

## 肉牛의 過排卵 誘起와 凍結方法이 卵子の 生存率에 미치는 影響

文星豪·金重桂

濟州大學校 農科大學 畜產學科

## Effect of Superovulation and Freezing Methods on the Survival of Bovine Embryos

S. H. Moon and J. K. Kim

*Department of Animal Science, College of Agriculture, Cheju National University*

### SUMMARY

The effect of superovulation (PMSG, FSH) on the ovarian response of matured cows were tested. The survival rates of bovine embryos and ovarian oocytes frozen by slow, rapid freezing and vitrification were investigated.

A total of 15 heads of cow were divided into 3 groups by injection dose of GTH (PMSG, FSH). Each group was superovulated with injections of 2,500, 3,000IU PMSG and 40mg FSH followed by injection of 30mg PGF<sub>2α</sub>. Embryos were non-surgically recovered from superovulated cows 6~7days after estrus. The recovered embryos were frozen in 10% glycerol + 10% sucrose by slow and rapid freezing. Ovarian oocytes were frozen in 20% glycerol+10% ethylene glycerol + 30% Ficoll + 10% sucrose by vitrification and the survival of frozen embryos and ovarian oocytes were judged by FDA-test. The results are summarized as follows:

1. Estrus after the injection of 2500, 3000 I.U. PMSG and 40mg FSH were 32.8, 35.0 and 43.4 and the duration of estrus were 18.6, 18.8 and 22.4 hours respectively.
2. The average sizes of the left ovaries were 5.4cm (2,500 IU PMSG), 5.1cm (3,000IU PMSG) and 6.4cm (FSH), and the right were 6.2cm (2,500IU PMSG), 5.7cm (3,000IU PMSG) and 7.8cm (FSH) respectively. There were significant differences in the right ovaries among treatments ( $P<0.05$ ).
3. The average number of ovarian follicles in the left ovaries were 4.8 (2,500 IU PMSG), 5.2 (3,000 IU PMSG) and 7.8 (FSH) respectively. There were significant difference in the right ovaries among treatments ( $P<0.05$ ).
4. In the average numbers of ovulation points in the left ovaries were 3.0 (2,500IU PMSG), 3.2 (3,000IU PMSG) and 4.4 (FSH) respectively, and the right were 7.2 (2,500IU PMSG), 7.8 (3,000IU PMSG) and 11.4 (FSH). There were significant differences in the right ovaries among treatments ( $P<0.05$ ).
5. The numbers of the recovered embryos were 20 (2,500IU PMSG), 19 (3,000 IU PMSG) and 21 (FSH) respectively, and oocytes and degenerated oocytes were 6.5 and

11.0 Estrus periods of post parturation were 52.4days (2,500IU PMSG), 69.8days (3,000IU PMSG) and 62.4days (FSH) respectively.

6. The FDA score of cow morulae frozen by slow freezing, semirapid freezing and vitrified freezing was higher in slow (3.1) and vitrified freezing (3.0) than that in semirapid freezing (1.28). The FDA-scores of cow, pig and rabbit ovarian oocytes frozen in 20% glycerol + 10% ethylene glycol + 30% Ficoll + 10% sucrose by vitrification were higher in cows (3.3) than both in pigs (2.6) and rabbits (2.3).

(Key word: bovine, embryo, ovarian oocyte, FDA-score, rapid freezing, vitrification)

## 緒 論

소 受精卵의 凍結은 1973년 Wimut와 Rowson이 凍結受精卵을 이용 仔畜을 생산한 보고 이후 受精卵 凍結에 대한 研究가 급속도로 進進되었다.

우리나라의 受精卵移植에 관한 研究는 1970년대 부터 시작되어 mouse, rabbit, goat에 대한 初步의 인 실험이 試圖되었고, 1980년대에 이르러 大家畜에서 본격적인 研究가 進進되어 다수의 研究결과가 보고되고 있다.

非外科的 採卵方法에 의한 受精卵 移植시에는 供卵畜이 우수한 遺傳能力을 갖고 있어야 하며 (Elsden, Seidel 등, 1982), 年齡과 產次(金 등, 1985; Greeve 등, 1979; Mogaugh 등, 1974), 品種(金과 鄭, 1985; Olive 등, 1984; Greeve, 1982), 體重(金 등, 1985; Schilling 등, 1982) 등이 성적에 영향을 미칠 수 있다고 하였다.

過排卵 誘起에 있어서 hormone은 대체로 PMSG(金 등, 1985; 南, 1984; 高橋, 1983, 丘와 鄭, 1982; 高 등, 1981a,b; Grave, 1976)를 사용하여 왔으며, 최근에 이르러 FSH(Donaldson, 1984; Halley 등, 1979; Elsdén 등, 1978)가 이용되었고, PMSG와 FSH 比較試驗이 試圖되었다(靑柳 등, 1987; Becker와 Pinheiro, 1986; Fahning, 1986; 金 등, 1985; 鄭 등, 1983; 鈴木 등, 1983).

受精卵의 回收方法으로서는 子宮角 基部에 固定시키는 方法으로 2원(2 way) 또는 3원식(Sugie 등, 1972)으로 非外科的 方法이 각광 받아 왔으나 근래에는 간편한 2元式 子宮體 固定方法(Nash, 1981)으로 採卵率 향상을 발표하였고(金 등, 1985a,b; 任 등, 1983), 더욱이 鈴木 등(1984, 1986)은 자동 관류기 이용과 catheter 개량으로 간편하고 쉽게 受精卵

回收率을 증진시켰다고 보고하였다. Bovine embryos의 凍結過程중에서는 대부분 programable freezer로 凍結하고 있으나 簡易凍結 方法으로서는 two-step freezing(Frank 등, 1986; Kenndy 등, 1983; Bouyssou와 Chupin, 1982)이 試圖되었으며, 液體窒素 container내에서의 凍結方法은 mouse에서 수편이 보고되었으나(宮木 등, 1986; Williams과 Johnson, 1985), 소에서는 Frank 등(1985)만이 같은 凍結速度로 凍結할 때 卵子 凍結機보다 약간 生存率이 떨어졌으나 有性性 없이 container내 凍結이 경제적으로 사용 가능성을 제시하였다.

