

동결-용해된 돼지난포란의 생존성에 대한 항동해제와 평형시간의 영향

이장희 · 김창근* · 박충생**
축산기술연구소 종축개량부

Effects of Cryoprotectants and Equilibration Time on the Viability of Frozen-thawed Porcine Oocytes

J. H. Lee, C. K. Kim* and C. S. Park**

*Department of Livestock Improvement,
National Livestock Research Institute*

SUMMARY

This study was undertaken in an effort to develop a cryopreservation system of immature and mature porcine oocytes. For this aim, the experiments were designed to examine the effect of cryoprotectants and equilibration time on the viability of frozen-thawed oocytes by using trypan blue(TB) and fluorescense diacetate(FDA) test.

The viability of frozen immature oocytes evaluated by TB test was slightly higher than that of frozen mature oocytes. The viability(25.0%) after IVM of frozen-thawed immature oocytes greatly decreased that(42.9%) of oocytes just after thawing, but it was higher than frozen-thawed mature oocytes(15.8%). When immature oocytes were equilibrated for 10, 20 and 30 minutes before freezing the oocyte viability was 20.0, 31.3 and 42.9%, respectively. There was a tendency for long equilibration before oocyte freezing to be more effective for the immature oocytes and a short equilibration time for mature oocytes. Although there was no difference in viability index of frozen oocytes between the viability test methods, the index of TB test was slightly higher than that of FDA test. The viability(FDA test) of frozen-immature oocytes with 3 different crtoprotectants was 22.2% for propylene glycol(PG), 9.3% for polyehylene glycol(PEG) and 65.6% for PG+PEG, in which PG+PEG was more protective against freezing effect.

(Key words : cryoprotectants, equilibration time, viability, cryopreservation, porcine)

서 론

난자는 정자의 수정능을 시험하기 위한 수단외
제공과 핵치환을 위한 수핵란으로서 매우 중요한
역할을 하는 바 난자의 동결은 장기보존을 통한 대

량확보의 수단으로 최근 여러 동물에서 관심이 고
조되고 있다.

가축에 있어서 난자의 동결은 소(Schellander
등, 1988; Otoi 등, 1993; Im 등, 1997), 돼지
(Didion 등, 1990; Rubinsky 등, 1991), 토끼
(Al-Hasani 등, 1989)에서 이루어 왔으며, 소의 경

* 중앙대학교 산업대학(College of Industrial Studies, Chung-Ang University)
** 경상대학교 농과대학 (College of Agriculture, Gyeongsang National University)

우 동결-난자로부터 체외수정후 산자생산에까지 성공적으로 이루어졌다(Fuku 등, 1992).

일반적으로 난자의 동결도 수정란과 마찬가지로 동결보호제의 처리 및 동결 용해후 동결보호제를 제거시키는 일련의 과정을 기본 방법으로 이용하고 있으나 수정란의 경우보다 동결에 더 민감하여 세포채질, 방추사, 난황막, 투명대 및 피층과립의 파괴때문에 용해후 발생율이 아직도 매우 낮은 실정이다(Glenister 등, 1987; Parks와 Ruffing, 1992). 난자의 동결은 성숙(Schmidt 등, 1993; Lim 등, 1991; Leibo, 1977) 또는 미성숙단계(Suzuki와 Nishikata, 1992; Van Blerkom, 1989)에서 행하여지고 있으나 이들 난자의 동결성에 대한 연구결과가 보고자간에 차이가 많다. 성숙난포란의 동결시 Rall(1992), Hamlett 등(1989)은 동결보호제에 노출되고 냉각되는 동안 metaphase 단계에서 방추사와 피층과립의 파괴에 따른 손상을 보고하였고, 미성숙 난포란의 동결시 Van Blerkom(1989)은 비정상적인 성상체(aster)의 형성으로 방추사의 수적인 감소가 일어나는 것으로 보고하였다. 난자동결도 수정란동결과 마찬가지로 동결전 배양액에 동결보호제를 첨가하는 방법과 난자를 일정시간 동결보존액에 정치하는 평형시간에 따라 영향을 받는 것으로 보고되어 있다. 이를 위해 Mazur(1970)는 동결과정에서 세포치사의 주된 요인이 세포내 빙정형성이기 때문에 적정 평형시간이 필요하다고 하였고, Willadsen 등(1976)은 단계적인 첨가 및 회석방법을 사용함으로써 삼투압영향과 화학적 독성의 영향을 최소화할 수 있다고 하였다. 난자 동결시의 평형시간에 관해서 Taha와 Schellander(1992)는 소에서 미성숙난포란이 체외성숙난포란보다 평형시간이 짧아야 하는 것으로 보고하였다. 그러나 아직까지 돼지 동결-난자로부터 산자생산이 성공된 예가 없으며 발생율도 극히 저조한 실정이다(Otoi 등, 1993; Rubinsky 등, 1991).

