

Vitrification에 의한 凍結保存이 토끼受精卵의 生存性에 미치는 影響

金熙錫·梁甫錫*·吳成宗*·李根常*
濟州大學校 農科大學, *農村振興廳 畜産試驗場

Factors Affecting the Survival of Rabbit Embryos Cryopreserved by Vitrification

Kim, H.S., B.S. Yang*, S.J. Oh* and K.S. Lee*
College of Agriculture, Cheju National University, *Livestock Experiment Station, RDA

SUMMARY

To improve the freezing techniques of animal embryos using vitrification solution as a cryoprotectant rabbit embryos, by cell stages, dehydration temperature and dehydration time, were frozen-thawed and cultured.

Followings are the main results obtained.

1. The damage rate of zona pellucida after thawing was higher(13.6%) when the cell stage of embryos was less than 4 cells than when the cell stage was 8~16 cell or morula.
The damage rate was higher when the dehydration temperature was 4°C than -30°C or -50~-80°C.
The zona pellucida was damaged more when dehydrated for 5 min than when dehydrated for 10~15 min.
2. After being cultured for 72 hours, 5.3% of 4 cell(or less) embryos were developed to morula, while 86.4% of morula embryos were developed further.
3. More percentage of embryos(73.2%) was developed when dehydrated at -30°C than when dehydrated at 4°C at -50°C~-80°C.
4. The hatching rate was higher when dehydrated for 5 min. When the embryos were dehydrated for 10~15 min and cultured for 24 hours, they were not even developed or development was not good in later stages.

I. 緒 論

最近 哺乳動物 受精卵의 凍結保存에 관한 획기적인 發展은 Wilmut(1972), Whittingham(1972)에 의하여 凍結過程의 發展과 簡便化에 成功한 후 Willadson(1977)에 의하여 凍結 및 融解速度에 관한 연구가 究明

됨으로써 이 方法은 오늘날 널리 活用되고 있다.

그후 Kasai & Niwa 등(1980), Wood & Farrant(1980)에 의한 2-step freezing 方法과 Massip(1984), Renard(1984), Williams(1986)에 의해서 凍結前 受精卵의 滲透壓差에 의한 脫水를 目的으로 sucrose의 使用에 의한 凍結融解時間의 短縮을 도모해오고 있으나

* 이 論文은 1990年度 韓國家畜學會誌 14卷 제1호에 발표된 것임.

이러한 方法들은 凍結過程中에 必須的으로 植水 (seed-ing) 이란 過程을 거쳐야만 하므로 더 많은 研究의 必要性이 要求된다.

生殖細胞에 대한 凍結의 害는 氷晶이 試料中에 形成되므로서 처음에 형성되는 細胞外 氷晶이 細胞內構造를 破壞시킴에 基因한다. 이러한 氷晶의 生成은 一定溫度 範圍(0~-30°C)와 시간이 필요하나 이 範圍域을 氷晶의 形成없이 超急速(100~200°C/秒)으로 通過하면 分子의 移動이 거의 없는 超低溫에 到達하게 되어 試料中에 氷晶 形成없이 固體化되는데 細胞는 生存을 繼續하게 된다.

Rall 과 Fahy(1985)는 高滲透壓(不凍液)溶液은 最低溫이 되면 粘性이 強하게 되어 氷晶形成없이 固體化됨으로써 細胞를 保存할 수 있다는데 根據를 두고 特殊한 高滲透壓溶液(vitrification solution(硝子化 溶液): VS1)을 제조하여 mouse 受精卵의 凍結保存試驗을 通하여 良好한 成績을 얻은 바 있으며, Rall(1987)은 glycerol 과 PEG 로 만들어낸 毒性이 弱한 vitrification solution(VS3)을 開發하여 mouse 胚를 利用하여 좋은 結果를 얻은 바 있다.