Renard 등(1983, 1982), Leibo(1983) 등은 one-step straw 移植方法을 간편화 시켜 受胎率을 향상시키고 있으며(鈴木 등, 1983, 1986; 松崎 등, 1986; Bielanski, 1985, 1986), 내동제 제거가 필요없는 direct transfer(Cseh 등, 1994; Voelkel와 Hu, 1992)에 의한 이식방법의 간편화와 난황을 첨가한 vitrification solution으로 배반포기 단계의 소 체외 수정란을 동결하여 높은 성적을 보고하였다(Kuwayama 등, 1994). 특히 최근에 이르러 mouse에서 vitrification solution에 대한 많은 試驗이 수행되고 있는 바(Kasai 등, 1990; Kim 등, 1990; Kono 등, 1987; Rall과 Fahy, 1985) 소에 있어서는 供試卵 獲得이 어려움으로 현재까지는 약간의 실험들만이 이루어지고 있는 실정이다(Osamu Douchi, 199; Masip 등, 1986, 1987). 그러므로 本 實驗은 肉牛 受精卵 簡易凍結 및 超急速凍結(vitrification)의 가능성을 검토하기 위하여 mouse에서 얻은 새 vitrification solution(20E, 10G, Ficol 30%) 으로 液體窒素 container에서 超急速 凍結(220℃ /sec)시킨 受精卵을 FDA-test 또는 CO<sub>2</sub> incubator에 培養시켜 다른 凍結 方法과 生死判定을 比較한 結果는 다음과 같다.

## 材料 및 방법

### 1. 試驗 期間 및 公試 動物

本 研究는 1988~1990년 濟州試驗場, 1991~1992년 濟州畜産事業所, 個人牧場(동일목장, 농원목장)에서 實施되었으며 供試動物은 NRC 飼養標準에 準해서 濟州韓牛 交雜種 14頭(예비 시험용 5두 포함, 홀스타인 5두)를 供試畜으로 사용하였다.

飼養管理는 放牧期인 5~10月은 放牧草地에서 放牧하여 自由菜食시켰으며, 舍飼期인 11~4月은 Italian ryegrass 乾草와 Italian ryegrass silage 및 corn silage를 위주로 사양하였고 濃厚飼料는 舍飼期에 한하여 體重의 0.8~1%를 급여하였다.

### 2. 過排卵 誘起

發情週期 9~14日에 直腸檢査를 實施하여 黃體開花期에 있는 供卵牛를 選拔하고 2,500~3,000IU의 PMSG(日本, 三供社)를 筋肉注射하고 48時間後 25mg의 PGF<sub>2α</sub>를 筋肉注射하여 過排卵을 誘起하거나 FSH(Sigma, F8001, L9510)처리는 40mg을 減量投與 方法으로 4日間 投與하고 3日後 PGF<sub>2α</sub>를 30mg 筋肉注射하여 過排卵을 誘起시킨 後 發情이 發現되면 standing-estrus를 보정하여 1次 人工授精을 實施하고, 12~15時間 間隔으로 2次 및 3次 人工授精을 追加로 實施하였다

### 3. 受精卵의 採卵 및 選別

受精卵은 人工授精後 6~7日째에 非外科적으로 回收하였으며 2% lidocaine 6~8ml를 第 1과 第 2尾椎 사이에 注射하여 後軀麻酔를 실시하였으며 擴張棒으로 子宮頸管을 擴張한 後 2way foley catheter를 子宮角 또는 子宮體에 固定하였다. Catheter 固定後 PBS액 800~1,000ml를 重力에 의하여 流入되게 장치하여 流入이 中止되면 回收하는 反復 回收方法에 의하여 500ml mess cylinder 및 1,000ml 회수병에 회수하였다. 回收된 採卵液은 常溫에서 30分間 放置한 後 上층액을 제거하고 10ml pipette을 사용하여 petridish에 分株한 後 30~40倍의 實體顯微鏡下에서 受精卵을 檢索하였다. 採卵된 受精卵은 신선한 PBS로 2回 이상 洗滌하여 受精卵의

이상여부를 확인하였으며 未受精卵 및 退化된 受精卵은 凍結에서 제외시켰다.

### 4. 凍結液 製造 및 凍結

受精卵의 凍結에 있어 緩慢 또는 超急速 凍結液은 mouse試驗에서 사용된 것과 같이 10% glycerol과 10% sucrose 및 20% FCS을 PBS에 첨가하여 製造하였으며 사용된 0.2 m filter paper로 濾過하였다. 製造된 凍結液에 受精卵을 직접 옮기는 one-step 方法에 의하여 5分間 平衡시킨 後 0.25 straw에 封入하였다. 주입순서는 Fig. 1과 같다.

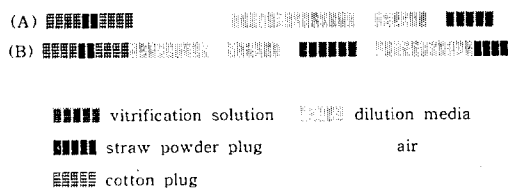


Fig. 1. Configuration of vitrification solution, dilution medium and air in 0.25 ml straw, just before loading embryos(A) and after sealing with straw powder(B).