한편 난자 및 수정란의 생존성을 판정하는 방법으로 FDA염색기법이 사용되어져 왔으며(Kim 등, 1988; Noto 등, 1991), 돼지에서는 Didion 등(1990), Yoshida 등(1993) 및 Wang 등(1997)이 동결된 난포란의 생존성을 trypan blue 및 형광염색법으로 판정하여 왔다.

따라서 본 연구에서는 돼지 난포란의 동결시 미성숙 또는 체외성숙난포란의 내동성, 평형시간 및 동결보호제에 따른 생존성을 염색기법과 체외발생을 통하여 조사하고 효과적인 난포란의 장기 보존방법을 모색하여 동결난포란으로부터 체외수정란의 생산 가능성을 제시하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시난자

본 실험에 공시된 난포란은 도축장에서 도살직후 난포기의 난소로부터 적출하여 inverted microscope(Olympus SZ-PT, Japan)하에서 난구세포층이 충분한 난자-난구세포 complex만을 선별하여 공시하였다.

2. 난포란의 동결보존 및 융해

1) 동결보존액의 제조

기본 동결보존액은 Yang 등(1992)의 방법에 따라 제조하였다. 평형용보존액으로는 Kobayashi 등(1990)과 Yang 등(1992)의 방법에 따라 기본 배양액에 각각 10% glycerol(G) + 20% propylene glycol(PG ; Sigma, USA)를 첨가하였고, 동결용보존액으로는 25% glycerol용액에 각각 25%의 PG, PEG 또는 PG+PEG를 첨가하여 제조하였다. 또한 용해후 동결보호제 제거용 회석액은 기본 배양액에 0.25 및 1.0 M의 sucrose용액을 사용하였다.

2) Straw내 분주와 봉인

포장방법은 Schiewe 등(1991)과 Kobayashi 등(1990)의 방법에 따라 동결보존액과 sucrose 용액의 혼합방지를 위해 double air층을 두고 0.25-ml straw(I.M.V., France)제작의 균일성과 난포란의 장진을 쉽게 하기 위하여 Fig. 1과 같이 제작하였다.

3) 동결방법

Yang 등(1992)의 동결방법에 준하되 성숙 및 미성숙 난포란을 상온에서 다음과 같이 실시하였다.

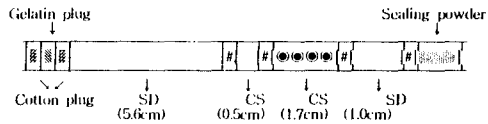


Fig. 1. Diagrammatic representation of 0.25-ml plastic straw(IMV, France) loaded with freezing solution and oocytes for freezing.

SD = sucrose diluent column(1.0M)

CS = cryoprotective solution column with or without oocytes

= air bubble column(0.5cm)

⊙ = oocytes in cryoprotective solution

즉 동결시킬 난자를 ① 10% G + 20% PG에 10, 20 또는 30분간 평형시킨 후 끝이 긴 micropipette을 이용하여 평형된 난포란을 미리 용해하여 준비해둔 straw내의 동결보존용 25% G + 25% PG용액, 25% G + 25% PEG용액 또는 25% G + 25% PEG용액내에 장진하였다. 난포란의 장진이 끝난 straw는 polyvinyl alcohol(sealing powder)로 봉인하고 4℃ 냉장고에 10~30분 정도 정지한 후 Smorag 와 Gajda(1991)의 방법과 같이 액체질소 표면 약 5cm 위에서 5분간 수직으로 정지하여 예비동결시킨 다음 액체질소내로 침지시켜 동결하였다.

