

생쥐 後期桑實胚의 Vitrification에 관한 研究

康 珉 秀
濟州大學校 農科大學

Cryopreservation of Mouse Late Morulae by Vitrification

M.S. Kang
College of Agriculture, Cheju National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the survival rates of late mouse morulae frozen in the state of vitrification and then thawed after equilibrating them separately in EFS 40, GFS 40 and DFS 40 at 10°C.

The results obtained are as follows :

1. Freezing in the state of vitrification and thawing late mouse morulae after equilibrating them at 10°C in EFS 40 for 30 seconds, one minute and two minutes, we obtained survival rates of 76.7%, 96.7% and 100%, respectively.
2. Freezing and thawing them after equilibrating at 10°C in GFS 40 for 30 seconds, one minute and two minutes, we obtained survival rates of 60%, 96.7% and 10%, respectively. These results are as similar as in the case of EFS 40.
3. Freezing and thawing them after equilibrating at 10°C in DFS 40 for 30 seconds and one minute, we obtained survival rates of 62.1% and 0%, respectively. These results represent lower survival rates than those obtained with EFS 40 and GFS 40.

In conclusion, even equilibrating late mouse morulae in EFS 40 and GFS 40 at 10°C for more than one minute gives a survival rate of more than 97%, while equilibrating them in DFS 40 at 10°C for more than one minute results in a 0% survival rate, which means that DFS 40 has a strong toxicity.

序 論

優秀한 遺傳形質을 가진 雌畜으로부터 人爲的으로 다수의 卵子를 放出시켜 採卵한 다음 健康한 雌畜에 移植시켜 仔畜을 生産할 수 있게 된다면 優秀한 遺傳形質을 가진 仔畜을 한번에 多數 生産해 낼 수 있게 된다. 이와 같은 思考로부터 近來 受精卵 移植 技術이 급속히 進行되고 있다. 受精卵 移植을 위해서는 donor 와 recipient의 性周期 同期化가 필요하며 여기에는 移植하는 胚의 보존이 不可缺한

技術이 된다.

從來의 胚의 凍結保存法에는 緩慢冷却法(Whittingham 등, 1972; Wilmut, 1972)과 急速冷却法(Willadsen, 1977; Whittingham 등, 1979)이 있다. 前者는 -50°C 이하까지 緩慢하게 冷却하여 胚를 충분히 脫水하고 나서 液體窒素에 투입하기 때문에 保存液은 結氷하지만 細胞內는 氷晶이 형성되지 않는다. 한편 後者는 -20°C ~ -40°C 까지 緩慢하게 냉각하여 胚를 어느 정도 脫水시키고 나서 液體窒素에 투입하기 때문에 細胞內外에 氷晶을 형성한다는 것이 알려져 있다. 어느 방법이든 胚의 生存性은

높으나 胚에 가급적 害를 적게 주기 위해서는 본래의 氷點보다도 약간 낮은 溫度에서 氷晶形成 유기 조작(植氷)이 필요하며, 또 緩慢冷却의 과정에는 다량의 液體窒素, 制御裝置 그리고 長時間이 所要된다.

그런데 1985년에 Rall 과 Fahy에 의해 0°C 이상의 溫度에서 직접 液體窒素에 투입하여 胚의 浮遊液을 結晶化 시키지 않고 생쥐 胚를 보존하는 유리화 法이 報告되었다. 이 方法에 이용한 保存溶液 VS1에는 매우 고농도의 耐凍劑가 함유되어 있고 동결전에 胚를 충분히 脫水하여 수축시키므로서 緩慢한 냉각이 필요 없고 氷晶도 형성되지 않기 때문에 植氷조작이 필요치 않다. 그러나 VS1의 耐凍劑(DMSO, acetamide, propylene glycol 등)의 毒性이 강하기 때문에 종래의 凍結法으로 보존한 경우보다도 胚의 生存率이 낮고 耐凍劑가 胚에 대한 害를 적게 하기 위해 凍結 및 融解시의 處理溫度와 時間에 큰 제약이 없지 않다. 그러나 最近 處理가 간단한 유리화 溶液으로서 30% Ficoll + 0.5M sucrose 를 첨가한 PBS에 ethylene glycol(EG)을 40% 로 稀釋한 유리화 溶液 EFS 液이 개발되어 생쥐 胚를 20°C 에서 數分間 처리한 후 液體窒素속에 투입하여 유리화 保存 融解 후 높은 生存率이 얻어졌다(Kasai 등, 1990).

