

體外成熟 소 卵胞卵의 凍結性에 관한 研究

김 수 · 정영채 · 김창근 · 윤종택* · 이종완**

중앙대학교 산업대학

Study on Freezability of *In Vitro*-Matured Bovine Follicular Oocytes

S. Kim, Y. C. Chung, C. K. Kim, J. T. Yoon* and J. W. Lee**

College of Industrial Studies, Chung-Ang University

SUMMARY

This study was investigated to test *in vitro*-maturation rate of bovine follicular oocytes, freezability of *in vitro*-matured bovine follicular oocytes with different stock solution in Glycerol and Propanediol, freezability of *in vitro*-matured bovine follicular oocytes on cryoprotectants, the viability of *in vitro*-matured bovine follicular oocytes by morphologically normal and FDA staining method.

1. The maturation rates of bovine follicular oocytes classified as grade A, B and C was 88, 63 and 21%, respectively.
2. Freezability of *in vitro*-matured bovine follicular oocytes on stock solution, TCM-199 + 5% FCS and m-PBS + 5% FCS was 61%(n=105), 48%(n=62) in 1M Glycerol and freeability of *in vitro*-matured bovine follicular oocytes on stock solution, TCM-199 + 5% FCS and m-PBS + 5% FCS was 68%(n=112), 42%(n=57) in 1~2 Propanediol. The results indicate that freezability of *in vitro*-matured bovine follicular oocytes with different stock solution is important.
3. Freezability of *in vitro*-matured bovine follicular oocytes on cryoprotectants was Glycerol and PROH was 56%(n=167), 57%(n=169). The results indicate that PROH was superior to Glycerol.
4. The rates of morphologically normal IVM oocytes after thawing of cryopreserved oocytes with Glycerol and PROH were 39%(n=18), 65%(n=39), respectively. The results indicate that PROH was superior to Glycerol.
5. The fluorescent light intensity after thawing of cryopreserved oocytes classified with Positive, Partial-I, Partial-II, Negative with Glycerol and PROH. The results of FDA-positive 24%, 42%, Partial-I 17%, 10%, Partial-II 20%, 12%, FDA-negative 39%, 37%, and Partial-I, II, respectively.

(Key words : bovine, IVM oocytes, freezability, cryoprotectants, FDA)

* 국립안성산업대학교(An Seong National University)

** 공주대학교(Kong Ju National University)

서 론

포유동물의 난자 동결보존에 관한 연구는 Whittingham(1977)이 생쥐의 성숙난자를 동결 융해하여 체외수정과 발생에 성공하였다. 일반적으로 난자의 동결도 수정란과 마찬가지로 동결보호제의 처리 및 동결·융해후 동결보호제를 제거시키는 일련의 과정을 기본 방법으로 이용하고 있으나, 수정란의 경우보다 동결이 더 민감하기 때문에 융해후 발생율이 아직도 매우 낮은 실정이다(Schroeder 등, 1990).

가축에 있어서 난자의 동결은 소(Schellander 등, 1988; Otoi 등, 1992; Schmidt 등, 1993), 토끼(Al-Hasani 등, 1989)등에서 이루어졌으며, 기타 포유동물에서는 생쥐(Shaw 등, 1992), 햄스터(Quinn 등, 1982)등에서 연구되어 왔다. 최근에 토끼(Al-Hasani 등, 1989), 생쥐(Kono 등, 1991; Wood 등, 1991)에서는 동결난자로부터 산자의 생산이 성공되었고, 사람의 경우에서도 임신이 성공된 바 있다(Chen, 1986). 현재 동결·융해후 생존성을 높이고 동결 융해기술을 간편화시키는 데 연구의 초점이 모아지고 있으나 아직까지도 소, 돼지에서는 동결난자로부터 산자생산에 성공한 예가 없다.

Vitrification 방법에 의한 수정란 또는 난자동결에 관심이 고조되고 있다. Otoi 등(1993)과 Hamano 등(1992)은 소의 체외성숙난포란을 동결하여 체외수정시킨 후 배반포까지의 발생을 보고하였다. 한편 국내에서는 소의 미성숙 난포란을 동결·융해후 생존성(오 등, 1993)에 관한 연구가 진행되었는데 50~60% 정도의 성숙율을 나타내었다. 그리고 돼지(이 등, 1993)에서도 생존 가능성을 시사하였다.

