

切斷마우스 二分胚의 凍結保存實驗

1. 마우스 切斷二分胚의 體外 發育能에 대하여

黃 禹 錫

北海道大學 獸醫學部

緒 論

동물에서의 受精卵移植은 1980년 영국의 Heape⁹⁾가 토끼를 이용하여 4 마리의 仔兔를 얻은 것을 시초로하여 綿양과 산양³⁸⁾, 돼지¹⁶⁾ 및 소⁴¹⁾에서 각각 처음 보고된 바 있으며 그 후 여러단계의 연구를 거쳐 현재는 세포융합에 의한 chimaeras³⁵⁾ 생산의 수준을 지나 이미 注入法에 의한 chimaeras⁸⁾ 생산이 이룩될 만큼 눈부신 발전을 거듭하고 있다.

인류에 대한 공헌이라는 점에서 볼 때 수정란 이식은 유전학, 육종학 및 생물검정 등의 측면 외에 인간에게 공급되는 產物(乳, 肉, 卵)의 生産性を 향상시키는데 지대한 공헌을 할 수 있는 분야가 될 수 있다.

수정란이식의 궁극적목표중의 하나인 젖소 등 有用動物의 生産性提高를 위해 수정란수준에서 性別, 유전능력 등을 豫知할 수 있다면 수정란을 欸사선택 할 수 있게 됨으로 이들의 인위적 지배가 가능할 것이다. 이를 위해서는 발생초기 단계에 있는 수정란을 切斷分離하여, 分離胚의 한쪽을 凍結保存하면서 다른 한쪽으로는 性染色體, 유전형질 등을 검사해야 한다.

그러나 강인한 透明帶로 피복, 보호되고 있는 래인 원래의 수정란(intact embryo)마저도 동결 및 융해과정에서 여러 요인으로 인해 그 生存성이 저조한 실정이므로 투명대를 제거하여 切斷된 二分胚의 동결보존에는 intact embryo 보다 더욱 복잡한 요인이 수반될 수밖에 없을

것이다. 그러므로 切斷二分胚의 凍結保存實驗의 前段階로 切斷胚의 體外에서의 發育能을 조사해야 할 필요가 있을 것이다.

割球自體의 發育能은 1942년 Nicholas 및 Hall²⁴⁾이 쥐에서 2細胞期 割球에 대해 처음으로 보고하였으며 마우스에 대해서는 1959년에 Tarkowski^{33,34)}가 2細胞期卵의 發育能에 대해서 보고한바 있다. 그후 Minz¹⁸⁾가 어느 단계에 있는 마우스의 수정란이라도 pronase로 처리하면 투명대를 제거할 수 있다고 보고한 이래 2세포기란^{10,20,31)}, 4~8 세포기란^{7,13,25,29,30,36)}, 2~8 세포기란^{3,4,14)}, 8 세포기란 및 桑實胚²³⁾의 割球發育能에 대한 연구가 진행되고 있다.

그러나 pronase처리에 의해 투명대를 제거시킨 후 Dulbecco's phosphate buffer saline(PBS) 처리로 割球를 decompaction시켜 이를 미세조작(micromanipulation)법에 의해 切斷한 후의 各割球의 發育能에 대한 보고는 적다.

이에 필자는 切斷二分胚의 凍結保存의 전단계의 하나로 마우스 수정란을 切斷하여 各割球의 체의발육능을 조사한 결과 몇가지 知見을 얻었기에 第一報로 보고한다.

材料 및 方法

供試動物 : 이 실험에서 사용한 마우스는 생후 4~5주령(체중 17~27g)의 ddY系 미성숙 마우스였다. 마우스 사육실내의 點燈은 오전 7시 30분부터 오후 9시 30분까지 14시간이었고 나머지 10시간은 消燈하여 명암을 조절하였다.

사료는 마우스, 래트 研究檢定用固型飼料(日本農産工業)로서 자유급식시켰으며, 물도 자유급수시켰다.

過排卵處理 : 과배란을 유기하기 위해 7.5 I.U.의 妊馬血清性腺刺戟호르몬(pregnant mare serum gonadotrophin, 帝國臟器製, 이하 PMSG)을 오후 4시에 복강내 주사하였고, 48시간 후 7.5 I.U.의 妊婦絨毛性腺刺戟호르몬(human chorionic gonadotrophin, 帝國臟器製, 이하 HCG)을 복강내 주사하였다.

HCG투여 후 즉시 同系의 雄性마우스를 同數로 하룻밤 동거시키고 다음날 아침 陰腔形成有無를 확인하였다.

受精卵의 採取 : HCG투여 후 평균 66시간과 76시간에 8細胞期卵과 桑實胚를 채취하였다.

