

FDA-Test 生死判定法이 超急速 凍結된 Mouse 受精卵의 培養과 移植後 着床에 미치는 影響

I. FDA 添加 水準이 超急速 凍結된 생쥐상실배의 培養과 移植에 미치는 영향

金重桂 · 梁柄哲 · 文星豪 · 高敬來 · 康珉秀 · 張德支
濟州大學校 農科大學

Effects of FDA-Test on the Survival and Conception Rate in Vitrified Mouse Embryos

I. Effects of Addition Levels of FDA(Florescein Diacetate) on Survival and Conception Rate in Vitrified Mouse Morulae

Kim, J. K., B. C. Yang, S. H. Moon, G. R. Ko, M. S. Kang and D. J. Jang

College of Agriculture, Cheju National University

SUMMARY

This study was carried out to test the effects of fluorescein diacetate(FDA 0 μ l/ml, 0.5 μ l/ml, 5 μ l/ml, 10 μ l/ml or 0 μ l/ml, 5 μ l/ml in PBS) treated before culture on the survival of vitrified mouse morulae in vitrification solution(20% glycerol + 10% ethylene glycol + 30% ficoll + 10% sucrose).

The results were summarized as follows;

1. The survival rate of the FDA-tested fresh mouse morulae after 24 hours culture was over 96%(P4.8) in the control or treatment groups with various levels of FDA. Because the rate of mouse morulae which developed to hatched blastocysts was higher with the various levels of FDA treatment(67%) than control(50%), it was considered that toxicity of FDA did not affect the survival of mouse morulae.
2. When mouse morulae were FDA-tested in FDA 0(control), 0.5, 5, and 10 μ l/ml treatment after vitrification, the development rate to expanded blastocyst were 66, 82, 64 and 76%, and FDA scores were P4.2(84%), P4.7(94%), P4.2(84%) and P3.9(78%), respectively. There were no significant differences between control and FDA treatments, but there were significant difference between 0.5 μ l/ml(94%) and 10 μ l/ml(78%) treatments(P<0.01).
3. The survival rates of cultured mouse morulae according to FDA-scores(P0 = non-fluorescence; P1~P5 = according to their fluorescence) after vitrification were P5:92%, P4:67%, P3:42% and P2-P0:0%, respectively.
4. Implantation rates of morulae stage embryos cultured into early blastocysts and implanted

into uterine horns after vitrification were 14 and 11% embryos treated control(0 μ l/ml) and FDA 5 μ l/ml and the normal fetus development was 2% embryos for both treatments.

Results of this present study indicated that toxicity of FDA does not affect not only the survival of fresh and vitrified mouse morulae but also the development rate and implantation of fetus after transfer as well. The development rates of mouse morulae with the FDA score of P5, P4 and P3 were 92, 67 and 42%, respectively, it was considered that FDA-test was fit for the judge of survival.

Key words: Vitrification solution, Mouse morula, Transfer, FDA-test, Expanded blastocyst, Implantation

I. 緒 論

近年에 이르러 家畜 受精卵移植 技術의 發達은 優秀 家畜의 改良 增殖 事業에 있어서 많은 寄與를 하고 있다. 그러나 受精卵의 凍結·融解 後 培養 및 移植 結果는 이들의 生存能力에 달려 있고 아직 그 成績은 低調한 實情이다.

凍結 融解卵을 移植한 後 受胎成績이 아직 低調한 이유는 受精卵의 凍結 融解後 生存率이 낮은 이유도 있겠지만, 受卵牛의 良否, 子宮의 環境要因, 移植技術, 그리고 受精卵의 精確한 生死判定 等 많은 어려움이 뒤따르기 때문에 思料된다. 一般的으로 凍結 및 融解 後 受精卵을 顯微鏡으로 觀察했을 때 外觀狀으로는 割球의 破壞나 變形이 없을지라도 이미 發育能力이 消失되거나 代謝作用의 停止, 또는 쇠약한 상태의 受精卵이 存在하게 되므로 生存性과 發育能力을 正確히 判定하여 移植하는 것이 重要하다.

