

# 肉牛受精卵 簡易凍結 및 融解方法에 관한 研究

## 一 液體窒素 container에서 凍結時 諸植氷方法이 mouse 受精卵 生存率에 미치는 影響<sup>\*</sup>一

金重柱 · 姜萬種 · 金瑩勳 · 張德支 · 康珉秀 · 金承浩

### Studies on Simplified Procedures for Freezing and Thawing of Bovine Embryos

— Effects of seeding procedures in a liquid nitrogen container on the survival rate of mouse embryos —

Kim, J. K., M. J. Kang, Y. H. Kim, D. J. Chang, M. S. Kang and S. H. Kim

#### SUMMARY

This study was done with mouse embryo to determine effects of freezing media with or without 10% sucrose, and seeding methods (pincette, no seeding, liquid nitrogen gas phase and copper wire coiled straw) on embryo survival were determined using the FDA test.

The summarized results are the following.

1. The FDA score found with copper wire coiled straw, no seeding, pincette and liquid nitrogen gas phase was 3.6, 3.6, 3.3 and 3.0, respectively. There were no significant differences.
2. The embryo score shows higher ( $P < 0.05$ ) survival rate using a freezing medium with sucrose than the one without it. Among the seeding procedures, better results are copper wire coiled straw and no seeded.
3. The results suggest that copper wire coiled seeding, no seeding are as good as seeding when the mouse embryos are frozen in a liquid nitrogen container using both the freezing and dilution media containing 10% sucrose.

\* 本論文은 韓國家畜繁殖學會誌 12(2) : 79~85(1988)에 게재 되었음.

## I. 緒 論

受精卵의 凍結過程에 있어서 植水(seeding)은 Whittingham 等 (1972)이 mouse 受精卵 凍結에서 最初로 利用하였으며, 卵子는 精子와 달리 水分含量이 많고 特殊한 膜構造(透明帶)를 갖고 있기 때문에 植水하지 않으면 過冷却으로부터 세포질내에 氷晶이 形成되어서 急速한 溫度上昇(潛在熱發生)이 생겨 세포질에 物理的 衝激을 주게 되어 傷害를 입게 되므로 卵子凍結時 植水은 꼭 施行하여야 하는 것이다.

또한 Leibo와 Mazur(1978)는 植水을 하므로서  $-5 \sim -15^{\circ}\text{C}$ 에서 細胞에 害를 주는 過冷却을 짧게 하기 위하여 straw內 氷結晶을 強制로 形成시키는 것으로 過冷却中 脫水가 유발되어 液狀에서 固體로 轉換될 때 潛在熱發散에 의한 sample의 溫度上昇(plateau)의 發生을 防止한다고 보고하였다.

植水方法은 Elsdén과 Seidel(1982)以後, 주로 cooled forcep으로 遂行되어 왔으며, Kasai等 (1980)은  $-7^{\circ}\text{C}$ 에서 液體窒素氣로, Kasai 等 (1984)은 dry ice로, Massip 等 (1982)과 Nieman 等 (1985)은 液體窒素를 blowing 하면서, Miyamoto 等 (1986)은 ice crystal로, Suzuki 等 (1985)은 seeding chamber를 별도로 만들어 cooled forcep으로 各各 植水을 試圖하였다.

그러나 Bui-Xuan-Nguyen 等 (1984)은 凍結溶液에 sucrose를 添加하면 受精卵이 凍結하기 전에 脫水되기 때문에 植水하지 않고 急速凍結하더라도 受精卵의 높은 生存率을 얻을수 있다고 하였고, 이외에도 여러 研究가 이루어지고 있다(Krag 等, 1985; Williams, 1983).

本 研究는 以前에 發表된(第IV報) 家兔 受精卵에서 얻은 結果를 再確認하기 爲하여 10% sucrose를 凍結溶液에 添加할때 植水하지 않은것, pincette植水, 液體窒素蒸氣 植水 그리고 銅線을 straw에 감고 植水을 誘導하는 方法等으로 區分하였으며 液體窒素 container에서 凍結速度別로 凍結한 後 融解液除去時 FDA-test로 生存率을 比較하여 大家畜 受精卵 凍結에 利用하고자 實施하였다.

## II. 材料 및 方法

供試動物은 ICR계 mouse를 利用하였으며 飼養管理는 配合飼料를 自由給食하였다.