供試마우스를 頸椎脫臼法으로 죽인 후 자궁, 난관 및 난소를 일괄 적출하여 卵管采, 자궁난관접합부에서 난관 및 자궁을 분리시켰다. 분리한 난관 및 자궁은 배양액이 담겨진 플라스틱 petri dish에 넣어서 배양액으로 채워진 1 ml주사기에 첨단부가 예리하지 않은 30gauge의 주사침을 부착시켜 25배 정도의 실체현미경하에서 난관은 난관채側에서 자궁은 子宮體側에서 부더灌流하였다.

채취된 수정란은 배양액에 담아서 100배의 倒立顯微鏡下에서 형태를 검정하여 정상형태를 지닌 8細胞期卵과 桑實胚만을 선정하여 實驗에 이용하였다.

현미경조작 및 정상란의 선택시에 이용한 培養液은 Brinster²¹⁾의 마우스卵 배양액(Brinster's mouse ova culture medium-3, 이하 BMOC-3)이었다.

수정란 회수시부터 사용한 灌流液, 培養液, 세척액, 투명대제거액, decompaction液 및 micromanipulation時의 使用液 등은 전부 brinster의 微小滴培養法¹⁾에 준하였다.

切斷胚의 作成

1. 受精卵의 前處理

가. 투명대의 제거 : 투명대제거에는 BMOC-3액에 희석한 5% pronase액(科研製藥製)을 5% CO₂ 배양기에 30분이상 평형시킨 후 37°C에서 수정란을 3~5분간 침적시켰다. 실체현미경하에

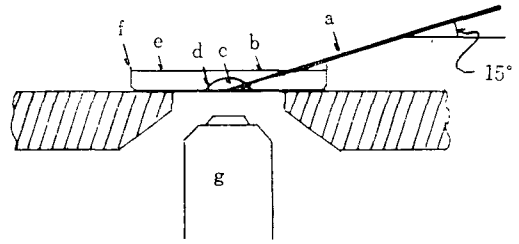


Fig. 1. Micromanipulation

- | | |
|---------------------------------|------------------------|
| a: micropipette | e: paraffin oil |
| b: micro glass needle | f: cover of petri dish |
| c: attached portion with embryo | g: lenz(X10) |
| d: microdrop of culture medium | |

서 투명대가 약화되는 것을 확인하고 BMOC-3액에 4회 세척하였다(1회 1~2초, 2~4회 각 5분간).

나. Decompaction : decompaction은 Nagashima 등²¹⁾의 방법에 준하였다.

즉, Na⁺ 및 K⁺의 포함되지 않은 Dulbecco의 인산완충액(Dulbecco's phosphate buffer saline, 이하 PBS(-)에 넣어 20~30분간 정치하여 실체현미경하에서 割球 個體別 윤곽이 명료해진 것을 확인하여 완성시킨 후 신선한 배양액에 3회 세척하였다.

2. Decompacted Embryo의 切斷二分處理

가. 分割操作器具 : 투과형미분간섭 현미경이 장치된 micromanipulator(日本 成茂科學機研究所製 MO-102)에 micro glass needle을 장착하여 절단에 이용하였다. micro glass needle은 微小電極製作器(日本 成茂科學製 PN-3)에서 뽑아서 제작하였으며 柄部(70~80mm)와 針部(약 10mm)로 구성되어 있고 수정란에 접촉되는 針部の 先端은 직경이 10~25μm이며 針부와 水平方向과의 角度는 약 15°이었다(Fig. 1).

나. 分割操作 : 분할조작은 Nagashima 및 O-gawa²²⁾의 방법에 준하였다. 즉, 流動 paraffin으로 덮혀진 微小滴培養液內에 수정란을 정치시키고 그 直上部에 micromanipulator의 針部를 위치시켜, 현미경시야에서 수정란가운데 원하는 切斷部에 針部를 부착하고 micropipette으로 흡입하여 절단조작을 완성하였다.

절단부의 선택은 割球數가 1개로부터 시작하여 morulae에서는 9개의 割球가 되도록까지 다양하게 실시하였으며 절단된 수정란은 각 pair별로 배양액에 넣고 기록하였다.

Table 1. Morphological Classification of Bisected 8-Cell Stage Embryos and Control Embryos after 48 Hours of *in vitro* Culture

Embryos	No. of blastomeres	No. of embryos cultured	Morphological classification of embryos					
			Eu-B	Pseu-B	TV	NIF	Deg	Others
Bisected		107	48 (44.9)	20 (18.7)	13 (12.1)	10 (9.3)	10 (9.3)	6 (5.6)
	4	54	35 (64.8)	12 (22.2)	1 (1.9)	3 (5.6)	1 (1.9)	2 (3.7)
	3	30	13 (43.3)	6 (20.0)	2 (6.7)	4 (13.3)	3 (10.0)	2 (6.7)
	2	15	—	2 (13.3)	10 (66.7)	—	2 (13.3)	1 (6.7)
	1	8	—	—	—	3 (37.5)	4 (50.0)	1 (12.5)
Control		86	82 (95.3)	—	—	2 (2.3)	1 (1.2)	1 (1.2)

Percentage of embryos enclosed in parenthesis.

