

凍結速度와 浸漬溫度가 Hamster 受精卵의 生存性에 미치는 影響

尹道重 · 李揆丞 · 朴昌植 · 徐吉雄

忠南大學校 農科大學

Effects of Cooling Rates and Plunging Temperatures on Survival of Hamster Embryos

Yoon, D.J., K.S. Lee, C.S. Park, and K.W. Seo

College of Agriculture, Chungnam National University

Summary

This experiment was carried out to investigate the optimal cooling rate and the plunging temperature into liquid nitrogen of the 8-cell hamster embryos. The female hamsters were induced to superovulate by intraperitoneal injections of 30 i.u. PMSG. Embryos were flushed from oviduct and uterine horn. Embryos were frozen and incubated with a modified Dulbecco's phosphate buffered saline, and equilibrated with 1.5M-dimethyl sulfoxide by a 3-step procedure. The cooling rate of samples was 1°C/min from room temperature to -5°C and the samples were seeded at -5°C. The plunging temperatures into liquid nitrogen were -20, -25, -30, -35, -40, -45, -50 and -55°C at 0.3°C/min, 0.5°C/min and 1°C/min cooling rates, respectively.

This mean numbers of ovulation points and recovered embryos were 59.4 and 48.4 appearing 81.6% recovery rate. The percentage of 8-cell embryos in recovered embryos was 68.2.

The survival rates of embryos plunged at -45°C were 73.5% at 0.3°C/min, 44.8% at 0.5°C/min and 30.3% at 1°C/min cooling rates, respectively. The survival rates at 0.3°C/min were significantly high.

Under the condition of 0.3°C/min cooling rate, the survival rates of embryos according to the plunging temperature were 70.0% and 73.5% at -40 and -45°C, and those were higher than other plunging temperatures. Under the condition of 0.5°C/min and 1°C/min cooling rates, the survival rates according to the plunging temperatures were lower than the cooling rate of 0.3°C/min, showing the similar tendency at all the plunging temperatures.

In conclusion, 8-cell hamster embryos showed the best survival rates at 0.3°C/min cooling rate and -45°C plunging temperature.

I. 緒 論

家畜에 대한 增殖 및 改良의 効率性을 提高시키기 위한 手段으로서 受精卵 移植技術이 家畜繁殖分野의 最尖端 技術로 擡頭되고 있다. 그러나 受精卵의 移植에는 供卵畜과 受卵畜의 發情을 同期化 시켜야 하고, 때에 따라서는 受精卵를 長距離로 輸送하여야 하는 등 解決하여야 할 많은 問題點을 內包

하고 있는데, 이와같은 諸般問題는 受精卵의 凍結保存方法을 確立하므로서 쉽게 解決할 수 있다. 따라서, 受精卵의 凍結保存에 관한 研究가 매우 활발하게 進行되고 있는 實情이다.

受精卵의 凍結保存은 Mazur(1963)에 의하여 細胞의 凍結時 細胞에 미치는 凍害의 概念이 밝혀지면서 본격적으로 研究되기 시작하였다. 그러나, 受精卵의 凍結保存에는 培養液의 條件, 冷却 및 融解

速度, 그리고 抗凍害劑의 種類와 이의 添加 및 除去方法 등 여러가지 要因이 크게 影響을 미치는 것으로 알려져 있는데, Bank(1974)는 이들 要因중 冷却 및 融解速度가 가장 重要하다고 報告하였다.

