

초자화동결을 이용한 제 3일째 생쥐 배아의 동결보존

대학 산부인과, 성신여자대학교 자연과학대학 생물학과*

윤숙영 · 손 철 · 배인하*

Cryopreservation of Day 3 Mouse Embryos by Vitrification

Sook-Young Yoon, Cheryl Sohn and In-Ha Bae*

Taehak Infertility Clinic, Seoul, Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University*

= Abstract =

The use of hormonal stimulation in human in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) leads to increased production of embryos for ET. So to avoid high pregnancies and to allow conception in future, unstimulated cycles, cryopreservation of spare embryos is desirable. One of the improvement of cryopreservation methods is vitrification.

We cryopreserved mouse day 3 embryos by vitrification using the three different vitrification solution (EFS40, VS11 and VS3a). EFS40 solution is consisted of 40% (v/v) ethylene glycol, Ficoll70 30% (w/v) and 0.5M sucrose and VS11 is 6.0M ethylene glycol and 1.8M glycerol. And VS3a is 6.5M glycerol and 6% (w/v) BSA (bovine serum albumin).

First we tested the toxicity of three vitrification solution by exposure to these solution during 3 min. After washing by thawing solution, the survival rates of each groups are 95.5%, 90.9% and 84.4% (EFS40, VS11 and VS3a). High percentages of them developed to expanded blastocyst and hatching embryos in culture 48hrs 94.2%, 97.7%, 100% and 97.4% (no treatment group, EFS40, VS11 and VS3a). So there is no significant differences among the each group.

Second, after thawing of vitrified embryos, the survival rates of each groups are 96.8% (slow freeze), 94.1% (EFS40), 85.5% (VS11) and 80.0% (VS3a, P vs. no freeze or EFS40 is 0.01). Vitrified embryos exhibited a high rate of development in vitro after 48hrs culture. The percentages of each group to blastocyst and hatching embryos are 88.7% (no freeze), 91.8% (slow freeze), 93.4% (EFS40), 87.7% (VS11) and 73.0% (VS3a, P vs. other group is 0.01).

The results suggest that there is no significant differences in exposure of various vitrification solution and day 3 mouse embryos can be vitrified in solution EFS40 and VS11 by simple procedure.

Key Words: Vitrification, Day 3 mouse embryos, EFS40, VS11, VS3a

서 론

최근 시험관아기기술이 발달하면서 과배란 유도로 얻어진 많은 수의 배아는 배아이식에 필요

한 적정수를 초과하고 있다. 따라서 다태아 임신 을 피하고 다음 주기에 과배란을 유도하지 않고 이들 배아를 이용한 임신 을 시도하기 위해 잉여 배아의 동결보존이 요구되고 있다.

Whittingham (1972)이 생쥐 배아의 완만동결과

완만해빙으로 동결보존에 성공한 이래 동결보존법은 이런 방법을 기초로 활발히 연구되어 왔다.

동결보존 후 배아의 생존율은 동결, 해빙과정 중에 사용되는 항동해제 (cryoprotectant)의 종류와 농도, 동결 방법과 해빙속도 등에 많은 영향을 받는다 (Friedler *et al.*, 1988; Mandelbaum *et al.*, 1988; Dumoulin *et al.*, 1994; Nowshari *et al.*, 1995). 또한 동결되는 배아의 세포주기 (Balakier *et al.*, 1991)와 발생 시기 (Liu *et al.*, 1993; Mandelbaum *et al.*, 1988), 그리고 배아의 종 (species)의 차이 (Friedler *et al.*, 1988)도 동결보존 후 생존율과 깊은 관계를 갖는다.

이들 동결보존에 대한 연구는 생존율 및 발생율을 높이는 동시에 그 과정을 단순화하려는 시도로 활발하게 이루어졌다. 이런 시도중의 하나로 Rall과 Fach (1985)는 초자화동결 (Vitrification)을 보고하였다. 이후 활발한 연구가 진행중인 초자화동결은 기존의 automatic freezer를 이용한 완만동결에 대해 다음과 같은 장점을 가지고 있다. 첫째, 고농도로 농축된 항동해제는 완만동결과정 중에 발생하여 세포 손상의 주원인이 되는 ice crystallization을 막는다. 둘째, 초자화동결은 동결 과정에 소요되는 시간을 감소시키며 기존의 automatic freezer가 필요없이 액화질소에 바로 넣음으로써 매우 경제적이다. 그러나 항동해제가 갖는 독성과 항동해제가 세포 내외를 이동하면서 생기는 삼투압 변화에 의한 세포 손상에 대해서는 아직까지 연구중이다. Rall과 Fach (1985)는 동결보존액에 dimethylsulfoxide (DMSO), acetamide, propylene glycol과 polyethylene glycol을 사용하여 생쥐 배아의 초자화동결에 성공하였다. 이후 생쥐 배아를 이용하여 항동해제의 종류 및 농도, 평형 시간, 해빙 방법 등에 대한 연구가 보고되었다 (Rall & Wood, 1987; Zhu *et al.*, 1993; Ali & Shelton, 1993 a,b; Kim *et al.*, 1996). 또 쥐의 포배기 (Nakamichi *et al.*, 1993), 토끼의 상실배 (Kasai *et al.*, 1992)와 소의 포배기 (Tachikawa *et al.*, 1993), 발생 단계에 따른 초자화동결 (Mahmoudzadeh *et al.*, 1995) 등 여러동물을 대상으로 연구되었다.

