

## 마우스 桑實胚의 Vitrification 에 관한 研究

康珉秀 · 孫始煥\* · 葛西孫三郎\*\*

濟州大學校 農科大學 畜產學科

### Vitrification of Mouse Morulae

Kang, M.S., S.H. Sohn\* and M. Kasai\*\*

College of Agriculture, Cheju National University

#### SUMMARY

*In vitro* survival of the mouse morulae frozen by vitrification method(Kasai et al., 1990) was investigated in the present study.

The embryos were plunged into LN<sub>2</sub> directly after exposure to the vitrification solutions(EFS, GFS and DFS). The results were obtained as follows.

The viability of morulae after freezing and thawing was high in EFS(96.7~100.0%) and GFS vitrification solution(93.3~96.7%), and the lowest in DFS vitrification solution(0.00~0.03%).

#### I. 緒 論

家畜 遺傳資源의 보존이나 優秀한 遺傳形質을 가진 家畜 繁殖現象의 人爲的 支配를 위한 有력한 技術로 受精卵 移植이 있다. 移植의 成功을 위해서는 卵子供給雌畜과 需要雌畜의 性周期 同期化가 필요하므로 卵子나 胚의 保存은 不可缺한 技術의 하나이다. 소에서는 非外科的으로 채취할 수 있는 卵子의 發育段階는 後期桑實胚 以後여서 이 發育段階 胚의 保存이 필요하다. 또 體外受精, 遺傳子導入, 核移植 등에서는 未受精卵이나 初期의 受精卵이 이용되기 때문에 이들 발육단계의 卵子 保存이 필요하다.

1972년에 Whittingham 등이 마우스 胚의 緩慢冷却法을 개발한 이래 哺乳動物의 凍結保存에 대해 많은 研究가 보고되고 있고, 현재에는 마우스 系統 등의 보존법으로서 實用化되고 있다. 이 細胞外에 氷晶을 형성하는 보존법으로서는 난자의 耐凍性이 발육단계별로 다르다는 것이 알려져 있다. 발육단계의 초기인 未受精卵으로부터 胚盤胚까지 보존 후에도 高率로 생존하여 産仔까지 발육시킬 수 있는 것이 가능하다(Whittingham et

al., 1972; Whittingham, 1977). Rat의 卵細胞에서는 卵核胞期卵에 비해 卵核胞崩壞이후의 卵子 耐凍性이 높다는 것이 알려져 있으나(Kasai et al., 1979) 凍結卵子 由來의 産仔는 얻지 못하고 있다.

前記의 凍結法에서는 當연 보존액에 氷晶을 형성시키지만, 1985년 Rall과 Fahy의 超急速凍結法으로서 보존액에 氷晶을 형성시키지 않는 유리化 法이 개발되었다. 이 방법은 從來 보존법처럼 植氷操作을 필요로 하지 않고 0°C 이상의 온도로부터 직접 液體窒素속에 마우스 胚(8 細胞期)를 투입하여 보존하는 것이 가능하다. 그러나 毒性이 높은 溶液(VS1)을 사용하고 있기 때문에 보존전의 平衡과 내동제의 稀釋을 低溫下(0~4°C)에서 실시해야 할 필요가 있으며 胚의 生存性도 종래의 방법보다 낮았다. 그 후 同液 혹은 이것을 改良한 보존액 등이 마우스 외에 각 發育段階의 胚에서도 유리화 보존이 시도되어 8細胞期胚 이외에도 未受精卵(Kono & Tsunoda, 1988a; Ismail et al., 1988), 1細胞期(Kono & Tsunoda, 1987; Hsu et al., 1986), 2細胞期(Shevach et al., 1987; Nakagata, 1989), 4細胞期(Nakagata, 1989), 桑

\*畜産試驗場(Livestock Experiment Station, R.D.A.)

\*\*日本 高知大學 農學部(College of Agriculture, Kochi University, Japan)

實胚(Scheffen, 1986), 胚盤胞(Van Der Zwalm et al., 1988)에서 胚의 생존이 보고되었으나 아직 모든 發育段階에 有効한 보존방법은 開發되어 있지 않다. 또 유리화 보존방법으로 卵子나 胚의 발육단계에 따른 耐凍性의 차이에 대해서도 아직 잘 밝혀져 있지 않다.