최근 난자의 발생단계에 따른 동결성에 대해 Schroeder 등(1990)은 생쥐에서 난핵포시기, 체외성숙 및 배란된 난자의 동결·융해후 생존성과 발생율이 배란된 난자에서 가장 높다고 하였다. 난자 또는 수정란 동결은 동결전 배양액에 동결보호제를 첨가하는 방법과 난자를 일정시간 동결보존액에 정착하는 평형시간에 따라 영향을 받는 것으로 보고되어 있다.

난자의 동결시 평형시간에 관해서 Taha와 Schellander(1992)는 소에서 미성숙난포란과 체외성숙난

포란이 20~60초 동안의 평형시간에서는 난할율과 배반포형성율에 차이가 없었으나, 5~10분 평형시 미성숙난포란의 경우 전혀 난할되지 않음으로서 평형시간은 짧아야 하는 것으로 보고하였다. 난자동결후 체외수정과 발생에서 아직까지 소, 돼지에서의 산자생산에 성공한 예가 없으나, 소에서는 동결 성숙난자로부터 체외수정후 17.6~22.4% 정도의 난할율을 얻었으며 배반포까지 발생율은 극히 저조한 실정이다(Lim 등, 1991; Otoi 등, 1993).

한편 성숙난자의 동결융해 후 생존성은 형태학적 판정 방법(Otoi 등, 1993)과 FDA(fluorescein diacetate)가 사용되어 왔으며(Kim 등, 1988; Noto 등, 1991) 세포질 염색정도와 밝기에 따라 난자의 생존성을 판정하기로 하였다.

따라서, 본 연구는 현재 도축장에서 도살되는 소의 난소를 채취하여 난포란을 채란하여 성숙난포란의 최적 동결보존의 조건을 구명하고, 동결보존 방법과 동해방지제에 따른 동결성 그리고 동결·융해후의 생존성 등을 형태학적 판정과 FDA 염색법에 의하여 동결보존의 가능성을 조사하고 Gene bank를 만들어 언제나 이용 가능하게 하므로 연구의 효율성을 높이고자 시도하였다.

재료 및 방법

1. 공시난자와 채란

본 실험에서 사용된 난포란은 도살장에서 도살되어지는 암소의 정상적인 난소를 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 후 항생제(염화나트륨 17g, 황산스트렙토마이신 0.5mg, 페니실린 100만IU /l)와 생리식염수가 들어있는 보온병(33~35℃)에 담아 2시간 이내에 38℃ 항온실로 운반하였고, 채란은 난소를 신선한 생리식염수로 3~4회 세척하고 20gauge 주사침이 부착된 10ml의 주사기를 이용하여 직경 2~5mm의 난포로부터 난포액과 함께 난포실질을 찢러 난포란을 채취하였다. 채취된 난포액과 난포란은 10ml의 시험관에 담아 일정시간 정착한 다음 하단액을 스포이드로 흡입하여 배양액이 들어 있는 petridish (#3001, Falcon plastic)에 혼합하여 실체 현미경하에서 난구세포층이 치밀하고 난포란의 세포질이 양호하고 균일한 것만을 선별 이용하였다.

2. 난포란의 체외성숙 배양액의 제조

난포란의 체외성숙배양액은 TCM-199(Gibco, USA)을 기본 배양액으로 하여 p-FSH(10 μ g/ml), HCG(10IU/ml), Estradiol-17 β (1 μ g/ml) 등의 호르몬을 첨가하고 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco, USA)를 첨가하여 제조하였다. 그리고 micromilipore filter(0.2 μ m)로 여과시킨 후 pH 7.4로 조정하여 39 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 95% air, 5% CO₂ incubator (Model No. 2300, Sheldon, USA)에서 12시간 전배양을 실시한 후 사용하였다.