Eu-B: Eu-blastocyst Pseu-B: Pseudo-blastocyst TV: Trophoctodermal vesicle. NIF: Non-integrated form.

Deg: Degenerated embryo.

Table 2. Morphological Classification of Bisected Morula Stage Embryos and Control Embryos after 48 Hours of *in vitro* Culture

Embryos	No. of Blastomeres	No. of embryos cultured	Morphological classification of embryos					
			Eu-B	Pseu-B	TV	NIF	Deg	Others
Bisected		154	114 (74.0)	19 (12.3)	4 (2.6)	8 (5.2)	4 (2.6)	5 (3.2)
	9	25	24 (96.0)	—	—	1 (4.0)	—	—
	8	44	41 (93.2)	—	—	1 (2.3)	—	2 (4.5)
	7	29	27 (93.1)	—	—	1 (3.4)	1 (3.4)	—
	6	21	14 (66.7)	5 (23.8)	1 (4.8)	—	1 (4.8)	—
	5	19	7 (36.8)	6 (31.6)	1 (5.3)	2 (10.5)	1 (5.3)	2 (10.5)
	4	10	1 (10.0)	6 (60.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	—
	3	6	—	2 (33.3)	1 (16.7)	2 (33.3)	—	1 (16.7)
Control		92	86 (93.5)	—	—	4 (4.3)	1 (1.1)	1 (1.1)

Percentage of embryos enclosed in parenthesis.

Eu-B: Eu-blastocyst. Pseu-B: Pseudo-blastocyst. TV: Trophoctodermal vesicle. NIF: Non-integrated form.

Deg: Degenerated embryo.

對照卵의 構成: 대조란은 실험군에서와 동일한 방법으로 0.5% pronase가 희석된 BMOC-3액에서 투명대를 제거시킨 8세포기란과, 투명대 제거 후 PBS(-)액으로 decompaction시킨 桑質胚로 구성하였다.

切斷二分胚 및 對照卵의 培養: 대조군 및 실험군의 수정란은 유동paraffin으로 덮혀진 微小滴培養液속에 넣어 37°C, 5% CO₂, 95% 空氣 및 습도가 포화상태인 CO₂배양기(日本田葉井製)에서 배양하였다.

培養後 受精卵의 形態의 分類: 배양개시 6시간 후부터 54시간에 이르기까지 매 6시간마다 倒立顯微鏡下에서 수정란을 검사하여 Nagashima 등²¹⁾의 분류법을 응용하여 다음과 같이 6형으로 분류하고 胞胚腔의 再形成時間을 기록하였다.

제 1형: 세포내용물(inner cell mass, 이하 ICM)이 명확하고 잘 발육된 營養膜細胞를 함유한 正常胚盤胞(Eublastocyst, 이하 Eu-B).

제 2형: 營養膜細胞層은 있으나 ICM이 잘 발육되지 않은 非正常胚盤胞(Pseudo-blastocyst, 이하 Pseu-B).

제 3형: 營養膜細胞는 있으나 ICM이 全無한 形(Trophectodermal vesicle, 이하 TV).

제 4형: 정상 營養膜細胞가 아닌 조그만 腔胞만 있거나 腔胞群에 세포만 집합되어 있는 形(Non-integrated form, 이하 NIF).

제 5형: 變性形(Degenerated form, 이하 Deg).

제 6형: 기타(배양 개시후 도중에 발육이 정지된 상태이거나 桑實胚에 머물러 있는 形).

8細胞卵 및 桑實胚의 切斷胚는 배양종료시점에서 형태가 정상인 胚盤胞로 발육된 卵(Eu-B)을 發育卵으로 判定하였으며 對照卵에서는 정상형태의 後期胚盤胞까지 발육된 것을 發育卵으로 判定하였다.

有意差檢定: 대조란 및 실험란에 있어서 體外發育能의 유의차검정은 χ^2 검정으로, 切斷卵과 對照卵에서의 胞胚腔再形成에 소요된 시간의 유의차 검정은 t 검정으로 실시하였다.

結 果

切斷胚의 發育成績: 切斷 8細胞卵 및 桑實胚가 Eu-B로 발육된 성적은 각각 44.9% 및 74.0%였다(Table 1, 2).

兩實驗群에서 對照卵이 Eu-B로 발육된 성적은 8세포기에서 95.3%, 桑實胚에서는 93.5%로서 有意差가 인정되지 않았다. 그러나 切斷 8細胞期卵 및 桑實胚에서의 發育能은 8세포기란보다 상실배에서 월등히 높았다($p < 0.05$).

8세포기란에서 割球數가 3, 4개인 경우 Eu-B로의 발육성적은 각각 43.3% 및 64.8%이었으나 2개의 割球만으로는 Eu-B로의 發育이 불가능했다(Table 1).