4) 용해 및 동해보호제의 제거

동결된 straw를 20℃ 수조에서 10초 간 용해시켰다. 용해된 straw의 내용물 전부를 petri dish (35mm × 5mm, Falcon, USA)에 쏟아 부어 10분간 정지한 다음 0.25M sucrose용액으로 옮겨 5분간 정지하고 기본 배양액으로 2~3회 세척하여 2단계 회석법으로 동결보호제를 제거하였다.

5) 생사 판정

동결 난포란의 생존성은 용해후 2시간동안 배양시킨 후 Didion 등(1990)의 방법에 따라 0.05% trypan blue(Shinyo, Japan) 용액에 10분간 정지시키거나 10μg/ml의 FDA(fluorescent diacetate; 10μg/ml)용액에 2분간 정지시킨 다음 PBS로 3~4회 세척하여 10분 이내에 inverted microscope(Nicon, Japan)하에서 40배 또는 100배로 검사하였다.

FDA용액은 암실에서 stock solution(FDA 5mg/ml acetone sol.)을 제조한 후 빛을 차단하기 위하여 알루미늄 호일로 sealing하여 냉동고(-20℃)에 보관 하였다가 사용직전에 stock solution 10μl를 10ml의 D-PBS에 희석하여 사용하였다. 생존정도는 Fig. 2 및 Fig. 3에서 보는 바와 같이 1(세포질과 난구세포가 모두 죽은 난포란), 2(죽은 세포질과 살아있는 난구세포를 가진 난포란 또는 살아있는 세포질과 죽은 난구세포를 가진 난포란) 및 3(세포질과 난구세포가 모두 살아있는 난포란)으로 구분

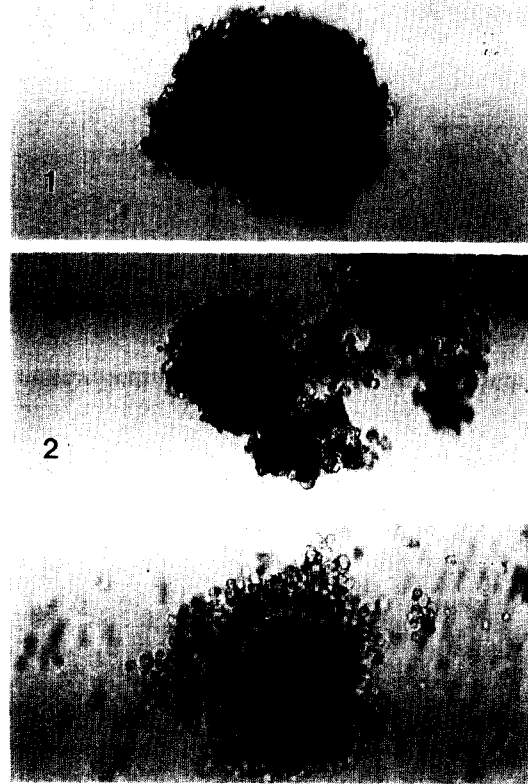


Fig. 2. Degree of viability(TB test) after freezing of oocytes.

Degree 1 : Oocytes with nonviable cytoplasm and cumulus cells.

2 : Oocytes with nonviable cytoplasm and viable cumulus cells or with viable cytoplasm and nonviable cumulus cells.

3 : Oocytes with viable cytoplasm and cumulus cells(×100)