過排卵誘起를 爲하여 PMSG(5~10IU)를 腹腔內에 注射하고, 48時間後 同量의 HCG를 同一한 方法으로 注射한 다음 同三系統의 雄性 mouse를 合舍하여 自然交尾를 誘導하였으며, 翌日아침 際에서 陰栓(coital plug)을 確認하고, 陰栓이 確認되지 않은 個體는 本 試驗에서 除外시켰다.

受精卵의 採卵은 HCG注射後 72~80時間에 屠殺하여, 子宮 및 卵管을 體外로 摘出하고 1ml 注射器를 利用하여 灌流液을 子宮의 한쪽끝에서 注入하여 watching glass內로 回收하였다.

이때 使用된 灌流液은 m-PBS로 使用前에 0.2  $\mu\text{m}$  millipor filter로 濾過시켜 無菌處理하였다.

採卵된 受精卵은 40倍 實體顯微鏡下에서 形態의 優秀한 卵子를 選別하여 新鮮 PBS로 2~3回 洗滌한 後 試驗에 利用하였으며 未受精卵 및 異常卵은 試驗對象에서 除外시켰다.

卵子凍結用液은 10% glycerol, 10% sucrose와 非働化시킨 20% donor serum을 含有하고 있는 PBS와 10% sucrose를 除外한 10% glycerol과 20% donor serum을 添加한 PBS를 利用하였다.

Glycerol 添加는 Leibo(1984)가 使用한 方法과 同一한 方法으로 卵子를 直接 凍結用液에 옮겨 平衡하는 one-step으로 添加한후 0.25ml plastic straw에 氣泡(air bubble)를 2個所 만들어 그 사이에 受精卵을 注入한 後 straw powder로 封印하였다(第6報; Fig.1)

封印된 straw를 곧바로 液體窒素(LN<sub>2</sub>) container로 옮겨 凍結을 實施하였으며 溫度確認은 自動細胞凍結器(R-204 cell freezer, planer products England)의 sensor에 凍結液으로 채운 0.5ml straw를 끼워서 固定後 使用하여 Auto recorder로 溫度確認을 하였다.

凍結速度는 다음과 같이 4가지로 區分하여 實施하였다.

1-F; 常溫에서  $-7^{\circ}\text{C}$ 까지는  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  下降시킨후

植水(seeding)하고, 5分동안 靜直한 다음  $-35^{\circ}\text{C}$ 까지는  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 씩 下降하여  $\text{LN}_2$  container에 浸漬保存하였다.

2-F; 植水後 5分靜直까지는 "1-F"와 같고  $-35^{\circ}\text{C}$ 까지는  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  下降시킨 다음  $-80^{\circ}\text{C}$ 까지는  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 씩 凍結하여 液體窒素에 浸漬保存하였다.

3-F; 直水後 5分靜置까지는 "1-F"와 같고  $-80^{\circ}\text{C}$ 까지는  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 씩 凍結하여 液體窒素에 浸漬保存하였다.

4-F; 直水後 5分間 靜置까지는 "1-F"와 같고 즉시 液體窒素 表面 3~5mm까지 下降시켜 5分間靜直시켰다가  $-96^{\circ}\text{C}$ 에 浸漬시켰다.

植水方法은 p-seeding(핀셋植水), N-seeding(植水 아닌 것),  $\text{LN}_2$ -seeding(液體窒素 蒸氣 植水), co-seeding(銅線植水)으로 區分하여 實施하였는데, P-seeding은 pincette로 수정란이 들어 있는 straw 上位部를 接觸시켜 氷結晶이 나타날 때까지 實施하였으며(Elsden과 Seidel, 1982),  $\text{LN}_2$ -seeding은  $-7^{\circ}\text{C}$ 일때 液體窒素 表面의 上面 2~5mm까지 瞬間적으로 下降시켰다 올렸으며 이 때 下降溫度는 約  $-12^{\circ}\text{C}$  前後(sensor 溫度)되도록 하였다.

Co-seeding은 1mm銅線을 straw밑에서부터 5mm間隔으로 윗부분까지 감아서  $-7^{\circ}\text{C}$ 일때  $\text{LN}_2$ -seeding과 同一한 方法으로 植水을 試圖하였다.

受精卵의 融解는  $38^{\circ}\text{C}$  水槽에서 straw를 천천히 흔들며 氷結晶이 사라질 때까지 實施하였는데 所要 時間은 約 10秒 程度였다.

Glycerol 除去는 添加方法과 同一한 one-stop 方法으로 glycerol 除去用液(PBS+10% sucrose)에 直接 옮겨 5分間 平衡시켜 glycerol을 除去하였다.

