韓國家畜繁殖學會誌 19(1) : 49~54(1995)
Korean J. Animal Reprod.

직접이식을 위한 소 체외 수정란의 동결 융해후 생존성 및 수태율에 미치는 영향

오성종 · 양보석 · 이명식 · 백광수 · 성환후 · 정진관 · 임경순*

축산기술연구소

Pregnancy and Survival Rate of *In Vitro* Fertilized Bovine Embryos Frozen for Direct Transfer

Oh, S. J., B. S. Yang, M. S. Lee, K. S. Kwang, H. H. Seong, J. K. Jung and K. S. Im*

National Livestock Reseach Institute

SUMMARY

This experiments were carried out to investigate the viabilities and the pregnancy rate of frozen-thawed IVF bovine embryos in various media, cryoprotectants and age of embryos produced. Hanwoo oocyte were collected in size of 2~7mm follicles, matured for 20~22hrs at 38.5℃ in 5% CO_2 incubator and then *in vitro* fertilized with Hanwoo semen. Blastocysts or more developed embryos at Day 7, 8 and 9 were frozen in 1.5 or 1.8M ethylene glycol. Viability of frozen thawed IVF embryos were identified the reformation of blastocoele after thawing and culture for 24~48 hours at 38.5℃ in 5% CO_2 incubator. Production rate of Hanwoo IVF embryos in TCM 199 and CR1aa was 21.3%(39/183) and 28.1%(41/146), respectively. The viability of frozen thawed IVF embryos was higher rate in 1.8M ethylene glycol and Day 7 embryos than that in 1.5M and Day 8.53 cows out of 100 Hanwoo receipients transfered IVF embryos were pregnant and twin production rate was 26.3%.

(Key words : IVF embryos, Hanwoo, direct transfer, frozen-thawed embryos, viability)

Ⅰ. 서 론

소 수정란의 동결은 주로 체내 수정란을 이용한 방법들이 개발되었고, 가장 보편적인 동결방법은 glycerol의 농도를 달리하여 충분히 항동해제의 평형을 이룬 후 동결기를 이용한 동결방법이었다. 그리고 동결란의 이식을 위하여 융해 후 동결의 역순으로 항동해제를 제거한 후 스트로우에 재주입하여 이식하는 복잡한 단계를 거쳐야 했다. 이를 개선한 one-step 동결융해방법이 제시되었으나 sucrose등의 분자량이 비교적 큰 물질이 수정란 이식시 자궁내에서 수정란의 재탈수과정 중에 수정란에 예상보다 훨씬 많이 침투되거나 혹은 분자량이 아주 낮은 항동해제를 사용하여 이식할 경우 역시 수정란이 과대팽창되어 이식후 배사망의 원인이 되는 문제로 남아 직접이식법의 개발이 지연되었다(Schneider et al., 1984).

최근에 Suzuki 등(1990)이 1.6M propylene glycol과 0.25M의 sucrose 용액으로 동결된 수정란을 융해후 아무런 조작도 없이 곧바로 수란우 33두에 이식하여 61%의 수태율을 얻음으로써 직접이식에 대한 연구는 급진전을 보게 되었다. Voelkel과 Hu(1992b)는 소의 체내수정란을 이용하여 1.5M ethylene glycol (EG), 1.5M propylene glycol, 1.5M DMSO 그리

* 서울대학교 생명과학대학

고 1.4M glycerol을 처리하여 동결융해한 결과 48~72시간 배양시 수정란의 생존율은 EG처리시 70~75%로 가장 높았고, 1.5M PG가 가장 낮은 11~16%였으며, EG의 농도는 1.0M과 2.0M 보다는 1.5M에서 가장 높은 84~89%의 생존율을 보였다. 한편 소 체외 수정란에서는 직접이식을 위한 항동해제로 1.3M glycerol, 1.1M diethylene glycol, 1.8M EG, 1.6M propylene glycol등을 사용하여 동결융해후 각각 92.8%, 92.2%, 89.8% 그리고 86.0%로 높은 生存率을 나타냈으나, 이식시 수태율은 1.8M의 EG에서 가장 높은 74%의 수태율을 보고했다(Suzuki 등, 1993). 그러나 수정란의 발육정도와 수정란의 발생배지에 따른 체외 수정란의 동결 융해후 생존율은 아직도 구체적으로 밝혀진 바가 없고 비교적 효과가 좋은 항동해제인 EG의 적정농도를 구명할 필요가 있으며, 특히 한우에 있어서는 아직도 이에 대한 보고가 전혀 없어 이를 분석구명코자 본 연구를 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 체외 수정란의 생산