3. 난포란의 체외성숙 및 성숙판정

난소에서 채취된 난포란을 신선한 TCM-199 배양액으로 2~3회 세척하며, 난구세포와의 공배양을 실시하기 위하여 직경 5mm 이상의 대난포로부터 난포액과 난구세포를 흡입, 채취하여 TCM-199 배양액을 1:1로 혼합한 후 1,500rpm으로 5분간 원심분리를 2회 반복한 다음 부유액은 제거하고, 성숙용 TCM-199 배양액 4ml를 주입하여 난구세포의 수를 1 \times 10⁶ cell/ml로 최종농도를 맞추어 4-well dish (Nuclon, Sweden)에 각 well에 0.5ml의 배양액을 넣고, 15~20개의 난포란을 주입하여 39 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 95% air, 5% CO₂ incubator에서 24시간 체외성숙을 실시하였다.

체외성숙의 판정은 Fagbohun과 Downs(1990) 및 Fenton 등(1993)의 방법을 이용하여 난구세포의 팽화 정도에 따라 육안으로 판정하여 팽화가 잘된 것만을 선별하여 공시하였다.

4. 성숙난포란의 동결보존 및 융해

1) 동결보존액의 제조

기본 동결보존액은 Otoi 등(1993)의 방법에 따라 25mM Hepes TCM-199에 5% FBS를 첨가한 것과 Otoi 등(1992)의 방법에 따라 modified phosphate-buffered saline(m-PBS)에 5% FBS를 첨가한 것 등 두가지로 나누어 제조하였다.

동결보존액으로는 Lim 등(1990)과 Takeda 등(1985)의 방법에 따라 기본 배양액 중 첫째로 25 mM Hepes TCM-199에 5% FBS를 첨가한 것에 1.

0M glycerol(GA-1601, Tedia Company, Inc.)과 1~2 propanediol(PR-1673, Tedia Company, Inc.)이 되게 제조하고, 둘째로 m-PBS에 5% FBS를 첨가한 것에 1.0M glycerol, 1~2 propanediol이 되게 제조하였다.

2) Straw 제작방법

Schiewe 등(1991)과 Kobayashi 등(1990), 그리고 이 등(1993)의 방법을 응용하여 Fig. 1과 같이 0.25-ml plastic straw (I.M.V., France) 제작과정 중 동결보존액의 혼합방지를 위해 공기층(air bubble column)을 두고 straw의 균일성과 난포란의 장진을 쉽게 하기 위해 straw의 가장 안쪽부터 동결보존액, 공기층, 동결보존액(난포란의 위치장소), 공기층, 동결보존액, 공기층, 동결보존액의 순으로 제작하여 사용하였다.

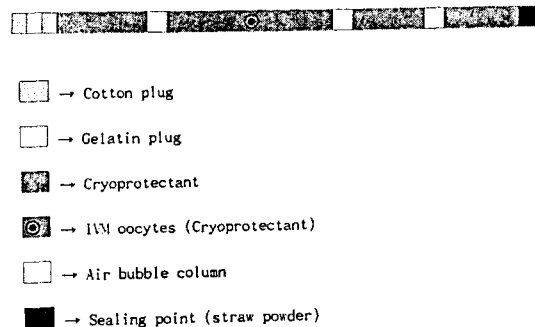


Fig. 1. Diagrammatic representation of 0.25-ml plastic straw loaded with solution and IVM oocytes for slow freezing method.

3) 동결방법

Otoi 등(1993), Hamano 등(1992)의 방법에 따라 성숙 난포란을 hyaluronidase(150IU/ml)에서 micropipette을 이용하여 난구세포층을 1~2층 정도 제거한 후 각 기본 stock solution에서 3회 정도 세척하고, 동결 medium과 M 농도에 따라 3단계에 걸쳐 평형시킨 후 동결을 시작하였다. 즉 ① 각각의 stock solution에 0.25M를 첨가한 다음 10분간 정치하고, ② 각각의 stock solution에 0.5M를 첨가한 후 10분간 정치하고 ③ 각각의 stock solution에 1.0M

를 첨가한 후 10분간 정치하였다. 이때 마지막 3번째 단계에서 10분간 정치하는 동안 straw내에 성숙 난포란을 끝이 긴 micropipette를 이용하여 주입하였다. 성숙난포란의 주입이 끝난 straw는 polyvinyl alcohol(sealing powder)로 straw의 끝부분을 봉입하였다. 이때 기본 stock solution의 종류나 동결 medium의 종류 등에 따라 유색의 sealing powder를 이용하여 표시하고 날짜와 난포란의 갯수도 기입하여 명확히 구분할 수 있도록 하였다.