康等(1991)도 EFS 液, GFS 液을 써서 마우스의 胚를 25°C에서 數分間 처리하여 유리화 保存 融解하여 EFS 液, GFS 液에서 매우 높은 生存率을 얻었다. 현실적으로는 20°C, 25°C 이외의 溫度環境에서도 胚를 처리할 필요성이 있는데 일반적으로는 耐凍劑의 毒性은 溫度와 밀접한 관계가 있다는 것이 알려져 있다.

본 研究에서는 20°C(Kasai 등, 1990), 25°C (康等, 1991)에서 胚의 生存에 有効한 EFS 40 液, GFS 40 液을 써서 10°C 下에 처리하여 유리화 保存 하였을 때 前處理 溫度와 平衡時間이 胚의 生存性에 미치는 影響에 대해 比較 檢討할 目的으로 實施하였다. 또 EFS 40 液, GFS 40 液과 비교하기 위해 DFS 40 液에 대해서도 胚의 生存性에 미치는 影響에 대해서 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 胚의 回收

6~7 週齡의 ICR 系 雌 생쥐를 5 IU PMSG 와 5 IU hCG를 48시간 間隔으로 腹腔內 注射하여 過排卵을 誘起하고 ICR 系의 成熟雄과 交配하였다. hCG 注射 後 77~79時間 後에 屠殺開腹하여 摘出한 子宮 및 일부의 卵管을 修正磷酸緩衝生理食鹽水(PBS:Whittingham, 1977)으로 관류하여 胚를 回收했다. 胚는 流動파라핀下의 PBS중에 모아 놓고 形態的으로 정상인 late morulae (or Compact morulae : 後期桑實胚)만을 實驗에 使用하였다.

2. 유리화 溶液

유리화 溶液으로서 EG를 30% Ficoll + 0.5M sucrose 첨가 PBS로 40% 稀釋한 溶液(EFS 40), glycerol를 30% Ficoll + 0.5M sucrose 첨가 PBS로 40% 稀釋한 溶液(GFS 40) 및 DMSO 를 30% Ficoll + 0.5M sucrose 첨가 PBS로 40% 稀釋한 溶液(DFS 40)을 사용하였다.

3. 胚의 유리화 保存

0.25ml 스트로의 양단을 0.5 M sucrose 첨가 PBS, 그 내측을 소량의 유리화 溶液(EFS 40, GFS 40, DFS 40), 그리고 중심에 2cm 柱의 유리화 溶液(여기에 胚를 封入한다)이 배치되게끔 吸引하여 10°C의 保存液에 浮遊한 後 同溫度에서 0.5分, 1.0分 및 2.0分間 平衡後 직접 液體窒素에 投入하여 保存했다.

4. 融解 方法(Kasai 등, 1990 : 康等, 1991)

- 1) PB1과 修正 KRB 液(M16)의 作成
- 2) 修正 KRB 液의 준비 : KRB 液이 흘러지지 않도록 2회에 걸쳐 넣는다.

Culture dish에 100 μ l KRB(\times 4) + 파라핀 + 100 μ l KRB(\times 4) + 파라핀
↓

8時間 以上 CO₂ 인큐베이터에서 平衡

- 3) PB1의 준비: KRB 液과 마찬가지로 culture

dish에 넣어 流動파라핀으로 덮는다(溫度變化를 적게 한다; 水分蒸發을 막는다) → 室溫에 넣어 둔다.