受精卵의 生死判定은 Schilling 等(1982)의 方法으로 FDA(3',6'-diacetyl fluorscence)를 利用하여 第5報와 同一한 方法으로 判定하였다.

### III. 結果 및 考察

10% sucrose를 添加한 後  $\text{LN}_2$  凍結速度와 여러 가지 植水方法에 따른 mouse 受精卵의 生存率을 FDA-test에 依하여 比較한 成績은 Table 1과 같다.

1-F(緩慢凍結)에서 FDA score는 N-seeding이

平均 3.8(76%), P-seeding; 3.8(76%),  $\text{LN}_2$ -seeding; 3.7(74%)이며 Co-seeding은 3.9(78%)로 1-F에서 가장 좋은 成績이며 N-seeding과 P-seeding은 同一한 成績을 나타내고 있다.

그리고 2-F(急緩慢凍結)에서는 N-seeding, P-seeding,  $\text{LN}_2$ -seeding, Co-seeding이 各各 2.9, 2.9(58%), 3.1, 3.1(62%)로 他 凍結보다 低調한 成績을 보여주고 있으며, 3-F(急速凍結)에서는 N-seeding; 3.7(74%), P-seeding; 3.4(68%), Co-seeding; 3.9(78%)로 Co-seeding이 가장 좋은 成績을 나타내고 있으며 P-seeding과  $\text{LN}_2$ seeding은 同一한 數値를 보여주고 있다.

4-F(超急速凍結)는 N-seeding; 3.3(66%), P-seeding; 3.2(64%),  $\text{LN}_2$ seeding; 2.4(48%)이며 Co-seeding은 4.0(80%)으로 가장 優秀하였고  $\text{LN}_2$ -seeding은 가장 不良한 成績이었다.

이러한 結果에 있어서 Co-seeding이 各 凍結處理에서 대체로 優秀하지만 實驗卵子數가 적으므로 再檢討가 必要하다.

여기서 銅線植水은 液體窒素 上面에서 溫度傳達이 빨라서 全體 straw에 均一하게 急冷却되어 自然 植水된 것으로 생각된다. 그리고 P-seeding에서는 seeding 하기 爲하여 straw를 空氣中에 露出시켜야 하므로 sample의 溫度上昇때문에 成績이 低調한 것으로 思料된다.

한편,  $\text{LN}_2$ -seeding에서 가장 낮은 數値를 보인것은 植水을 하기 爲해서 container로 下降시킬 때 간혹 液體窒素에 straw가 瞬間적으로 接觸하면서 溫度下降이  $-15^{\circ}\text{C}$  以下로 떨어지는 境遇에 受精卵 生存率 低下를 나타낸 理由로 들수 있다.

Table 2는 凍結用液에 sucrose를 添加한 것(PGS)과 添加하지 않은 것(PG)으로 區分하여 植水方法에 따라 FDA-test로 mouse 受精卵의 生存率을 比較한 것으로, N-seeding에 있어서는 PG가 平均 score 3.0(60%)으로 PGS의 3.8(76%)보다 低調한 成績을, P-seeding은 PG와 PGS가 同一하게 3.3(66%)의 score를 보여주고 있다.

또한  $\text{LN}_2$ -seeding에 있어서는 PG와 PGS가 同一한 3.0(60%)의 score를 提示하고 있으나 Co-seeding에서는 PG가 2.9(58%), PGS 3.9(78%)로 suc-

Table 1. Effects of seeding procedures according to freezing procedures by LN<sub>2</sub> container on mouse embryos survival evaluated by FDA-test