Whittingham 등(1972)과 Wilmot(1972)는 0.2~1.9 °C/min의 凍結速度와 215~450°C/min의 急速融解에서는 小數만이 生存하였다고 報告하였고, 最適生存을 爲하여는 0.2~0.8°C/min의 緩速凍結과 4~25°C/min의 緩速融解가 必須的이라고 하였다. Whittingham(1975)은 흰쥐의 8細胞期胚를 0.6~1°C/min으로 -80°C까지 冷却後 液體窒素에 沈漬한 다음 5°C/min으로 緩速融解하였을 때 68~73%의 높은 生存率을 보였고, 450°C/min의 急速融解時에는 모두 死滅하였다고 報告하였다. 또한, Willadsen 등(1977)은 羊의 受精卵를 利用한 實驗에서 0.3°C/min의 冷却速度와 12°C/min의 融解速度에서 가장 좋은 結果를 얻었다고 하였고, Wilmot와 Rowson(1973)도 同一한 方法으로 85.7%의 높은 生存率을 얻었다고 報告하였다. Parkening 등(1977)은 생쥐의 受精卵로 實驗한 結果 植氷溫度부터 -75°C까지 同一한 速度로 冷却한 것보다 -45°C 또는 -55°C까지는 0.33°C/min의 速度로 冷却하고, 그로부터 -75°C까지 1°C/min의 速度로 冷却하였을 때 훨씬 좋은 結果를 나타냈다고 하여 -45°C~75°C 사이의 溫度域이 受精卵의 生存性에 重要하게 作用한다고 報告하였다. 이와같은 많은 研究에서 緩速冷却을 하였을 때 急速融解로는 좋은 生存率을 얻을 수 없다고 報告하고 있는데 이들 結果와는 다르게 急速融解로도 좋은 結果를 얻었다고 報告한 例도 많다. 즉, Wilmot 등(1973)은 소의 受精卵를 0.2°C/min의 速度로 凍結하여 350°C/min의 速度로 急速融解하였을 때에도 生存함을 보였고, 또한 생쥐胚를 120°C/min의 速度로 融解한 다음 24時間 培養한 結果 85.7%의 生存率을 얻었다고 報告하였으며, 宮本과 石橋(1976)는 생쥐胚를 0.33°C/min의 速度로 冷却시켜 -10~-79°C 사이의 溫度에서 液體窒素에 沈漬하여 保存한 다음 500°C/min의 速度로 融解하였을 때 -50°C~-79°C 사이의 沈漬溫度에서 有意差 없이 44~47%의 生存率을 얻었다고 報告하였다.

Bilton(1980)은 소의 胚를 緩速으로 凍結하여 -30°C와 -48°C의 溫度에서 液體窒素에 沈漬하여 保存한 다음 12°C/min의 速度로 緩速融解하였을 때는 모두 死滅하였으나, 360°C/min의 速度로 急速融解

하였을 때는 각각 50% 및 72.7%의 生存率을 나타냈다고 하였으며, Whittingham 등(1979)도 緩速冷却한 8細胞期의 생쥐 胚를 -35°C, -40°C에서 液體窒素에 沈漬한 後 275°C~500°C/min의 速度로 急速融解하였을 때 각각 72% 및 88%의 生存率을 얻었다고 報告하였다. 또한, Maria Czlonkowska 등(1985)은 馬胚를 緩速(0.3°C/min)으로 -35°C와 -40°C까지 얼린 後 液體窒素에 沈漬하였다가 360°C/min의 速度로 急速融解하였을 때 -35°C에서 沈漬한 受精卵이 약간 좋은 生存率을 나타냈다고 보고하였다. Kassi 등(1981)도 0.33°C/min의 緩速冷却과 360°C/min의 急速融解로 높은 生存率을 얻었다고 하였으며, Farrand 등(1985)도 소의 胚를 0.3°C/min의 緩速으로 -19~-57°C까지 冷却後 液體窒素에 沈漬한 다음 25°C의 水槽에서 急速融解하였을 때 -33°C, -38°C, -43°C의 沈漬溫度에서 別 差 없이 높은 生存率을 얻었다고 報告하였다.

위에서 보는 바와같이, 受精卵의 凍結保存에 관한 研究는 매우 多樣하게 遂行되어 왔으나 아직까지 明確한 凍結方法이 確立되었다고는 볼 수 없다. 따라서, 凍結保存된 受精卵의 生存率을 높이고, 지금까지 알려진 凍結方法들보다 간편하고 빠르게 凍結保存하는 方法을 찾아내는 研究가 절실하게 必要한 實情이다. 이에 著者는 hamster 胚의 凍結保存時 生存率을 높일 수 있는 가장 適한 冷却速度와 液體窒素에 沈漬하는 溫度를 究明하기 위하여 本 實驗을 遂行하였는 바 그 結果를 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗動物 및 飼育方法

實驗動物은 忠南大學校 農科大學 家畜繁殖學 教室에서 保有하고 있는 120~150日齡(體重: 80~120g)의 未經産 golden hamster를 使用하였다. 飼養管理는 N. R. C. 飼養標準에 맞추어 配合된 Pellet 飼料를 自由給餌시켰으며, 물은 地下水를 自由給水시켰다. 飼育室의 條件은 溫度 19~22°C, 濕度 50~55%, 日照時間 14時間으로 調整하였다.

2. 過排卵의 誘起

過排卵을 誘起하기 위하여 午前 10時에 陰垢를 檢査하여 發情後期인 個體를 골라 午後 6時에 30 IU의 PMSG(Folligon, Intervet Co., Holland)를 腹

腔內에 注射하고 72時間後에 雌雄을 1:2로 合畵시킨 後, 翌日 午前 8時에 腔에서 精子가 發見된 個體만을 交尾된 것으로 看做하였고, 그 외의 것은 本實驗에서 除外시켰다.