- 4) Sucrose 液의 작성 : 1.712g sucrose + 8.91 ml PB1, 혹은 그의 比率, 다만 거품이 일어나지 않도록 하기 위해 BSA는 sucrose 溶解 후에 첨가한다.
- 5) Sucrose 液의 준비 : (가) PB1과 마찬가지로 culture dish에 넣는다 → 10°C 에 넣어 둔다. (나) 10ml 시험관 그대로 10°C 에 넣어 둔다.
- 6) 18G의 주사침을 붙인 1ml 注射器에 試驗管的 sucrose 液을 0.8ml 吸引한다.
- 7) 가능한한 設定된(여기서는 10°C) 溫度에 가까운 實驗室에서 실시한다. Watching glass 옆이나 sucrose 液을 넣은 장소 부근에 溫度計를 넣어 두고 溫度를 測定한다(顯微鏡의 光源 가까운 곳에는 溫度가 높다). 溫度가 높아도(예를 들어 15°C) 凍結前的 平衡시 만큼 큰 影響은 없을 것으로 생각되나 이 때에는 溫度를 기록해 둔다.
- 8) 保溫瓶에 液體窒素를 넣고 스트로를 옮긴다(스트로 마크를 확인하기 쉽고 스트로의 溫度가 올라가지 않게 注意). 窒素容器로부터 스트로를 들어 올릴 때 溫度가 上昇하지 않도록 注意한다. 綿栓이나 파우다栓이 날아가는 수가 있다.
- 9) 스트로를 핀셋으로 잡고 10°C의 水槽에 직접 침적하여 가볍게 흔든다. 극히 드물게 burst하여 保存液이 없어지는 수가 있다.
- 10) Sucrose 液이 투명해지면(약 10초) 신속히 水分을 除去하고 파우다 쪽의 sucrose 液 부분을 가위로 찢는다. 이 때 溶液의 들어 있는 부분을 손으로 잡지 않도록 注意한다.
- 11) 스트로를 옆으로 눕혀 綿栓 부근의 sucrose 液 부분을 찢는다.
- 12) 주사기의 sucrose 液으로 스트로의 내부를 綿栓쪽에서 파우다쪽으로 천천히 watching glass에 灌流한다. 스트로의 각도는 30度 以下(30度 以上の 각도가 되면 空氣가 들어가 거품이 많아진다). Watching glass를 가볍게 흔들

어 타이머를 ON에 넣는다. 水槽에 投入으로부터 灌流까지 될 수 있는 한 빠르게 조작한다(胚가 溶液속에 있다 → 毒性이 影響이 있다 : 특히 室溫이 높은 경우).

- 13) 스트로는 그 속에 sucrose 液을 남긴채로 平行으로 눕혀 둔다(溶液은 점도가 높기 때문에 胚가 스트로 벽에 붙은 채로 나오지 않는 경우가 있다.)
- 14) 實體顯微鏡下에서 胚를 찾아 culture dish의 sucrose 液에 옮긴다. 胚가 전부 회수되지 않을 때는 sucrose 液을 넣어둔 스트로내의 液을 watching glass에 옮기고 다시 한번 찾는다.
- 15) 스트로 灌流 後 약 5분만에 PB1에 옮긴다. 10°C에서는 몇 분 더 길어져도 별 影響은 없으나 溫度가 높아지면 時間이 길어지지 않도록 하는 것이 좋다.
- 16) 回收胚數 및 透明帶가 없는 胚, 透明帶內에 氣泡가 있는 胚(液의 상부에 뜨는 수가 있다) 등 胚의 形態를 관찰 기록한다. 細胞質의 상태 확인은 약 1時間(혹은 그 以上) 培養 後에 관찰하는 것이 명확하다.
- 17) CO₂ 인큐베이터에서 平衡해 둔 培養液(修正 KRB 液, M16)의 하나에 胚를 옮기고 洗淨後, 다른 培養液에 옮기고 移植할 때까지 培養한다. CO₂ 平衡하지 않는 pH 높은 液에 넣어서는 안된다. 短時間이라면 다른 PB1으로 洗淨한 후 거기에 넣어 뒤도 상관없다.

5. 胚의 培養

回收한 胚는 修正 KRB 液(m-KRB; Toyoda and Chang, 1974)로 洗淨하여 流動파라핀으로 덮은 m-KRB로 옮겨 5% CO₂ 를 함유한 37°C의 大氣중 에 培養했다. 1日 2回 實體顯微鏡下에서 관찰하며 3일간 培養하고 expanded blastocyst까지 發育하는 能力에 의해 生存性을 判定했다.