Freezing procedure	Methods of seeding	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival embryos evaluated by FDA-test				Score
			P-5	P-3	P-1	N-0	
1-F <sup>a</sup>	N-S	70	41 (58.6)	18 (25.7)	8 (11.4)	3 (4.3)	3.8
	P-S	78	49 (62.8)	16 (20.5)	5 (6.4)	8 (10.3)	3.8
	LN <sub>2</sub> -S	39	24 (61.5)	7 (17.9)	4 (10.3)	4 (10.3)	3.7
	Co-S	32	22 (68.8)	3 (9.4)	7 (21.9)	0 (0.0)	3.9
2-F <sup>b</sup>	N-S	76	34 (44.7)	14 (18.4)	8 (10.5)	20 (26.3)	2.9
	P-S	84	31 (36.9)	25 (29.8)	5 (6.0)	23 (27.4)	2.9
	LN <sub>2</sub> -S	94	38 (40.4)	23 (24.5)	7 (7.4)	26 (27.7)	3.1
	Co-S	51	23 (45.1)	13 (25.5)	5 (9.8)	10 (19.6)	3.1
3-F <sup>c</sup>	N-S	100	55 (55)	30 (30)	0 (0)	15 (15)	3.7
	P-S	73	29 (39.7)	34 (46.6)	1 (1.4)	9 (12.3)	3.4
	LN <sub>2</sub> -S	30	15 (50)	7 (23.3)	5 (16.7)	3 (10)	3.4
	Co-S	28	15 (53.6)	10 (35.7)	3 (10.7)	0 (0)	3.9
4-F <sup>d</sup>	N-S	65	32 (49.2)	14 (21.5)	12 (18.5)	7 (10.8)	3.3
	P-S	70	27 (38.6)	29 (41.4)	5 (7.1)	9 (12.9)	3.2
	LN <sub>2</sub> -S	28	5 (17.9)	11 (39.3)	8 (28.6)	4 (14.3)	2.4
	Co-S	21	15 (71.4)	1 (4.3)	0 (0)	3 (14.3)	4.0

\*a; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5 min seeding → -35°C (0.3°C/min) → -196°C  
 b; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5 min seeding → -35°C (3°C/min) → -80°C (5°C/min) → -196°C  
 c; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5 min seeding → -80°C (15°C/min) → -196°C  
 d; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5 min seeding → Rapid freezing by LN<sub>2</sub> vapour for 5 min → -196°C  
 N-S; Non-seeded P-S; Pincette-seeded LN<sub>2</sub>-S; Liquid nitrogen seeded Co-S; Copper wire seeded

rose를 添加한 것이 優秀한 成績을 보여주고 있다 (P<0.05).

本 成績을 相互 比較하여 보면 sucrose를 添加하지 않았을 境遇는 P-seeding이 N-seeding, LN<sub>2</sub>-seeding, Co-seeding보다 優秀하였으며, sucrose를 첨가할 경우에 있어서는 seeding을 하지 않아도 他 植氷方法보다 優秀하였고 特히, Co-seeding이 良好하였다.

그러므로 LN<sub>2</sub>-container에서는 sucrose를 添加하

므로서 植氷을 하지 않아도 mouse 凍結卵 生存率에는 큰 關係가 없는 것을 보여주고 있다.

여러가지 植氷方法을 綜合적으로 分析한 것은 Table 3에서 보여주는 바와 같이 N-seeding은 P-5가 54.2%, P-3; 25.1%이며 N-0; 10.5%로 平均 3.6(72%)의 score를 나타내고 있으며, P-seeding에 있어서 P-5가 44.6%, P-3; 33.5%, N-0 16.8%로 平均 score 3.3(66%)을 보여주고 있다. 한편, LN<sub>2</sub>-seeding은 P-5가 42.9%, P-3; 25.1%,

Table 2. Effects of freezing media according to seeding procedures on mouse embryos survival evaluated by FDA

Method of seeding	Freezing medium	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival evaluated by FDA-test				Score
			P-5	P-3	P-1	N-0	
N-S	PG	83	36 (43.4)	19 (22.9)	10 (12.0)	18 (21.7)	3.0
	PGS	223	126 (56.5)	57 (25.6)	18 (8.1)	22 (9.9)	3.8
P-S	PG	92	37 (40.2)	37 (40.2)	3 (3.3)	15 (16.3)	3.3
	PGS	207	93 (44.9)	65 (31.4)	15 (7.2)	34 (16.4)	3.3
LN <sub>2</sub> -S	PG	46	19 (41.3)	13 (28.3)	4 (8.7)	10 (21.7)	3.0
	PGS	137	59 (43.1)	32 (23.4)	19 (13.9)	27 (19.7)	3.0
Co-S	PG	39	13 (33.3)	14 (35.9)	6 (15.4)	6 (15.4)	2.9
	PGS	87	55 (63.2)	18 (20.7)	10 (11.5)	4 (4.6)	3.9

PG;PBS+10% glycerol PGS;PBS+10% glycerol+10% sucrose

N-S;Not seeded P-S;Pincette seeded LN<sub>2</sub>-S;Liquid nitrogen vapour seeded Co-S;Copper wire seeded

-0; 19.4%의 生存率을 보여 score 3.1(61%)의 가장 不良한 成績을 보이고 있다.