따라서 FDA-test는 그 處理가 간단하고, 螢光顯微鏡만 있으면 短時間(2~5分)에 난자의 生死判定이 可能하다. 그리고 一部分割球의 죽은 部分까지도 精確히 判定이 되며 等級別로도 區分할 수 있을 뿐만 아니라 一般顯微鏡으로는 生死判定이 불가능한 卵胞卵(follicular oocyte), 排卵된 成熟卵子(oocyte), 胚盤胞期胚(blastocyst), 裸化胚(hatched blastocyst) 等도 明確하게 生死判定할 수 있다. 더우기 卵子 發育에 害가 없으며 一般顯微鏡 아래서의 外觀判定보다 正確性을 10% 程度 增加시킬 수 있으므로(Schilling & Dopke, 1978; Shilling 等, 1982), 處理別 比較 試驗에서도 正確性을 기대할 수 있고 같은 時間에 많은 試驗을 遂行할 수 있다.

FDA-test는 Rotman 과 Papermaster (1966)에 의해 體外培養 受精卵의 生存性을 測定하는데 最初로 사용되었다. 그 이후 이 試驗法을 受精卵 生死判定에 이용한 報告는 bovine(Schilling & Dopke, 1978; Schilling 等, 1979ab, 1982; Frank 等, 1986; Bielanski 等, 1986), mouse(Leibo & Mazur, 1978a, b; Linda & Trounson, 1980; Schmidt 等, 1985), rabbit(Schilling & Dopke, 1978; Schilling 等, 1979a), pig oocyte(Didion 等, 1990)等에서 있었으며, 國內에는 最近 mouse 受精卵에서 Kim 等(1988), Kang 等(1989 a, b), 高 等(1991)이, 돼지 受精卵에서는 Lee 等(1992), Kim 等(1992)이 凍結 融解後 FDA-test에 의해 生存性 判定을 한 例가 있다.

앞으로 FDA-test 가 超急速 凍結後 受精卵의 生死判定基準에 適合하다는 것이 本 試驗에서 再確認 된다면 많은 家畜 受精卵의 應用 比較 試驗에서 CO₂ incubator가 없더라도 많은 比較 實驗이 可能하며, FDA-score 에서 P4~P5(80~100% 發光하는 것) 等級의 優良受精卵을 移植시킴으로서 家畜受精卵의 凍結 融解 後 移植 成功率를 向上시킬 수 있을 것으로 思料된다.

그러므로, 本 實驗에서는 FDA-test 生死判定法이 琉璃化 凍結된 受精卵의 發育에 有害與否를 判定하기 위하여 凍結融解 前·後에 각각 FDA 添加水準을 달리 處理하여 培養 및 移植한 後 生存性과 着床여부를 確認하여 이의 활용을 增進시키고자 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 受精卵 採取

PMSG 6 IU 를 피하주사 48 시간 후 HCG 6 IU 를 주사하여 과배란 시킨 ICR mouse 를 동일계의 雄性생쥐와 1:1로ผสม, 自然交尾를誘導하였다. 다음날 아침 vaginal plug가 確認된 것만 實驗에 供試하였다. HCG 주사 후 72~75時間에 開腹手術하여 子宮과 卵巢를 摘出하여 m-PBS로 子宮을 灌流하여 morula stage를 回收하였다. 新鮮한 PBS로 3回 洗滌하고 形態의으로 正常的인 것만 選別하여 실험에 供試하였다.

2. 凍結·融解

凍結保存液은 vitrification solution(ficoll 30%, glycerol 20%, ethylene glycol 10%, sucrose 10% + PBS)을 준비하였다(Ko, 1991). 凍結液은 1ml주사기를 연결시킨 0.25ml straw에 미리 PBS(50 μ l), air bubble(20 μ l), PBS(30 μ l), air bubble(20 μ l), 50 μ l의 凍結液순으로 注入하여 준비하였다(Fig. 1).

受精卵(7~10개 /straw)은 凍結液 drop에 침지한 後 미리 준비한 straw의 凍結液으로 옮겨 straw powder로 封印하고, 室溫(26 \pm 1 $^{\circ}$ C)에서 LN₂ container에 직접 超急速 凍結(220 $^{\circ}$ C /sec) 시켰으며, 平衡時間은 실온에서 10分으로 하였다. 融解는 38 $^{\circ}$ C 溫水에서 10초 동안 흔들면서 融解한 後, 신선한 PBS에 5分 동안 靜置하여 卵子內의 耐凍劑를 除去하고 PBS에 3回 옮긴 後 FDA-test를 실시하였다.