3. 受精卵의 回收

受精卵의 回收는 交尾確認 84時間 後에 屠殺하여 子宮角과 卵管을 分離切斷한 後 各各을 別個의 watch glass에 灌流하여 實施하였다. 이에 使用한 灌流液은 m-PBS (Whittingham, 1974)였으며 使用直前에 0.2 μ m의 millipore filter로 濾過하여 細菌과 異物을 除去하였다. 回收된 受精卵은 m-PBS로 3回 洗滌한 다음 位相差顯微鏡으로 8細胞期의 正常受精卵만을 選別하여 冷凍保存에 供用하였다.

4. 受精卵의 凍結保存

保存液으로는 위에 記述한 m-PBS를 使用 하였으며, 抗凍害劑로서 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 0.5M, 1.0M 및 1.5M 添加한 液內에서 단계별로 10分, 10分 및 30分間씩 受精卵을 培養한 다음 0.5 ml의 plastic straw에 옮겨 straw powder로 封하였다.

受精卵이 封入된 straw는 곧 바로 自動細胞凍結機 (R-204 Cell Freezer, Planer Products, England)에 옮겨 凍結을 實施하였는데 凍結過程은 -5°C 까지 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 下降시킨후 植氷하여 5分間 靜置한 다음 冷却速度別로 液體窒素에 浸漬하는 各溫度까지 冷却하여 沈漬하였다. 이때 冷却速度는 0.3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 그리고 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 3處理이며, 浸漬溫度는 -20°C 에서 -55°C 까지 5 $^{\circ}\text{C}$ 간격으로 8個의 處理水準을 두었다. 液體窒素에 沈漬된 受精卵은 融解時까지 10日間 保存되었다.

5. 受精卵의 融解 및 抗凍害劑의 除去

受精卵의 融解는 25 $^{\circ}\text{C}$ 의 水槽에서 straw를 조심스럽게 저어서 얼음 結晶이 사라질때까지 實施하였으며 所要時間은 40秒 程度였다. 融解된 受精卵은 곧바로 DMSO를 除去하기 위하여 1.5M濃度の DMSO를 含有한 m-PBS에서 10分, 1.25M에서 10分, 1.0M에서 10分, 0.5M에서 10分, 0.25M에서 10分, 그리고 DMSO가 含有되지 않은 新鮮한 m-PBS溶液에서 30分間 培養하였다. DMSO 除去直後 受精卵을 觀察하여 形態의 正常性을 調査하였다.

6. 受精卵의 生存性 檢査

受精卵의 生存性 檢査는 抗凍害劑의 除去過程을 거친 受精卵中에서 正常的인 受精卵만을 選別하여 培養한 다음 受精卵의 發育與否를 判別하여 生存率을 算出하였다.

培養方法은 滅菌된 組織培養用 plastic petridish에 8ml의 液體 paraffin을 따르고 50 μ l의 m-PBS 小滴溶液을 petridish低面에 附着시킨 다음 小滴當 3~5個의 受精卵을 넣어 바로 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 CO₂培養機 (5% CO₂, 95% air)에 옮겨 實施하였다.

生存與否의 判別은 48時間 培養後 受精卵을 實體顯微鏡下에 옮겨 桑實胚 또는 初期胚盤胞로의 發達與否로 判別하였다.

III. 結果 및 考察

1. 卵巢의 反應

30IU의 PMSG를 33頭의 hamster에 注射하였을 때 나타난 卵巢의 反應은 Table 1에 表示된 바와 같이 左右卵巢로부터 觀測된 排卵點은 1960個로 마리당 59.4個였으며 回收된 受精卵은 總 1,599個로 마리당 48.4個가 回收되어 81.6%의 回收率을 보였다. 回收된 卵子의 細胞期別 分布는 未受精卵 20.3%, 4細胞期 2.2%, 8細胞期 62.8%, 16細胞期 以上에서 9.3%를 나타냈다.

回收된 受精卵의 分布는 Table 2에 表記한 바와 같이 81.8%가 子宮에서, 18.2%가 卵管에서 回收됨으로써 상당수의 受精卵이 卵管內에 存在함을 보였다. Table 3와 Table 4에 나타난 바와 같이 細胞期別 分布에서 卵管 및 子宮의 左右間 差異는 없었고, 未受精卵은 子宮에서보다 卵管에서의 比率이 높았으나 (43.3% > 15.1%), 16細胞期 以上에서는 子宮쪽이 높게 나타났다 (11.1% > 1%).