완전하게 제작된 straw는 Otoi 등(1993), Lim 등(1991)의 방법에 따라 완만동결법으로 미리 program이 입력되어 있는 Cell Freezer(Planner, England)를 이용하여 실온에서 0℃까지 냉각시키고, 0℃에서 난포란이 주입되어 있는 straw를 Cell Freezer의 chamber에 넣어 0℃에서 -5.5℃까지 -1℃/min의 속도로 예비냉각을 실시한 후 -5.5℃에서 manual seeding에 따라 5초간 식빙(seeding)을 실시하였다. 이때 seeding 온도의 안정화를 위해 5분간의 soak time을 준다. 식빙이 끝난 후 다시 -30℃까지 -0.6℃/min의 속도로 완만동결을 실시하였다. Cell Freezer의 program에 의해 동결이 끝난 straw는 액체질소(-196℃)에 옮겨 침적하였다.

4) 용해방법

동결난포란을 용해하기 전에 동결에 사용했던 배지의 종류를 잘 구분하여 사용하였다. 동결보존된 straw를 액체질소에서 꺼낸 후 상온에서 약 5초간 대기한 후 37℃ 항온수조에 침적시켜 약 30초간 용해를 실시하였다. 이렇게 용해한 straw는 양쪽 끝부분을 cutting scissors로 절단한 다음 동결배지의 종류에 따라 각각의 stock solution에 1.0M, 0.5M, 0.25M 동결 medium이 첨가된 4 well dish에 동결난포란을 유출시켜 동결방법의 역순으로 3단계에 걸쳐서 각 단계별로 10분씩 정치하여 충분히 희석시켰다. 그리고 각각의 stock solution에 3~4회 정도 깨끗이 세척하여 잔여 동결보호제를 완전히 제거하였다.

5. 동결난포란의 생사 판정

동결·용해한 성숙난포란의 생존성 검사는 형태학적 판정방법과 FDA test 실시하여 확인하였다.

먼저 형태학적 판정방법은 Otoi 등(1993)의 방법에 따라 난포란의 형태가 균일하고 세포질이 충만하며 난구세포가 잘 부착되어 있는 것은 생존한 것으로 판정하였고 그 밖에는 퇴화된 것으로 판정하였다.

FDA 염색액 제조법은 Trounson 등(1980), Niemann 등(1983), Didion 등(1990)의 방법에 따라 acetone 1ml에 FDA(sigma, USA) 5mg을 녹여 stock solution을 제조하여 알루미늄 호일로 sealing하여 빛을 차단시키고 냉장보관하였다가, 사용 직전에 stock solution 5 μ l를 10ml의 m-PBS에 희석하여 working solution으로 사용하였다.

FDA 염색방법은 동결 용해한 성숙난포란 중 cumulus cell이 붙어 있는 난자를 hyaluronidase (150IU/ml)로 처리하여 cumulus cell를 완전히 제거하였다. 그리고 slide glass위에 난자를 놓고 그 위에 100~200 μ l working solution의 droplet를 만들어 4분 동안 37℃ incubator에 배양한다. 배양이 끝난 후 난자를 덮고 있는 working solution을 최대한 제거한 후, 다시 난자 바로 위에 고정액을 떨어뜨리고 cover glass로 고정시켰다. 그리고 형광 현미경 200~400배의 배율하에서 생사를 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 난포란의 채란과 체외성숙

난포란은 난소에서 20 gauge needle을 이용하여 2~5mm 정도의 중난포에서 채란하였고, 투명대에 부착된 난구세포층의 유무와 상태에 따라 난구세포층이 난자를 조밀하게 둘러싸고 있는 난포란을 Grade A, A와 유사하지만 난구세포층의 일부가 박리된 부분적 裸化난자를 Grade B, 완전히 裸化한 난자와 난구세포층이 雲霧狀으로 투명대 부착이 원만하지 못한 난자를 Grade C로 분류하는 花田(1985)의 방법에 준하여 체외성숙시킨 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