따라서 本試驗은 vitrification 溶液(VS1)을 利用하여 토끼受精卵을 凍結 融解한 후 培養成績에 의하여 凍結過程中 供試受精卵의 細胞期別(發育段階別), 脫水溫度別 및 脫水時間別로 受精卵의 狀態變化와 發育成績등 受精卵 生存性에 미치는 要因을 調査하여 今後 家畜受精卵 移植의 實用化를 위한 凍結保存技術開發의 基礎資料로 活用하고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試受精卵

뉴질랜드백색종 未經産토끼에 50 IU 의 PMSG [Peamex, 三共(株), 日本] 및 100~300 IU 의 HCG [昭和藥品(株)]를 各各 72時間 間隔으로 耳靜脈內 注射하고 즉시 수토끼 3두로 연속 3회의 交配를 실시했으며 交配後 48~60시간 以內에 反復採卵을 위해 外科의 手術 또는 屠殺하여 採卵하였다. 이때 手術採卵時는 Nembutal 2ml 를 耳靜脈에 注射하여 全身麻酔시키고 正中線 切開하여 卵管에서 子宮角쪽으로 下向式으로 採卵하였다. 灌流液은 modified Dulbecco's PBS 에 10%의 토끼血清을 混合하여 使用하였다.

2. 凍害保護物質

本試驗에 使用한 vitrification solution(VS)은 高濃度凍害保護物質이 들어 있는 液으로 Rall & Fahy (1985)의 液을 使用하였는데 그 組成은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of vitrification solution

Component*	Concentration	
	% (w/v)	(mol/l)
DMSO	20.5	2.62
Acetamide	15.5	2.62
Propylen glycol	10.0	1.32
Polyethylene glycol	6.0	0.08
Total		6.6

* in HBI (m-PBS(PBI) + BSA 3mg/ml + 20mM HEPES + KH₂PO₄ 1mM)

3. 受精卵의 VS液內 浸漬

0.3%의 牛血清이 들어있는 m-Dulbecco's PBS (PBI)를 VS 原液에 가하여 稀釋함으로써 25%와 50%의 VS液을 제조한 다음 Fig.1과 같이 수정란을 室溫에서 HBI로 여러 차례 washing 한 후 watching glass 에서 25%VS液에 15分間 浸漬시켜 VS液이 서서히 受精卵細胞質內로 들어가도록 誘導한 다음 50%

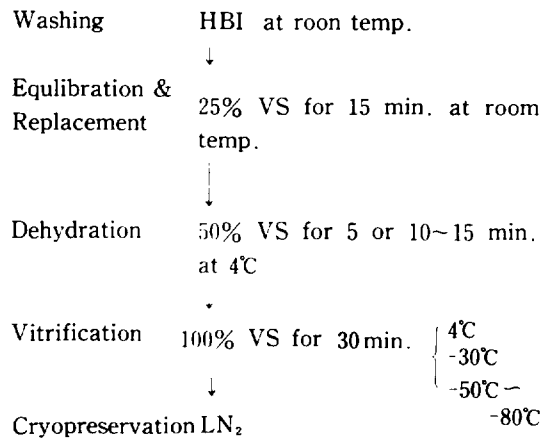


Fig. 1. Procedures of Vitrification

의 VS液에서 4°C를 維持시키면서 5分 또는 10~15分間 脫水시켰다.

그후 2ml들이 cryotube內에 100% VS液 40μl을 넣고 여기에 受精卵을 옮겨 30分間 靜置시켜 Vitrification(硝子化)을 誘導한 다음 LN₂에 옮겨 凍結保存시켰는데 100% VS液內에 30分間 靜置時는 4°C(氷水中), -30°C(凍結器活用に틸알콜중), -50~-80°C(液體空素 上面中)로 區分 實施하였다.

4. 受精卵의 融解 및 培養

液體空素中에 1~2日間 保存된 cryotube를 꺼내어 38°C의 water bath中에 15秒間 浸漬시켜 融解한 다음 즉시 氷水中에서 watching glass를 利用하여 50%의 VS液에 옮겨 5分間, 25%VS液으로 다시 옮겨 5分間 浸漬시켜 凍結時와는 反對는 凍結液인 VS濃度を 段階的으로 낮추는 方法으로 VS를 除去시켰으며(Fig. 2) 室溫에서 HBI液으로 여러번 洗滌한 다음 BMOC-3培養液에서 CO₂ 5%, 38°C, 濕度飽和狀態로 培養하면서 時間別로 發育成績으로 調査하였다.