結果 및 考察

Table 1에서는 EFS 40 液으로 10°C 下에 0.5分, 1.0分 및 2.0分間 平衡한 後 유리化 保存하여 融解

한 후 생존율을 조사한 결과 각각 76.7%, 96.7% 및 100%로 나타났다. 따라서 10°C 下에서는 平衡時間이 1分 以上の 경우에 生存率이 良好하였다.

GFS 40 液으로 10°C 下에 유리화 凍結 融解하였을 때는 0.5分 平衡이 60.0%의 生存率, 1.0分 平衡은 96.7%, 2.0分 平衡에서 100%의 生存率이 얻어졌다. 이 결과는 EFS 40 液의 경우와 類似한 것이다(Table 2).

한편 DFS 40 液으로 10°C하에 0.5分 및 1.0分間 平衡하고 유리화 凍結 融解한 결과 그 生存率은 0.5分 平衡이 62.1%, 1.0分 平衡에서는 0%를 나타내어 EFS 40 液이나 GFS 40 液의 경우에 비해 현저히 낮은 生存率을 나타냈다. 특히 1分間 平衡에서 生存率 0%를 나타내므로서 DFS 40 液의 毒性이 强함을 알 수 있었다.

생쥐胚의 유리화 保存에서는 高濃度의 耐凍劑를

使用하기 때문에 그 毒性을 調査할 必要가 있다. 從來의 유리화 保存에 이용된 溶液 VS1에는 毒性이 强한 耐凍劑가 含有되어 있으나 胚의 前處理 溫度를 내려주므로서 VS1이 胚에 주는 害를 줄이고 있다(Rall과 Fahy, 1985).

本 實驗에서 이용한 유리화 溶液 EFS 40 液은 VS1과 달리 毒性이 낮은 유리화 溶液으로서 開發되어 생쥐 桑實胚를 凍結前에 20°C에 단시간 처리하여 높은 生存率이 얻어졌음을 報告했다(Kasai 등, 1991). 康等(1991)도 생쥐의 桑實胚를 써서 25°C 下에서 EFS 40 液, GFS 40液 및 DFS 40 液으로 유리화 凍結保存 後 融解한 다음 生存率이 EFS 液 96.7~100%로 優秀하였고, GFS 40 液 역시 93.3~96.7%로 EFS 40 液과 유사한 生存率이 얻어졌다. 그러나 DFS 40 液의 경우는 거의 生存胚를 認定할 수 없었다.

Table 1. Survival of mouse late morulae stored at -196°C by vitrification in EFS 40 solution

Equilibration		No. of embryos stored	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to expanded blastocysts in culture (%)*
Temperature(°C)	Period(min.)			
10	0.5	30	30	23(76.7)
	1.0	30	30	29(96.7)
	2.0	30	30	30(100.0)

*Percentage of recovered embryos.

Table 2. Survival of mouse late morulae stored at -196°C by vitrification in GFS 40 solution

Equilibration		No. of embryos stored	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to expanded blastocysts in culture(%)*
Temperature(°C)	Period(min.)			
10	0.5	20	20	12(60.0)
	1.0	30	29	29(96.7)
	2.0	30	30	30(100.0)

*Percentage of recovered embryos.

Table 3. Survival of mouse late morulae stored at -196°C by vitrification in DFS 40 solution

Equilibration		No. of embryos stored	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to expanded blastocysts in culture(%)*
Temperature(°C)	Period(min.)			
10	0.5	30	29	18(62.1)
	1.0	30	30	0(0)

*Percentage of recovered embryos.

本實驗에서는 前記 溫度보다 낮은 10°C에서 前處理가 생쥐 胚의 生存性에 미치는 影響을 比較 檢討할 目的으로 實施하였다.