본 실험에서 사용된 총 난포란은 1,343개이고 난포란의 상태와 난구세포의 팽화 정도에 따라 4등급으로 나누어 체외성숙시킨 결과 Grade A에서는 263개의 난포란 중 232개, Grade B는 410개 중 258개, Grade C는 670개의 난자 중 139개였고, 각 Group에서 나타난 성숙율이 88.2, 62.9, 20.7%로서

Table 1. *In vitro*-maturation rate of bovine follicular oocytes

Morphological Grade* of oocytes	No. of oocytes		Maturation rate, %
	Examined	Matured	
A	263	232	88.2
B	410	258	62.9
C	670	139	20.7

* Grade A: Cumulus-enclosed oocytes, completely
 B: Corona-enclosed oocytes
 C: Denuded oocytes, nearly or incompletely

난구세포가 치밀한 난포란일수록 성숙율이 높았다. 한편 소 난포란의 체외성숙배양시 난구세포의 존재는 성숙율에는 크게 영향을 미치지 않으나 수정을 및 전핵 형성율이 향상되며 (Fukui와 Sakuma, 1980; Lenz 등, 1983) 체외성숙시 난구세포가 치밀하게 부착된 난자가 가장 좋은 발생능을 얻는다(Yang와 Lu, 1990). 이로 미루어 볼 때, 미성숙난포란은 형태학적 분류를 통해 선별하여 배양하는 것이 체외성숙율의 향상면에 바람직한 것으로 사료된다. 따라서 난포란의 동결실험에서는 체외성숙된 난포란 중 정상적인 형태를 가진 Grade A, B를 이용하였다.

2. 성숙난포란의 동결성

성숙난포란의 동결성을 구명하고자 동결보존액

의 종류와 기본 medium의 종류에 따라 실험하였고 그 결과는 Table 2와 같다.

Otoi 등(1993)의 방법에 따라 동결·용해하여 1M glycerol에서 m-PBS를 기본배지로 사용한 경우에는 61%(n=105)로 TCM-199를 기본 배지로 사용한 경우 48%(n=62)보다 높은 결과를 나타내었다. 또한 PROH에서도 glycerol의 경우와 마찬가지로 m-PBS에서 68%(n=112)였고, TCM-199에서는 42%(n=57)의 결과를 얻었다. 그러므로 이는 동결보존액 제조시 가장 기본이 되는 stock solution의 종류가 성숙난포란의 동결성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

또한 m-PBS를 기본 배지로 사용하여 동결보존제의 종류에 따라 동결성을 실험한 결과, glycerol의 경우에는 동결 용해한 난자 261개 중 56%(n=167)가 생존하였으며, PROH은 258개 중 57%(n=169)의 생존성을 나타내었다. 이와 같이 PROH이 glycerol보다 약간 높은 결과를 얻었다. 이는 Otoi 등(1993)이 PROH의 경우 22.4%, Glycerol의 경우 20.6%의 동결 용해 성숙난포란의 생존율을 보인 것과 유사한 결과이다.

3. 동결난포란의 생존성

동결보호제가 다른 동결보존액에서 성숙난포란의 동결 용해후 생존성을 형태학적 관점과 FDA 염색법을 이용하여 생사판정한 결과는 Table 3, 4와

Table 2. Effect of freezing medium and cryoprotectant on morphological viability of oocytes matured *in vitro*

Cryoprotectant (1.0 M)	Medium	No. of IVM oocytes			% of normal oocytes	
		Frozen (a)	Recovered (b)	Normal (c)	c/a	c/b
Glycerol	TCM199	129	103	62	48	60
	m-PBS	172	158	105	61	66
	Total	301	261	167	56	64
PROH	TCM199	135	117	57	42 ^a	49 ^a
	m-PBS	164	141	112	68 ^b	79 ^b
	Total	299	258	169	57	66

Survival of oocytes after freeze-thaw were defined by observation of dark evenly granulated cytoplasm and irregular shaped oocytes with dark yellow cytoplasm were defined as degenerated.

