. 1978. 家兎受精卵の長期保存. *日本家畜繁殖誌* 24(4): 157-160.
57. 角田幸生, 下洞義之, 和泉邦昭, 相馬 正, 杉江 信. 1979. 家兎卵子の凍結保存, 発育ステージ別にみた凍結融解後の生存性. *日本家畜繁殖誌* 25(4): 189-193.
58. 内海恭三, 湯原正高. 1976. 家兎胚の凍結保存に関する研究. *卵子談話会* 17: 20-21.
59. 内海恭三, 沖増英治, 源原正高. 1976. ラット受精卵の凍結保存に関する研究, とくに凍結過程における氷晶形成と生存性について. *岡山大学農学部 学術報告* 第47号: 59-66.