이와같은 結果는 Dukelow와 Mizoguchi (1981)가 hamster에 25IU의 PMSG를 注射하였을때 平均排卵數가 57.8個였다는 報告內容보다 낮은 成績이었으며, Greenwald (1976)가 30IU의 PMSG를 hamster에 注射하여 45.5個의 卵子를 妊娠 3日째에, 54.8個의 卵子를 妊娠 2日째에 얻었다는 報告內容과 대체로 一致하는 傾向을 보였다.

한편 本實驗의 回收率은 梁등 (1983)의 53.1%나 沈등 (1984)의 72%보다 높은 成績이었다. 그러나, 外

Table 1. Cell stage and recovery rate of recovered embryos from 33 heads of superovulated hamster

Item	Ovulation point			Cell stage of recovered embryos					Recovery rate (%)
	Left	Right	Total	Unfert. ova (%)	4 Cell (%)	8 Cell (%)	Beyond 16 Cell (%)	Total (%)	
Total	976	984	1960	324 (20.3)	35 (2.2)	1091 (68.2)	148 (9.3)	1599 (100)	81.6
Mean	29.6	29.8	59.4	9.8	1.1	33.1	4.5	48.5	81.6

Table 2. Distribution of recovered embryos

Item	Oviduct (%)	Uterine horn (%)	Total (%)
Total	291 (18.2)	1308 (81.8)	1599 (100)
Mean	8.8	39.7	48.5

因性 호르몬을 投與하였을 때 卵巢의 反應은 호르몬의 種類 및 量과 實驗動物의 種類에 따라 많은 差異가 있는 것이고, 同種의 實驗動物에서도 個體差異와 飼育條件 및 實驗條件에 따라 많은 影響을 받는 것이기 때문에 排卵數와 回收率을 明確히 比較

하기는 어려운 點이 많을 것으로 思料된다.

2. 冷却速度에 따른 生存率

8細胞期의 hamster 受精卵을 각각 0.3°C/min, 0.5°C/min 및 1°C/min의 速度로 植水溫度부터 -45°C까지 冷却한 다음 浸體窒素에 浸漬하였을 때, 生存率은 Table 5에서 보는 바와 같이 0.3°C/min의 冷却速度에서 73.5%로 가장 높은 生存率을 나타냈고 1°C/min의 冷却速度에서는 30%의 生存率을 나타냈을 뿐이다. 한편, 각 浸漬溫度까지의 凍結速度間 生存率의 比較는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 浸

Table 3. Cell stage of collected embryos from oviduct

Item		Unfert. ova (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	Beyond 16-cell (%)	Total (%)
Right	Total	66 (44.7)	7 (4.6)	76 (50.0)	1 (0.7)	152 (100)
	mean	2.1	2.3	2.3	0	4.6
Left	Total	58 (41.7)	3 (2.2)	76 (54.7)	2 (1.4)	139 (100)
	mean	1.8	0.1	2.3	0.1	4.2
Right + Left	Total	126 (43.3)	10 (3.4)	152 (52.2)	3 (1.0)	291 (100)
	mean	3.8	0.3	4.6	0.1	8.8

Table 4. Cell stage of collected embryos from uterus horn

Item		Unfert. ova (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	Beyond 16-cell (%)	Total (%)
Right	Total	105 (16.0)	11 (1.7)	464 (70.7)	76 (11.6)	656 (100)
	mean	3.2	0.3	14.0	2.3	19.9
Left	Total	94 (14.4)	14 (2.1)	475 (72.9)	69 (10.6)	652 (100)
	mean	2.8	0.4	14.4	2.1	19.8
Right + Left	Total	199 (15.1)	25 (1.9)	939 (71.8)	145 (11.1)	1308 (100)
	mean	6	0.7	28.4	4.4	39.7

Table 5. Effect of cooling rate on survival of hamster embryos plunged at -45°C

Cooling rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	No. of embryos frozen.	No. of embryos after removal of DMSO (%)		No. of embryos after incubation		Survival rate (%)
		Recovered	Normal	Incubated	Developed	
0.3	40	38 (95.0)	36 (94.7) ^a	34	25	73.5 ^a
0.5	38	34 (89.5)	30 (88.2) ^b	29	13	44.8 ^b
1	49	40 (81.6)	21 (52.5) ^c	20	6	30.0 ^c

a, b, c. Values within columns that do not have a common superscript differ ($P < .01$)