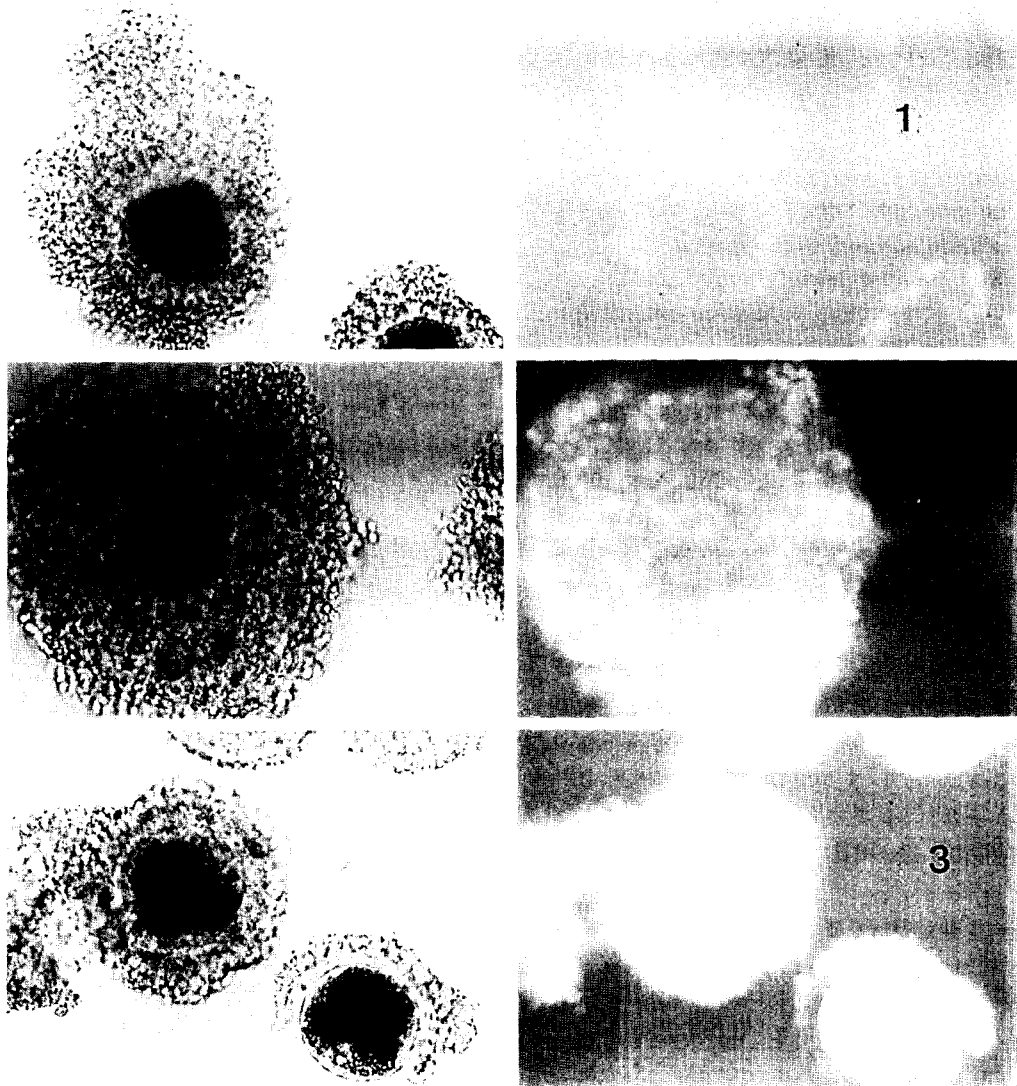


Fig. 3. Degree of viability(TB test) after freezing of oocytes.

Degree 1 : Oocytes with nonviable cytoplasm and cumulus cells.

2 : Oocytes with nonviable cytoplasm and viable cumulus cells or with viable cytoplasm and nonviable cumulus cells.

3 : Oocytes with viable cytoplasm and cumulus cells(×100)

하고 처리별 평균값을 생존지수(VI;viavility index)로 표시하였다. 이때 생존지수는 생존정도(D_i ; $i = 1, 2$ 및 3)를 1, 2 및 3의 값으로 정하고 생존 정도에 대한 빈도(F_i)에 대해서 공식,

$$VI = \frac{\sum D_i F_i}{\sum F_i}$$

으로 구하였다.