그리고 Co-seeding에서는 P-3가 23.3%, N-0.9%로 平均 score 3.6(72%)로 가장 優秀하였으나 處理別 有意性은 없었다.

여기서 N-seeding이 P-seeding보다 良好한 것은 家兔(第4報)에서도 같은 結果를 提示하여 주었는데 sucrose添加의 原因도 있겠으나 植水方法中 straw 氣泡(air bubble) 2個가 存在하여 이곳이 먼저 冷却되어 液狀部에 傳達되므로서 自然植水이 된 것이 아닌가 思料되며 이것은 앞으로 더 試驗이 施行되어야 할 課題인 것이다.

本 研究를 綜合的으로 考察하여 보면 Whittingham(1972)이 mouse에서 -3.5~-4.5℃ 사이에 植水하여 좋은 成績을 얻은 以後 必히 遂行하여야 되는 것으로 認識하며 이제까지 大部分 Elsdon과 Seidel(1980)의 方法인 cooled forcep으로 植水되어 왔다.

그런데 이러한 過程은 複雜하고, 自動式이 아닐때는 항상 空氣에 露出시켜야 하므로 잘못 施行하였을 때는 오히려 sample의 溫度上昇을 誘導시킬 可能性이 있다고 井上等(1982)이 보고하였다. Leibo와 Mazur(1978)에 따르면 植水을 하므로서 氷結晶을 誘導시켜 過冷却 期間을 짧게 하고 sample 溫度上昇(plateau)의 被害를 막을수 있다고 하였다.

그리고 Massip等(1980)이 耐凍劑에 sucrose를 添加시킬 경우 Miyamoto와 Ishibashi(1983)는 mouse 受精卵에서 dry ice로 凍結한 後 seeding하지 아니하였을 때, 언제 氷晶核이 發生하는지는 試驗하지 아니하였지만, one-step addition(glycerol)에서는 植水을 하지 않는 것이, stepwise 方法으로 漸次 glycerol을 添加했을 때 植水을 하지 않을 때가 성적이 향상되었다는 보고와 本 成績과 一致하였으며, 1986年度에는 LN<sub>2</sub> gas로 凍結할 境遇 seeded와 notseeded區와는 耐凍劑 平衡時間이 5分以後 부터는 거의 差異가 없어 (glycerol 2.0M일때) 80~85

Table 3. Effects of seeding procedures on mouse embryos survival evaluated by FDA-test

Method of seeding	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival embryos evaluated by FDA-test				Score
		P-5	P-3	P-1	N-0	
N-S	275	149 (54.2)	69 (25.1)	28 (10.2)	29 (10.5)	3.6
P-S	316	141 (44.6)	106 (33.5)	16 (5.1)	53 (16.8)	3.3
LN <sub>2</sub> -S	191	82 (42.9)	48 (25.1)	24 (12.6)	37 (19.4)	3.1
Co-S	116	64 (56.0)	27 (23.3)	13 (11.2)	11 (9.5)	3.6

N-S; Not seeded. P-S; Pincette seeded.  
LN<sub>2</sub>-S; Liquid nitrogen vapour seeded. Co-S; Copper wire seeded.

%로 높은 생존율을 보고하고 있다.

Krag等(1985)은 murine 受精卵에서 그리고 Miyamoto等(1986)도 mouse 受精卵을 얼음(氷)으로 植氷할 때 生存率이 73~82%, 植氷하지 않은 것이 57~61%로서 本成績과 相反되는 傾向이 나타났다. 그리고 Bui-Xuan-Nguyen等(1986)은 bovine 受精卵에서 sucrose를 添加하여 植氷하지 않고 81.8%의 生存율을, 그리고 William과 Johnson(1986)도 mouse 受精卵으로 80% 前後의 生存율을 얻음으로써 거의 一致하고 있다.

그러나 Szall과 Shelton(1986a, 1986b, 1987)의 90% 前後의 生存율보다는 低調한 成績이었다.

그러므로 前述한 바와 같이 10% sucrose를 添加할 때 植氷하지 않아도 된다는 것을 本研究의 結果에서 再立證되고 있다. 그런데 動物種類에 의한 受精卵크기, 耐凍劑의 種類 및 濃度, 卵子發育段階, 凍結速度와 凍結器具, 植氷方法 等に 依해서 많은 變異가 있는 것으로 思料되어 繼續 究明이 必要하며 大家畜, 特히 牛의 受精卵 凍結에 應用하여 繼續試驗을 갖고자 한다.