細胞透過性 耐凍劑인 EG의 毒性은 濃度나 溫度가 높아지면서 강해졌다(西森, 1989). 이것은 濃도가 높아지면 EFS 液에 함유된 PBS의 比率이 작아지는 것이 중요한 要因으로 생각된다. 또 溫度가 높아지면 溶液의 粘性이 낮아지고 耐凍劑가 細胞內에 들어가기 쉽게 되어 細胞質에 害를 주기 때문에 생각된다. 이에 대해서 低溫에서는 高濃度라도 강한 毒性이 認定되지 않았던 것은 溶液의 粘性이 높아져 細胞內에 浸透하기 어렵게 되기 때문에 생각된다. EG는 DMSO, glycerol(Gly), propylene glycol(PG)에 비해 毒性이 낮은 耐凍劑로 생각된다(高鴨, 1989) 透過性인 이상 基本的으로는 胚에 대해서 毒性이 있다.

이에 대해서 非透過性인 Ficoll 存在하에 保持한 胚의 生存率은 EFS 液에 含有된 것보다 높은 濃度 50, 60%에서도 높게 維持되었다. Ficoll은 非透過性 耐凍劑로서 더우기 高分子여서 溶液中에 胚를 浮遊시키면 胚는 收縮하지 않고 細胞內에 Ficoll은 浸透하지 않으므로 胚에 直接的인 害를 주지 않는 것으로 생각된다.

Kasai 등(1981)은 1.5M의 濃度로 여러가지 耐凍劑와 함께 생쥐 胚를 20°C 로 5日間 保存한 結果, Gly 나 EG의 影響은 작으나 DMSO의 毒性은 顯著히 높음을 報告했다. 透過性 耐凍劑는 單獨 高濃度로 하면 유리화 하나 보다 低濃度로 유리화 하기 위해 非透過性 高分子의 添加가 有效한 것이 알려져 있다(Fahy 등, 1984). 同一 濃度の 透過性 耐凍劑를 함유하는 경우에는 m-PBS로 稀釋하는 것보다 血清 혹은 非透過性 高分子 添加液으로 稀釋한 쪽이 유리화를 促進하기 쉽다는 것이 確認됐다(古味, 1989).

Sucrose液을 凍結保存液에 添加하면 胚는 水晶이 形成되기 어려워 보다 急速 凍結이 가능해진다(Renard 등, 1984 ; Takeda 등, 1984). EF와 sucrose를 첨가한 EFS 液을 20°C에서 毒性을 조사한 結果 sucrose를 添加하면 生存率이 분명히 높아졌고, 또 凍結融解胚의 生存性도 EF보다 EFS 液으로

處理한 경우에 확실히 높았다(古味, 1989). 이것은 耐凍劑의 除去方法 差異가 큰 影響을 준 것으로 여겨진다. 이미 凍結融解胚의 耐凍劑의 제거에 sucrose의 有效性이 認定된바 있다(Kasai 등, 1980 ; Szell과 Shalton, 1986 ; Takeda 등, 1987).

金 등(1993)은 室溫下에 0%의 glycerol과 10% ethylene glycol(20G10E)에 acetamide 10%, 15%, 20%를 첨가하여 FDA-score로 處理區間에 差異가 없었으나, 前記 20G10E 溶液에 10%의 sucrose를 첨가하여 平衡時間을 조사한 結果 5분과 10분間, 10분과 20분間에 각각 有意性 있는 生存率이 얻어졌다고 報告했다. 또 20G10E 溶液에 Ficoll(0, 10, 30%)을 添加한 vitrification solution으로 超急速凍結한 mouse molulae의 生存率은 높았으며 添加水準에 관계없이 대조구와 有意差가 없었다고 하였다.

본 研究에서는 EFS 40 液과 GFS 40液이 20°C (Kasai 등, 1991), 25°C(康 등, 1991)에서 높은 生存率이 얻어지는데 이어 10°C 下에서도 유리화 凍結融解에 의해 生存性이 良好하다는 것이 認定되었다.

摘 要

Mouse의 後期桑實胚를 10°C 下에서 EFS 40, GFS 40 및 DFS 40 液으로 유리화 凍結 融解後 生存率을 調査한 結果는 다음과 같다.