6) 통계분석

실험결과의 통계분석은 Minitab statistical sof-

twere(Minitab, New York, 1985)의 일반선행모델을 사용하여 student's t-test로 유의성 검정을 실시하였으며 수정란의 난할율은 χ^2 -test로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1) 체외성숙 전후(前後)동결난포란의 생존성

채란직후의 미성숙난포란과 42시간동안 체외성숙시킨 성숙난포란을 Kobayashi 등(1990)의 방법에 따라 동결-융해하여 trypan blue(0.05%) 용액으로 염색하여 생존정도(Di)를 Fig. 2에서와 같이 1, 2 및 3의 값으로 정하고 생존정도에 대한 빈도(Fi)에 대해서 생존성을 생존지수(VI; viability index)로 표시하였을 때 동결융해직후의 미성숙난포란, 동결융해후 체외성숙된 성숙난포란 및 체외성숙후 동결융해된 성숙난포란의 생존지수는 Table 1과 같다.

동결융해된 미성숙난포란의 융해직후와 42시간

동안 성숙배양후의 생존지수는 각각 2.14와 2.08로서 융해직후의 생존지수가 다소 높게 나타났으나 생존지수가 3을 보인 난자의 비율은 42.9와 25%로 차이가 매우 컸다. 또한 42시간 체외성숙후 동결융해된 성숙난포란의 생존지수와 생존율은 각각 1.63과 15.8%로 미성숙란의 동결융해후 체외성숙보다 낮았다.

이와 같은 결과는 Didion 등(1990)이 돼지 미성숙난포란을 동결융해직후 trypan blue 염색에서 세포질과 난구세포가 모두 살아있는 난포란이 전혀 없었고, 난구세포만 살아있는 난포란이 53%, 세포질과 난구세포가 모두 죽은 난포란이 47%로 생존성이 거의 없다고 보고한 결과보다는 본 실험의 생존성이 매우 높았다. 그러나 소에서 Schellander 등(1988)은 미성숙난포란의 동결융해후 생존율이 88.9%로 매우 높다고 하였다. 또한 Schroeder 등(1990)은 생쥐에서 배란난자와 난핵포기의 난포란의 동결융해에서 형태적으로 정상인 난자의 비율이 배란난자 즉 성숙난자에서 훨씬 높았다고 하였다.

Table 1. Viability of frozen-thawed mature and immature oocytes

Condition of oocytes	No. of oocytes examined	Degree ¹⁾ of viability(TB test)			
		1	2	3(%)	VI ²⁾
Unfrozen oocytes	49	3	7	39(79.6)	2.73
Frozen-thawed immature oocytes	14	4	4	6(42.9)	2.14
Matured oocytes after thawing	12	2	7	3(25.0)	2.08
Frozen-thawed mature oocytes ³⁾	57	31	17	9(15.8)	1.63

1) Degree of viability was assessed according to a subjective lightness and darkness from "1"(nonviable oocyte) to "3"(viable oocyte) by method modified Didion et al. (1990).

2) VI (viability index) was defined as follows:

$$VI = \frac{\sum D_i F_i}{\sum F_i}$$

Where, D_i : ith value for degree of viability, i = 1, 2, 3.

F_i : frequency corresponding to D_i.

Degree 1 : Oocytes with nonviable cytoplasm and cumulus cells;

2 : Oocytes with nonviable cytoplasm and viable cumulus cells or with viable cytoplasm and nonviable cumulus cells;

3 : Oocytes with viable cytoplasm and cumulus cells.

3) Frozen-thawed oocytes were cultured for 42hrs in maturation medium containing hCG(10IU/ml) and PMMSG(10IU/ml) before vitrification.

특히 Glenister 등(1987)은 난포란의 동결에서 polyploid의 발생빈도가 비동결 난포란보다 2배 정도 높다고 하였다. Kono 등(1991)은 생쥐 난포란을 vitrification 으로 동결하였을 때 83%의 정상형태의 유지가 가능하였으며, Mandelbaum 등(1987)은 사람에서 성숙난자가 미성숙난자보다 동결융해후 생존성이 2배 정도 높았다고 하였다.

이와 같이 타동물에서 보고된 연구결과와 비교하여 볼 때 본 실험의 결과는 이들과 차이를 보였을 뿐만 아니라 생존율에 있어서도 매우 낮은 수준이었다. 그러나 미성숙난포란의 동결에서는 감수분열시 방추사의 손상을 줄일 수 있으며(Friedler 등, 1988), aneuploid의 발생빈도가 낮다는 보고(Van blerkorn, 1991)가 있기 때문에 앞으로 미성숙난포란의 동결은 수정란의 체외생산기술 개발과 이용에 있어서 주요한 연구과제로 사료된다.