본 연구는 지금까지 보고되어 온 여러가지 초자화동결액을 사용하여 제 3일째 생쥐배아의 초자화동결을 시행하였다. 초자화동결액으로는 세포내로의 투과가 가능한 ethylene glycol, Ficoll70과 세포내로의 투과는 불가능하지만 동결동안 세포 응축에 대한 보호효과가 보고된 sucrose를 사용

한 EFS40 (Kasai *et al.*, 1990)과 ethylene glycol과 glycerol을 기본으로 한 VS11 (Ali & Shelton, 1993, a)을 사용하였다. 또 non-toxic solution으로 보고된 VS3a (glycerol과 albumin, Rall & Wood, 1994)을 사용하면서 그 과정을 단순화하거나 보완하였다. 또한 이들 동결보존액의 영향을 조사하기 위한 대조군으로 automatic freezer를 이용하여 완만동결을 시행하여 해빙후의 생존율과 발생율을 조사함으로써 제 3일째 생쥐 배아동결보존에 효과적인 방법을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 6~9주의 Swiss albino인 ICR계통의 생쥐 암컷을 7.5IU의 PMSG (Sigma)와 hCG (Sigma)를 48시간 간격으로 복강주사하여 과배란을 유도하였다. hCG주사 후 수컷과 합사시킨 다음 날 copulation plug가 확인된 것을 제 1일로 하여 제 3일째 (hCG 72~74 시간)에 난관과 자궁 상부를 해부현미경 하에서 10% FBS가 함유된 dPBS (Gibco)용액을 30G needle로 관류하여 후기 8세포배와 상실배를 수집하였다.

2. 초자화동결액 (vitrification solution)

모든 처리액은 10% FBS가 함유된 dPBS를 기본액으로 하였다. 대조군인 완만동결은 1.5M 1,2-propanediol (ProH)과 0.1M sucrose를 사용하였다. EFS40은 ethylene glycol 40% (v/v), Ficoll70 (molecular weight 70,000)을 30% (w/v), 0.5M sucrose를 기본액에 혼합하였다. VS11은 6.5M ethylene glycol과 1.8M glycerol을 혼합하였으며 VS3a는 6.5M glycerol과 6% BSA (w/v)를 녹여 사용하였고, 모든 용액은 여과 멸균 (0.22 μ m) 후 사용하였다. 또 해빙액은 완만동결의 경우 기본액에 0.4M sucrose를 넣었고, EFS40은 0.5M sucrose, VS11과 VS3a는 1.0M sucrose를 녹여 여과 멸균 후 사용하였다.

3. 초자화동결액의 독성 실험 (Toxicity of vitrification solution)

수집된 배아를 배양접시에서 각 초자화동결액에서 3분간 상온에서 방치한 후 각각의 해빙액에서 5분간 처리한 다음 dPBS (10%FBS)로 충분히 세척하여 배양하였다.

4. 동결방법

1) 완만동결

준비된 동결액을 배양접시에 넣고 수집된 배아를 넣어 10분간 탈수화 (dehydration)하였다. 탈수화되는 동안 10~15개의 배아를 멸균된 straw (IMV)에 동결액과 함께 넣은 후 straw powder와 고무로 된 capillary tube sealer (Crito seal)를 이용하여 straw끝을 막았다. 동결기는 ethanol bath automatic freezer (IWAKI, Japan)을 이용하였고 10℃에서 시작하여 -6℃에 식빙 (seeding)한 후 -0.25℃/분의 속도로 -30℃까지 냉각 후 straw를 서서히 액화질소 (-196℃)에 침지하였다.

2) 초자화동결

완만동결과 동일한 방법으로 straw에 넣은 후 액화 질소통에 옮기기까지 2분 30초를 초과하지 않았으며 서서히 액화질소에 침지하였다.