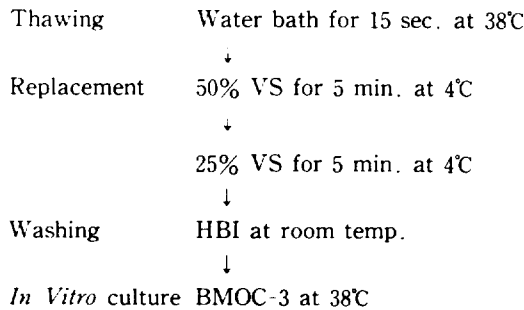


Fig. 2. Procedures of thawing and culture

III. 結果 및 考察

1. 凍結損傷에 대한 受精卵細胞期, 溫度 및 脫水時間의 效果

VS液으로 凍結保存했다가 38°C에서 15秒間 담가 融解한 후 受精卵의 細胞期別 透明帶 損傷比率을 調査한 結果는 Table 2와 같다.

4細胞期에 있어서 透明帶가 損傷된 受精卵의 比率은 13.6%로서 8細胞期 以上에 비하여 높았으며 正常受精卵의 比率은 morula가 90.2%로서 細胞期의 發達이 더딘 것에 비하여 더 높은 비율을 나타내었다.

受精卵을 凍結融解한 후 顯微鏡으로 判定했을때 透明帶損傷(破裂)比率은 4細胞期 以下の 것에서 그리고 正常卵比率은 morula의 것에서 높았는데 이는 Massip 등(1986)이 受精卵의 發育段階가 많이 進行된 것일수록 凍結時 生存率이 높다고 한 바와 같이 一般的으로 化學的 毒性的 機轉은 細胞膜의 破裂, 蛋白質의 變性 등은 물론 生細胞內 酵素界의 影響에 까지 多樣性을 가지기도 하나 細胞期가 어느 정도 進行된 것이 營養膜細胞의 發達은 물론 滲透壓差에 대한 抵抗이 다소 높았기 때문인 것으로 思料된다.

Vitrification 처리시의 溫度가 受精卵의 凍結融解후 狀態에 미치는 效果는 Table 3에 나타내었다. Table 3에서 보면 4°C에서 vitrification 했을때가 受精卵의 損傷比率이 12.5%로서 -30°C나 -50~-80°C에서 처리했을 때보다 다소 높았는데 이는 vitrification에 당시 溫度가 높을수록 細胞內 VS液이 속히 浸透된다고 (Rall & Fahy, 1985)한 바와 같았다.

그리고 50% VS液에서 VS液이 細胞內浸透를 위해

Table 2. Effect of cell stage on the No. of rabbit embryos recovered after frozen-thawing.

Cell stage	No. of emb. frozen	No. of emb. after thawing(%)		
		lost	Z. P. cracked	normal
less than 4 cell	22	1 (4.5)	3(13.6)	18(81.8)
8~16	217	23(10.6)	18(8.3)	176(81.1)
Morula	41	1(2.4)	3(7.3)	37(90.2)
Total	280	25(8.9)	24(8.6)	231(82.5)

emb. : embryos Z. P : zona pellucida

Table 3. Effect of vitrification temperature on the No. of rabbit embryos recovered after frozen-thawing.

Vitrification temp.	No. of emb. frozen	No. of emb. after thawing(%)		
		lost	Z.P.cracked	normal
4°C	8	— (0)	1 (12.5)	7 (87.5)
-30°C	205	22 (10.7)	19 (9.3)	164 (80.0)
-50~-80°C	67	3 (4.5)	4 (6.0)	60 (89.5)
Total	280	25 (8.9)	24 (8.6)	231 (82.5)

Table 4. Effect of dehydration time prior to vitrification on the No. of rabbit embryos recovered after frozen-thawing.

Dehydration time	No. of emb. frozen	No. of emb. after thawing(%)		
		lost	Z.P.cracked	normal
5 min	258	20 (7.8)	23 (8.9)	215 (83.3)
10~15 min	22	5 (22.7)	1 (4.5)	16 (72.7)
Total	280	25 (8.9)	24 (8.6)	231 (82.5)

脫水(dehydration)시키는 時間에 따라 凍結融解後 受精卵의 損傷與否 조사결과는 Table 4에 나타내었다.