3. FDA-test

FDA液은 fluorescein diacetate(Sigma, Cat. No. F-7378) 5mg/ml acetone을 stock solution (Linda & Trounson., 1980)으로 製造하여 使用前에

(1) 0.5 μ l stock/ml PBS(standard), (2) 5 μ l stock/ml PBS(S \times 10倍), (3) 10 μ l stock/ml PBS(S \times 20倍)로 준비하였고, (4) 對照區는 0 μ l stock/ml PBS(FDA-free PBS)로 하였다.

凍結融解 및 fresh embryos는 4處理區에 각각 任意配置하여 室溫(26 \pm 1 $^{\circ}$ C)에서 공히 10分동안 FDA에 露出시키면서 位相差螢光顯微鏡의 U.V. light下에서 等級을 判定하였다. 10分 後 各 處理의 受精卵은 FDA-free PBS로 옮긴 後 4回 洗滌하였으며, 12時間 동안 paraffin oil下에서 前培養한 培養液에 옮겨 5% CO₂ 大氣의 37 $^{\circ}$ C incubator에서 培養하였다.

FDA-score는 다음과 같은 基準에 의하여 判定하였다.

P-5: 수정란의 分割球 全體가 綠色螢光을 強하게 發散하는 것(5점;100% 生存)

P-4: 수정란의 分割球중 80%가 螢光을 띠거나 positive-5보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는 것(4점;80%)

P-3: 수정란의 分割球중 60%가 螢光을 띠는 것, 또는 positive-4보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(3점;60%)

P-2: 수정란의 分割球중 40%가 螢光을 띠는 것, 또는 positive-3보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(2점;40%)

P-1: 수정란의 分割球중 20%가 螢光을 띠는 것, 또는 positive-2보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(1점;20%)

P-0: 螢光을 전혀 發散하지 않는 것(0점;0%, negative)

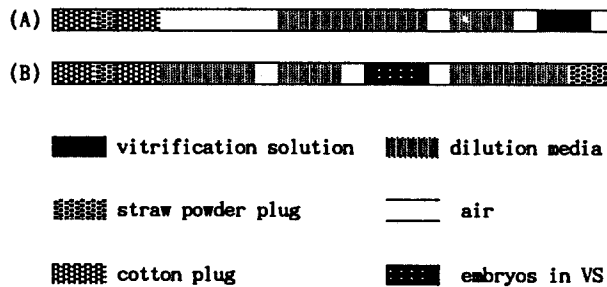


Fig. 1. Configuration of vitrification solution, dilution medium and air in 0.25 ml straw, just before loading embryos(A) and after sealing with straw powder (B).

平均 FDA-score는 다음 식에 의하여 計算되었다.

$$\text{Mean score} = [(A \times 5) + (B \times 4) + (C \times 3) + (D \times 2) + (E \times 1)] / N$$

A : No. of P-5 B : No. of P-4
 C : No. of P-3 D : No. of P-2
 E : No. of P-1
 N : Total of P-0~P-5

4. 受精卵 培養

培養液은 20% FCS(Gibco, Cat, No. 201-6170)를 첨가한 후 pH 7.2~7.4, osmolality 270~290 m osmol/kg으로 정한 Ham's F-10 을 0.22 μ m 의 membrane filter 로 여과한 후 5% CO₂, 37 incubator 에서 前培養시켜 배양을 실시하였다.

5. 受精卵 移植

受卵 생쥐는 6~8 주령의 未經産 雌性 ICR mouse 로서, 精管切除手術한 雄性 mouse(7~10 週齡)와 1:1로 ผสม하여 vaginal plug가 확인된 날 아침을 위 임신 1일로 하여, 위임신 3일째에 移植하였으며, 이 때 受精卵의 준비는 凍結·融解 後 FDA 處理區와 無處理區로 구분하여 24시간 培養後(early 또는 middle blastocyst stage) 右側 子宮角 上端部에는 FDA 處理卵子, 左側에는 無處理 卵子(5~7)를 각각 移植하였다. 移植 確認은 14日 後 開腹手術하여 左·右側 子宮角에 着床 狀態를 記錄하였다.

6. 統計分析

統計分析은 FDA-score에 의해 Minitab의 T-test 로 하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

FDA 添加水準이 수정란 발육에 미치는 유해 여부를 파악하기 위해서 凍結·融解 과정을 거치지 않은 新鮮한 mouse morulae의 FDA 處理水準에 따른 배양 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

Mouse 子宮을 外科的으로 摘出하여 PBS로 flushing한 新鮮한 mouse morulae는 培養前에 FDA-test 에서 모두 P5(100% 生存)를 나타내었으며, 24時間 培養 後 control(FDA-free)에서 90%(18/20)가 expanded blastocysts 단계까지 발달하였고, 이때 39%(7/18)가 hatched blastocysts까지 發達 狀態를 보였다.