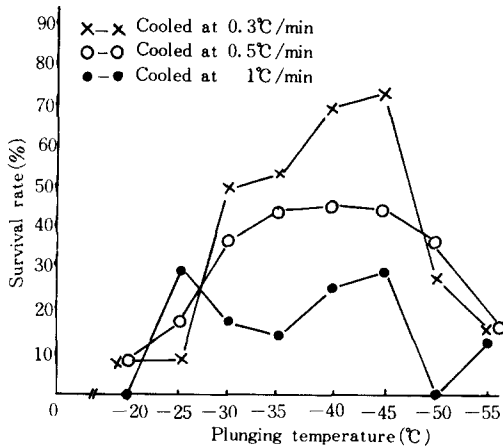


Fig. 1. Percentages of embryos developed to morula or early blastocyst.

漬溫度에 따라서 部分的인 差異는 있지만 大部分의 浸漬溫度에서 0.3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 凍結速度가 가장 좋은 生存率을 나타냈고, 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 凍結速度에서 가장 낮은 生存率을 보였다.

이와 같은 結果는 Whittingham 등(1972)이 생쥐 胚의 最適生存을 爲한 凍結速度는 0.3~0.4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 라고 報告한 內容과 같은 傾向을 보였고, Wilmut (1972)가 생쥐의 8細胞期 受精卵 및 胚盤胞를 凍結保存하였을 때 1.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 凍結速度보다 0.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 凍結速度에서 65%의 더 높은 生存率을 얻었다는 報告와도 一致하였다. 그리고, Whittingham 등(1972)과 Leibo 등(1974)이 생쥐 胚의 生存을 위해서 0.2~0.8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 冷却速度가 必須的이고 -7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以의 冷却速度에서는 生存할 수 없다는 報告와도 部分的으로 一致하였다. 이것은 Whittingham (1975)이 흰쥐 胚를 0.3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 凍結하였을 때 65%의 生存率을 나타냈으나 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以의 速度로 凍結하였을 때는 모두 死滅하였다는 報告 및 Fisher 등(1977)의 생쥐 胚를 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 凍結하

였을 때는 73%의 生存率을 얻었으나 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 凍結速度에서는 62%, 그리고 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 凍結速度에서는 모두 死滅하였다는 報告와도 一致하는 것이었다. 또한, 宮本 등(1978)이 생쥐 胚를 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 과 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 凍結하였을 때 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度에서 더 좋은 生存率을 얻었다는 報告와 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 8細胞期 생쥐 胚를 凍結하였을 때 높은 生存率을 얻었다는 Rall(1980)의 報告에도 一致하였다. 한편, 소의 胚를 凍結하는데 0.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 凍結速度가 適合하다는 Wilmut(1973)의 報告內容과 hamster 卵子를 0.24 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 凍結하여 80.5%의 높은 生存率을 얻었다고 報告한 DeMayo 등(1985)의 結果와도 거의 類似하였다. 이와같이 생쥐 胚를 0.3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 凍結하여 높은 生存率을 얻었다는 報告와 本實驗의 結果를 볼 때 受精卵의 凍結保存에는 0.3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 凍結速度에서 높은 生存率을 얻을 수 있다는 것을 立證하였다.

3. 浸漬溫度에 따른 生存率

8細胞期の hamster 受精卵을 植水溫度인 -5°C 부터 0.3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 各 浸漬溫度(-20°C 부터 -55°C 까지 5 $^{\circ}\text{C}$ 間隔)까지 凍結하였을 때 浸漬溫度에 따른 受精卵의 生存率은 Table 6에서 보는 바와 같이 -40°C 와 -45°C 에서 液體窒素에 浸漬하였을 때가 각각 70.0%와 73.5%로 높은 生存率을 보였고, 이 溫度域에 未達하거나 超過하였을 때는 生存率이 낮았다. 한편, 冷却速度를 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 하였을 때는 Table 7에 나타난 바와 같이 -35°C , -40°C 및 -45°C 의 浸漬溫度에서 각각 44.8%, 46.7% 및 44.8%를 나타내어 다른 浸漬溫度 보다는 높은 生存率을 보였다. 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 凍結溫度에서는 Table 8에서 보는 바와 같이 -25°C 와 -45°C 의 浸漬溫度에서 30%의 生存率을 보였고 -40°C 에서 26.7%를 나타냈으나 全般的으로 매우 낮은 生存率

Table 6. Effect of plunging temperature on survival of hamster embryos cooled at 0.3°C/min cooling rate