Cumulus cell-expanded mature oocytes after 24-h IVM were removed their cumulus cells to 1~3 layers by hyaluronidase and pipetting before freezing.

^{a, b} Different superscript within column is significant difference using Chi-square test (P<0.05).

Table 3. Percentage of morphologically normal IVM oocytes after thawing

Cryoprotectant in m-PBS (1.0 M)	No. of straws	No. of frozen oocytes	No. (%) of morphologically normal oocytes
Glycerol	12	46	18 (39)
PROH	15	60	39 (65)

Table 4. Survival of frozen oocytes based on fluorescein diacetate stain after thawing

Cryoprotectant in m-PBS (1.0 M)	No. of frozen oocytes	No. (%) of normal oocytes in FDA test*		
		Positive	Partially	Negative
Glycerol	46	11 (24)	17 (37)	18 (39)
PROH	60	25 (42)	13 (32)	22 (37)

* FDA-Positive : very bright and uniform fluorescein within cells

FDA-Partially : bright or pale and uniform or patchy fluorescein within cells

FDA-Negative : no fluorescein visible

같다.

동결보호제인 glycerol과 PROH에서의 생존성을 형태학적으로 판정하였을 때 glycerol의 경우 총 46개의 동결 용해한 난포란 중 18개(39%), PROH의 경우 총 60개의 난포란 중 39개(65%)로 PROH로 다소 높은 생존성을 보여 주었으며, 이 결과는 Otoi 등(1993), Hernandex-Ledezma 등(1989)의 보고에서와 같이 유사한 결과를 나타내었다.

그리고 FDA 염색법을 통한 생존성은 Table 4와 같이 Positive, Partially, Negative의 3등급으로 분류하여 판정하였으며, glycerol과 PROH의 경우 각각 FDA-positive 24%, 42%, Partially 37%, 22%, FDA-negative 39%, 37%로 Partially에서는 glycerol이 다소 높은 결과를 나타냈으나, PROH의 경우 Positive가 높은 결과를 얻었으며, 이는 형태학적 판정과 마찬가지로 PROH이 glycerol보다 동결보존액으로 적합하다고 사료된다. 한편 FDA에 의한 생존성의 판정결과가 Al-Hasani 등(1986)이 토끼의 미성숙난포란 동결에서 생사판정의 방법으로 이용 가능함을 확인할 수 있었으며, Mohr와 Trounson (1980)도 세포의 생화학적 활성을 분석하는데 독성이 없는 유용한 재료임을 지적한 바 있다. 그러나 이러한 생존성의 판정방법은 다소 주관적인 판단에 기초하고 있기 때문에 정확도를 더욱 높이기 위해서 앞으로 개선하여야 할 문제가 많이 있는 것으로 사료되었다.

적 요

본 연구는 한우 난포란을 이용하여 체외성숙을 유도하기 위하여 도축우의 난소로부터 채란한 난포란을 Grade A, B, C으로 구분하여 체외배양시켜 체외성숙을 조사하였고, 그 중 성숙난포란의 상태가 좋은 A, B급만 동결에 이용하였으며, 성숙난포란의 동결보존을 위하여 기본배양액 및 동결보호제가 난포란의 생존성에 미치는 영향과 동결·용해한 성숙난포란의 생존성 검사를 위해 형태학적 판정과 FDA 염색법을 이용하여 조사하였다.

1. 회수한 난포란을 24시간 전 배양시킨 결과 Grade A와 B에서 88.2%과 62.9%, Grade C에서는 20.7%의 성숙율을 보였다.
2. 성숙난포란의 동결성을 구명하고자 동결보존액의 종류와 기본 medium의 종류에 따라 동결·용해하여 1M glycerol에서 m-PBS을 기본 배지로 사용한 경우에는 61% (n=105)로 TCM-199을 기본 배지로 사용한 경우 48% (n=62)보다 높은 결과를 나타내었다. 또한 PROH에서도 glycerol의 경우와 마찬가지로 m-PBS에서 68%(n=112)였고, TCM-199에서는 42%(n=57)의 결과를 얻었다. 그러므로 이는 동결보존액 제조시 가장 기본이 되는 stock solution의 종류가 성숙난포란의 동결성에 영

향을 미치는 것으로 사료된다.