5. 해빙 및 배양

1) 동결보존 기간은 1~7일이었으며, 완만동결군은 액체 질소통에서 꺼낸 straw를 상온에서 1분간 방치한 후 34℃ 수조에 넣어 약하게 흔들었다. 준비된 해빙액에서 8분간 처리한 후 기본액으로 충분히 세척하여 배아의 생존 여부를 확인하여 배양하였다. 초자화동결군은 액체 질소통에서 꺼낸 straw를 상온에서 약 1분간 방치하면서 멸균된 휴지로 straw 밖으로 형성되는 얼음을 닦으면서 내부의 동결액이 액체화되는 것을 확인하여 가위로 양끝을 자른 후 동결된 배아를 수집하였다. 수집된 배아는 각 해빙액에서 EFS40은 5분, VS11과 VS3a는 10분간 처리한 후 기본액으로 세척 후 생존한 배아를 플라 배양하였다.

2) 수집된 배아는 10% FBS가 함유된 Ham's F-10 (Gibco)에서 mineral oil을 덮은 microdroplet 방

법으로 24, 48시간 배양하면서 관찰하여 발생율을 조사하였다.

6. 통계처리

대조군과 처리군의 통계적 유의성은 SPSS/PC⁺ (version 7.0)을 이용하여 Chi-square test로 하였다.

결 과

1. 초자화동결보존액의 독성

1) 수집된 배아를 EFS40, VS11, 그리고 VS3a에 넣어 상온에서 3분간 방치한 후 각 해빙액으로 5분간 처리하여 세척한 후의 생존율은 Figure 1과 같다. EFS40은 45개중 43개가 생존하여 95.5% 생존율을 보였다 (Fig. 4A). VS11은 44개중 40개가 (Fig. 4B), VS3a는 45개중 38개로 각각 90.9%, 84.4%로 각군간 유의한 차이는 없었다 ($p < 0.05$).

2) 생존한 배아를 48시간 배양한 결과는 Figure 2와 같다. 동결보존액을 처리하지 않은 무처리군과 EFS40은 포배기에서 부화기까지 (BL~Hng)의 발생율은 94.2% (65/69)와 97.7% (42/43)였다. 또 VS11은 100% (40/40)와 VS3a는 97.4% (37/38)로 각 군 모두 대조군과 차이없는 비슷한 발생율을 보였다. 그러나 48시간 배양중 부화기만 (Hng) 50.7% (35/69)였고, EFS40이 81.4% (35/43), VS11 62.5% (25/40), 그리고 VS3a 50.0 (19/38)로, EFS40이 다른 처리군보다 높은 부화율을 보였다 ($p < 0.05$).

2. 초자화동결

1) 동결 후 제 1일에서 7일 후 해빙된 배아의 회수율과 생존율은 Figure 3과 같다. 초자화동결보존액은 첨가된 성분들에 의해 매우 높은 점성을 갖고 있으므로 해빙 중의 회수율을 조사하였다.

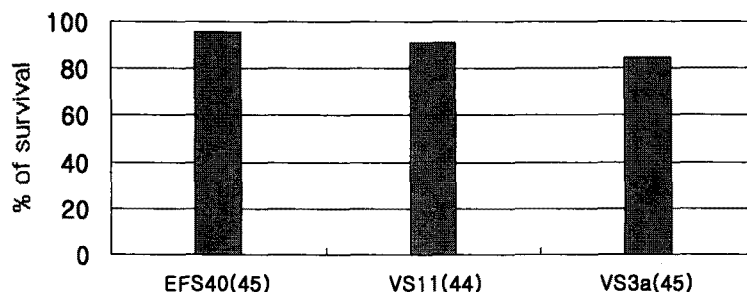


Figure 1. Survival rate of exposed embryos in various vitrification solution after washing. Four replicates were done. (); Total number of embryos.

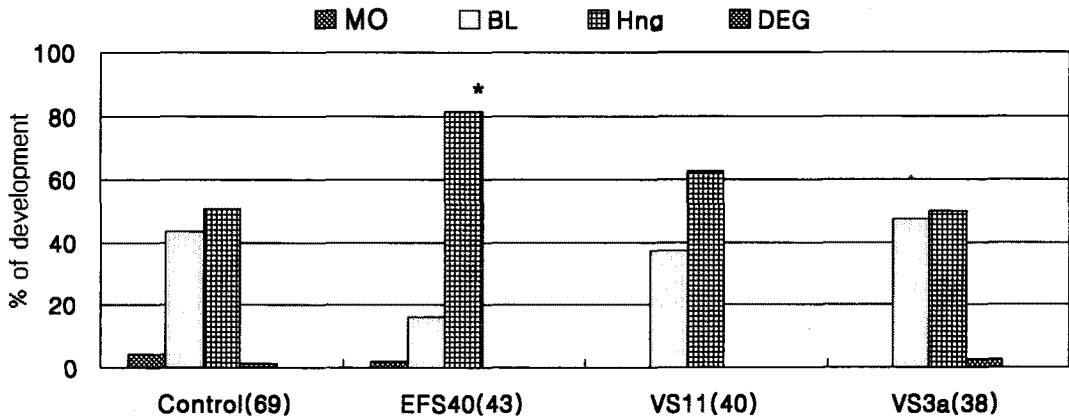


Figure 2. Development of exposed embryos in various vitrification solution *; p. vs control<0.05, N; Total embryos, MO; morula, BL; blastocyst, Hng; hatching, DEG; degenerated embryo.