Plunging temp. °C	No. of embryo frozen	No. of embryos after removal of DMSO (%)		No. of embryos after incubation.		Survival rate (%)
		Recovered	Normal	Incubated	Developed	
-20	24	21 (87.5)	13 (61.9) ^{ab}	13	1	7.7 ^a
-25	24	18 (75.0)	12 (66.7) ^b	12	1	8.3 ^a
-30	30	25 (86.7)	20 (76.3) ^{bc}	20	10	50.0 ^{bc}
-35	35	35 (100.0)	28 (80.0) ^c	28	15	53.6 ^{bc}
-40	48	46 (95.8)	41 (89.1) ^{cd}	40	28	70.0 ^c
-45	40	38 (95.0)	36 (94.7) ^d	34	25	73.5 ^c
-50	30	27 (90.0)	15 (55.6) ^a	14	4	28.6 ^{ab}
-55	24	21 (87.5)	12 (57.1) ^a	12	2	16.7 ^a

a, b, c Values within columns that do not have a common superscript differ (P<.05).

Table 7. Effect of plunging temperature on survival of hamster embryos cooled at 0.5°C/min cooling rate

Plunging temp. °C	No. of embryos frozen	No. of embryos after removal of DMSO (%)		No. of embryos after Incubation.		Survival rate (%)
		Recovered	Normal	Incubated	Developed	
-20	22	19 (86.4)	13 (68.4) ^{ab}	13	1	7.7 ^a
-25	30	26 (84.6)	22 (84.6) ^{cd}	22	6	27.3 ^{bc}
-30	39	35 (89.7)	27 (77.1) ^{bc}	27	10	37.0 ^{cd}
-35	40	32 (80.0)	30 (93.8) ^d	29	13	44.8 ^d
-40	40	34 (85.0)	30 (88.2) ^{cd}	30	14	46.7 ^d
-45	38	34 (89.5)	30 (88.2) ^{cd}	29	13	44.8 ^d
-50	24	18 (75.0)	13 (72.2) ^{ab}	13	5	38.5 ^{cd}
-55	20	19 (95.0)	12 (63.2) ^a	12	2	16.7 ^{ab}

a, b, c, d Values within columns that do not have a common superscript differ (P<.05).

Table 8. Effect of plunging temperature on survival of hamster embryos cooled at 1°C/min cooling rate

Plunging temp. °C	No. of embryos frozen	No. of embryos after removal of DMSO (%)		No. of embryos after incubation.		Survival rate (%)
		Recovered	Normal	Incubated	Developed	
-20	30	24 (80.0)	3 (12.5) ^a	3	—	0 ^a
-25	28	25 (89.3)	10 (40.0) ^b	10	3	30.0 ^b
-30	44	33 (75.0)	17 (51.5) ^b	17	3	17.6 ^{ab}
-35	49	37 (75.5)	20 (54.1) ^b	20	3	15.0 ^{ab}
-40	45	39 (86.7)	16 (41.0) ^b	15	4	26.7 ^{ab}
-45	49	40 (81.6)	21 (52.5) ^b	20	6	30.0 ^b
-50	28	22 (78.6)	10 (45.5) ^b	9	—	0 ^a
-55	23	18 (76.3)	7 (38.9) ^b	7	1	14.3 ^{ab}

a, b Values within columns that do not have a common superscript differ (P<.05)

을 보였다.

