

마우스 胚의 凍結保存

康珉秀

濟州大學校 農科大學 畜産學科

Cryopreservation(Vitrification) of Mouse Embryos

M. S. Kang

Department of Animal Science, College of Agriculture

Cheju National University

Summary

The method of vitrification has various merits. It needs neither seeding nor slow freezing. It can freeze embryo by putting it directly into liquid nitrogen at the indoor temperature to 0°C. The operation process is quite easy. Moreover, higher promise of survival can be expected as there is no physical damage by any lumps of ice with the exception of cells. In Kasal's experiment (1990) using EFS liquid and Kang's experiment (1991) using GFS liquid the ratio of the damaged embryo was only 2~3%.

But, the method of vitrification is now on the process of improvement, and the final or united method is not yet established. At the present time, most of the major institutes all over the world are using the traditional freezing method in the preservation of mouse embryo, but it is very likely that the vitrification will prevail in the near future considering the various merits of it.

Calves can be begotten from the embryo by means of vitrified preservation in the cases of cow, rat, and rabbit as well as of mouse. In addition, recent experiments have shown that vitrified preservation was successful in the case of drosophila embryo which was much bigger than mammalian embryo, which fact tells that this method is expected to be preferably used even in the preservation of living organs in the near future.

緒 論

Table 1에서 보는 바와 같이 1972年 最初로 凍結保存한 마우스 胚로부터 産仔가 얻어졌다(Whittingham et al., 1972). 그 때 사용한 凍結法은 生存率이 높으면서 再現性이 優秀하였으므로 보존방법으로 확립되어 현재에도 널리 이용되고 있다. 그러나 分當(每分) 0.3~0.5°C라는 매우 緩慢한 速度로 장시간 冷却시켜야 하는 操作을 요하기 때문에 그 후 이 보다 더 간편한 방법에 대해 계속 개발되어 왔다. 그리고 근래 窮極的인 簡易凍結法으로서 고안된 것이 vitrification(유리화)法이다(Rall and Fahy, 1985). 이 vitrification法은 용액에 浮遊시킨 胚를 직접 液體窒素에 투입하여 동결 보존할 수 있기 때문에 동결에 요하는 시간이 불과 5~10秒이며 더우기 從來의 동결

Table 1. Successful young after embryo cryopreservation (-196°C) in domestic animals, laboratory animals and human

Species	Year
Mouse	1972
Cattle	1973
Rabbit	1974
Sheep	1974
Rat	1975
Goat	1976
Horse	1982
Deer	1983
Human	1983
Pig	1990

법보다 良好한 生存率이 報告되고 있다.

Vitrification이란?

水溶液을 氷點까지 냉각하면 氷晶을 형성 시킬 수 있다. 純水의 氷點은 0℃, 생리적인 溶液의 氷點은 약 -0.6℃이지만 glycerol(Gly)이나 dimethyl sulphoxide (DMSO) 등의 低分子의 耐凍劑를 첨가하면 氷點은 降下하여 胚의 凍결에 適宜 利用하는 濃度 (1.0~2.0M)의 내동제를 함유한 용액에서는 -2.6~-4.8℃로 된다.

그러나 이와 같은 용액을 냉각해도 氷點보다 10℃ 정도 낮은 온도까지는 氷晶이 형성되지 않고 일단 過冷却 상태로 되며 더 저온으로 냉각 했을 때에야 비로소 氷晶이 형성된다. 그런데 더욱 氷點이 낮은 매우 高濃度의 내동제를 함유한 용액을 급속히 냉각하면 液體窒素(-196℃) 속에서도 과냉각 상태 그대로 氷晶의 형성을 억제할 수 있게 된다. 이 경우 용액의 粘性이 높아져 어떤 온도 이하에서는 非結晶 그대로 固體로 된다. 이 현상을 유리(vitri) 모양의 상태로 된다고 하여 이로부터 vitrification(유리화)이라 부르고 있다(Fahy et al., 1984).