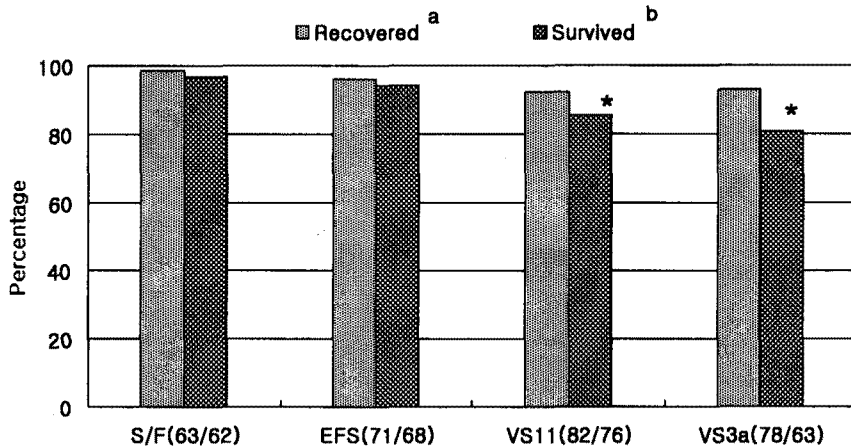


Figure 3. Survival rate of vitrified embryos in various vitrification solution. *p<0.05 vs. S/F, a; recovered/vitrified embryos, b; survived/recovered embryos. (); Total No. of embryos.

VS11에서 92.3% (76/82), 그리고 VS3a에서 92.9% (78/84)로 각 군에서 큰 차이가 없었다.

2) 회수된 배아 중에서 생존한 배아의 생존율은 Figure 3과 같다. 완만동결군이 62개 중 60개가 생존하여 96.8%의 생존율을 보이며 EFS40은 94.1% (64/68), VS11은 85.5% (65/76)였고 VS3a는 80.8% (63/78)의 생존율을 보였다. 각 군을 대조군인 완만동결군과 비교했을 때 EFS40은 큰 차이가 없으나 VS11과 VS3a는 유의한 차이가 있다 (VS11, p<0.05; VS3a, p<0.005).

3) 초자화동결-해빙 후의 배아의 발생율은 Table 1, 2와 같다. 이들 배아를 24시간 배양한 결과, 각 군 모두 비슷한 발생율을 보이고 있다. 완만동결군이 동결하지 않은 대조군과 다른 군에 비해 다소 높은 부화율 (15.0%)을 보이고 있으나

(Figure 5), 통계적으로는 유의하지는 않다. 또 VS11과 VS3a는 다른 군보다 높은 상실배와 퇴화율을 보이지만 역시 통계적으로는 유의하지 않다.

4) 배양을 48시간 연장한 결과는 Table 2와 같다. 본 결과는 24시간 배양과는 다소 다른 결과를 보여준다. 동결을 시행하지 않은 군, 완만동결군, EFS40군에서 포배기~부화기 (BL~Ha-tched)까지의 발생율은 각각 84.0% (60/71), 90.0% (54/60), 90.0% (58/64)로 비슷하지만, 완전히 부화된 비율 (Hatched)은 대조군에 비해 완만동결군과 EFS40군이 유의하게 높다 (p<0.05). 또 VS11군은 다른 군과 비교시 높은 퇴화율을 (23.8%)을 보이고 있으며 (p<0.005), 이는 대부분 상실배와 비정상적인 포배형성 도중에 퇴화하였다.