#### 1) 基本凍結(緩慢凍結)

Cell Freezer(R 204. Panner)를 이용하여 常溫에서  $-7^{\circ}\text{C}$ 까지는  $1^{\circ}\text{C}/\text{ml}$  下降시킨 後 식빙(Seeding)하고 5分間 정지한 다음  $-35^{\circ}\text{C}$ 까지  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 緩慢凍結시킨 後 液體窒素에 침적시켰다.

#### 2) 簡易凍結

Straw에 주입된 受精卵은 LN<sub>2</sub> container에서 凍結速度를 室溫에서  $-7^{\circ}\text{C}$ 에서 식빙後 5分 定置하였고, 定置後  $-35^{\circ}\text{C}$ 까지는  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 凍結한 다음  $-35^{\circ}\text{C}$ 에 도달시 바로 液體窒素 container에 침적시켜 저장하였다. 溫度 확인은 凍結液으로 채운 0.5ml straw를 Cell Freezer의 sensor에 끼워서 固定後 straw가 들어있는 container에 넣어 auto-recorder로 확인하였다.

#### 3) 超急速 凍結(vitrification)

Vitrification solution은 1ml 주사기가 연결된 0.25ml 플라스틱 straw에 PS(PBS + sucrose), air,

PS를 주입하여 준비하였다. 본 實驗에 사용된 수정란의 발달단계는 morulae이며 petri dish에 50  $\mu$ l의 VS drop에 부유(浮遊)한 후 30  $\mu$ l의 다른 drop에 한번 옮겼다. 수정란을 함유한 drop을 미리 준비된 straw에 주입한 後 air bouble, PS순으로 주입하여 straw powder로 封入하였다. 室溫에서 10分동안 平衡後 즉시 LN<sub>2</sub> container에 침적하여 7~15日 동안 저장하였다.

#### 5. 受精卵의 融解 및 生死 判定(FDA-test)

受精卵의 融解는 38℃ 溫水에 straw내의 氷片이 완전히 녹을 때까지 실시하였으며 融解後 耐凍劑 첨가와 같은 one-step 方法에 의하여 PBS에 10% sucrose를 첨가한 제기액(PS)에서 耐凍劑를 제거하였다.

耐凍劑 제거후 生死判定은 diacetyl fluorecence (FDA) 1mg을 acetone 1ml에 녹인 다음 이것을 PBS 액에 600,000대 1로 稀釋(pH 7.0~7.4)한 FDA액에 受精卵을 넣고 常溫에서 3~5分동안 培養後 FDA가 없는 PBS액에 옮겨 200倍 位相差 螢光顯微鏡(螢光顯微鏡)하에서 다음과 같은 score로 判定하였으며 이를 平均 점수로 산출하였다.

P-5 : 受精卵의 分割球 全體가 綠色 螢光을 強하게 發散하는 것 (5點: 100%).

P-4 : 受精卵 分割球 中 80% 以上 綠色 螢光을 띠는 것 (4點: 80%).

P-3 : 受精卵 分割球 中 60% 以上 綠色 螢光을 띠는 것 (3點: 60%).

P-2 : 40% 以上 分割球가 綠色螢光을 發散하거나 또는 전반적으로 弱하게 螢光을 發散하는 것 (2點: 40%).

P-1 : 20%以下 分割球가 綠色螢光을 發하거나 매우 弱하게 螢光을 發散하는 것 (1點: 20%).

N-0 : 綠色 螢光을 전혀 띠지 않고 어둡게 보이는 것 (0點: 0%).

#### 6. 統計處理

統計處理는 分散分析을 하였고, 分散分析後 有意性이 認定된 경우 duncan의 單檢定法에 의하여 各處理間의 有意差를 檢定하였다.

### 結果 및 考察

#### 1. 過排卵處理와 卵巢反應

供卵牛에 過排卵處理時 發情發現, 發情持續時間 그리고 直腸檢査에 의한卵巢反應狀態를 조사한 것은 Table 1과 같다.

Table 1. Esterus states and ovarian size of cows after PMSG, FSH treatment by palpation

Treatment (unit)	No. of heads	Time of estrus sign after PGF <sub>2α</sub> treatment (hr)	Duration of estrus (hr)	Ovarians size before PMSG or FSH treatment (cm)		Ovarian size at estrus (cm)	
				Left (L×W)*	Right (L×W)	Left (L×W)	Right (L×W)
PMSG (2,500 IU)	5	32.8±1.7	18.6±0.8	2.7±0.1	3.3±0.2	5.4±0.5	6.2±0.3 <sup>b</sup>
				×	×	×	×
				2.3±2.2	2.3±0.3	4.5±0.4	4.7±0.6
PMSG (3,000 IU)	5	35.0±2.8	18.8±2.4	2.8±0.2	3.1±0.2	5.1±1.1	5.7±0.9 <sup>a</sup>
				×	×	×	×
				2.3±0.3	2.4±0.3	4.1±0.5	4.3±0.4
FSH (40mg)	5	43.3±2.9	22.4±2.9	2.8±0.4	3.1±0.6	6.4±1.5	7.8±0.6 <sup>c</sup>
				×	×	×	×
				2.2±0.3	2.4±0.2	4.5±0.4	5.9±1.2

\* L : Length, W : Width, \* Mean ± S.D.

Different of superscripts denote significant differences within columns (P<0.05)

PGF<sub>2α</sub> 投與後 發情開始時間은 PMSG 2,500IU에서 32.8時間, PMSG 3,000IU에서 35.0時間, 그리고 FSH 40mg는 43.4時間을 나타내었고, 發情持續時間은 각각 18.6, 18.8, 22.4時間으로 FSH 40mg處理區가 PMSG처리구보다 대체로 길었으며, PMSG 2,500IU와 3,000IU에서는 약간의 差異가 있었으나 有意性은 없었다.