3. 위의 결과를 토대로 stock solution은 m-PBS를 기본 배지로 사용하여 동결보존제의 종류에 따라 동결성을 실험하였는데, glycerol의 경우에는 동결 용해한 난자 261개 중 56% (n=167)가 생존하였으며, PROH은 258개 중 57% (n=169)의 생존성을 나타내었다. 이와 같이 PROH이 glycerol보다 약간 높은 결과를 얻었다.
4. 동결보호제가 다른 동결보존액에서 성숙난포란의 동결 용해후 생존성을 형태학적 판정법을 이용하여 생사판정한 결과, 동결보호제인 glycerol과 PROH에서의 생존성을 형태학적으로 판정하였을 때 glycerol의 경우 총 46개의 동결 용해한 난포란 중 18개 (39%), PROH의 경우 총 60개의 난포란 중 39개 (65%)로 PROH이 다소 높은 생존성을 보여 주었다.
5. FDA 염색법을 통한 생존성은 Positive, Partially, Negative의 3등급으로 분류하여 판정하였으며, glycerol과 PROH의 경우 각각 FDA-Positive 24%, 42%, Partially 37%, 22%, FDA-Negative 39%, 37%로 Partiality에서는 glycerol이 다소 높은 결과를 나타냈으나, PROH의 경우 Positive가 높은 결과를 얻었으며, 이는 형태학적 판정과 마찬가지로 PROH이 glycerol보다 성숙난포란의 동결보존액으로 적합하다고 사료된다.

결론적으로 완만동결법에 의해서 성숙 난포란은 동결보존이 가능하며 본 실험에서 사용된 방법은 다양한 난자의 공급경로에 매우 중요한 역할을 할 것으로 기대되며, 아울러 돼지, 토끼, 산양 등과 같은 가축은 물론 사람에게 있어서도 이용 가능성이 증가함에 따라 적용범위를 확대할 수 있게 되었다.

참고문헌

- Al-Hasani S, Tolksdorf A, Diedrich K, van der ven H and Krebs D. 1989. Successful *in vitro* fertilization of frozen thawed rabbit oocytes. Human Reprod., 1:309-312.
- Al-Hasanis S, Kirsch J, Diedrich K, Blanke S, van der Ven H and Krebs D. 1986. Successful embryo transfer of cryopreserved and *in vitro* fertilized rabbit oocytes. Human Reprod., 4(1):77-79.
- Al-Hasanis S, Diedrich K, van der ven H, Reinicke A, Hartje M and Krebs D. 1987. Cryopreservation of human oocytes. Human Reprod., 2:695-700.
- Chen C. 1986. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet 1(19):884-886.
- Fleming AD, Yanagimachi R and Yangimachi H. 1979. Fertilizability of cryopreserved zona-free hamster ova. Gamete Res., 2, 357-366.
- Friedler S, Giudice LC and Lamb EJ. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil. Steril., 49:743-764.
- Fukui Y and Sakuma Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: Relation to ovarian activity, follicular size, and the presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod., 22:669-673.
- Hamano S, Koikeda A, Kuwayama M and Nagai M. 1992. Full-term development of *in vitro*-matured and vitrified and fertilized bovine oocytes. Theriogenology, 38:1085-1090.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1981. Effect of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen mouse embryos. J. Reprod. Fert., 63, 175-180.
- Kim JK, Lee KH, Kang MJ, Kim YH, Oh UY and Kang MS. 1988. Studies of simplified procedures for freezing and thawing of bovine embryos. V. Effects of the glycerol cryoprotectants containing sucrose on the mouse embryo survival rate determined by FDA test. Korean J. Anim. Reprod., 12: 70-76.
- Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa H, Kato K and Ogawa S. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification met-