切斷桑實胚에서 割球數에 따른 발육성적은 割球數가 7, 8 및 9개였을때는 각각 93.1%, 93.2% 및 96.0%가 Eu-B로 判定되었으나 5개 및 6개로 割球數가 감소함에 따라 Eu-B로의 발육성적도 36.8% 및 66.7%로 현저히 감소하였다.

割球數가 3, 4개였을 때는 Eu-B로의 발육이 거의 불가능했다(Table 2).

그러나 8세포기란 및 桑實胚에서 割球數가 감소할수록 Eu-B로의 발육성적은 저하되었으나 Pseu-B나 TV로의 전환율은 증가되었다(Table 1, 2).

胞胚腔再形成時間: 배양종료시점에 Eu-B나 Pseu-B로 判定된 切斷胚 및 後期胚盤胞까지 발육한 對照卵에 대하여 매 6시간마다 胞胚腔의 再形成을 관찰한 결과는 표 3에 나타난 바와 같다.

Table 3. Percentage of Blastocoele Formation in Each Time Lapse from Beginning of *in vitro* Culture of 8-Cell and Morula Stage Embryos

Embryos	No. of embryos cultured	Percentage of blastocoele formation in time(hours) lapse									Mean
		6	12	18	24	30	36	42	48	54	
8-Cell stage											
Eu-B	48	—	—	—	4.5	37.1	40.7	14.3	3.4	—	35.1 ^b
Pseu-B	20	—	—	—	3.1	34.3	43.3	15.2	4.1	—	34.7 ^c
Control	82	—	—	—	40.7	22.3	25.5	11.5	—	—	30.5 ^a
Morula stage											
Eu-B	114	—	21.6	56.2	17.1	5.1	—	—	—	—	18.7
Pseu-B	19	—	30.2	15.3	27.5	15.4	11.6	—	—	—	23.2
Control	86	—	29.1	28.5	9.6	24.3	7.5	—	—	—	20.7

Eu-B: Eu-blastocyst. Pseu-B: Pseudo-blastocyst. a vs b: ($p < 0.01$) a vs c: ($p < 0.05$)

즉, 切斷된 8 세포기란에서의 胞胚腔再形成時間은 Eu-B 및 Pseu-B에서 각각 35.1시간 및 34.7시간으로 유의차가 인정되지 않았으나 對照卵의 30.5시간에 비해서는 각각 1% 및 5% 수준의 유의차가 인정될 정도로 짧았다.

切斷된 桑實胚에서의 胞胚腔再形成時間은 Eu-B, Pseu-B 및 對照卵에서 각각 18.7, 23.2 및 20.7시간으로서 상호간의 유의차는 인정되지 않았다.

考 察

동물의 수정란을 分割하는 데에는 保定用 피펫으로 수정란을 보정하고 割球分離用 피펫이나 micro glass needle을 사용하여 分割하는 方法^{39, 40)}과 保定用 피펫으로 수정란을 보정하고 外科用 메스를 改良한 기구로 투명대를 뚫는 方法²⁶⁾ 및 투명대가 제거된 수정란을 micro glass needle만으로 절단하는 方法²²⁾이 있다.

이 실험에서는 Nagashima 및 Ogawa²²⁾법을 준용하여 보정용 피펫을 사용하지 않고 micro glass needle만으로 수정란을 성공적으로 절단하였다.

마우스 분할란의 正常胚盤胞까지의 발육율은 8~16세포기란에서 59%²⁷⁾ 및 77%¹⁵⁾라는 보고가 있다.

桑實胚에서는 27~54%²⁸⁾, 64.9%²¹⁾, 78%³⁷⁾ 및 74~84% 등¹⁹⁾이 있는데 이 실험에서의 성적인 44.9%(8세포기란) 및 74.0%(桑實胚)는 이들의 성적과 유사한 결과라 하겠다.

그러나 8 세포기란에서의 切斷胚의 발육율이 44.9%인데 비해 同期의 對照卵에서는 95.3%인 것이나 切斷桑實胚에서의 發育率이 74.0%인데 비해 同期의 對照卵에서는 93.5%인 것을 비교해 볼때 桑實胚는 割球가 ICM이나 營養膜細胞로의 分化期라고 한 보고^{5, 11, 12)}를 감안하면 8 세포기란 시기보다는 桑實胚時期가 적절한 切斷期라고 여겨지며, 비록 桑實期라해도 割球에 주어질 수 있는 기계적 손상이 최소한으로 되도록 적절히 decompaction 시켜야 할 것으로 사료된다.