Greve 등(1979)은 經産牛에서 PGF<sub>2α</sub> 投與後 發情開始는 40時間 以前에 나타나고 48時間 以後는 卵자의 回收率과 生存率이 낮아진다고 하였다. 高橋 등(1983)도 發情開始時間이 길어질수록 平均 排卵率이 有意하게 낮아진다고 보고하였다(Fahning, 1986; 全川 등, 1976).

Yadav 등(1985)은 Cloprostenol(prostaglandin)을 投與時 41.3±1.25時間에 發情이 開始된다고 하여 本 實驗結果와 比較했을 때 FSH 40mg 處理區는 差異가 없었으나, PMSG 處理區는 發情開始時間에서 약간 差異가 있었다.

卵巢의 크기에 있어서는 hormone 投與前은 差異가 없었으며, 投與後에 左側卵巢의 길이는 각각 5.4±0.5, 5.1±1.1, 6.4±1.5cm이고, 폭은 4.5±0.4, 4.1±0.5, 4.5±0.4로 統計的 有意差는 없었다. 그러나 右側卵巢 길이는 각각 6.2±0.3, 5.7±0.9, 7.8±0.6cm이고, 폭은 4.7±0.6, 4.3±0.4, 5.9±1.2cm로 FSH 40mg은 投與後에 매우 크게 나타나고 있으며, 右側卵巢의 길이는 處理後에 유의적인 차를 보였다(p<0.05).

이는 過排卵 處理時 FSH 40mg에서는 많은 수의 卵胞가 成長하였으나 정상적인 排卵이 안되고 閉鎖 卵胞 또는 estradiol-17β의 濃度가 낮고, 排卵內의 inhibin activity가 變化되지 않아 FSH에 分泌를 抑制시키지 못하여 排卵이 되지 않는 것으로 報告되었다(Padmanabham 등, 1984).

Ireland 등(1982, 1983)은 PGF<sub>2α</sub> 注射後 6mm 以上 卵胞에서 E-A卵胞(estrogen-active follicle)와 E-I卵胞(estrogen-inactive follicle)가 形成되는데, E-A卵胞는 卵胞液內 estradiol-17β의 濃度가 높고, 顆粒膜細胞에서 <sup>125</sup>I-HCG의 特異的 結合이 增加하여 排卵卵胞가 되며, E-I卵胞는 排卵液內 estradiol의 濃度가 낮은 반면, progesterone과 androgen은 濃度가 높고, 顆粒膜細胞의 數가 줄어들어서 <sup>125</sup>I-HCG와의 結合이 低下되므로 閉鎖細胞가 된다고 報告하였다.

過排卵處理後 卵胞數, 排卵數 그리고 受精卵의 回收率에 성적은 Table 2에 提示한 것과 같다.

PMSG 2,500IU, 3,000IU 그리고 FSH 40mg 處理區에 있어서 直腸檢査에 의한 卵胞數에 있어서 直腸檢査에 의한 左側卵巢에서 각각 4.8±0.7, 5.2±1.4, 5.6±1.0個로 統計的 有意差는 없었다. 그러나 右側卵巢는 5.6±0.4, 6.2±1.3, 7.8±1.1個로 各 處理區에서 有意性이 있었다(P<0.05).

排卵數는 左側卵巢에서 各各 3.0±0.6, 3.2±1.1, 4.4±1.0個로 有意差는 없었고, 右側卵巢는 4.2±1.1, 4.6±1.8, 7.0±1.4個로 處理間에 有意的인 差

Table 2. Effects of levels of PMSG, FSH injection on ovulation point and recovery rate of embryos after superovulation by palpation

Dosage (unit)	No. of heads	No. of ovarians follicles			No. of ovulation points			No. of recovery embryos	Recovery rate(%)
		Left	Right	Total	Left	Right	Total		
PMSG (2,500IU)	5	4.8±0.7	5.6 <sup>a</sup> ±0.4	10.4±1.0	3.0±0.6	4.2 <sup>a</sup> ±1.1	7.2 <sup>a</sup> ±1.3	5.2±1.3	72
PMSG (3,000IU)	5	5.2±1.4	6.2 <sup>b</sup> ±1.3	11.4±2.3	3.2±1.1	4.6 <sup>a</sup> ±1.8	7.8 <sup>a</sup> ±2.6	4.8±1.7	61
FSH (40mg)	5	5.6±1.0	7.8 <sup>b</sup> ±1.1	13.2±1.9	4.4±1.0	7.0 <sup>b</sup> ±1.4	11.4 <sup>b</sup> ±1.2	6.4±2.7	56

\* Mean ± S.D.

Different superscripts denote significant differences within columns (P<0.05)

를 보였다( $P < 0.05$ ). 이에 反하여 전체 回收卵子數를 보면 各 hormone處理別로 5.2개, 4.8개, 6.4개로 差異가 없었으며, 특히 回收率은 PMSG 2,500IU에서 72%, PMSG 3,000IU에서 61%이고, FSH 40mg에서는 56%로 다소 떨어지는 成績을 보였다. FSH 處理區가 回收率이 낮은 原因은 採卵時期가 여름철에 偏重되었고, 방목지에서 遂行하였기 때문에 것으로 思料된다.