1989년 Kasai 研究室에서 開發한 마우스 桑實胚의 유리화 보존액(EFS 40: ethylene glycol(EG)을 30% Ficoll+0.5M-sucrose(Su) 添加 PB1에 40%로 희석한 용액)을 사용하면 室溫(20°C)에서 平衡, 融解, 稀釋 등의 操作이 가능하며 더우기 높은 생존성이 얻어졌다고 報告하였다. 本 實驗에서는 25°C에서 EFS 40 溶液이 桑實胚의 유리화 보존과 GFS 40, DFS 40 유리화 溶液을 사용했을 때의 胚 生存性에 대해 比較 檢討를 目的으로 實施하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 胚의 回收

5~8週齡의 ICR 系 雌 마우스를 사용했다. 먼저 5 i.u. PMSG를 腹腔內 주사하여 48시간후 5 i.u. hCG를 주사 過排卵 處理한 후 ICR 系 成熟雄 마우스와 交配시켰다. 過排卵 處理後 78~79시간에 子宮 및 卵管 一部分을 PB1으로 灌流하여 桑實胚를 回收하였다.

採取한 桑實胚는 流動 피라핀 下의 PB1속에서 형태적으로 정상인 것만을 檢査 實驗에 供試하였다.

### 2. 胚의 生存性

桑實胚를 修正 KRB 液(mKRB; Toyoda & Chang, 1974)으로 洗淨하여 流動 피라핀으로 덮은 mKRB 液에 옮겨 5% CO<sub>2</sub>를 함유한 37°C의 大氣中에 培養했다. 生存性의 判定은 12시간 간격으로 관찰하면서 擴大胚盤胞까지의 發育率로 生存性의 判定을 하였다.

### 3. 實驗方法

0.25ml 플라스틱 스트로의 兩端을 0.5M-Su 첨가 PB1, 그 내측을 소량의 保存液, 그리고 그 내측에 2 cm 柱의 保存液(여기에 桑實胚를 封入한다)이 배치되게 吸引한다(Kasai et al., 1990). 25°C條件下에서 時計皿 위에서 各種 보존액(EFS, GFS, DFS)에 桑實胚를 浮遊시켜 스트로의 내측에 封入하여 30초에서 2분간 平衡한 후 액체질소에 沈積하므로써 유리화 保存했다.

유리화 용액의 조성은 EFS 40은 30% Ficoll+0.5 M-Su 첨가 PB1에 ethylene glycol을 40% 희석한 溶液이며 GFS 40, DFS 40은 ethylene glycol(EG) 대신에 glycerol 및 dimethyl sulphoxide(DMSO)를 각각 40% 희석한 용액이다. 1~20일간 보존후 25°C의 室溫에서 스트로를 신속히 25°C의 水中에 넣고 融解하여 0.5M-Su 添加 PB1에 보존액마다 時計皿에 流出하여 0.5M-Su 첨가 PB1속에서 5분간 넣어 EG glycerol, DMSO를 除去한 후 신선한 PB1에 옮겨 sucrose를 제거했다.

## III. 結果 및 考察

從來의 保存方法에서는 마우스 卵子의 耐凍性은 發育段階에 따라 다소 다르다는 것이 알려져 있고 발육단계의 초기인 난자는 耐凍性이 낮은 것이 보고되어 있다(Whittingham et al., 1977) 유리화 보존액으로서 EFS 40, GFS 40, DFS 40을 써서 마우스 桑實胚를 유리화 보존한 결과가 Table 1, 2 및 3에 나타났다. EFS 40용액은 25°C에서 平衡時間 30秒, 1分, 2分間 처리하여 유리화 보존 용해한 結果 생존율이 96.7~100.0%을 보였다(Table 1). 그리고 GFS 40(Table 2)도 EFS 40처럼 양호한 생존율을 나타냈다(93.

Table 1. Survival of mouse morulae stored at -195°C by vitrification in EFS 40 solution

Equilibration		No. of embryos stored	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to expanded blastocysts in culture (%)*
Temperature (°C)	Period (min)			
25	0.5	30	30	30 (100.0)
	1.0	30	30	29 (96.7)
	2.0	30	30	29 (96.7)

\*Percentage of recovered embryos.