도축장에서 도축되는 한우 암소의 난소를 25℃의 생리식염수에 넣어 2~3 시간 이내에 실험실로 옮겨 37℃의 생리 식염수로 4~5회 난소를 깨끗이 씻은 후 5%의 FCS가 함유된 주사기에 21G의 주사바늘을 부착시켜 2~7mm이내의 난포에서 난자를 흡인하였다. 그리고 실체 현미경하에서 cumulus cell이 충실히 부착되어 있는 난포난만을 CO_2 배양기에서 20~22시간 성숙배양하였고, B.O.액에 5mM의 caffeine과 10 mM의 heparin를 넣은 정자 세척액으로 정자를 세척하여 정장물질을 제거시킴과 동시에 수정능력을 획득시킨 후 정자 농도가 $5\sim6\times10^6$/ml 로 조정한 다음 6시간 동안 수정을 하였다. 수정이 끝난 후 TCM-199 배양액으로 난자를 8회 이상 세척하여 신선 TCM 배양액으로 옮겨 9일간 배양하면서 상실배 혹은 배반포 이상 발달한 수정란중 현미경하에서 아주 정상적인 형태의 수정란만을 동결시험에 사용하였다.

2. 항동해제 준비 및 평형

직접이식을 위해서 항동해제로는 ethylene glycol (Sigma, 미국)을 이용하여 고정하였고, 농도는 1.5M과 1.8M로 하고 기본 동결배지는 수정란 동결용 medium(Gibco, 미국)에 20%의 FCS를 첨가하여 이용하였다. 동결배지는 사용시까지 20℃의 온도를 유지하였으며 배반포기 수정란을 신선 TCM배양액으로 2~3회 세척후 직접이식용 동결액으로 옮겨 15~20분간 평형을 한 다음 곧바로 0.25ml의 straw(FHK, 일본)에 수정란을 주입하였다. 이때 온도는 20℃를 유지하였다.

3. 수정란의 동결

항동해제의 평형이 끝난 수정란을 0.25ml 스트로우에 넣은 후 바로 −7℃로 냉각된 수정란 동결기(山川, 한국)의 cooling chamber에 넣고 2분후 식빙을 시켜주었고, 10분간 정치후 −31℃까지 분당 −0.3℃씩 온도를 낮춘 다음 −196℃의 액체 질소에 보존하였다.

4. 동결 수정란의 융해 및 배양

−196℃의 액체질소통에 보존중인 소 체외 수정란은 20℃의 물에서 융해하였다. 융해후 현미경하에서 수정란을 찾아 신선한 TCM-199배양액으로 5~6회 세척후 TCM-199 drop에 넣어 48~72시간 동안 CO_2 배양기에서 배양하면서 배반포강이 정상으로 형성되고 확장 배반포 혹은 부화 배반포로 발육되는 것을 생존한 것으로 판단하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 체외 수정란 생산

한우 암소의 난포난에서 체외 수정란 생산 성적은 Table 1에서 보는 바와 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 한우 난포란의 체외 수정후 48시간에 난분할율은 54.71% 였고, 배반포 발생율은 수정후 7일째 TCM-199 배양액에서는 19.6% 였으나 CR1aa 배양액에서는 28.2%로 유의적으로 높았으나 Day 8 과 Day 9에 생산되는 배반포의 비율은 배양액에 관계없이 비슷한 경향을 나타냈다. 전체적으로 수정된 난분할란에서 배반포 생산율은 TCM-199 배양액에서 38.2%, CR1aa 배양액에서는 52.6%로 CR1aa 배양액이 훨씬 높은 배반포 발생율을 나타냈다. 특히 CR1aa 배양액에서는 초기 배반포 발생율이 높은 경향이었고 시간이 경과할수록 배양액에 상관없

Table 1. Production of *in vitro* fertilized bovine embryos by various culture medium

Medium	No. of oocyte	No.(%) of cleavaged eggs	No.(%) of blastocysts produced at			
			Day 7	Day 8	Day 9	Total
TCM-199	183	102(55.74)	20(19.6)	14(13.7)	5(4.9)	39(38.2)
CR1 aa	146	78(53.42)	22(28.2)	13(16.7)	6(7.7)	41(52.6)
Total	329	180(54.71)	42(23.3)	27(15.0)	11(6.1)	80(44.4)

이 낮아졌다.