2) 평형시간과 생존성

성숙 또는 미성숙난포란의 동결시 10% glycerol + 20% propylene glycol이 들어 있는 평형 보온액에서 10, 20 및 30분간 평형하였을 때 평형시간에 따른 동결융해후의 생존성은 Table 2와 같다.

융해후 생존지수가 체외성숙난포란보다 미성숙난포란에서 모든 평형시간에 대해 다소 높게 나타났으며 미성숙난포란에서는 30분간의 평형시간의 경우 생존성이 다소 높아 평형시간이 길어질수록 생존성도 다소 높아지는 경향을 보였다. 그러나 체외성숙난포란에서는 짧은 평형기간에서 생존성이 높게 나타났다. 한편 생존정도 3을 보인 난자의 비

율은 성숙난포란의 경우에는 평형시간간에 큰 차이가 없었으나 미성숙난포란의 경우에는 현저한 차이가 있었다.

이와 같은 결과는 Shaw 등(1991)이 생쥐의 배란된 난자에서 평형시간이 짧을수록 생존율이 높았던 결과와 유사한 경향을 보여 주었다. 그러나 생쥐에서 Friedler 등(1987)은 vitirification(VS1)동결으로 동결할 때 5~30분간의 평형시간 비교에서 10분간 평형이 가장 생존성이 높다고 하였으며, Gajda와 Smorag(1993)도 토끼 1~2세포기 수정란의 동결에서 10분간 평형이 생존이 높았다고 하였다. 그러나 이들에 대한 생존성이 사용된 vitrification 용액에 따라 차이가 있을 뿐만 아니라 평형시간의 효과도 일정하지 않음을 제시해주고 있다.

한편 vitirification용액의 농도와 평형시간에 대해서 妹尾 등(1981)과 Takahashi와 Kanagawa(1990)은 최적의 평형시간 즉 수정란의 최소용적 도달시기가 동물종에 따라 다르다고 한 바 있다. 그러나 돼지난포란의 경우에는 소와 토끼 등 다른 가축에 비해 세포질내의 지방층이 과다하여 1-2propypanediol 및 glycerol 등과 같이 침투성동결보호제가 세포내 탈수작용을 일으키는데에 소요되는 시간이 다소 길기 때문으로 사료된다.

3) 동결보호제와 생존성

동결보호제로써 propylene glycol(PG), polyethylene glycol(PEG) 및 PG+PEG를 사용하여 미성숙난포란을 동결하고 융해후 생존 정도를 FDA 와 trypan blue염색하여 생존지수로 나타내었을 때

Table 2. Effect of equilibration time on viability of frozen-thawed mature and immature oocytes

Oocytes	Equilibration time(min.)	No. of oocytes		Degree of viability (TB test)			
		Frozen	Recovered(%)	1	2	3 (%)	VI ¹⁾
Mature ²⁾	10	45	41(91.1)	20	14	7(17.1)	1.68
	20	44	38(86.4)	19	14	5(13.2)	1.63
	30	63	57(90.5)	31	17	9(15.8)	1.63
Immature	10	20	5(25.0)	1	3	1(20.0)	2.00
	20	16	16(100.0)	3	8	5(31.3)	2.13
	30	14	14(100.0)	4	4	6(42.9)	2.14

1) VI(viability index) : refer to Table 1.

2) Mature oocytes were cultured for 42hrs in maturation medium containing hCG(10IU/ml) and PMSG(10IU/ml) before vitrification.

Table 3. Effect of cryoprotectants on survival of frozen-thawed immature oocytes

Cryoprotectant	Degree of viability(TB test)					Degree of viability(FDA test)				
	n ¹⁾	1	2	3(%)	VI ²⁾	n	1	2	3 (%)	VI
Propylene glycol(PG)	22	5	12	5(22.7)	2.00	36	7	21	8(22.2)	2.03
Polyethylene glycol(PEG)	69	8	49	12(17.4)	2.06	54	30	19	5(9.3)	1.54
PG + PEG	27	5	9	13(48.2)	2.60	32	6	5	21(65.6)	2.47

1) n = No. of oocytes examined

2) VI(viability index) : refer to Table 1.