- hod. *Theriogenology*, 33:777-788.
- Kono T, Kwon OY and Nakahara T. 1991. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. *Cryobiology*, 28:50-54.
- Leibo SP and Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:81-94.
- Lim JM, Fukui Y and Ono H. 1991. The post-thaw development capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 35:1225-1235.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL and First NL. 1983. *In vitro*-maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. *Biol. Reprod.*, 29:173-179.
- Otoi T, Tachikawa S, Kondo S and Suzuki T. 1992. Developmental Capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation *in vitro* and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes. *Theriogenology*, 38:711-719.
- Otoi T, Ogura T, Tachikawa S, Kitamura S and Suzuki T. 1993. Deep freezing of bovine oocytes using different cryoprotectants. *Theriogenology*, 39:275.
- Otoi T, Tachikawa S, Kondo S and Suzuki T. 1993. Developmental capacity of bovine oocytes frozen of different cryoprotectants. *Theriogenology*, 40:801-807.
- Parkening A, Tsunoda Y and Lang MC. 1976. Effect of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Exp. Zool.* 197, 369-374.
- Quinn P, Barros C and Whittingham DG. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66, 161-168.
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:237-245.
- Schellander K, Brackett BG, Fuhrer F and Schleger W. 1988. *In vitro* fertilization of frozen-thawed cattle oocytes. Proc. 11th. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem. June 26~30. Dublin, Ireland. Vol. I. p. 349 (Abst.)
- Schmidt M, Hyttle P, Greve T and Avery B. 1993. Ultrastructure of frozen/thawed bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology*, 39:304.
- Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE and Eppig JJ. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 89:43-50.
- Shaw PW, Brnarde AG, Fuller BJ, Hunter JH and Shaw RW. 1992. Vitrification of oocytes using short cyroprotectant exposure: Effects of varying exposure times on survival. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:210-214.
- Surrey ES and Quinn PJ. 1990. Successful ultrarapid freezing of unfertilized oocytes. *J. IVF & ET*, 7, 262-266.
- Suzuki T and Nishikata Y. 1992. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. *Theriogenology*, 37:306.
- Taha TA and Schellander K. 1992. Developmental capacity of immature and *in vitro* matured bovine oocytes after exposure to vitrification solution. *Theriogenology*, 37:307.
- Takeda T, Elsdon RP and Seide GE. 1985. Survival of cryopreserved bovine embryos cooled at 0.5 or 1°C /min. *Theriogenology*, 23:232.
- Tsunoda Y, Parkening TA and Lang MC. 1976. *In vitro* fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing, *Experientia* 32:223-224.

- Whittingham DG. 1977. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C . J. Reprod. Fert., 49, 89-94.
- Yang NS, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1992. Vitriification of bovine blastocysts produced *in vitro*. Theriogenology, 37:326.
- Yang YB and Lu KH. 1990. The influence of bovine oocytes type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*. Theriogenology, 33:355(Abstr.).
- 花田章. 1985. 牛 卵胞內 未熟卵子からろ 受精卵生産. 臨床獸醫, 3(9):71-75.
- 孔一根, 1994. 韓牛 卵胞卵의 體外受精과 受精卵移植의 凍結保存에 關한 研究. 慶尙大學校 博士學位論文.
- 金昌根, 鄭英彩, 朴在元, 宋海範. 1988. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精能力에 關한 研究. 韓國畜産學會誌, 30:224-232.
- 金昌根, 鄭英彩, 尹鍾澤, 崔善昊, 柳範龍, 鄭光朝, 金興律, 宋海範. 1990. 소의 體外成熟 卵胞卵의 體外受精과 發生에 關한 研究. 韓國畜産學會誌, 32(1):27-36.
- 오강택, 이중환, 박기상, 최승철, 유형진, 이상호. 1993. 동결보존 소 난포란의 체외성숙 및 치너 발생. 한국수정란이식학회지, 8(2):133-138.
- 이장희. 1993. 돼지 난포란의 동결보존과 체외수정에 관한 연구. 중앙대학교 박사학위논문.
- 鄭英彩, 金昌根, 柳範龍, 尹鍾澤, 金亨泰, 李揆丞. 1990. 家畜의 改良 및 繁殖效率 增進에 關한 研究. VI. 소에 있어서 體外受精 卵胞卵의 發生能向上에 關한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 14(1):73-83.