排卵數는 過排卵 處理後 채란일에 黃體發育狀態를 直腸檢査에 의해서 조사하였는데, PMSG 2,500IU에서는 大形黃體(5mm 이상)가 均일하게 분포하였으며, PMSG 3,000IU와 FSH 40mg은 小型黃體(5mm 이하)가 出現하였다. 특히 FSH 처리구는 황체발달이 均일하지 못하였고, 小型黃體와 排卵되지 않은 卵胞가 나타나고 있었다. 小型黃體의 出現에 대하여 명확히 규명되지 않았지만 Elsdén (1982)은 卵巢反應이 나쁜 개체에서 딱딱하고 작은 黃體가 發生한다고 보고하였다. Monniaux 등 (1983)은 Charolais 經産牛 28頭에 PMSG 2,500IU를 投與하여 8.1±7.4個의 排卵數를 報告하였고, Vesetinovic 등(1984)도 Holstein 經産牛 12頭에서 PMSG 3,000IU를 注射하여 平均 12.7個의 排卵成績을 얻었다. 그리고 韓牛에서 高 등(1981)은 PMSG 2,000IU를 使用하여 平均 6.5個, 任 등(1984)은 同量의 PMSG로 平均 6.9個를 發表하였다. 本 實驗에서 PMSG 2,500IU와 3,000IU 投與後 排卵數는 各各 7.2, 7.8個로 Sergeev 등(1990)의 11.2個 보다는 떨어지는 成績이었다.

過排卵處理後 FSH投與는 Chupin과 Procureur

(1983)가 32, 50mg을 利用하여 8.9, 9.7個의 排卵數를 報告하였고, Bugrov 등(1990)은 33mg을 未經産牛에 注射하여 11.3個에 比하여, Sovetkim 등(1989)의 Holstein 經産牛에서 50, 40, 32mg의 FSH를 投與하여 5.8, 6.8, 6.8個의 排卵成績과 비슷하였고, 2.75, 3.35, 3.43個의 受精卵를 回收한 것보다는 다소 양호한 成績이었다.

過排卵處理時 個體間의 差異는 各 個體의 營養 또는 遺傳的인 差異에 起因한다고 報告(Dunn, 1980; Steenan 등, 1976)한 바와 같이 本 實驗에서도 같은 結果를 볼 수 있었다. 過排卵處理時 發情週期 6~7일에 採卵한 卵子의 形態는 Table 3와 같이 hormone 處理別 回收卵數는 各各 26, 24, 32個이고, 이중 正常卵은 1, 3, 6個로서 非正常卵이 많이 發見되었다.

Greve 등(1979)은 Holstein 經産牛에서 PMSG 2,000IU를 投與하여 平均 6.2個의 受精卵를 回收하였으며, Monniaux 등 (1983)은 Charolais 經産牛의 2,500IU의 PMSG를 利用하여 6.0±6.4個를 採卵하였고, Gorchach 등(1984) PMSG 2,000~3,000IU를 使用하여 平均 7.19個의 受精卵를 回收하였다.

Wubishet 등(1986)은 Holstein 經産牛에서 FSH 50mg의 投與로 8.2개의 受精卵를 投與하여 桑實胚 2.3個, 胚盤胞期 4.2個, 未受精卵 2.3個를 發表했으며, 南 등(1985)은 平均 5.0個의 卵자를 回收하여 桑實胚 1.7개(32.8%), 胚盤胞期 1.8개(35.8%), 退行卵은 1.4개(28.4%)를 報告하였고, 本 實驗에서 卵자의 採卵은 各 처리별 平均 5.2, 4.8, 6.4

Table 3. Development stages of embryos recovered on 6~7 days after estrus

Treatment (unit)	No. of eggs recovered	No. of normal embryos			No. of atypical embryos		
		Morulae	Blast-ocysts	Total(%)	UF* eggs	Deg** embryos	Total (%)
PMSG (2,500IU)	26	14	6	20 (77)	5	1	6 (23)
PMSG (3,000IU)	24	12	7	19 (79)	2	3	5 (21)
FSH (400mg)	32	19	2	21 (66)	5	6	11 (34)

\* Unfertilized eggs, \*\*Degenerated embryos

個였으며, 正常卵은 各各 4.0, 3.8, 4.2個를 나타내었다. 發育段階別로 볼 때 수정란은 PMSG 2,500 IU에서 桑實胚는 2.8개(54%), 胚盤胞期 1.2개(23%), 未受精卵과 退行卵 1.2개(23%)였고, PMSG 3,000IU는 桑實胚 2.4개(50%), 胚盤胞期 1.4개(29%), 未受精卵과 退行卵 1.0개(21%)였으며, FSH 40mg은 桑實胚 3.8개(59%), 胚盤胞期 0.4개(6%), 未受精卵과 退行卵 2.3개(34%)를 나타내었다.

正常受精卵이 比率은 PMSG 2,500IU는 77%였고, PMSG 3,000IU에서 79%였으며, FSH 40mg에서는 66%의 成績을 얻었다. Ozil 등(1979)과 Elsdén 등(1976)의 正常受精卵 比率 70%의 보고와 本 實驗의 PMSG 2,500IU, 3,000IU에서는 비슷한 成績을 보였으나, FSH 40mg처리구에서 正常卵 많이 발생한 것은 다른 처리구에 비해 發情持續時間도 길었으며, 따라서 排卵時間도 작기에 排卵이 안되어 배란지연에 의해서 退行卵이 多發한 것으로 사료된다.

過排卵 處理後에 正常 發情再歸日의 發現狀態는 Table 4와 같이, 過排卵 處理後에 정상적인 發情 증세는 PMSG 2,500IU에서 52.4일, PMSG 3,000IU에서 69.8일 그리고 FSH 40mg에서는 62.4일에 發現되었다. PMSG 2,500IU에서 發情再歸일이 짧은 것은 적은 量의 hormone투여에 起因한 것으로 생각된다.