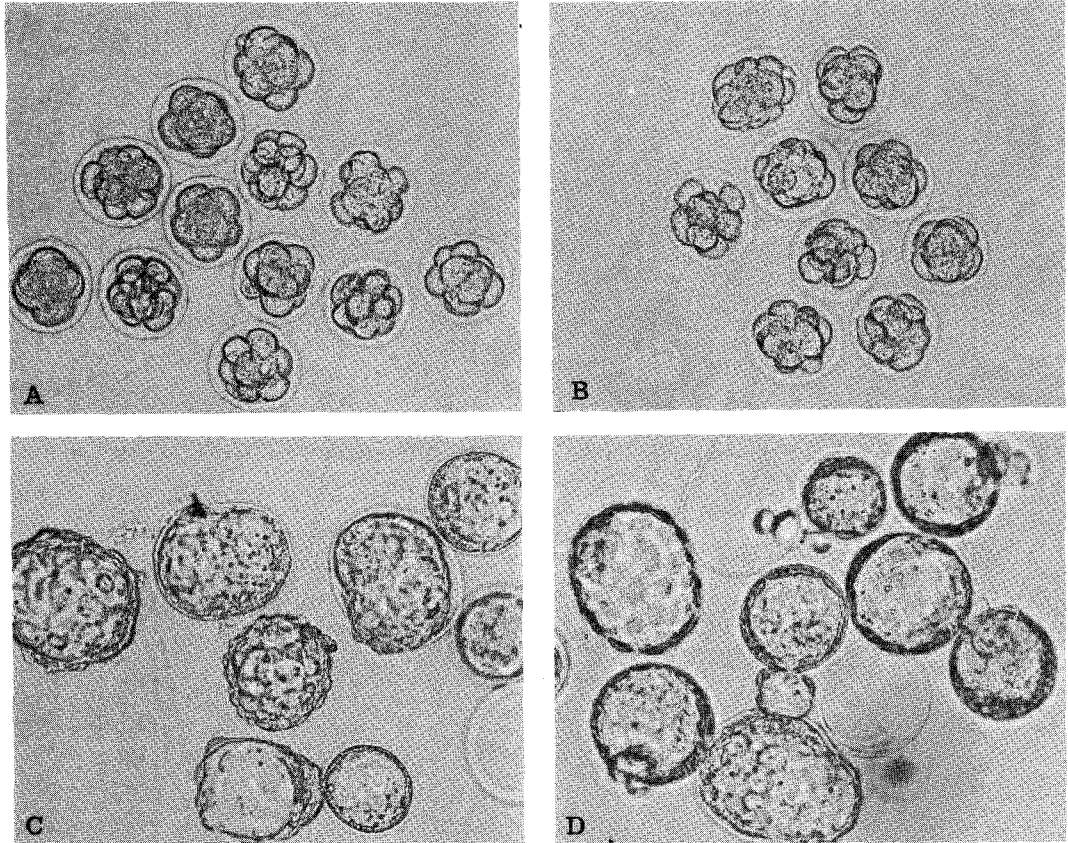


Figure 4. Photograph of exposed embryos in EFS40 and VS11 solution. After washing in EFS40 (A) and VS11 (B) solution. After cultured for 48hrs of vitrified embryos in EFS40 (C) VS11 (D).

Table 1. Development of vitrified embryos in various solution cultured for 24hrs after thawing

	No. of embryos	Development (%)					p vs. S/F
		MO	BL	ExpBL	Hng	Deg	
N/F	71	30 (42.3)	19 (26.8)	16 (22.5)	6 (8.5)	0	
S/F	60	29 (48.3)	10 (16.7)	9 (15.0)	9 (15.0)	3 (5.0)	
EFS40	64	34 (53.1)	8 (12.5)	17 (26.6)	4 (6.3)	1 (1.6)	
VS11	65	31 (47.7)	11 (16.9)	15 (23.1)	1 (1.5)	7 (10.8)	
VS3a	63	36 (57.1)	7 (11.1)	11 (17.5)	2 (3.2)	7 (11.1)	

N/F; No freeze, S/F; slow freeze, MO; morula, BL; blastocyst, Hng; hatching, Deg; degenerated embryos. Six replicates were done.

고 찰

초자화동결 (vitrification)이란 세포가 동결되는 동안 동결용액의 점성의 증가로 세포내외의 ice crystallization이 이루어지지 않는 동결법이다. 그러나 초자화된 동결용액 (vitrified solution)은 낮

은 온도에서 과냉각 (supercooled)되기 때문에 해빙되는 동안 결정화 (ice crystallized)가 이루어져 세포에 손상을 줄 수도 있다. 따라서 냉동 보존되는 동안 초자화된 상태를 유지하고 해빙되는 동안 결정화를 막기 위해서는 높은 농도의 투과성이 있는 항동해제가 필수적이다 (Rall *et al.*, 1987). 최초의 성공적인 초자화동결보존액은 투