Table 2. Survival of mouse morulae stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification in GFS 40 solution

Equilibration		No. of embryos stored	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to expanded blastocysts in culture (%) *
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Period (min)			
25	0.5	30	30	29 (96.7)
	1.0	30	30	28 (93.3)
	2.0	30	30	39 (96.7)

\*Percentage of recovered embryos.

Table 3. Survival of mouse morulae stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification in DFS 40 solution

Equilibration		No. of embryos stored	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to expanded blastocysts in culture (%) *
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Period (min)			
25	0.5	30	30	1 (0.03)
	1.0	30	30	0 (0.00)

\*Percentage of recovered embryos.

3~96.7%). 그러나 DFS 40은 EFS 40, GFS 40과 달리 30秒 平衡에서 생존율 0.03%, 1分間 平衡에서 0%의 생존율을 나타냈다 (Table 3).

本 實驗에서 EFS 40과 GFS 40용액은  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 유리화 保存 處理했을 경우 平衡時間 (30秒, 1分, 2分)에 관계없이 매우 높은 생존율을 나타냈다. 따라서  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 GFS 40 溶液도 EFS 40 용액처럼 마우스 桑實胚의 유리화 保存에 有效한 용액으로 이용될 수 있을 것으로 여겨진다.

1985年 Rall과 Fahy는 最初로 마우스 胚의 유리화 보존에 성공을 報告했다. 그들이 사용한 VS 1溶液의 耐凍劑로는 DMSO를 기초로 하여 그 독성을 緩和시키기 위해 acetamid, 또 유리화를 促進시키기 위해 propylene glycol, polyethylene glycol (PEG)를 添加하고 있다. 이 방법은 凍結前과 融解後에 각각 30~40분이 所要되므로 그 操作이 간편하다고는 볼 수 없다.

VS 1의 毒性에 대해서는 마우스 8細胞期胚를  $4^{\circ}\text{C}$  100% VS 1에 沈積하면 30分 後에는 거의 死滅하는 것이 알려져 있고 (Rall, 1987), 이에 대해서 glycerol과 PEG로 만들어져 있는 VS 3液은 VS 1液에 비해 그 조성이 단순할 뿐만 아니라 마우스 胚에 대한 毒性도

顯著히 낮다는 것이 알려져 있다 (Rall, 1987). 그런데 前核期의 유리화 보존에 VS 3는 적합하지 않고 반대로 VS 1을 쓰면 良好한 성적이 얻어지고 있으며 (Kono & Tsunoda, 1987, 1988a), 또 平衡時間을 극히 짧게 (10秒) 하므로서 未受精卵의 유리화 保存에 成功하고 있다 (Nakagata, 1989). 따라서 卵細胞이나 未受精卵의 유리화 보존에는 VS 1에 함유되어 있는 ethylene glycol보다도 DMSO 쪽이 적합할지도 모른다. 그러나 本 實驗에서 桑實胚의 유리화 보존의 경우는 DMSO가 함유된 DFS 液에서 극히 불량한 생존율을 보였다.

Hsu 등 (1986)은 vitrification법에 의한 마우스 胚의 보존결과 8細胞期胚의 생존율에 비해 桑實期胚 및 胚盤胞期胚의 생존율이 낮은 경향이었다고 報告하고 있다.

한편 胚의 發育이 進전되어 細胞의 단위면적당 表面의 이 커질수록 개개 細胞의 脫水效果가 높아져 保存에는 유리한 것으로 생각되고 있다 (Utsumi, 1984).

Schneider와 Mazur (1984)는 共沈透劑인 sucrose는 細胞膜을 거쳐 水分의 이동을 制限하고 신속히 세포 내의 凍害保護物質을 제거하는 작용이 있다고 기술하고 있다.

中瀾 (1989)는 DAP 213이라는 유리화 용액을 써서

2-cell, morulae를 유리화 보존하여 각각 54%, 78%의 생존율을 얻고 있다. 中濁 DAP213유리화 용액은 DMSO, acetamid, prophylyene glycol을 2:1:3의 비율로 첨가한 것으로 Rall과 Fahy(1985)의 VS1과 類似하나 polyethylene glycol을 반드시 첨가하는 것은 아니다. 그의 생각은 극히 짧은 시간내에 처리하므로서 毒性을 回避하려는데 있다.