Table 4에 나타난 바와 같이 5分 및 10~15分 脫水한 것은 破裂比率이 8.9%(23/258) 및 4.5%(1/22)로서 10~15分 脫水한 것이 破裂比率이 다소 낮았으며 正常卵比率은 5分 및 10~15分 탈수의 경우 각각 83.8% 및 72.9%로서 5分 脫水한 것이 약간 높은 경향이었다.

본 연구에서 여러 개의 受精卵이 lost 당한 것은 受精卵 凍結容器가 2 ml의 cryotube에서 용해後 watching glass에 保存液과 함께 性狀檢査時 찾지 못한 것이었는데 松本 등(1987)은 LN₂에 straw를 浸漬할때 straw가 破損되었기 때문이었다고 한바 있으며 그는 또한 脫水時間이 짧은 것이 胚發達이 進行된 것에서는 有利하다고 하였다.

2. 凍結後 培養成績에 미치는 受精卵의 細胞期, 溫度 및 脫水時間의 效果

凍結融解한 후 培養했을 때 受精卵의 發育에 미치는 細胞期의 效果는 Table 5에 나타난 바와 같다.

Table 5에서 培養時間에 따른 受精卵의 發育段階를 보면 4細胞期 以下の 受精卵의 경우 72時間에 blastocyst까지 發達한 것은 5.3%에 불과하였으나 8~16細胞期의 것은 48時間에 hatched된 것까지 포함하여 52.5%가 發育했으며 72시간까지는 64.1%가 되었다. 그리고 Morula는 48시간에 blastocyst로 된 것이 70.3%, hatched된 것이 16.2%였으며 72時間에는 blastocyst가 40.5%로 되고 hatched된 것이 45.9%로 되어 전체 86.4%가 發育됨을 알 수 있었다.

Matsumoto 등(1987)이나 HSU 등(1986)이 8細胞期에 비해 morula 및 blastocyst가 生存率은 낮은 경향을 나타내었다는 報告가 있으며 Massip 등(1986)은

Table 5. Effect of cell stage on the development of rabbit embryos frozen-thawed by culture time.

Cell stage	No. of emb. cultured	Culture time (hr)	No. of emb. developed (%)			
			morula	blastocyst	hatched	Total
<4 Cell	19	48	1 (5.3)			1 (5.3)
		72		1 (5.3)		1 (5.3)
8~16	181	24	33(18.2)	2(1.1)		35(19.3)
		48	52(28.7)	42(23.2)	1(0.6)	95(52.5)
		72	30(16.6)	77(42.5)	9(5.0)	116(64.1)
		24		14(37.8)	6(16.2)	20(54.1)
Morula	37	48		26(70.3)	6(16.2)	32(86.4)
		72		15(40.5)	17(45.9)	32(86.4)

소의 morula와 blastocyst를 VS液으로 凍結후 溶해하여 各各 42.8%와 53.8%의 生存率을 얻은바 있어서 受精卵의 發育段階가 많이 進行된 것일수록 生存率이 높다고 하였다.

河野 등(1987)도 VS液으로 마우스受精卵을 凍結保存했을때 生存性이 優秀하였다는 報告가 있는가 하면 Massip(1987) 등이 blastocyst는 VS液으로 凍結했을때 受胎率에 있어서 morula는 39.1%임에 비해 0%로 극히 나빴는데 이는 凍結保護劑의 高濃度에 의한 毒性때문이며 毒性敏感度는 아마 滲透壓에 따른 것이다.

作用時間과 溫度에 關係가 깊다고 한바 있지만 本試驗에 使用한 受精卵의 發育段階에 따른 培養成績은

8~morula까지가 4細胞期 以下보다도 良好한 結果를 보이고 있어 今後 受精卵의 發育段階에 따른 좀더 깊이 있는 研究의 必要性을 提示해주고 있다.