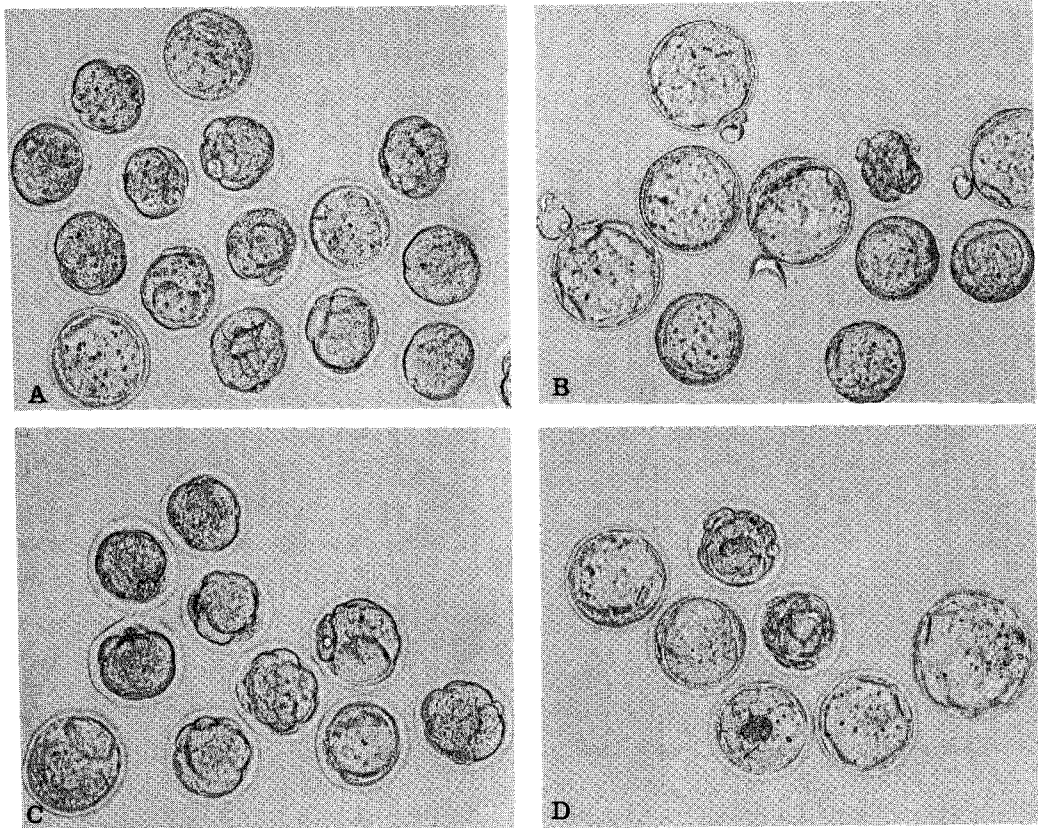


Figure 5. Photograph of cultured for 24hrs in control (A), S/F (B), EFS40 (C) and VS11 (D).

Table 2. Development of vitrified embryos in various solution cultured for 48hrs after thawing

Embryos	Development (%)							p vs. S/F
	MO	BL	ExpBL	Hng	Hed	Deg		
N/F	71	6 (8.4)	3 (4.2)	22 (31.0)	37 (52.1)	1 (1.4)	2 (10.5)	
S/F	60	2 (3.3)	1 (1.7)	19 (31.7)	25 (41.7)	10 (16.7)	3 (5.0)	
EFS40	64	1 (1.6)	2 (3.1)	13 (20.3)	38 (59.4)	7 (10.9)	3 (4.7)	
VS11	65	0	6 (9.3)	10 (15.4)	29 (44.6)	12 (18.5)	8 (12.5)	
VS3a	63	2 (3.2)	7 (11.1)	16 (25.4)	21 (33.3)	2 (3.2)	15 (23.8)	<0.005

N/F; No freeze, S/F; slow freeze, MO; morula, BL; blastocyst, Hng; hatching, Hed; Hatched, Deg; degenerated embryos. Six replicates were done.

과성의 항동해제인 dimethylsulfoxide (DMSO), acetamide와 propylene glycol을 사용하였다 (Rall & Fach, 1985; Rall *et al.*, 1987). 그러나 이 용액은 온도에 따라 매우 민감하여 첨가된 항동해제의 독성을 최소화하기 위해 0°C에서 실시해야 하는 불편함이 있었다.

그 후 glycerol과 propylene glycol은 초자화동결에 효과적인 것으로 보고되고 있다 (Kasai *et al.*,

1990; Ali & Shelton, 1993, a, b; Rall & Wood, 1994).

한편 Kasai 등 (1990)은 세포내로 투과가 가능한 ethylene glycol (EG)과 glycerol, propylene glycol을 사용하여 생쥐 상실패의 초자화동결에 성공하였다. 이들은 앞서의 보고에서와 같은 온도에 대한 민감성이 없으므로 20°C에서 실시가 가능하였다. 40%의 EG와 30% (w/v)의 Ficoll70 (molecular

weight 70,000), 그리고 0.5M의 sucrose를 사용한 EFS40용액에서 생쥐의 상실배를 동결하여 해빙한 결과 매우 높은 포배로의 발생 (97~98%)에 성공하였다. 또한 51%의 live young을 얻었다. 이후 EFS40은 생쥐 (Zhu *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1996), 소 (Mahmoudzadeh *et al.*, 1995), 토끼 (Kasai *et al.*, 1992) 등에서 활발한 연구가 보고되었다.