또한 切斷胚도 궁극적으로는 生體內에 移植하여 착상을 이룩해야 한다는 점에서 8 세포기란

의 4球에서의 발육율인 64.8%나 桑實胚에서의 6割球의 66.7% 정도로서는 배양후에 연결되어야 할 동결보전 및 移植段階를 고려할 때 수정란의 分割은 桑實胚에서 시행해야 할 것이며 割球數는 적어도 7割以上이어야 되겠다고 사료된다. 이와같은 결과는 Nakagawa 등²³⁾의 결론과도 일치한다.

한편 胞胚腔의 再形成時間에 대해서 Smith 및 McLaren²²⁾은 細胞數나 分裂回數에 의존하기 때문에 分割卵이나 對照卵에서 同一한 시간이 소요된다고 하였으나 Fernandez 및 Izquiedo⁶⁾는 세포수나 분열횟수가 문제되지 않고 受精으로부터 경과된 시간에 의존된다고 하였다.

이 실험에서는 胞胚腔再形成時間은 8 세포기란에서는 切斷卵과 對照卵間に 유의차가 있었으나 桑實胚에서는 實驗卵 및 對照卵間に 유의차가 없는 점에서 受精으로부터의 경과시간에 의존한다는 학설⁶⁾과 일치하는 결과이었다.

結 論

切斷된 受精卵의 凍結保存實驗의 前段階로 마우스 수정란의 切斷 후 체외에서의 發育能과 胞胚腔再形成時間을 알아보기 위해 8 세포기란과 桑實胚를 micromanipulator로 절단하여 배양시킨 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 보정용 피펫이나 그밖의 미세기구를 이용하지 않고 micro glass needle만으로 受精卵을 切斷할 수 있었다.

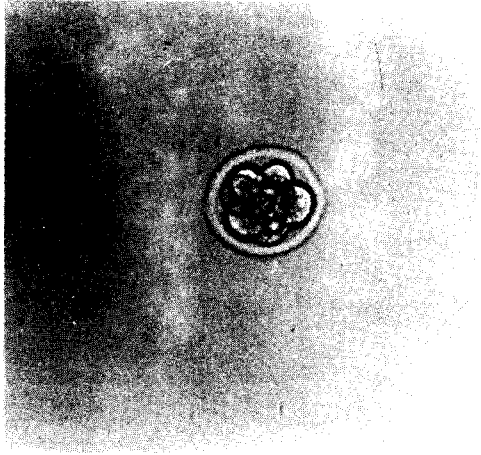
2. 切斷桑實胚에서 割球數가 7~9개 일 경우 정상적인 胚盤胞로의 發育率은 94.1%였으나 8 세포기란에서 切斷 후 割球數가 4개일 경우에도 正常胚盤胞로의 發育率은 64.8%로서 저조하였다($p < 0.05$).

3. 割球數가 감소할수록 正常胚盤胞로의 發育率은 저하되었으나 僞胚盤胞 또는 營養膜細胞로의 전환율은 증가되었다.

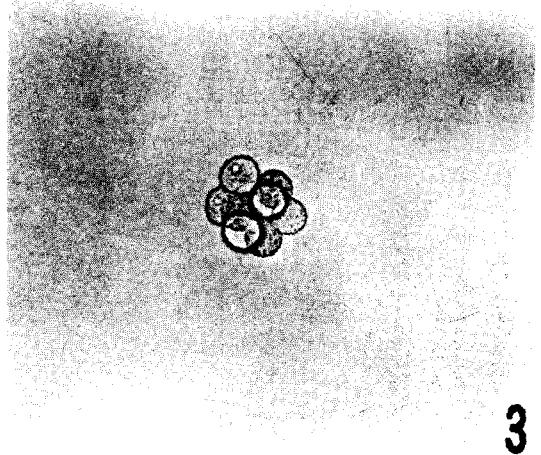
4. 胞胚腔의 再形成時間은 桑實胚에서는 유의차가 없었으나 8細胞期卵에서는 切斷卵이 對照卵에 비해 유의성있게 지연되었다($p < 0.01$, $p < 0.05$).