Kasai(1990) 등은 실온하에서 1段階 평형후 凍結될 수 있도록 독성이 낮은 유리화 용액(EFS)을 作出해냈다. 耐凍劑로는 細胞透過性的 ethylene glycol을 기초로 하여 非透過性인 Ficoll과 sucrose를 첨가하고 있다. 胚는 실온에서 2~5분간 평형하는데 견딜 수 있기 때문에 스트로 등의 容器에 對入하는데 시간적 여유가 있고 더우기 胚의 생존율도 매우 높았다.

胚盤胞에 대해서는 rat에서 VS1을 써서(Kono et al., 1988a), 마우스에서는 VS1과 VS2를 써서(Van Der Zwalmen et al., 1988) 유리화 保存하여 良好한 成績이 얻어지고 있다.

#### IV. 要約

마우스 桑實胚의 유리화 보존(Kasai et al., 1990)에 EFS 용액이 有效하다는 것이 알려져 있으나, EFS 용액의 ethylene glycol 대신에 glycerol, DMSO를 각각 40%를 稀釋한 용액(GFS, DFS)으로 室溫(25°C)에서 유리화 보존처리가 마우스 桑實胚의 生存性에 어떤 影響을 미칠 것인가에 대해서 比較 檢討할 目的으로 實施하였으며 얻어진 결과를 要約하면 다음과 같다.

유리화 保存한 마우스 桑實胚의 生存率은 EFS 40 용액에서 96.7~100%였고, GFS 40은 93.3~96.7%로 매우 높았다. DFS 40용액은 30秒, 1分間 平衡에서 각각 0.03% 및 0.00%의 생존율을 나타냈다.

#### V. 引用文獻

1. Ismail K., Carol K., Jillan S., Anna D. & Alan T. 1988. Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses, *Teratology* 38: 467-474.
2. Jackowski S., Leibo S.P., Mazur P. 1980. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. *J. Exp. Zool.* 212: 329-341.
3. Kono T. & Tsunoda Y. 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33: 77-81.
4. Kono T. & Tsunoda Y. 1988a. Ovidal effects of vitrification solution and the vitrification-warming cycle and establishment of the proportion of toxic effects on nuclei and cytoplasm of mouse zygotes. *Cryo biology* 25: 197-202.
5. Kono T., Suzuki O. & Tsunoda Y. 1988b. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 25: 170-173.
6. Kasai M., Iritani A. & Chang M.C. 1979. Fertilization *in vitro* of rat ovarian oocytes. *Biol of Reprod.* 21: 839-844.
7. Kasai M., Komi J.H., Takakamo H., Tsudera H., Sakurai T. & Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* 89: 91-97.
8. Massip A., Van Der Zwalmen P. & F. Ectors. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27: 69-79.
9. Mazur P., Rigopoulos N., Jackowski S. G. & Leibo S.P. 1976. Preliminary estimates of the permeability of mouse ova and early embryos to glycerol and sucrose concentrations. *Biophys. J.* 16: 223a. Abstr.
10. Nakagata N. 1989. Survival of 4-cell mouse embryos derived from *in vitro* fertilization after ultrarapid freezing and thawing. *Exp. Anim.* 38(3): 279-282.

11. Rall W.F. & Fahy G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 313 : 573-575.
12. Rall W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24 : 387-402.
13. Schneider U., Mazur P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21 : 68-79.
14. Shevach Friedler M.D., Eve Shen M.S. & Emmet. J. Lamb M.D. 1987. Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification : methodologic studies. *Fertility and Sterility* Vol. 148, No. 2 : 306-313.
15. Teng-Tsao Hsu, Hirohito Yamakawa, Junko Yamanoi & Shyoso Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method. *Japn J. Anim. Reprod.*, 32 : 29-32.
16. Toyoda Y. & Chang M.C. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.* 36 : 9-22.
17. Utsumi K. 1984. Frozen storage of mammalian eggs and its development. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 55 : 523-534 (in Japanese).
18. Van Der Zwalm P., Gaurois B. Ectors F.J., Touati K., Massip A. & Ectors F. 1988. Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology* 30 : 1177-1183.
19. Wilmut I. & Rowson L.E.A. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Res.* 92 : 686-690.
20. Whittingham D.G. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature* 233 : 125-126.
21. Whittingham D.G., Leibo S.P., & Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science* 178 : 411-414.
22. Whittingham D.G. 1977. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J. Reprod. Fert.* 49 : 89-94.