본 연구에서 얻어진 54.7%의 난분할율은 Fukui와 Ono(1988)등이 보고한 52.4%와는 비슷한 결과를 보였으나 Rosenkrans등(1993)의 52.4%와 68.2% 보다는 다소 낮은 결과였다. 또한 본 연구의 배반포 생산율 24.3%는 Goto 등(1988)이 보고한 15.1%보다는 높은 경향이었다. 이러한 보고자간의 난분할율과 배반포 생산율에 차이는 체외수정에 이용된 정자의 수정능력 획득, 발생배양시 이용되는 공배양 세포 및 배양액의 차이뿐만 아니라 기술상의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 또한 난분할율은 CR1aa와 TCM-199간에 차이가 없었으나, 배반포 생산율에 있어서 CR1aa가 좋았던 것은 TCM-199에는 glucose와 phosphate가 함유되어 있어서 난구세포와 공배양을 하더라도 Rieger(1992)의 보고에서와 같이 ATP생산이 적어서 CR1aa보다 배반포 생산율이 적었던 것으로 사료된다. 그러나 Bavister등(1992)이 보고한 TCM-199 단독의 배양을 하더라도 체외수정 배양의 20%가 배반포로 발생하여 이는 배양액의 질에 기인되는 것으로 사료되나 더 기초적인 연구가 필요하다고 본다. 또한 CR1aa에서 난분할된 난자중 배반포 생산율 52.6% (41/78)는 Rosenkrans 등(1993)이 CR1aa에서 배양시 7일째에 상실배 이상이 약 40%라는 보고보다도 다소 좋은 결과였다. 이러한 차이는 Rosenkrans 등(1993)은 수정후 45±2시간 후에 난구세포를 제거하여 배양을 하였으며, 본 연구에서는 수정후 난구세포를 제거하지 않고 배양을 하여 같은 배양액을 사용하더라도 공배양을 함으로써 공배양 세포로부터 수정란의 발육에 좋은 인자들이 분비되었기 때문이라고 사료된다.

2. 배양액별 ethylene glycol의 농도별 융해후 생존율

여기서 공시된 수정란은 TCM-199과 CR1aa 배양액에서 생산된 배반포 이상의 체외 수정란을 이용하였고 각 발생 배양액별 ethylene glycol 농도는 각각 1.5M과 1.8M로 하여 수정란을 동결하였으며 융해후 확장 배반포 이상 발육된 성적은 Table 2에 나타냈다.

Table 2에서 보는 바와 같이 동결융해된 체외수정란의 전체적인 생존율은 67.7%였으며, TCM-199에서 EG의 농도에 따른 동결 융해후 생존율은 1.8M과 1.5M에서 각각 73.3%와 70.6%로 유의적인 차이는 없었다. 그러나 CR1aa에서는 각각 68.8%와 58.8%로서 EG의 농도가 1.8M에서 높은 융해후 생존율을 나타내었다. 또한 전체적으로 TCM-199을 이용 생산

Table 2. *In vitro* viability of frozen-thawed embryos by concentration of cryoprotectant in two different media

Medium	Concentration of ethylene glycol	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos refomed blastocoele
TCM-199	1.8M	16	15	11(73.3)
	1.5M	18	17	12(70.6)
CR1aa	1.8M	16	16	11(68.8)
	1.5M	17	17	10(58.8)
Total		67	65	44(67.7)

된 수정란이 CR1aa에서 생산된 수정란보다 다소 높은 동결 융해후 생존율을 나타내었다.

본 연구에서 나타난 항동해제인 EG를 이용하여 동결융해후 항동해제를 제거하지 않고 직접 수정란을 배양했을때 전체적으로 67.7%의 생존성을 보인 것은 Szell 등(1989)이 보고한 바와 같이 소의 발정후 7일째의 상실배와 배반포에서 EG가 glycerol 보다 투과성이 높아서 동결융해후 항동해제를 제거하지 않고 직접이식한 수태율과 비슷한 결과를 얻었다. 또한 본 연구에서 나타난 1.8M EG가 1.5M보다 동결 융해후 생존성이 다소 높았던 결과는 Suzuki 등(1993)이 체외수정 배반포 동결시 EG의 농도를 1.5, 1.8 및 2.1M로 하였을 때 동결 융해후 생존성이 1.8M이 가장 좋았다는 결과와 일치되었으나, Voelkel과 Hu(1992a)이 보고한 1.5M의 EG가 1.0M이나 2.0M 보다 동결융해후 생존성이 좋았다는 결과와는 다소 차이가 있었다. 이러한 보고자간의 차이가 나타난 것은 식빙온도, 냉각속도 및 액체질소 침적온도 등과 같은 동결조건의 차이에서 나타난 것으로 사료되며 본 연구에서 1.8M의 EG농도가 좋은 것도 본 연구에서 사용된 동결조건이 1.5M보다 좋았던 것으로 생각된다.