그러나 PMSG 3,000IU와 FSH 40mg에서 正常 發情再歸일이 길어지는 것은 過排卵處理時 形成된 黃體가 萎縮되는 상태로 장기간 지속되었고, 또한 閉鎖卵胞도 休止된 狀態로 오랫동안 지속되고 있었다. Table에는 提示하지 않았지만, 過排卵 處理後에 正常 發情發現時 子宮頸管粘液 pH는 8~10 정도로 높게 나타나고 있으며, 卵巢內 Graafian follicle도 成長이 低調하였으며 排卵時間도 지연되는 현상

을 볼 수 있었다. Hormone 처리하여 採란 후 發情再歸日에 관해서 Lubbadé 등(1980)은 乳牛에 PMSG 3,000IU를 처리한 후 正常 發情再歸日은 29~66일(평균 48일)로 報告하였으나, 本 實驗에서는 이보다 다소 길게 나타나고 있었다.

한편, 發情再歸發現日의 길이와 頻度가 不規則的으로 變化하는 데 있어서 Spilman 등(1973)과 Booth 등(1975)은 發情再歸가 延長되는 現狀은 progesterone 水準의 間歇的으로 上昇된데 起因한다고 보았으며, progesterone 水準의 上昇은 過排卵 處理後에 形成된 黃體로부터 由來하여 部分的으로 閉鎖卵胞에서도 起因한다고 하였다. 따라서 progesterone 水準은 過排卵 處理後 形成된 黃體數와 正의 相關關係가 있다고 報告하고 있다(Brand 등, 1977; Both, 1975).

## 2. 受精卵과 卵胞卵의 凍結

牛 受精卵의 緩慢凍結과 急速凍結時 生存率(FDA-score)에 미치는 影響을 比較 調査한 結果는 Table 5와 같다.

牛 受精卵의 凍結融解後 FDA-score는 緩慢凍結이 3.1(62%), 유리화 동결이 3.0(60%)로서 急速凍結의 1.2(24%)보다 높게 나타나고 있으며, 緩慢凍結에서 P<sub>5</sub>와 P<sub>3</sub>의 FDA score는 72%로 良好한 生存率을, 유리화 동결에서는 60%로서 完만 동결보다 낮은 반면, 急速凍結은 P<sub>5</sub>와 P<sub>3</sub>에서 33%로 낮은 生存率을 보여주고 있다. 이러한 結果는 凍結液에 添加된 glycerol 濃度를 1.4M로 同一한 處理方法과 凍結用 器具(cell freezer와 LN<sub>2</sub> container)의 差異로 原因을 들 수 있으나 내동제 농도가 높은 유리화 동결도 대가축에서 유리화 동결 가능성을 제시하여 주었다.

일반적으로 受精卵의 凍結處理에 있어서 細胞死滅에 主原因은 脫水狀態, 冰晶形成, 平衡時間 등을

Table 4. Effects of PMSG and FSH administration on interval of spontaneous estrus

Treatment	No. of heads	Spontaneous	
		Range(day)	Mean ± S.D.
PMSG 2,500 IU	5	32 ~ 70	52.4 ± 14.1
PMSG 3,000 IU	5	42 ~ 92	69.8 ± 16.6
FSH 40 mg	5	41 ~ 73	62.4 ± 11.5

Table 5. Effects of slow and rapid freezing procedures with freezing media containing 1.4 M glycerol on the survival rate (evaluated by FDA-test) after freezing and thawing

Method of freezing	No. of recovered embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
		P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
Slow freezing (Cell Freezer)	25	5	9	4	2	1	4	3.1
Rapid freezing (LN <sub>2</sub> container)	27	—	6	3	7	2	9	1.2
Vitrification	10	2	1	3	3	1	—	3.0

The composition of slow & rapid freezing media was both 10% glycerol + 10% sucrose with PBS.

들 수 있는데 凍結과 融解시 細胞內外에서 生成되는 적당한 脫水, 氷晶形成은 細胞質에 物理的 壓力를 가하게 되므로서 細胞質이 死滅하게 된다. 그리고 平衡時間도 凍結液內도 透過性 物質과 細胞內의 水分移動時에 적절한 시간과 融解後 細胞內의 耐凍濟 이동이 細胞의 생존에 영향을 미쳐서, 生存率이 저하되는 것이다(Leibo, 1984; Wood & Farant, 1980). 특히 本 實驗의 急速凍結 處理區에서 受精卵의 透明帶 손상은 없었으나 割球細胞가 파괴되어 死滅한 것을 볼 수 있었는데, 이러한 현상은 耐凍劑 添加水準(glycerol 1.4M)이 낮아 凍結前 수정란 내부의 수분이 脫水되지 않은 상태에서 LN<sub>2</sub> (-196℃)에 급속히 침지함에 따라 형성된 氷晶이 細胞膜을 파괴시킨 것으로 사료된다.

Bilton 등(1981)은 glycerol 1.0M로 牛 受精卵을 緩慢凍結과 急速凍結時 各各 28.8, 47.7%로 生存率에서 急速凍結이 優秀하다고 發表했으나, Lehn-Jensen(1983)은 glycerol 1.4M로 胚盤胞期에 牛 受精卵을 緩慢凍結하여 57%의 受胎率을 報告하였다.

새로운 vitrification solution(glycerol 20%, et-

hylene glycol 10%, Ficoll 305, sucrose 10%)으로 牛, 돼지 및 家兎 등의 未成熟卵자를 超急速凍結後 融解한 生存率(FDA-score)비교는 Table 6과 같다. Table 6에서 나타난 바와 같이 牛, 돼지, 家兎 등의 卵胞卵의 生存率(FDA-score)은 각각 3.3(66%), 2.6(52%), 2.3(46%)로 牛 準急速凍結(Table 5) 보다 약간 높을 뿐이고 거의 비슷한 生存率을 보여 주었다.