Legends for Figures

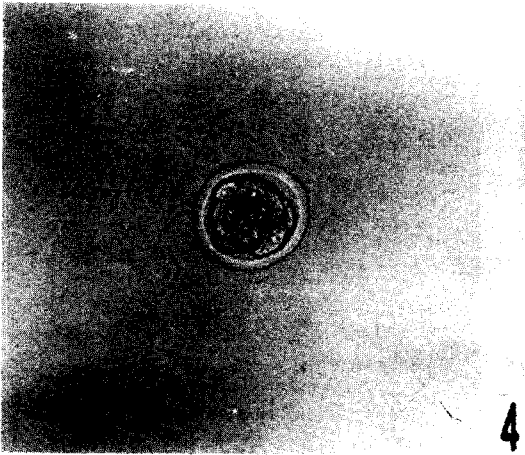
- Fig. 2.** Zona-intact 8-cell embryo obtained 66 hours after HCG injection, X200.
- Fig. 3.** Zona-free 8-cell embryo obtained after 0.5% pronase solution treatment for 3~5 minutes, X200.
- Fig. 4.** Zona-intact compacted morulae obtained 76 hours after HCG injection, X200.
- Fig. 5.** Zona-free compacted morulae obtained after 0.5% pronase solution treatment for 3~5 minutes, X400.
- Fig. 6.** Decompacted morulae obtained after PBS(-) solution treatment for 20~30 minutes, X200.
- Fig. 7.** Decompacted morulae during bisection procedure with micro glass needle, X200.
- Fig. 8.** Morulae bisected and divided into 4 blastomeres and another. Arrowed morulae has 4 blastomeres, X200.
- Fig. 9.** Eu-blastocyst cultured for 18 hours *in vitro* after bisection(the same pair as Fig.8). Pointer indicates degenerated portion which is injured during bisection, X400.
- Fig. 10.** Eu-blastocysts obtained after 48 hours of *in vitro* culture, X200.
- Fig. 11.** Eu-blastocyst obtained after 18 hours of *in vitro* culture from control morulae, X400.
- Fig. 12.** Eu-blastocyst obtained after 18 hours of *in vitro* culture from bisected morulae, Pointer indicates degenerated portion which is injured with glass needle during bisection X400.