이와같은 결과와 다른 研究報告들을 比較하여 보면 宮本등(1977)은 생쥐胚를 0.3°C/min의 速度로 凍結하여 -79°C 및 -120°C에서 液體窒素에 浸漬하였을 때 각각 88% 및 38%의 生存率을 얻었고, Farrant등(1977)은 羊의 胚를 0.3°C/min의 速度로 -33°C와 -36°C까지 冷却한 후 液體窒素에 浸漬하였을 때 60% 内外의 生存率을 얻었다고 하였으며, Willadsen등(1978)도 羊의 胚를 0.3°C/min의 速度로 -30°C 및 -36°C까지 冷却한 후 液體窒素에 沈漬하였을 때 가장 좋은 成績을 얻었다고 報告하였는데 이들의 結果와 대체로 類似하였다. 또한 Whittingham등(1979)은 생쥐胚를 0.3°C/min의 速度로 -30°C 및 -40°C까지 冷却한 후 液體窒素에 浸漬하였을 때 각각 71.9% 및 87.5%의 生存率을 얻었다고 報告하였고, 宮本등(1981)도 생쥐胚를 1°C/min의 速度로 凍結하여 -15°C~-75°C의 溫度에서 液體窒素에 浸漬하였을 때 -40°C와 -35°C의 浸漬溫度에서 각각 54%와 35%의 生存率을 얻었다고 報告하였으며, 石橋등(1983)은 생쥐胚를 0.5°C/min의 速度로 凍結하였을 때 -40°C에서 浸漬한 境遇에 80% 内外의 높은 生存率을 얻었다고 報告하였는데 이들의 報告內容과 거의 같은 傾向을 보였다. 그리고 Quinn등(1982)은 hamster 卵子를 0.3°C/min의 速度로 凍結하였을 때 -40°C에서 浸漬한 境遇에 75%의 生存率을 얻었으나, -80°C에서 浸漬하였을 경우에는 80%의 生存率을 얻었다고 報告하였는데, 本實驗의 結果와 많은 差異를 보이는 理由는 融解方法의 差異에서 오는 것으로 思料된다. Maria Czlonkowska등(1985)은 馬胚를 凍結保存하였을 때 -35°C의 浸漬溫度에서 -45°C의 浸漬溫度에서 보다 融解後 正常外貌를 갖춘 胚가 더 많았다고 報告하였는데 本實驗의 結果와 약간 다른 傾向이었다. 또한, 소의 受精卵의 凍結保存에 대한 研究에서 Bilton(1980)은 0.3°C/min의 凍結速度로 -30°C, -36°C, -42°C 및 -48°C까지 凍結한 후 液體窒素에 浸漬하였을 때 각각 25%, 85.9%, 40% 및 20%의 生存率을 얻었다고 報告하였고, Lehn-Jensen등(1982)은 -30°C와 -48°C의 浸漬溫度에서 가장 높은 生存率을 얻었다고 하였으며, Farrand등(1985)은 -33°C, -38°C 및 -43°C의 溫度에서 液體窒素에 浸漬한 경우에 각각 66.5%, 66.5% 및 74.8%의 生産率을 얻었다고 報告하였는데 本實驗의 結果도

이와 매우 類似한 傾向이었다. 따라서, 本實驗의 結果는, 細胞의 凍結保存時 細胞의 死活을 左右하는 要因이 細胞內 氷結晶의 生成에 있다는 Whittingham(1971)이나 Mazur등(1972)의 理論에 따라, -30°C 以上の 溫度에서 液體窒素에 浸漬할 경우에는 細胞內 水分의 不完全脫水로 因하여 細胞內 氷結晶을 生成시킴으로써 低調한 生存率을 보이게 되고 -50°C 以下の 溫度까지 緩速으로 凍結할 경우에는 細胞內 分子構造의 不安定을 招來하기 때문에 急速 冷却이 必要하다는 理論을 間接적으로 證明하였다고 본다.

IV. 摘要

本實驗은 受精卵 凍結保存에 가장 適合한 凍結速度 및 液體窒素에의 浸漬溫度를 究明하기 위하여 實施하였다.

受精卵의 採取는 hamster 頭當 30IU의 PMSG로 過排卵을 誘起한 후 卵管과 子宮을 灌流하여 實施하였다. 凍結 및 培養에 必要한 保存液으로 m-PBS를 使用하였으며, 抗凍害劑는 DMSO로서 3段階로 最後濃度가 1.5M이 되게 하였다. 凍結方法은 室溫에서 -5°C까지 1°C/min의 速度로 下降시켜 植水하고 5分間 靜置한 다음 各 浸漬溫度까지 0.3°C/min, 0.5°C/min 및 1°C/min의 速度로 凍結 후 液體窒素에 浸漬하였다. 液體窒素에의 浸漬溫度는 各 凍結速度別로 -20°C부터 -55°C까지 5°C間隔으로 設定하였다.

卵巢에서의 平均排卵點은 59.4個였고 回收된 受精卵은 48.4個로 81.6%의 回收率을 보였으며, 그 중 8細胞期의 受精卵은 33.1個로 68.2%의 分布를 나타냈다.

受精卵은 -45°C에서 液體窒素에 浸漬했을 때 冷却速度에 따른 生存率은 0.3°C/min에서 73.5%, 0.5°C/min에서 44.8% 및 1°C/min에서 30.3%로서 0.3°C/min의 速度로 冷却한 것이 有意하게 좋은 成績이었다.

受精卵을 0.3°C/min의 速度로 凍結했을 때 浸漬溫度에 따른 生存率은 -40°C와 -45°C에서 각각 70%와 73.5%를 나타내어 다른 浸漬溫度에서 보다 좋은 成績이었으며, 0.5°C/min와 1°C/min의 速度로 凍結했을 때는 全體의인 生存率은 낮았지만 變化傾向은 0.3°C/min에서와 類似하였다.