본 실험에서는 EFS40용액을 생쥐 제 3일째 후기 8세포배와 상실배의 초자화동결에 사용한 결과 매우 높은 생존율과 발생율을 보여주었다. 또 본 실험에서는 상온 (25~27°C)에서 one-step method에 의해 실시하여 초자화동결과정을 최대한 간결화하였으나 다른 보고와 동일한 결과를 얻었다. 이런 결과는 동결하지 않은 무처리군이나 완만동결군에 비해 떨어지지 않으며 오히려 부화율에서는 높은 결과를 보여주었다.

그 이유는 명확하지 않으나 동결보존액 중에 함유된 특정 성분이, 혹은 동결이라는 물리적 현상이 세포의 대사에 영향을 준 것으로 볼 수도 있어 이에 대한 좀 더 구체적인 연구가 있어야 할 것이다.

또 다른 효과적인 동결보존액으로는 Ali와 Shelton (1993, a, b)이 보고한 VS11용액이다. Ali와 Shelton (1993, a)은 10개의 서로 다른 항동해제를 단독 또는 혼합하여 사용하면서 생쥐의 발생 시기별로 초자화동결보존한 결과, 8-세포기배를 VS11 (glycerol 1.8M, ethylene glycol 6.0M)에서 동결하여 97.5%의 높은 발생율을 보였으며 이후 live fetus를 얻는 것에도 성공하였다.

본 실험에서는 이들이 사용한 동일한 VS11을 사용하였다. 동결전의 평형시간을 위 저자들은 20분으로 하였으나 본 실험에서는 예비실험을 통해 2분 30초로 다른 처리군과 동일하게 하였다. Figure 1, 2, 3와 Table 1, 2에서 보이는 바와 같이 무처리군이나 완만동결군에 비해 유의한 차이가 없는 생존율과 발생율을 보이고 있다. 또 해빙 후 24시간 배양시에는 EFS40군과 큰 차이가 없으나 48시간으로 배양을 연장한 결과 유의하게 높은 부화율을 보이고 있다. 이런 결과는 이전의 보고에서는 포배로까지만의 발생율을 보고하였으므로 비교할 수 없으나 매우 효과적인 용액이라고 할 수 있다. 그러나 항동해제로 사용된 ethylene glycol이 쥐 (rat)의 착상전 발생중 기관 형성 (organogenesis)에 해로운 영향을 준다는 보고 (Grifton, 1981)도 있으므로 이 용액을 사용할 때에는

다른 용액과 마찬가지로 충분한 세척이 필수적이다.

한편 Rall과 Wood (1994)는 6.5M의 glycerol과 6% (w/v)의 bovine serum albumin(BSA)만을 사용한 VS3a용액을 소개하였다. 이들은 이 용액에 glycerol 이외의 세포에 유해한 성분이 첨가되지 않았으므로 non-toxic solution 이라 이름하여 보고하였다. 또 동결과정은 straw 내에 해빙액인 1.0M sucrose를 넣어 해빙과 동시에 동결액의 희석을 유도하였다.

본 실험에서는 VS3a를 사용하면서 EFS40이나 VS11에서와 같은 one-step 방법을 사용하였고 실험동물도 ICR계 생쥐를 사용하였다. 그러나 실험 결과는 이들의 91%의 생존율보다 다소 낮은 80.8%를 보이고 있다. 또 발생율 역시 Rall과 Wood (1987)에서 상실배에서 포배까지가 97%였으나 본 실험에서는 89%였다. 이는 동결과 해빙 방법의 차이에 의한 것이라고 할 수도 있으나 이는 예비실험을 통해 큰 차이가 없음을 확인하였다. 또 다른 원인으로서는 사용된 실험 동물이 다소 다르기 때문이라고도 생각된다. 위의 저자들은 ICR 암컷과 C57BL/6J x DBA/2J의 잡종 숫컷을 사용하였다. 본 실험에서는 암 수 모두 ICR계를 사용하였다. 이는 생쥐의 embryonic genome activation이 2-세포기에 이루어지는 점을 참고 (Bae & Yoon, 1995)로 할 때 동결시기인 상실배는 배아유전자가 활성화된 상태이므로 여기서 오는 차이로 볼 수도 있을 것 같다. 또 본 실험에서 사용된 세가지 용액을 생쥐 후기 2세포기 (hCG주사 후 48시간)의 초자화동결에 사용한 경우 VS11과 VS3a용액은 해빙시 생존이 거의 불가능하였다. 따라서 최적의 성공도를 보인 초자화동결용액이라 해도 이는 실험동물의 종과 발생시기에 따라 매우 다른 양상을 보임을 알 수 있다. 한편 본 실험에서 VS3a는 해빙 후 24시간 배양시에는 큰 차이가 없으나 48시간 배양시 포배에서 부화기까지의 비율은 73% (46/63)로 이전의 다른 보고들과 비교 시 비슷한 수준을 나타낸다.