1. EFS 40液으로 10°C에서 0.5分, 1.0分 및 2.0分 平衡하여 유리화 凍結 融解한 다음 生存率은 각각 76.7%, 96.7% 및 100%였다.
2. GFS 40液으로 10°C에서 0.5分, 1.0分 및 2.0分 平衡하여 유리화 凍結 融解한 後 生存率은 각각 60.0%, 96.7% 및 100%로 EFS 40液과 類似하게 나타났다.
3. DFS 40液으로 유리화 凍結 融解後 生存率은 EFS 40 液, GFS 40 液과 달리 生存率이 매우 不良하였다. 즉 0.5分 平衡에서 62.1%를 나타냈으나 1.0分 平衡에서는 0%였다.

EFS 40 液 및 GFS 40 液으로 10°C 下에서 1~2 分間 平衡하여 유리화 凍結하여 融解한 後 生存率

이 97~100%로 나타나므로서 10°C 下에서도 유리화凍結融解로 優秀한 生存率을 얻을 수 있음이 認定되었고, 반면 DFS 40 液은 1分間 平衡에서 生存率 0%로 나타나므로서 그 毒性이 强함을 認定하였다.

參考文獻

- Kono T, Suzuki O and Tunoda Y. 1988. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 25:170-173.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 63 : 175-180.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1983. Protective effects of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0°C. *J. Reprod. Fert.* 68:377-380.
- Kono T and Tsunoda Y. 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33:77-81.
- Leibo SP. 1989. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 31:85-93.
- Miyamoto H and Ishibashi. 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presense of ethylene glycol. *J. Reprod. Fert.* 50:373-375.
- Macfarlane DR. 1987. Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *Cryobiology* 24:181-195.
- Miyamoto H and Ishibasi T. 1986. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 57:250-256.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *J. Reprod. Fert.* 80:499-504.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fert.* 80:499-504.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:387-402.
- Szell A and Shelton JN. 1986. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.* 76:401-408.
- Takeda T, Elsdon RP and Seidal GE., Jr. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology.* 21:226 Abstr.
- Takeda T, Elsdon RP and Seidal GE, Jr. 1987. Use of sucrose during removal of cryoprotectants after thawing eight-cell mouse embryos. *Theriogenology.* 28:101-107.
- Toyoda Y and Chang MC. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.* 36:9-22.
- Whittingham DG. 1972. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature.* 233:125-126.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science* 178:411-414.
- Willadsen SM. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In the freezing of mammalian embryos(K. Elliot & J. Whelan, eds.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 175-189.
- Willmut. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent, and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Science* 11:1071-1079.

- 葛西孫三郎, 吉原洋明, 町田隆彦. 1985. 0°C에 保存したマウスの體外での生存性に及ぼす糖類の保護效果. 日本家畜繁殖誌 31:177-180.
- 中瀧直己. 1989. 體外受精由來マウス4細胞期胚の超急速凍結融解保存について. Exp. Anim. 38: 279-282.
- 中瀧直己. 1989. 超急速凍結法を用いた體外受精由來マウス初期胚の凍結保存について. 哺乳卵雜誌 6-1:23-26.
- 高鴨亞紀. 1989. 低毒性ガラス化保存液によるマウス桑實胚超急速凍結. 日本高知大學農學部畜產學研究室.
- 上田好明. 1990. ガラス化保存したマウス胚の生存性に及ぼす脱ガラス化の影響. 高知大學農學部畜產學教室.
- 西森光孝. 1989. ガラス化保存したマウス胚の生存性に及ぼす前處理溫度の影響. 日本高知大學農學部畜產學教室.
- 古味ジヨン浩. 1989. 低毒性ガラス化保存液によるマウス桑實胚の超急速凍結. 日本高知大學農學部畜產學教室.
- 康珉秀. 1991. 마우스 胚의 凍結保存. 韓國受精卵移植研究會誌 6:30-36.
- 康珉秀, 孫始換, 葛西孫三郎. 1991. 마우스 桑實胚의 Vitrification에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會 15(3):173-178.
- 金重桂, 康珉秀, 張德支, 高敬來, 梁炳哲. 1993. 超急速凍結에 있어서 Vitrification Solution開發과 FDA 生死判定이 受精卵의 培養과 移植後 着床에 미치는 影響
2. Vitrification Solution 内の 非透過性 物質 (Ficoll, sucrose)과 平衡時間이 超急速凍結 後 Mouse Morulae의 生存率에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會誌 16(4):317-324.