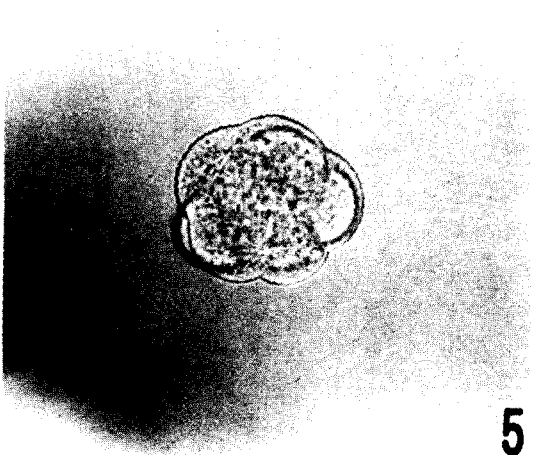
2



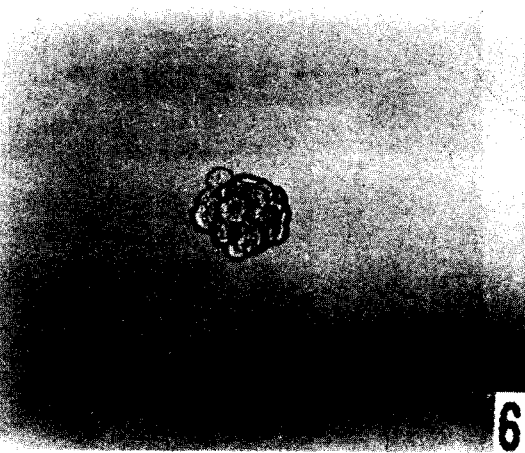
3



4



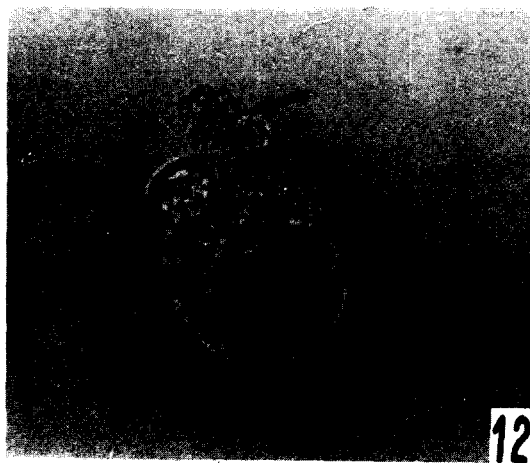
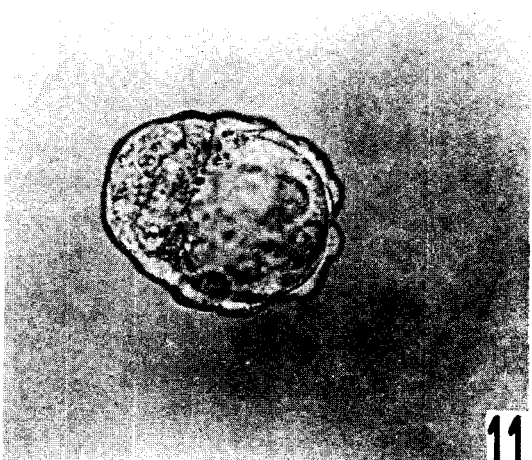
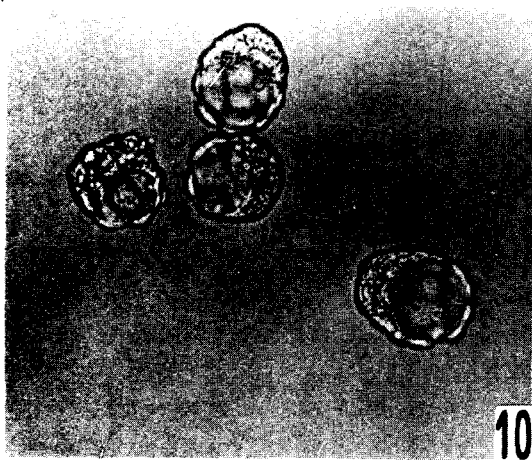
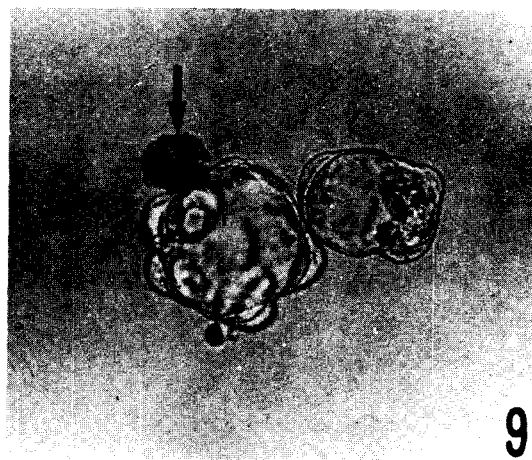
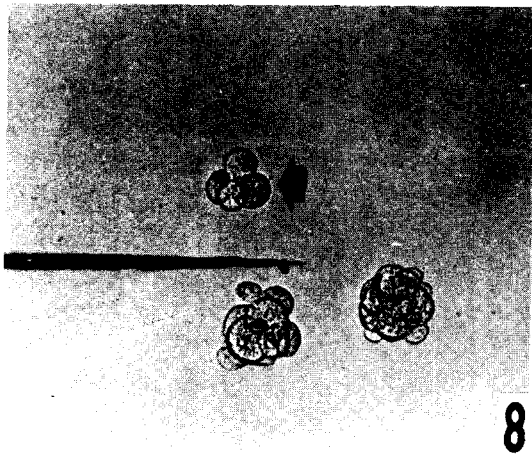
5



6



7



参 考 文 献

1. Brinster, R.L. : A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp. Cell Res.* (1963) 32 : 205.
2. Brinster, R.L. : *In vitro* culture of the embryo, in *Pathways to Conception*, edited by Sherman, A.I., Charles, C.T., Publishing Company, Springfield, Illinois(1971) p.245.
3. Bronson, R.A. and McLaren, A. : Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* (1970) 22 : 129.
4. Chung, K.S. and Rho, H.C. : *In vitro* culture of blastomere separated from mouse embryo. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Univ. of Illinois, U.S.A. (1984) 223.
5. Duchibella, T. : Surface change of the developing trophoblast cell. In *Development in Mammals*, Vol. 1, edited by Johnson, M.H.; Amsterdam, North Holland(1977).
6. Fernandez, M.S. and Izquierdo, L. : Blastocoele formation in half and double mouse embryos. *Anat. Embryol.* (1980) 160 : 77.
7. Fisher, P.S. and Macpherson, J.W. : Development of embryonic structures from isolated mouse blastomeres. *Can. J. Anim. Sci.* (1975) 56 : 33.
8. Gardner, R.L. : Mouse chimaeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* (1968) 220 : 596.
9. Heape, W. : Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc. R. Soc. Lond.* (1890) 48 : 457.
10. Hoppe, P.C. and Witten, W.K. : Does X-inactivation occur during mitosis of first cleavage? *Nature*(1972) 239 : 520.
11. Johnson, M.H. : Intrinsic and extrinsic factors in preimplantation development. *J. Reprod. Fertil.* (1979) 55 : 255.
12. Johnson, M.H., Handyside, A.H. and Braude, P.R. : Control mechanisms in early mammalian development. In *Development in Mammals*, Vol. 1, edited by Johnson, M. H., Amsterdam, North Holland(1977).
13. Kelly, S.J. : Studies of potency of the early cleavage blastomeres of the mouse. in *The Early Development of Mammals*, edited by Balls, M. and Wild, A.E., London and New York, Cambridge Univ. Press(1975).
14. Kelly, S.J., Mulnard, J.G. and Graham, C.E. : Cell division and cell allocation in early mouse development. *J. Embryol. Exp. Morph.* (1978) 48 : 37.
15. Koster, U. : Versuche zur Mikromanipulation an Mause und Kaninchenzygoten im Hinblick auf die Erstellung idetischer Zwillinge. Hannover, Tierarztl. Hochschule, Inaug. Diss. (1982).
16. Kvangnickii, A.V. : Interbreed ova transplantation. *Sovetsk. Zooteh.* (1951) 1 : 36.
17. Mintz, B. : Formation of genotypically mosaic mouse embryos. *Amer. Zool.* (1962) 2 : 432.
18. Minz, B. : Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida. *Science*(1962) 138 : 594.
19. Moustafa, L.A. and Hahn, J. : Experimentelle Erzeugung von identischen Mausezwillingen. *Dtsch. Tierartzt. Wschr.* (1978) 85 : 242.
20. Mulnard, J. : Studies of regulation of mouse ova *in vitro*, in *Preimplantation Stages of Pregnancy*. A Ciba Foundation Symposium, edited by Wolstenholme, G.E.W. and O'Connor, M., London: J. and A. Churchill(1965).
21. Nagashima, H., Matsui, K., Sawasaki, T. and Kano, Y. : Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fertil.* (1984) 70 : 357.
22. Nagashima, H. and Ogawa, S. : Studies on the developmental potential and the survival after deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. *Jpn. J. Anim. Reprod.* (1981) 27 : 12.
23. Nakagawa, A., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. : Studies in developmental potentials of bisected mouse embryos *in vitro* and *in vivo*. *Jpn. J. Vet. Res.* (1985) 33 : 121.
24. Nicholas, J.S. and Hall, B.V. : Experiments on developing rat. II. The development of isolated blastomeres and fused egg. *J. Exp. Zool.* (1942) 90 : 441.