#### IV. 摘要

Sucrose를 凍結液과 除去液에 添加하여 液體窒素(LN<sub>2</sub>) container에서 凍結할 때, 植氷하지 않은 것, pincette로 植氷, 液體窒素 蒸氣로 植氷, 구리줄로 straw를 감아서 植氷한 것 等으로 區分하여 凍結速

度에 따라 FDA test로 生存율을 比較한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Sucrose 添加와 함께 LN<sub>2</sub> container에서 凍結時, 植氷方法에 따른 FDA test의 score는 Co-S(구리선을 감은 것) 3.6, N-S(植氷하지 안니한 것) 3.6, P-S(pincette 植氷) 3.3 그리고 LN<sub>2</sub>S(LN<sub>2</sub> gas 植氷) 3.0 順位였다(P<0.005).>

2. 凍結液에 sucrose 添加가 添加하지 아니한 것보다 生存율이 높았으며 가장 좋은 것은 sucrose를 添加한 Co-S(3.90)와 N-S(3.8)였다.

3. 結果적으로, sucrose 添加시킨 耐凍劑에서 LN<sub>2</sub> container에 凍結시킬 때 구리선 감은 植氷과 植氷하지 않은 것이 pincette seeding과 같은 成績을 보여 주어 植氷하지 않아도 된다는 것을 指示하여 주었다.

#### V. 引用文獻

1. Bui-Kuan-Nguyen, N., Y. Heyman and J.P. Renard. 1984. Direct freezing of cattle embryo after partial dehydration at room temperature. Theriogenology, 22 : 389-400.
2. Chupin, D. and M.M. De Reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. Theriogenology, 26 : 157-166.
3. Elsdon, R.P., Seidel, G.E. Jr., T. Taketa and G. D. Farrand. 1982. Field experiments with fro-

- zen-thawed bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology*, 17 : 1-10.
4. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59 : 51-56.
  5. Krag, K.T., I.M. Koehler and R.W. Wright, Jr. 1985. A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 23 : 199.
  6. Krag, K.T., I.M. Koehler and R.W. Wright, Jr. 1985. Trehalose : A non-permeable cryoprotectant for direct freezing of early stage murine embryos. *Theriogenology*, 23 : 200.
  7. Leibo, S.P. and P. Mazur. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. Inidaniel, J.C. Jr. (ed). *Methods in Mammalian Reproduction* Academic Press New York ; 179-197.
  8. Massip, A., Vander Zwalmen, P., Hanzen, C. and F. Ectors. 1982. Fast freezing of cow embryos in French straws with an automatic program. *Theriogenology*, 18 : 325-332.
  9. Merry, D.A., R.L. Allen, K. Krag and R.W. Wright, Jr. 1983. Sucrose dilution of frozen mouse embryos ; Interaction of glycerol and sucrose concentrations. *Theriogenology*, 20 : 325-332.
  10. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Solid  $CO_2$  Freezing of mouse embryos. *J. Report. Fert.*, 67 : 107-111.
  11. Miyamoto, H., Y. Miyamoto and T. Ishibashi. 1986. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Japan. J. Zootech. Sci.*, 57 : 250-256.
  12. Nieman, H. 1985. Freezing of bovin Embryos ; effects of a one-step addition or 1.4M glucerol. *Theriogenology*, 23 : 369-379.
  13. Leibo, S.P. 1984. Osmotic responses of bovine embryos in solutions of sucrose, glycerol or glycerol-sucrose. *Cryobiology*, 21 : 711.
  14. Schilling, E., H. Nieman and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15 : 245-248.
  15. Szell, A. and J.N. Shelton. 1986a. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Repord. Fert.*, 76 : 401-408.
  16. Szell, A. and J.N. shelton. 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Repord. Fert.*, 78 : 699-703.
  17. Szell, A. and J.N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerolsucrose solution on day-3 mouse embryos. *J. Repord. Fert.*, 80 : 309-316.
  18. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}C$  and  $-296^{\circ}C$ . *Science*, 178 : 411-414.
  19. Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23 : 235.
  20. Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 26 : 125-133.
  21. 井上忠怒, 吉田光, 金川弘司, 坂尾伸夫, 倉岡泰郎. 1982. 受精卵凍結装置の開発とウシ受精卵への應用. *家畜繁殖誌* 28 : 150~152.