0.5 μ l/ml(standard)에서는 16개의 morulae 모두 (16/16) expanded blastocysts로 발달하였으며, 이 중 hatched blastocysts까지 發育狀態를 나타낸 것은 50%(8/16)였다. 5 μ l/ml(S \times 10)에서도 역시 14개의 morulae중에서 93%(13/14)가 發達하였으며, 그 중 46%(6/13)가 hatched blastocysts 상태를 나타내었다. 10 μ l/ml(S \times 20)에서도 17개의 morulae중 71%(12/17)가 24時間 培養 後 發達하였고, hat-

Table 1. Effects of FDA concentration on the survival of fresh mouse morulae

Treatment ^a (FDA/PBS)	No. of embryos	No. (%) of embryos developed to		Mean FDA score
		Expanded blastocysts*	Hatched blastocysts*	
Control	20	18(90)	7(39)	5.0
0.5 μ l/ml	16	16(100)	8(50)	5.0
5 μ l/ml	14	13(93)	6(46)	5.0
10 μ l/ml	17	12(71)	6(50)	4.8

^a Control; FDA-free PBS

0.5 μ l/ml; Stock(FDA 5mg/ml acetone) 0.5 μ l/ml PBS (standard)

5 μ l/ml; Stock(FDA 5mg/ml acetone) 5 μ l/ml PBS (S \times 10 times)

10 μ l/ml; Stock(FDA 5mg/ml acetone) 10 μ l/ml PBS (S \times 20 times)

* Culture for 24hrs.

ched blastocysts 狀態인 것은 59%였다. 이때 각 處理區에서 培養 24時間 後 모든 胚를 FDA-test한 결과 control, 0.5 μ l/ml, 5 μ l/ml에서 모두 P5.0의 狀態를 보였고 10 μ l/ml에서는 P4.8(96%)을 나타내었으나 處理間 有意差는 없었다. 그리고 培養 24時間 後 hatched blastocysts까지 발달한 것은 對照區 (FDA-free PBS)에서보다 FDA處理區에서 약간 높은 傾向을 나타내었다. 그러므로 凍結·融解하지 않은 mouse morulae는 FDA濃度を Linda & Trounson (1980)이 발표한 濃度 (1:400,000~800,000)의 10배 (5 μ l/ml), 또는 20배(10 μ l/ml)까지 높여도 이들의 發達에는 影響을 미치지 않았다.

이러한 結果는 新鮮한 embryos를 FDA 또는 U. V. light에 露出 후 *in vitro*, *in vivo* 發育에 影響을 주지 않는다는 Linda & Trounson(1980)의 報告와 一致하며, FDA-test는 無處理區와 거의 비슷한 발달 (Bielanski 等, 1986) 또는 오히려 處理區가 더 좋았다는 Schilling 等(1976)의 成績과 一致했다.

以上的 成績을 基礎로 하여 琉璃化 凍結 融解한 embryos에서 같은 방법으로 FDA 濃度別 處理 後 48時間 동안 培養한 結果는 Table 2와 같다.

對照區(FDA-free PBS), 0.5 μ l stock/ml PBS (standard 處理), 5 μ l stock/ml PBS(S \times 10) 그리고 10 μ l stock/ml PBS(S \times 20)로 處理 後 培養하여 24時間에 late morulae-blastocysts로 發達한 成績이 各各 94%(30/32), 100%(22/22), 96%(27/28), 97%(28/29)이었고, 48時間 培養 後 expanded blastocysts까지 발달한 成績은 各各 21(70%), 18(82%), 18(67%), 22(79%)이며, 이때의 FDA-

score는 各各 P4.2, P4.7, P4.2, P3.9로서 對照區와 各 處理區와는 有意차가 없었으나(P>0.01), FDA 處理區중 0.5 μ l/ml와 이 濃度の 20배(10 μ l/ml)處理와는 높은 有意차를 나타내었다(P<0.01).