위의 여러 가지 실험결과를 고려해 볼 때 생쥐 제 3일째 배아의 동결보존은 완만동결과 비교시 초자화동결이 매우 경제적이며 생존율이나 발생에 성공적이라 할 수 있다. 또 초자화동결보존은 EFS40이 다른 VS11과 VS3a 보다 적절하며 완만동결보다 높은 부화율을 보이고 있어 EFS40의 이용이 효과적인 것으로 사료된다. 그러나 다른

두가지 용액에 대해서도 동결 방법이나 해빙 방법 등의 수정 과정을 통한 연구가 진행되어야 한다고 본다.

결 론

본 실험은 시험관아기기술의 발달로 얻어지는 다량의 배아를 냉동보존하는 방법 중 하나로 초자화동결 (Vitrification)을 이용하였다. 초자화동결은 기존의 완만동결시 형성되는 세포내외의 Ice-crystallization이 형성되지 않으므로 동결 해빙 후 배아의 생존율이 높으며 동결과정이 경제적이며 간단하다는 장점을 가지고 있다.

제 3일째 생쥐 배아를 사용하여 여러 가지 동결 보존액 및 동결법을 단순화하거나 보완하여 실시하여 다음의 결과를 얻었다.

1. ICR 생쥐 제 3일째 배아의 동결보존은 완만동결과 초자화동결에서 비슷한 결과를 보이므로 시간, 경제적인 면에서 초자화동결이 효율적으로 보인다.

2. EFS40은 다른 VS11과 VS3a에 비해 생존율과 발생율이 높으며, 또한 완만동결군 보다 유의하게 높은 부화율을 보이므로 생쥐 제 3일째 배아의 초자화동결은 EFS40의 이용이 안전하다고 본다.

3. VS11은 EFS40보다는 낮으나 동결하지 않은 군과 완만동결군에 비해 비슷한 발생율을 보이므로 이 용액에 대해서는 연구가 좀 더 진행되어야 할 것이다.

4. VS3a는 다른 군에서 보다는 낮은 생존율과 발생율을 보이지만 그 성분이 다른 세포의 동결에 흔히 쓰이는 것이므로 이에 대한 수정, 보완을 통한 연구가 진행되어야 할 것이다.

인 용 문 헌

- Ali J, Shelton N: Vitrification on preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1993, a, 98, 459-465.
- Ali J, Shelton N: Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil* 1993, 99, b, 471-477.
- Bae In-Ha and Yoon SY: The effect of Ca^{2+} inhibitor on the in vitro 2-cell block of the mouse. *Kor J Fertil Steril* 1995, 22, 1-10.
- Balakier H, Zenzes M, Wang P, MacLusky NJ, Casper RF: The effect of cryopreservation on the development of S- and G₂-phase mouse embryos. *J In Vitro Fertility Embryo Transfer* 1991, 8, 89-95.
- Dumoulin JC, Bergers-Janssen JM, Pieters MH, Enginsu ME, Geradts JP, Evers JL: The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zona pellucidae and embryos. *Fertil Steril* 1994, 62, 793-798.
- Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ: Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988, 88, 743-763.
- Grafton TF, Hansen DK: In vitro embryotoxic effects of ethylene glycol in rats. *Teratog Carcinog Mutagen* 1987, 7, 483-489.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T: A simple methods for mouse embryo cryopreservation in a low toxic vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990, 89,91-97.
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T, Machida T: High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol Reprod* 1992, 46, 1042-1046.
- Kim SE, Uhm SJ, Kim EY, Yoon SH, Park SP, Lim JH: Cryopreservation of mouse IVF/IVM blastocysts by vitrification. *Kor J Fertil Steril* 1996, 23, 41-49.
- Liu J, Van der Abbeel E, Van Steirteghem AC: Assessment of ultrarapid and slow freezing procedures for 1-cell and 4-cell mouse embryos. *Human Reprod* 1993, 8, 1115-1119.
- Mahmoudzadeh A, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, de Kruif A: Optimization of simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *J Reprod Fertil* 1995, 103, 33-39.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache, C, Tesquier L: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Human Reprod* 1988, 3,

117-119.

Nakamichi R, Ohboshi S, Fujihara N: Vitrification of rat blastocysts developed in vitro. *Zygote* 1993, 1, 281-285.

Nowshari MA, Nayudu PL, Hodges JH: Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Human Reprod* 1995, 10, 3237-3242.

Rall WF, Fach GM: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985, 313, 573-575.

Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG: Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fert* 1987, 80, 499-504.

Rall WF, Wood MJ: High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified frozen in non-toxic solution of glycerol and albumin. *J Reprod Fert* 1994, 101, 681-688.

Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M: Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Mol Reprod Devel* 1993, 34, 266-271.

Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P: Survival mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. *Science* 1972, 178, 411-414.

Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T and Machida T: Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fert* 1993, 98, 139-145.