超急速 凍結(琉璃化)에 사용된 Ficoll은 高分子 物質(分子量 70,000)로서 凍結時琉璃化를 促進시키는 非透過性 物質인 반면, sucrose는 低分子 物質(分子量 342)로 內部細胞의 수분이나, 融解性 內部細胞에 투과되어 있던 동결액을 脫水시키는 역할을 하므로서(Kasai 등, 1980; Mazur, 1970) 生存率을 向上시킬 수 있다고 하였다. 과거 이러한 vitrification 방법은 4℃에서 受精卵을 平衡하기전 100% vitrification solution의 毒性을 제거하기 위해서 5℃에서 낮은 濃度에서부터 높은 농도의 vitrification solution로 여러번 平衡시켜야만 하였다(Rall 등, 1987; Rall 과 Fahy, 1985). 姜 등(1990)은 mouse

Table 6. The comparison of the survival of vitrified cow, pig and rabbit ovarian oocytes by FDA test

Animal	No. of oocytes frozen	No. of oocytes evaluated by FDA-test						FDA test
		P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>0</sub>	
Cow	31	17	10	1	0	3	3.3	
Pig	42	19	3	8	7	5	2.6	
Rabbit	34	10	1	13	6	4	2.3	

The composition of vitrification solution was 20% glycerol + 10% ethylene glycol + 30% Ficoll + 10% sucrose with PBS



2-cell 受精卵을 超急速凍結하여 89.9%의 生存率을 發表하였고, ethylene glycol과 dimethyl sulfoxide를 이용한 vitrification solution으로 소 수정란을 동결하여 73~90%의 생존율을 보고(Ishimori 등, 1993)한 것에 비해서는 낮은 성적이었으나, Massip 등(1986)은 牛 受精卵을 vitrification solution로凍結時 各各 42.8와 53.8%의 生存率을 報告한 것과 Mahmoudzadeh 등(1995)이 ethylene glycol, ficoll, sucrose를 이용하여 소 수정란을 동결하였을 때 morulae 54%와 blastocysts 52%보다는 다소 높은 생존율을 보여주었다.

최근에 鄭 등(1990)은 1~2 cell의 mouse 卵子에서 20% HCS + 3.5M DMSO + 0.25M sucrose를 제조하여 동결속도 5°C/sec와 200°C/sec로 동결하였을 때 생존율은 각각 94.6, 75.4%로 성적을 발표하였다. 그리고 金 등(1991)은 牛의 體外受精卵을 超急速凍結 20% FCS + 2.0M glycerol + 0.25M sucrose를 이용하여 75%의 생존율을 발표하였다. 그러므로 本 實驗에서 牛 卵子(卵胞卵)로 vitrification solution을 이용할 때 난자의 直徑(150~160 $\mu$ )이 크더라도 동결 가능성을 보이고 있어 今後 vitrification solution를 利用한 超急速凍結에서 採卵된 受精卵의 發育段階에 따른 좀 더 깊이 있는 研究의 必要性을 提示해 주고 있다. 그리고 돼지와 家兔의 卵胞卵이 牛 成績보다 떨어진 것은 家兔는 卵子周圍에 mucin層이 있고, 돼지의 卵子는 脂肪이 많이 함유되어 있어 凍結이 어렵다고 보고한 것으로서 Bank 등(1974)보다 높은 生存率을 보였으며, 앞으로 이에 관한 보다 많은 공시란과 계속실험이 요구되었으며 체외수정과 관련되므로 追加實驗이 要望된다. 더욱이 중요시 생각되는 것은 오랫동안 수정란의 동결 실험에서 얻은 結論으로 난자의 耐凍性은 精子의 경우와 같이 가축품종뿐만 아니라 개체, 계절 난자의 상태 등에 따라 크게 영향을 미치는 것으로 추측할 수 있으며 앞으로 이에 관한 실험이 수행되어야 한다고 사료된다.

결론적으로 本 實驗은 새로운 vitrification 과정을 室溫에서 간단한 방법으로 遂行할 수 있고, 凍結方法이 예비동결없이 동결전 탈수시킴으로서 常溫에서 超急速으로 직접 液體窒素에 침지하여 凍結시키는데 意義가 있었으며, 특히 FDA관정으로 mouse

는 물론 大家畜 受精卵 및 卵胞卵에서도 凍結 可能性 여부를 提示해 주었으며 동결시킨 난자의 여러 가지 처리방법에 따른 생존율 시험이 계속 수행되어야 한다고 사료된다.

## 摘 要

本 研究는 過排卵 處理 호르몬인 PMSG, FSH處理가 肉牛의 卵巢反應에 미치는 影響과 緩慢, 急速凍結 및 超急速凍結(vitrification)이 採取卵(morulae)과 卵胞卵(ovarian oocytes)의 生存율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실행되었다. 總 15頭의 肉牛를 3 처리구(2,500 IU; 3,000IU, 40mg FSH)로 분류하여 PMSG 또는 FSH처리후 PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  30mg으로 발정을 유도하였다. 採卵된 受精卵은 10% glycerol + 10% sucrose 凍結液에서 緩慢과 急速凍結方法으로 卵胞卵은 20% glycerol +10% ethylene glycol +30% Ficoll +10% sucrose로 조성된 vitrification solution에서 超急速凍結로 동결, 저장 후 FDA-test를 이용하여 生存率을 判定한 중간 보고를 要約된 結果는 다음과 같다.