따라서 FDA處理 濃度は FDA stock 5 μ l/ml PBS(S \times 10)까지는 해가 없다고 할 수 있으며 FDA 處理後 螢光을 發光하기까지의 時間은 室溫(26 $^{\circ}$ C)에서 0.5 μ l/ml가 5分 以上の 時間을 要했으며, 5 μ l/ml PBS는 1分 以內에 FDA-score로 分類 가능한 發光狀態를 나타냈다.

本 實驗은 共히 10分씩 FDA 와 U.V. light下에 露出시켰으므로 FDA-score를 빨리 決定하여 凍結, 培養 또는 移植에 이용하는데 不必要한 *in vitro* 操作 時間을 줄이는 것이 必要하다고 思料된다.

凍結融解 胚의 發育遲延은 Table 1과 比較했을 때 FDA處理와는 상관없이 新鮮한 胚는 24時間 培養時 90%(control)以上이 expanded blastocysts로 발달 (control: 90%)하였으나, 凍結融解 胚(Table 2)에서는 48時間까지 培養한 後 비로소 이와 비슷한 發育 狀態(control:94%)를 보인 것으로 充分히 推定할 수 있다. 現在까지 本 實驗의 凍結 融解 卵子에서 FDA 標準區와 10배 까지의 添加는 害가 없는 것으로 判斷 되었으며, 이러한 成績은 Bielanski 等(1986)이 bovine embryos의 FDA-test와 培養에서 對照區와 거의 같은 成績(33 vs 20)을 보인 것과 一致하며, 凍結·融解 cattle embryos에서 FDA와 DAPI를 사용해 生存性 判定後 培養한 것은 發育에 支障이 없었다는 Shilling 等(1982)의 報告와도 一致한다.

Table 3은 凍結·融解 mouse morulae의 FDA 等

Table 2. Effects of FDA concentration on the survival of vitrified mouse morulae

Treatment (FDA/PBS)	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered(%)	No.(%) of embryos developed to		Mean FDA score
			Late morulae -blastocyst*	Expanded blastocyst**	
Control	41	32(78)	30(94)	21(66)	4.2 ^{ab}
0.5 μ l/ml	26	22(85)	22(100)	18(82)	4.7 ^a
5 μ l/ml	31	28(90)	27(96)	18(64)	4.2 ^{ab}
10 μ l/ml	33	29(88)	28(97)	22(76)	3.9 ^b

* Culture for 24hrs.

** Culture for 48hrs.

^{ab} Means with different superscripts are significantly different(P<0.01).

Table 3. The development rate of mouse morulae cultured according to FDA-score after vitrification

FDA score	No. of embryos recovered	No. embryos of developed to		No. (%) of total survived embryos	No. (%) of degenerated embryos
		Late morula* - early blast.	Expanded* blastocysts		
P5	72	29	37	66(92)	6(8)
P4	30	18	2	20(67)	10(33)
P3	12	5	0	5(42)	7(58)
P2	6	0	0	0(0)	6(100)
P1	7	0	0	0(0)	7(100)
P0	7	0	0	0(0)	7(100)

* Culture for 48hrs.

級別(P5~P0) 48時間 培養 後 發達된 生存率을 調査한 것이다.

凍結·融解後 FDA-test에서 P5(100% 生存)를 나타낸 72個의 mouse morulae는 F-10에서 48時間 培養後 late morulae와 expanded blastocysts 까지 92%(66/72)로 發達이 良好하였으며, 退化된 것이 8%(6/72)이다. 그리고 P4(80% 생존)에서는 67%(20/30)가 late morulae에서 expanded blastocysts까지 發達狀態를 보였으며, P3(60% 生存)에서는 12個중 3個(35%)만이 late morulae 까지 發達했으며 더 이상은 발달하지 못하였다. P2에서 6個의 卵子는 전혀 發達하지 않고 發育停止 또는 退化狀態를 나타냈으며, P1(20% 生存)과 P0(0% 生存)에서도 48時間 培養 後 전혀 發達을 나타내지 않았다. 全體의 으로 P3 以下에서는 48時間 培養 後 blastocysts까지의 發達은 전혀 나타나지 않았다.

이것은 Schilling 等(1979 a, b)이 受精卵 FDA-score를 4 等級으로 分類하여 brilliant 85%, week 20%, partly 16%, negative 0%로 발달을 보인 것보다 더 높은 成績이었으나, 各 等級別로는 비슷한 傾向 値를 나타냈으며, 凍結 融解 後 培養에서 發育할 수 있는 能力과 FDA 等級間에는 높은 相關(0.96)이 있다는 報告와 一致하였다(Leibo & Mazur, 1978a,b).