25. O'Brien, M.J., Grister, E.S. and First, N.L. : Developmental potential of isolated blastomeres from early murine embryos. *Theriogenology*(1984) 22 : 601.
26. Ozil, J.P. : Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fertil.* (1983) 69 : 463.
27. Rodrigues, J.L. : Embryotransfer bei der Maus unter besonderer Berücksichtigung von Zonafreien und geteilten Zygoten. Hannover, Tierarztl. Hochschule, Inaug. Diss. (1981).
28. Rodrigues, J.L., Schneider, U. and Hahn, J. : Versuche zur Erstellung von identischen Mausezwillingen. *Zuchthygiene*(1980) 15:89.
29. Rossant, J. : Cell commitment in early rodent development. in *Development in Mammals*. Vol. 2, edited by Johnson, M.H., Amsterdam, North Holland(1977).
30. Rossant, J. : Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J. Embryo. Exp. Morph.* (1976) 36 : 283.
31. Sherman, M.I. : The role of cell-cell interaction during early mouse embryogenesis. In *The Early Development of Mammals*. Edited by Balls, M. and Wild, A.E., London, Cambridge Univ. Press(1975).
32. Smith, R. and McLaren, A. : Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. *J. Embryol. Exp. Morph.* (1977) 41 : 79.
33. Tarkowski, A.K. : Experiments of the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature(Lond.)*(1959a) 184 : 1286.
34. Tarkowski, A.K. : Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse egg. *Acta. Theiologica.* (1959b) 3 : 191.
35. Tarkowski, A.K. : Mouse chimaeras developed from fused egg. *Nature*(1969) 190 : 857.
36. Tarkowski, A.K. and Wroblewaka, J. : Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryo. Exp. Morph.* (1967) 18 : 155.
37. Tsunoda, Y. and McLaren, A. : Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. *J. Reprod. Fertil.* (1983) 69 : 315.
38. Warwick, B.L. and Berry, R.O. : Inter-genetic and inter-specific embryo transfer. *J. Hered.* (1949) 40 : 297.
39. Willadsen, S.M. : A method of culture of micro-manipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*(1979) 277 : 298.
40. Willadsen, S.M. and Godke, R.A. : A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.* (1984) 114 : 240.
41. Willett, F.L. : Successful transplatantion of a fertilized bovine ovum. *Science*(1951) 113 : 247.

Effects of Freezing on Bisected Mouse Embryos

1. Developmental Potentials of Bisected Mouse Embryos *in vitro*

Woo-Suk Hwang, DVM, MS, PhD.

Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University

Abstract

Mouse embryos of 8-cell stage and compacted morulae (approximately 16 cells) containing different number of blastomeres were bisected and cultured *in vitro* to determine the developmental potentials of the divided embryos compared with those of unmanipulated control embryos. The results were as follows.

1. Micromanipulation was performed successfully by means of a simple manipulator which holds a fine glass-needle, without the use of any micro-instruments for support.

2. The percentage of bisected morulae with 7-9 blastomeres that developed to eu-blastocyst was 94.1%, while only 64.8% of the bisected 8-cell embryos with 4 blastomeres developed to eublastocysts ($p < 0.05$).
3. The percentage of eu-blastocysts decreased, while that of pseudoblastocysts and trophoctodermal vesicle increased as the number of blastomeres decreased in the bisected embryos of the two stages.
4. The time of the blastocoele re-formation of the bisected and control embryos was not significantly different in morulae stage embryos, but it was significantly delayed in the 8-cell stage embryos (Eu-B, Pseudo-B) compared with control embryos ($p < 0.01$, $p < 0.05$ respectively).