1. PMSG와 FSH處理區에서 2,500IU, 3,000IU, PMSG와 FSH 40mg을 투여한 후 發情이 發現되는 시간은 각각 32.8, 35.0, 43.4시간째 發情徵候를 보였으며, 發情持續時間은 각각 18.6, 18.8, 22.4 시간이었다.
2. 2,500IU와 3,000IU PMSG, FSH 40mg 처리구에서의 卵巢크기는 좌측난소가 각각 5.4, 5.1, 6.4cm으로서 有意性이 없었으나, 우측난소에서는 6.2, 5.7, 7.8cm로서 有意性이 있었다 ( $P < 0.05$ ).
3. 2,500IU, 3,000IU PMSG 및 FSH 40mg처리구에서의 卵胞發育數는 좌측난소에서 4.8, 5.2, 5.6개로 有意性이 없었으나, 우측난소에서는 5.6, 6.2, 7.8개로 有意性이 있었다 ( $P < 0.05$ ).
4. 2,500IU, 3,000IU PMSG, FSH 40mg처리구에서는 排卵數는 좌측난소에서 3.0, 3.2, 4.4개로 有意性이 없었으며, 우측난소에서 7.2, 7.8, 11.4개로 有意性이 있었다 ( $P < 0.05$ ).
5. 2,500IU, 3,000IU PMSG, FSH 40mg처리구에서 채란된 정상난자수는 20, 19, 25개이었으

며, 未受精卵과 退行卵은 각각 6, 5, 11개였다. PMSG 2,500IU, 3,000IU, FSH 40mg 처리구에서 過排卵處理後 發情發現日數는 각각 52.4, 69.8, 62.4일로 PMSG 2,500IU 처리구가 가장 좋은 것으로 나타났다.

6. 緩慢凍結과 準急速凍結 그리고 琉璃化凍結을 실시하여 융해후 FDA-test를 이용 生存率을 判定하였을 때 FDA-score는 각각 3.1(62%), 1.2(24%), 3.0(60%)로서 緩慢凍結과 琉璃化凍結에서 급속동결 1.2(24%)보다 더 높은 成績을 얻었으며, 20% glycerol + 10% ethylene glycol + 30% Ficoll + 10% sucrose로 造成된 vitrification solution(VS)에서 소, 돼지 및 토끼의 卵胞卵을 超急速凍結한 後의 生存率은 돼지(2.6)보다 토끼(3.1)와 소(3.3)에서 더 높은 成績을 보여주었다.

### 參考文獻

- Bielanski AV, Schneider VP and Maoletto RJ. 1986. Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos *in vitro* : The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. *Theriogenology*, 25:429-437.
- Bilton RJ and Moore NW. 1977. Successful transport of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. *J. Reprod. Fert.*, 5, 363.
- Bouyssou B and Chupin D. 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts in french-straws. *Theriogenology*, 17(1):80(Abstr).
- Bugrov AD and Nevinsky NA. 1990. Embryo transfer at a large dairy farm. *Zootehniya.*, No. 5, 67-69.
- Cseh S, Seregi J and Solti L. 1994. Practical experiences with direct transferred frozen embryos. *Theriogenology*, 41:185.
- Frank GC, Coley SL, Betterbed B and Page RD. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology*, 26: 134-144.
- Greve T, Lehn-Jensen H and Rasbech NO. 1979. Morphological evaluation of bovine embryos recovered non-surgically from superovulation dairy cows on days 6 1/2., 7 1/2: A field study. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19(5):1599-1611.
- Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y, Seike N and Kainuma H. 1993. Vitrification of bovine in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, 40:427-433.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Anim. Repord. Fert.*, 59:51-56.
- Kuwayama M, Tasaka and Hamano S. 1994. In straw dilution of bovine IVF-blastocysts cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 41:231.
- Lubbadeh WF, Graves CN and Spahr SL. 1980. Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 50(1):124-127.
- Massip A, Van der Zwalmen P, Puissant F, Camus M and Leroy F. 1984. Effects of *in vitro* fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. *J. Reprod. Fert.*, 71: 199-204.
- Mazur RR. 1977. Slow freezing injury in mammalian embryos : In the freezing of mammalian embryos(Ellott k & Whelan eds) Ciba Fndn symp. No. 52. 19, Elsevier /North Hollan Amsterdam.
- Mahmoudzadeh AR, VanSon A, Bols P, Ysebaert MT and de Kruif A. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: Effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on em-

- bryonic survival. J. Reprod. Fert., 103: 33-39.
- Monniaux D, Chupin D and Saumande J. 1983. Superovulated responses in cattle. Theriogenology, 19(1):55-81.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. Nature Vol. 313:573-575.
- Sreenan JM and Beehan D. 1976. Method of induction of superovulation in the cow and transfer results. In "Egg transfer in cattle" (L.E.A. Rowson, ed, Commission for the European Communities, Luxemburg, EUR 5491. 19-34.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. Theriogenology, 37:687-697.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, 37:23-37.
- Williams TJ and Johnson SE. 1985. Quick-Freezing of day four mouse embryos. Theriogenology, 23:235.
- Wilmot I and Rowson LEA. 1973. Experiments of the low temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec., 92:686-690.
- Wubishet ACN, Greaves SL, Spahr DJ, Kesler and Favero. 1986. Effects of treatment on superovulatory responses of dairy cows. Theriogenology, 25:423-427.
- Yadav MC, Leslie KE and Walton JS. 1985. The onset and duration of ovulation in superovulated beef heifers. Theriogenology, 23(1):237. Abstr.
- 김상근, 이봉구, 이규승. 1991. 소체외수정란의 초급속동결에 관한 연구: 1. 소 체외수정란의 초급속동결 용해후의 생존성에 관한 연구. 한국가축번식학회보, 15(2):133-139.
- 김중계, 양병철, 강민수, 고경래, 고혁진, 장덕지. 1995. 소, 돼지 미성숙 난포란의 유리화 동결. 용해 후 FDA처리가 체외수정과 배발육에 미치는 영향: 1. 포유동물 난포란의 유리화 동결 후 FDA-TEST에 의한 생존성 판정. 한국수정란이식학회지, 10(3):183-191.
- 정구민. 1990. 소와 생쥐 초기난자의 체외발생 능력과 초급속 동결에 영향하는 생리적, 물리적 요인에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문.