Morulae stage의 mouse 受精卵을 超急速 동결 溶해한 後 FDA 處理區와 無處理區(control)로 區分하여 移植한 結果는 Table 4에 나타낸 바와 같다.

超急速 동결溶해 mouse morulae는 FDA(S×10) 處理, 또는 처리를 하지 않고(control) Ham's F-10에 24時間 동안 培養시켜 late morulae에서 middle blastocysts로 발달한 것을 偽妊娠 3日의 同一種 受卵 mouse 子宮角 上端으로 移植하였다. 이때 左側은 對照區, 右側은 FDA處理區로 하여 同一 個體에 두 처리

Table 4. Effect of FDA-test and non FDA-test on the implantation rate of cultured(24hrs) mouse morulae after vitrification

Treatment*	No. of embryos recovered	No. (%) of embryos transferred after 24h culture	No. (%) of		
			Pregnants /Recipients	Resorption sites	Normal fetuses
Control	71	56(79)	3/11	8(14)	1(2)
FDA	70	57(81)	3/11	6(11)	1(2)

* Control; FDA-free PBS,

FDA: FDA stock 5 μ l/ml PBS (S×10 times)

를 移植하였으며, 移植 確認은 14日째에 開腹手術을 하여 胎兒發育 상태를 確認하였다. 總 11마리의 recipients에 Non FDA; 56 embryos, FDA; 57 embryos를 移植하여 3/11(27.3%)마리가 妊娠되었으며, 着床後 退化되고 있는 胎兒는 control;14%(8), FDA;11%(6)이었으며, 正常 胎兒로 發育하고 있는 것은 各各 2%(1), 2%(1)이었다. 이들은 FDA處理區와 無處理區간 크기와 外觀狀 形態的 差異가 없었다. 移植後 妊娠率이 低調한 것은 처음 移植 實驗을 하므로 인해 技術的, 그리고 계절적으로 여름에 移植을 하여 이에 대한 環境的 要因이 問題인 것으로 推測된다.

Linda & Trounson (1980)은 mouse embryos를 FDA 處理 後 移植하여 45%가, 無處理區에서 49%의 正常胎兒가 確認되었으며 이들 간에 有意差는 없었다고 하였다. 그리고 Schilling 等(1976b)은 FDA-treat에서 產子로 더 많이 發育되었고 奇型 또한 나타나지 않았다고 報告한 바 있다(FDA-treat;22/35, control;16/35).

綜合的으로 FDA를 이용한 生死判定은 上記 培養試驗과 移植 成績으로 볼 때 發育과 胎兒의 着床에 害가 없었음을 알 수 있었으나, 과도한 濃度의 FDA 사용은 害가 있었음을 알 수 있었다.

IV. 摘 要

本 實驗은 vitrification solution(20% glycerol + 10% ethylene glycol + 30% ficoll + 10% sucrose)으로 超急速 凍結한 mouse morulae를 FDA 添加 水準別(FDA 0 μ l/ml, 0.5 μ l/ml, 5 μ l/ml, 10 μ l/ml in PBS)로 生死判定 後 CO₂ incubator에서 培養, 또는 recipients에 移植하였을 때 生存率 및 着床에 미치는 影響을 究明하기 위해서 實施하였으며 要約된 結果는 다음과 같다.

1. FDA 處理後 24時間 동안 培養한 新鮮卵의 發達 상태는 FDA 添加水準에 관계없이 96%(P4.8) 이상 生存率을 나타내었으며, 이 중 對照區에서 50%, FDA 處理區에서 67% 以上이 hatched blastocysts로 發達하여 對照區보다 發達成績이 좋은 것으로 나타나 FDA 處理가 新鮮卵의 발달에서 전혀 害가 없는 것으로 나타났다.
2. Mouse morulae를 超急速 凍結 後 FDA 濃度

0(對照區), 0.5, 5, 10 μ l/ml에서 FDA-test와 培養하였을 때 expanded blastocysts까지 發達한 것은 各各, 66, 82, 64, 76% 이었다. 이 때의 FDA-score는 各各 P4.2(84%), P4.7(94%), P4.2(84%), P3.9(78%)로서 對照區와 FDA 處理區間에서는 有意差가 없었으나, 0.5 μ l/ml 處理區와 10 μ l/ml 處理에서는 有意差가 있었다 (P<0.01).