또한 본 연구에서 나타난 동결 융해후 생존성이 TCM-199이 CR1aa보다 좋았던 결과는 Iwasaki 등(1990)이 보고한 체외수정란을 수정후 난구세포와 공배양하거나 토끼 난관에서 체내배양할 경우 수정란내 내세포괴를 이루는 세포의 수와 생존된 세포수가 체내배양한 경우가 좋았다. Leibo와 Loskutoff 등(1993)이 체외수정란의 동결 융해후 생존성은 배양액의 종류와 공배양시 이용된 체세포의 종류에 따라 차이가 나타난다는 결과로 미루어 볼 때 체외 수정란의 생산 조건이 있어서는 Table 1에서와 같이 CR1aa가 좋으나 동결을 위해서는 TCM-199이 좋은 것으로 사료되며 금후 체외배양시 수정란의 질과 동결에 영향을 미치는 배양체계에 대한 연구도 필요하다고 사료된다.

3. 배반포 발생일에 따른 동결융해후 생존율

체외수정후 7일째 생산된 배반포의 수정란을 1.8M의 EG를 이용하여 동결 융해후 48~72시간 동안 배양시 배반포강이 재형성되어 확장 배반포 이상으로 발육되는 비율이 74.36%로 Day 8의 57.60%보다 유의적으로 높은 경향을 나타냈다.

본 연구에서 얻어진 체외 수정후 7일째 생산된 배반포가 8일째 생산된 것에 비하여 동결융해후 생존성이 좋았던 결과는 Del Campo(1993)가 glycerol을 이용하여 6, 7, 8 및 9일째 생산된 배반포를 동결 융해한 결과 부화율은 각각 8, 33, 8 및 9%로서 7일째 발생한 배반포가 가장 좋았다는 결과와, Han 등(1994)이 보고한 수정후 7일과 8일째 생산된 배반포를 동결한 결과 융해후 생존율이 7일째가 좋았다는 보고 및 Takagi 등(1994)이 보고한 7일째나 9일째의 동결 융해후 생존율에서 7일이 좋았다는 결과들과 일치하는 경향이었다. 이상과 같은 체외수정 배반포의 동결 융해후 생존성은 배반포 발생일과 관계가 있으며, 수정후 7일째 생산된 배반포가 가장 좋았다는 결과들은 Iwasaki 등(1990)이 보고한 체외수정된 배반포의 질은 배반포까지의 발생속도가 빠른 것이 배반포에 존재하는 내세포괴의 수가 많아 질이 좋다는 결과로 설명이 가능하며, 다배란 처리시 발정후 7일째 회수된 수정란의 질이 상실배와 배반포배이므로 체외수정란의 7일째 발육단계가 배반포인 것으로 체내조건과 같은 난분할 속도이므로 수정란의 질이 좋았던 것으로 사료된다.

4. 동결 체외 수정란의 직접이식 및 수태율

체외수정에 의해 생산된 배반포의 수정란을 직접 이식법으로 동결하여 발정이 동기화된 한우 성빈우 100두에 이식하여 53두가 임신(53%)되었고 분만된 38두

Table 3. Viability of frozen-thawed bovine IVF embryos by date of blastocyst production

Days to produce blastocyst	No. of frozen embryos	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos reformed blastocoele
Day 7	40	39	29(74.36)
Day 8	27	26	15(57.69)
Total	67	65	34(52.31)

Table 4. Pregnancy and twin production rate of bovine IVF embryos by direct transfer

Embryo	No. of transfer	No. of cows pregnant	No. of cows delivered	No.(%) of twin production
Blastocyst	100	53(53.0%)	38	10(26.3%)

중 10두가 쌍자 분만하여 쌍자 생산율이 26.3%였다.

Moore(1994)는 체내 수정란을 1.4M glycerol + 0.6M sucrose로 동결한 후 직접이식하여 53%(29/76)의 수태율을 얻었고, McIntosh와 Hazeleger (1994) 역시 동결 체외수정란을 직접이식으로 59%의 임신율을 보고하였고, 체외 수정란인 경우는 Suzuki (1993)등이 1.8M의 ethylene glycol을 이용하여 74%의 수태율을 보고하였으나 많은 보고는 없는 실정이다.