本實驗의 結果로, hamster 受精卵을 凍結保存했을 때, 0.3°C/min의 速度로 -45°C 까지 冷却한 후 液體窒素에 浸漬하여 保存하는 方法이 가장 適合한 것으로 나타났다.

V. 引用文獻

1. Bank, H. and R.P. Maurer. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Exptl. Cell Res.*, 88:188.
2. Bilton, R.J. 1980. Preservation of embryos of the large domestic species. *Proc. IX Int. Congr. Anim. Reprod. Artific. Insem. (Madrid)*, 2:245.
3. DeMayo, F.J., R.G. Rawlins and W.R. Dukelow. 1985. Xenogenous and in vitro fertilization of frozen/thawed primate oocytes and blastomere separation of embryos. *Fertility and Sterility*, 43(2):295.
4. Farrand, G.D., R.P. Elsdon, and G.E. Seidel. 1985. Effect of slow cooling and point temperatures on survival of frozen Bovine embryos. *J. of Anim. Sci.*, 61(2):460.
5. Farrant, J., H. Lee and C.A. Walter. 1977. Effects of interactions on survival of cell. In *The Freezing of Mammalian Embryos*. Elsevier, Excerpta Medica, Amsterdam, 49:67.
6. Fiser, P.S., and J.W. Macpherson. 1977. Survival of mouse embryos after freezing in medium containing dimethyl sulfoxide and yolk extract. *Dairy. Sci.*, 60:1301.
7. Greenwald, G.S. 1976. Effects of superovulation on fetal development and hormone levels in the pregnant hamster. *J. Reprod. Fert.*, 48:313.
8. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 63:175.
9. Lehn-Jensen, H. and T. Greve. 1982. The survival of cow blastocysts frozen in 1.4M glycerol after plunging between -15 and -60°C and rapid thawing. *Theriogenology*, 17:95 (Abstr).
10. Leibo, S.P., P. Mazur and S.C. Jackowski. 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Expl. cell Res.*, 89:79.
11. Maria Czlonkowska, M.S. Boyle and W.R. Allen. 1985. Deep freezing of horse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 75:485.
12. Mazur, B., S.P. Leibo and E.H. Y. Chu. 1972. A two factor hypothesis of freezing injury. *Expl. cell Res.*, 345.
13. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fert.*, 50:373.
14. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1978. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J. Reprod. Fert.*, 54:427.
15. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1981. Survival of mouse embryos after freezing and thawing in the presence of erythritol. *J. Expl. Zoology*, 216:337.
16. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. *J. Expl. Zoology*, 226:123.
17. Mizoguchi, H. and W.R. Dukelow. 1981. Fertilizability of ova from young or old hamsters after spontaneous or induced ovulation. *Fert. Steril.*, 35:79.
18. Parkening, T.A., Y. Tsunoda and M.C. Chang. 1977. Effects of various low temperature, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Expl. Zool.* 197:369.
19. Quinn, P., C. Barros and D.G. Whittingham.

1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66:161.
20. Rall, W.F., D.S. Reid and J. Farrant. 1980. Innocuous biological freezing during warming. *Nature*, Vol. 286, 31 July.
21. Whittingham, D.G. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature Lond.*, 233:125.
22. Whittingham, D.G. 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.*, 43:575.
23. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Maxur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, 178:411.
24. Whittingham, D.G., Maureen Wood, J. Farrant, H. Lee and J.A. Halsey. 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C . *J. Reprod. Fert.*, 56:11.
25. Wiliadsen, S.M. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep freezing and thawing. In: K. Elliott and J. Whelan (Ed.) *The freezing of mammalian embryos*. Ciba Foundation, symp., 52:175, Elsevier, Amsterdam.
26. Wilmot, I. 1972. Effect of cooling rate, warming rate, cryo protective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*, 11:1071.
27. Wilmot, I. and L.E.A. Rowson. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92:686.
28. 宮本元, 石橋武彦. 1976. 液體窒素(-196°C)に凍結されたマウスの8細胞卵および桑實胚の生存性に影響をおよぼす要因. *日畜會報* 47(1): 23.
29. 沈金燮, 卞奉鎬, 李存根. 1984. 過排卵處理 家兔에서 非外科的 回收와 外科的 回收의 比較. *韓國家畜繁殖研究會報* 8(1): 16.
30. 梁富根, 南相憲, 高光斗, 金正翊. 1983. 家兔의 受精卵移植에 關한 研究. I. PMSG와 H-CG 投與에 따른 卵巢反應. *韓國家畜繁殖研究會報* 7(1): 15.