동결보호제의 종류에 대한 생존성은 Table 3과 같다.

동결보호제인 propylene glycol(PG), polyethylene glycol(PEG) 및 PG+PEG에서의 생존성을 TB 검사로 판정하였을 때의 생존지수는 각각 2.00, 2.06 및 2.60으로서 PG+PEG에서 다소 높은 생존성을 보여주었으며 FDA 검사에서도 같은 결과를 나타내었다. PG와 PEG간에는 PG가 PEG보다 다소 생존성이 높은 경향을 보였다. 또한 생존성의 판정시 생존지수는 TB test보다 FDA test가 다소 낮은 비율로 나타났으며, PG+PEG로 동결한 미성숙 난포란의 경우 TB 검사와 FDA 검사에 생존지수는 차이가 없었으나 생존율은 FDA 검사가 다소 높게 나타났다.

동결보호제의 이용효과에 대하여 Friedler 등(1988)은 생쥐난자 동결에서 PG가 빙정형성을 제한하기 때문에 매우 안정적이며 DMSO보다 독성이 적다고 하였다. Siebzehnuebl 등(1989)도 사람과 토끼 난포란의 동결시 PG가 급속동결에서 효과가 현저함을 보고하였다. 또한 Vincent 등(1989)은 토끼에서 PG가 삼투압 영향을 줄이는데 다소 유리함을 보고한 바 있다.

본 실험에서도 이러한 이유에 근거하여 침투성 동결보호제인 PG가 비침투성 동결보호제인 PEG보다 다소 유리한 항동해제인 것으로 사료되었다. 한편 FDA에 의한 생존성의 판정결과가 Al-Hasani 등(1986)이 토끼의 미성숙난포란 동결에서 보고한 것보다 낮았으나 생사판정의 방법으로 이용 가능성을 확인할 수 있었으며 Mohr와 Trounson(1980)도 세포의 생화학적 활성을 분석하는데 독성이 없는 유용한 재료임을 지적한 바 있다. 그러나 이러한 생

존성의 판정방법이 다분히 주관적인 판단에 기초하고 있기 때문에 정확도를 더욱 높이기 위해서 앞으로 개선하여야 할 문제가 많이 있는 것으로 사료되었다.

적 요

본 연구는 성숙 및 미성숙난포란의 동결시스템을 개발하고자 동결용해된 돼지 난포란을 Trypan blue 및 FDA(fluorescein diacetate)검사로 생존성을 판정하고 생존성에 미치는 평형시간 및 동결보호제의 영향을 조사하고자 실시하였다.

Trypan blue 검사에 의한 동결난포란의 생존성은 동결미성숙난포란이 동결성숙난포란보다 다소 높았으며, 동결용해된 미성숙난포란의 42시간 성숙 후 생존성(25.0%)은 용해직후의 생존성(42.9%)보다 훨씬 낮았으나 동결용해된 성숙난포란보다는 다소 높았다. 동결전 10, 20 및 30분간 평형하였을 때 미성숙난포란의 생존성은 20.0, 31.3 및 42.9%였다. 미성숙난포란의 경우 긴 평형시간에서 생존성이 높은 경향이었으나 동결성숙난포란은 짧은 평형시간에서 높은 경향이였다. 생존성 검사 방법간의 생존지수는 차이가 없었으나 TB test의 생존지수가 FDA test보다 다소 높은 경향으로 나타났다. FDA test에 의한 동결미성숙난포란의 생존율은 propylene glycol(PG)에서 22.2%, polyethylene glycol(PEG)에서 9.3% 및 PG+PEG에서 65.6%로서 PG+PEG가 가장 효과적이었다.

이와 같은 결과는 동결보호제로서 PG+PEG 이용이 돼지 난포란의 동결에 효과적이었으며 동결용해된 미성숙난포란은 체외성숙, 체외수정 및 체외

발생이 가능함을 제시해 주었다.