한편 英語에서 氷晶형성을 수반하는 현상을 freezing이라 부르기 때문에 vitrification은 freezing에 포함되지 않는다. "Freezing"은 통상 "凍結"이라 번역하지만 이것들을 同意語로 하면 "유리화 法에 의한 凍結保存"은 있을 수 없다. 그러나 여기서는 유리화를 포함한 極低溫下의 保存(cryopreservation)을 "凍結"로 부르기로 한다.

유리화 溶液 : 細胞外의 유리화

水溶液을 유리화 시키기 쉽게 하기 위해서는 몇 가지 手段이 알려져 있다. 예를 들어 액량을 적게 하여 냉각속도를 빠르게 하면 유리화 하기 쉽게 된다. 그 외 냉각속도는 胚를 封入하는 용기의 材質과 두께, 冷却에 쓰이는 冷媒, 冷媒와의 接觸方法 등에 좌우된다.

그 한 예로 0.25ml 플라스틱 스트로에 넣은 용액을 직접 액체질소에 침적하므로써 每分 2,500℃ 정도의 속도가 얻어지나 이것은 胚의 유리화에 있어서는 충분히 빠른 속도이다. 또 高壓下에서의 동결처리도 氷晶형성의 억제에 유효하지만 현실적인 방법은 아니다.

용액의 유리화를 좌우하는 가장 중요한 要因은 내동제(cryoprotective agent)이다. 氷點을 降下시켜 유리화 시키기 쉽게 하기 위해서는 重量 濃度를 높일 필요가 있고 이 때문에 分子量이 낮은 物質의 첨가가 필요하다. 유리화 용액에 이용되는 低分子 내동제로는 DMSO, glycerol, ethylene glycol, propylene glycol 등 종래의 동결법에 쓰이는 것과 같은 물질이지만 그 농도는 매우 높고 8M 이상에 달하는 경우도 있다. 이들 내동제는 細胞透過性이지만 더우기 非透過性의 高分子 물질을 첨가하면 유리화를 촉진시키는 效果가 있는 것이 알려져 있고, 이를 위해 polyethylene glycol(PEG), Ficoll, 牛血清 알부민(BSA) 등이 쓰이고 있다.

高濃度의 細胞透過性 내동제는 용액의 유리화에는 유효하지만 細胞를 보존하기 위한 용액으로서는 毒性을 높이게 되어 이것이 큰 障害가 된다. 여기서 될 수 있는 한 毒性을 緩和시키기 위해서 低毒性 내동제의 사용, 유리화 하기 쉬운 내동제의 사용, 내동제 농도의 低減 등을 考慮할 필요가 있다(Fahy et al., 1984).

또 氷晶 형성의 유무를 확인하기 위해서는 이론상 白濁 하는가 여부로 判定할 수 있으나 이론상 光波長보다 작은 氷晶은 肉眼으로는 확인할 수 없다. 따라서 보다 확실한 유리화의 證明을 위해서는 熱量變化의 分析 및 X線解析 등에 의해 관찰하지 않으면 안된다.

細胞内の 유리화

細胞内の 氷晶 형성은 반드시 致命的이라고는 말할 수 없으나 일반적으로 세포의 생존성을 損傷시키는 큰 要因이다. 따라서 細胞外에 氷晶이 형성되는 종래의 동결법에 있어서도 胚의 세포내에 氷晶이 형성되지 않는다. 細胞内の 내동제농도가 동결전에 가령 1M 이었다 하면 동결시에는 세포외의 용액이 氷晶형성에 의해 濃縮되어 세포가 脫水되는 과정에 몇배로 上昇한다. 더우기 細胞膜은 氷을 통과시키기 어렵기 때문에 그대로 액체질소에 急冷해도 세포내에 얼음이 형성되지 않는 즉, 유리화되고 있는 것으로 생각된다(Mazur, 1990).

한편 세포외의 용액이 유리화한 경우에 세포의 내부가 반드시 유리화하고 있다고는 할 수 없다.

그러나 유리화 法에 있어서도 세포내의 빙정은 생존성을 손상시킬 수 있을 것으로 예상되기 때문에 세포내에도 유리화시킬 필요가 있다.