앞으로 보다 높은 수태율과 쌍자 생산율을 얻기 위하여 동해방지제의 선발 및 세포내 침투성 혹은 비침투성을 잘 조화하는 연구가 집중적으로 보완되어야 할 것으로 사료된다.

Ⅳ. 적 요

본 연구는 한우 체외 수정란의 직접이식을 위해 수정란 생산 배양액의 종류, 항동해제의 적정 농도 및 체외 수정란 생산일과 발육정도에 따른 동결 융해후 생존성과 수태율을 조사하기 위하여 수행하였으며 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 한우 체외 수정란 생산을 위해 발생배지로 TCM-199과 CR1aa를 이용한 배반포이상의 수정란 생산율은 각각 21.3%(39/183)과 28.1%(41/146)로 CR1aa 배양액에서 더 높은 체외 배반포 이상 발생 수정란수가 많았다.
2. TCM-199 혹은 CR1aa배양액에서 생산된 수정란을 EG 1.8M과 1.5M로 동결융해후 생존율은 각각 73.3, 70.6 그리고 68.8%, 58.8%로 항동해제의 농도는 1.8M이 다소 좋으나 그보다는 발생된 배양액의 차이가 더 많은 것으로 나타났다.
3. 체외 수정란 생산일에 따른 동결 융해후 생존율은 Day 7에서 74.4%로 Day 8일의 57.7% 보다 유의적으로 높은 차이를 보였다.
4. 한우 체외 동결 수정란을 발정이 동기화된 수란우 100두에 이식 53두가 임신되었고, 현재까지 38두가 분만되었으며 그중 10쌍의 쌍자송아지가 분만되어 26.3%의 쌍자 생산율을 얻었다.

Ⅴ. 인용문헌

1. Bavister, B. D., T. A. Rose-Hellekant and T. Pinyopummintr. 1992. Development of *in vitro* maturated/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. Theriogenology, 37:127-146.
2. Del Campo, M. R., M. X. Donoso, A. T. Palasz, A. Garia and R. J Mapletoft. 1993. The effect of days in co-culture on survival of deep frozen bovine IVF blastocysts. Theriogenology, 39:208.
3. Fukui, Y. and H. Ono. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. Vet. Rec., 122:282.
4. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogaw. 1988. Pregnancies after co-coulture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Rep. Fert., 83:753-758.
5. Han, Y. M., H. Yamashina, N. Koyama, K. K. Lee and Y. Fukui. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived Bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. Theriogenology, 42:645-654.
6. Iwasaki, S., N. Yoshiba, H. Ushijima, S. Watanabe and T. Nakahara. 1990. Morphology and proportion of innercell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. J. Reprod. Fertil., 90:279-284.
7. Leibo, S. P. and N. M. Loskutoff. 1993.

Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. Therogenology, 39:81-94.

8. McIntosh, A. and N. L. Hazeleger. 1994. The use of ethylene glycol for freezing bovine embryos. Theriogenology, 41:253
9. Moore, R. L. 1994. The direct transfer of frozen thawed bovine embryos. Theriogenology, 41:260
10. Rieger, D., N. M. Loskutoff and K. J. Betteridge. 1992. Developmentally requlated changes in the uptake & metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced *in vitro*. Reprod. Fertil. Dev., 4: 547-557.
12. Rosenkrans, Jr. C. F., G. Q. Zeng, G. T. McNamara, P. K. Schoff & N. L. First. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substraes. Biol. Reprod., 49:459-462.
13. Schneider, U., P. Mazur and S. P. Leibo. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. Theriogenology, 21:68-79
14. Suzuki,T., M. Takagi, M. Yamamoto, A. Boediono, S. Saha, H. Sakakibara and M. Oe. 1993. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. Theriogenology, 40:651-659
15. Suzuki, T., M. Yamamoto, M. Ooe, A. Sakata, M. Matsuoka, Y. Nishikata and K. Okamoto. 1990. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryo refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. Theriogenology, 34:1051-1057
16. Szell, A., J. N. Shelton and K. Szell. 1989. Osmotic characterristics of sheep and cattle embryos. Cryobiology , 26:297-301.
17. Takagi, M., T. Otoi, A. Boediono, S. Saha and T. Suzuki. 1994. Viability of frozen-thawed bovine IVM /IVF embryos in relation to ageing using various cryoprotectants. Theriogenology, 41:915-921
18. Voelkel, S. A. and Y. X. Hu. 1992a. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, 37:23-37
19. Voelkel, S. A. and Y. X. Hu. 1992b. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. Theriogenology, 37:687-697