참고문헌

- Al-Hasani S, Tolksdorf A, Diedrich K, Van H der ven and Krebs D. 1989. Successful *in vitro* fertilization of frozen thawed rabbit oocytes. Hum. Reprod., 1:309-312.
- Al-Hasani S, Kirsch J, Diedrich K, Blanke S, Van H der Ven and Krebs D. 1986. Successful embryo transfer of cryopreserved and *in vitro* fertilized rabbit oocytes. Hum. Reprod., 4(1):77-79.
- Didion BA, Pomp D, Martin MJ, Homanics GE and Markert CL. 1990. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. J. Animal Sci., 68:2803-2810.
- Friedler S, Giudice LC and Lamb EJ. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil and Steril., 49:743-764.
- Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ and Downey BR. 1992. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. Cryobiology, 29:485-492.
- Gajda B and Smorag Z. 1993. Factor affecting the survival of one and two cell rabbit embryos cryopreserved by vitrification. Theriogenology, 39:499-506.
- Glenister PH, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG. 1987. Incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. Gamete Research, 16:205-216.
- Hamlett DK, Franken DR, Cronje HS and Luus H. 1989. Murine oocyte cryopreservation: comparison between fertilization success rates of fresh and frozen metaphase I and II oocytes. Arch. Androl., 23:27.
- Im KS, Kang JK and Kim HS. 1997. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. Theriogenology, 47:881-891.
- Kim JK, Lee KH, Kang MJ, Kim YH, Oh UY and Kang MS. 1988. Studies on 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 method. 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. 1977. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In the freezing of mammalian embryos. Ciba Foundation Symposium 52, K. Elliott and J. Whelan, eds. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 69-92.
- Lim JM, Fukui Y and Ono H. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. Theriogenology, 35:1225-1235.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M and Alnot MD. 1987. Cryopreservation of human embryos and oocytes. Human Reprod., 3:117.
- Mazur P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems. Science, 168:939-949.
- Noto V, Campo R, Roziers P and Gordts S. 1991. Fluorescein diacetate assessment of embryo viability after ultrarapid freezing of human multipronucleate embryos. Fert. Steril., 55:1171-1175.

- Otoi T, Ogura T, Tachikawa S, Kitamura S and Suzuki T. 1993. Deep freezing of bovine oocytes using different cryoprotectants. *Theriogenology*, 39:275.
- Parks JE and Ruffing NA. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37:59-73.
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:237-245.
- Rubinsky B, Arav A and Devries AL. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. *Cryo-letters*, 12:93-106.
- 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.).
- Schiewe MC, Rall WF, Stuart LD and Wildt DE. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*, 36:279-293.
- 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 cryoprotectant exposure: Effects of varying exposure times on survival. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:210-214.
- Siebzehnuebl EE, Todorow S, Van Uem J, Koch R, Wildt L and Lang N. 1989. Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol. *Hum. Reprod.*, 4:312-317.
- Smorag Z and Gajda B. 1991. Vitrification of non-cultured rabbit embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 26:151-158.
- 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.
- Takahashi Y and Kanagawa H. 1990. Effect of Equilibration Period on the Viability of Frozen-Thawed Mouse Morulae After Rapid Freezing. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:105-110.
- Van Blerkom J. 1989. Maturation at high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocytes in mice. *Theriogenology*, 33:365.
- Vincent C, Garnier V, Heyman Y and Renard JP. 1989. Solvent effects on cytoskeletal organization and *in vitro* survival after freezing of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 87:809-820.
- Willadsen SM, Trounson AO, Polge C, Rowson LEA and Newcomb R. 1976. Low temperature preservation of eggs. In: *Egg transfer in cattle*. (L.E.A. Rowson, ed.). Commission of the European Community Publications, Luxemburg. pp177-124.
- Yang NS, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1992. Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 37:326.
- Yoshida M, Cran DG and Pursel VG. 1993. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertiliza-

tion of pig oocytes. Mol. Reprod. Dev., 36: 462-468.

Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y and Day BN. 1997. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. Bio. Reprod., 56:1376-1382.

妹尾 左知丸, 加藤淑裕, 入谷 明, 鈴木秋悦, 館 麟.
1981. 哺乳動物胚の初期發生. 基礎理論と實驗
法. 理工學社. 東京. pp. 243.

(접수일자 : 1997. 11. 3 / 채택일자 : 1997. 12. 15)