Vitrification 당시의 溫度가 凍結融解後 培養時 發育에 미치는 效果는 Table 6에서 보는 바와 같다.

氷水中(4°C)에서 vitrification을 實施한 것은 72時間까지 培養했을때 71.4%가 發育되었으나 hatched된 것이 없었으며 blastocyst까지만 발육했으며 -30°C에서 實施한 것은 72時間 培養으로 73.2%가 發育을 했는데 hatched된 것이 된 것이 14.9%나 되었다. 그러나 -50~-80°C에서 실시한 것은 72時間 培養에서 33.9%만이 發育했으며 hatched된 비율은 1.6%에 불

Table 6. Effect of vitrification temperature on development of rabbit embryos frozen-thawed by culture time.

Vitrif. temp.	No. of emb. cultured	Culture time (hr.)	No. of emb. developed (%)			
			morula	blastocyst	hat.	Total
4°C	7	24	1(14.3)			1(14.3)
		48		4(57.1)		4(57.1)
		72		5(71.4)		5(71.4)
-30°C	168	24	23(13.7)	16(9.5)	6(3.6)	45(26.8)
		48	39(23.2)	64(38.1)	6(3.6)	109(64.9)
		72	24(14.3)	74(44.0)	25(14.9)	123(73.2)
		24		9(14.5)		9(14.5)
-50°C ~ -80°C	62	48	14(22.6)		1(1.6)	15(24.2)
		72	7(11.3)	13(21.0)	1(1.6)	21(33.9)

과하였다.

사실 受精卵의 培養率에 미치는 vitrification 溫度는 매우 重要한 것으로 4°C에서 보다는 -30°C에서 실시했을 때가 良好한 發育成績을 나타내고 있는데 이는 -30°C까지는 氷晶의 形成없이 超急速으로 (100~200°C/秒) 通過하면 水分子의 移動이 거의 없는 超低溫에 到達하게 되어 試料中 氷晶形成없이 固體化되어 細胞는 生存을 계속하게 된다고 Luyet 등(1940)도 報告한 바 있다. 그리고 本試驗은 72時間 까지만 培養觀察하였으므로 그 以後의 培養時間 延長에 의한 發育이 예상되기도 한다.

한편 -50~-80°C의 경우는 培養率이 33.9%에 不過한데 이는 液體窒素증기위에서 受動的으로 試料의 높이 조절에 의해 溫度를 調節한 것이므로 不規則的인 溫度가 作用되었기 때문인 것으로 여겨진다.

脫水時間에 따른 培養時 發育成長이 Table 6에 나타나 있다.

50%의 VS 液에서 5分 脫水の 경우 72時間 培養時 65%가 발육되었으며 10~15分 脫水한 것은 24시간 培養時에서는 受精卵의 發達이 일어나지 않았으며 72時間에는 76.5%가 發育하여 다소 良好한 發育을 나타냈으나 hatched 된 것이 없어 後期發育이 나빴다.

Matsumoto 등(1987)은 10分 및 2分 脫水時 마우스 受精卵 8細胞期에서는 모두 89%가 expanded blastocyst로 자랐으며 morula에서도 各各 33%와 32%로 나타났는데 blastocyst에서는 各各 0%와 25%를 나타내어 脫水時間이 짧은 것이 胚發達이 進行된 것에서 有利하다고 하였다.

또한 Rall 등(1985)에 의하면 VS 液은 毒性이 강하

므로 VS 液이 細胞質에 들어간 후는 安全하게 平衡이 이루어지기 위해서는 溫度(低溫)와 時間을 注意해서 實施해야 한다고 한 바도 있지만 受精卵을 VS 液에 浸漬하면 1~2分 以內에 脫水에 의하여 細胞質이 收縮되었으며 5~10分 후에는 재차 원상태의 正常卵에 比較하여 약 80%로 팽대됨을 볼 수 있었는데 이는 VS 液이 細胞質에서 빠져나온 水分에 代置하여 細胞質內로 浸透하고 있음을 알 수 있다. 이는 凍結保護劑가 細胞內 充分히 浸透되기 위해서는 低濃度에서 脫水가 먼저 일어나야 하며 充分한 脫水가 안되거나 너무 늦게 일어나면 毒性의 被害를 받게 되므로 적당한 脫水時間이 필요하다.