3. FDA-score別(P0, P1, P2, P3, P4, P5)로 分類하여 凍結融解 受精卵을 48時間 동안 培養한 後 發育成績은 各各 P5;92%, P4;67%, P3;42%로 發達하였으나, P2 以下에서는 모두 退化했다.
4. 凍結 融解한 mouse morulae를 24時間 동안 培養한 後 對照區(FDA 0 μ l/ml)와 FDA 處理區(5 μ l/ml)에서 各各 56, 57個의 early blastocysts를 移植하여 14日 後 着床率은 對照區와 FDA 處理區에서 各各 14%(8), 11%(6) 이었고, 이 중 正常的인 發達을 보인 것은 두 處理에서 各各 2%(1) 이었다.

以上の 結果에서 알 수 있듯이 FDA-test는 (0.5 μ l/ml)의 10 배까지 어떠한 害가 없었으며 新鮮卵과 凍結卵의 生存性 判定에 害가 없는 것으로 나타났으며, 또한 移植後의 着床率과 胎兒의 發育에도 影響을 미치지 않았으며 유리화 凍結後 FDA-test에서 P5;92%, P4;67%, P3;42%가 培養 後 生存率을 보임으로서 수정란의 生死判定에 효과적임을 提示해 주었다.

V. 引用文獻

1. Bielanski, A. V., V. P. Schneider and R. J. Maoletoft. 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.
2. Didion, B. A., D. Pomp, M. J. Martin, G. E. Homanics and C. L. Markert. 1990. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage.

- J. Anim. Sci. 68:2803-2810.
3. Frank, G. C., S. L. Coley, B. Betterbed and R. D. Page. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology*, 26:134-144.
 4. Kang, M. J., Y. H. Kim, S. H. Moon and J. K. Kim. 1989a. Studies on the rapid freezing of mouse embryos : I. Effects of cryoprotectants concentration on the mouse embryo survival of the rapid freezing. *Korean J. Anim. Reprod.*, 13(3) : 134-140.
 5. Kang, M. J., Y. H. Kim, S. H. Moon and J. K. Kim. 1989b. Studies on the rapid freezing of mouse embryos : I. Effects of development stage and seeding on mouse embryo survival of rapid freezing. *Korean J. Anim. Reprod.*, 13(3):141-148.
 6. Kim, J. K., C. K. Kim. M. J. Kang. D. J. Chang and S. H. Kim. 1988. Studies on simplified procedures for freezing and thawing of bovine embryos : IV. Effect of simplified procedures of freezing and seeding using a cryoprotectant containing sucrose on the rabbit embryo survival rate determined with the FDA test. *Korean J. Anim. Sci.*, 30(10) :583-589.
 7. Lee, B. K., S. K. Kim and K. S. Lee. 1992. Studies on the survival rates after slow and ultrarapid frozen-thawing of porcine embryos. *Korean J. Anim. Reprod.*, 16(2) :117-123.
 8. Leibo, S. P. and P. Mazur. 1978a. Preservation of mammalian embryos by freezing. Academic Press, New York:179-197.
 9. Leibo, S. P., and P. Mazur. 1978b. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In *Methods in Mammalian Reproduction*. 179-201.
 10. Linda, R. M. and A. O. Trounson. 1980. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 58:189-196.
 11. Schilling, E. and H. H. Dopke. 1978. A rapid diagnostic test for the viability of early cattle and rabbit embryos using diacetyl-fluorescein. *Naturwissenschaften*. 65:658-659.
 12. Schilling, E., H. Niemann, S. P. Cheng. and H. H. Doepke. 1979a. DAPI - a further fluorescence test for diagnosing the viability of early cow and rabbit embryos. *Zuchthyg*. 14:170-172.
 13. Schilling, E., D. Smidt, B. Sacher, D. Petac, S. E. Kaschab. 1979b. Diagnosis of the viability of early bovine embryos by fluorescence microscopy. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 19(5):1625-1629.
 14. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. 349-355.
 15. Schmidt, P., M. C. Schiewe and D. E. Wildt. 1985. Variables influencing post-thaw embryo survival rates in mice. *Theriogenology*. 23:229.
 16. 고경래. 1991. Vitrication solution의 耐凍劑 組合이 凍結融解 後 생쥐 受精卵의 生存率에 미치는 影響. 濟州大學校 碩士學位 論文.