IV. 摘要

家畜受精卵의 凍結保存技術을 改善하기 위하여 凍結保護劑로서 vitrification solution을 利用하여 토끼 受精卵의 細胞期別, 凍結過程中的 脫水溫度 및 脫水時間別로 凍結融解後 受精卵의 狀態 및 培養成績을 調査하였던바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 凍結融解後 受精卵의 透明帶 損傷比率을 보면 4細胞期 以下가 13.6%로서 8~16細胞期나 morula에 비하여 높았으며, 凍結過程中 脫水溫度에 있어서는 4°C가 -30°C나 -50~-80°C에 비하여 損傷率이 높았다. 그리고 脫水時間에 따라서는 5分 脫水の 경우가 10~15分 脫水の 경우보다 損傷率이 다소 높았다.

2. 融解된 受精卵의 發育成績을 보면 72時間 동안 培養했을 때의 4細胞期 以下 受精卵凍結時는 5.3%만이 morula까지 發育했으며 morula受精卵을 凍結했을 때

Table 7. Effect of dehydration time on development of rabbit embryos frozen-thawed by culture time.

Dehyd. time	No. of emb. cultured	Culture time (hr.)	No. of emb. developed (%)			
			morula	blastocyst	hatched	Total
5 min.	220	24	33	16	6 (2.7)	55 (25.0)
		48	46	62	7 (3.2)	115 (52.3)
		72	27	83 (37.7)	26 (11.8)	143 (65.0)
10~15 min.	17	24	-	-	-	-
		48	7 (41.2)	6 (35.3)	-	13 (76.5)
		72	3 (17.6)	10 (58.8)	-	13 (76.5)

는 86.4%가 發育했다.

3. 凍結過程中 脫水溫度에 따른 受精卵의 發育成績은 -30°C에서의 脫水가 73.2%로서 4°C나 -50~80°C에서 脫水한 것보다 양호하였다.

4. 脫水時間에 따른 受精卵의 發育成績은 5分 脫水가 10~15分 脫水보다 受精卵의 hatching比率도 높았는데 10~15分 脫水는 24時間 培養時에서는 受精卵의 發達이 일어나지 않았으며 後期 發育이 좋지 않았다.

V. 引用文獻

1. Hsu, T.T., Yamakawa, J., Yamanoi and S. Ohawa. 1986. Survival and transfer test of mouse embryos frozen by vitrification method. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 32 : 29-32.
2. Kasai, M., Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.* 59 : 51-56.
3. Luyet, B.J., P.M. Gehenio. 1940. Life and death at low temperatures. *Biodynamica Pub.*, Normandy, Mo.
4. Massip, A., P. Van der Zwalmen and F. Leroy. 1984. Effect of stage of development on survival of mouse embryos frozen-thawed rapidly. *Cryobiology* 21 : 574-577.
5. Massip, A., P. Van der Zwalmen, B. Scheffen, and F. Ectors. 1986. Pregnancies follow transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters*. 7 : 270-273.
6. Massip, A., P. Van der Zwalmen and F. Ectors. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27 : 69-79.
7. Matsumoto, T., M. Ishiwata, J. Yamanoi, H. Yamakawa, Y. Kondo, S. Kawate and S. Ogawa. 1987. Effect of sucrose dilution on survival of mouse early embryos after being frozen-thawed by vitrification method.
8. Rall, W.F. and G.M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313 : 573-575.
9. Rall, W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24 : 387-402.
10. Renard, J.P., N. Bui-Xuan-Nguyen and V. Garnier. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.* 71 : 573-580.
11. Whittingham, D.G., S.P. Leibo, and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science* 178 : 411-414.
12. Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology* 26 : 125-133.
13. Wilmut, I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryo during freezing and thawing. *Life Sciences* 11 : 1071-1079.
14. Wood, M.J. & J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology* 17 : 178-180.
15. 河野友宏, 角田辛生. 1987. 카라스화 초고속 동결법による 마우스 初期胚의 生存性および 移植實驗. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33 : 77-81.