유리화 法에 의하지 않고 胚를 동결 보존하는 경우에는 사전에 내동제 등을 첨가한 수용액에 일정유도로 일정시간 胚를 보존하여 세포내에 내동제를 浸透시킬 필요가 있는데 이것을 "平衡(equilibration)"이라 부른다. 유리화 法에서는 세포외에 빙정이 없기 때문에 냉각과정에 세포의 脫水는 일어나지 않는다. 따라서 평형시에 세포내에 透過性 내동제를 침입시킨 다음, 이어서 탈수를 促進하는 등 동결전에 그 농도를 충분히 높게 해 둘 필요가 있다. 또 細胞質內에 존재하는 蛋白質 등의 生體分子도 非透過性 물질로서 유리화를 촉진하는 것으로 생각되고 있다.

胚의 유리화 保存과 回收操作的 概要와 注意点

1. 유리화 용액

胚의 유리화에 쓰이고 있는 주요 溶液과 耐凍劑의 組成을 Table 2에 나타냈다. 또 내동제를 첨가하는 基礎溶液에는 통상 修正磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)(河野와 角田, 1987)가 쓰이고 있다.

2. 平 衡

細胞內外가 유리화 해도 세포가 생존한다고는 할 수 없다. 특히 平衡시에는 고농도 내동제 毒性의

영향을 받아 胚가 死滅할 가능성이 있고 이것을 잘 어떻게 回避할 수 있을지가 중요하다. 하나의 有效한 방법은 유리화 용액보다도 저농도의 내동제 용액으로 平衡하는 것이 있는데 이 경우에는 그 후 脫水を 促進하고 細胞內 내동제 濃度を 높일 필요가 있다. 또 용액의 毒性은 내동제농도외에 처리하는 溫度와 時間에도 의존하고 있기 때문에 평형시의 溫度의 低下 및 時間의 단축도 毒性 緩和의 有效한 수단이 된다. 주요 평형처리 방법을 Table 3에 나타냈다.

3. 凍 結

유리화시키는 操作 자체는 간단하여 胚를 봉입한 스트로(0.25ml) 등을 액체질소에 직접 沈積하는 것으로서 이대로 -196℃에 보존할 수 있다.

4. 融 解

保存 샘플의 融解는 水中(0~37℃)에 침적하여 급속히 加溫한다. 액체질소중에 유리화시킨 용액은 일종의 過冷却 상태에 있기 때문에 加溫中에 이것이 破裂되어 빙정을 형성하는 경우가 있는데 이것을 脫유리化(devitrification)라 부른다. 세포외에 脫유리化는 반드시 세포의 生存性을 低下시키는 것은 아니나 세포내의 脫유리化를 유기하므로써 胚를 死滅시킬 가능성도 있다. 그것을 방지하기 위해 急速融解가 필요하다.

5. 耐凍劑의 除去

내동제의 稀釋 혹은 除去시 세포내에 浸透한 내동

Table 2. Composition of cryoprotectant for vitrification of mouse embryos

Vitrification solution	Cryoprotectant		
	Permeability	Nonpermeability	
		High molecule	Low molecule
VS1(Rall and Fahy, 1985)	20.5% DMSO+15.5% AA+10% PG(w/v)	6% PEG(w/w)	-
90% VS1(Rall and Fahy, 1985)	18.5% DMSO+14% AA+9% PG(w/v)	5.4% PEG(w/v)	-
VS2(Rall, 1987)	5.5M-PG	6% PEG(w/v)	-
VS3(Rall, 1987)	6.5M-Gly	6% PEG(w/v)	-
GP25(Scheffen et al., 1987)	25% Gly+25% PG(v/v)	-	-
DAP213(中瀬, 1989)	2M-DMSO+1M AA+3M PG	-	-
EFS(Kasai et al., 1990)	40% EG(v/v)	18% Ficoll(w/v)	0.3M Suc
GFS(Kang et al.)*	40% Gly(v/v)	18% Ficoll(w/v)	0.3M Suc

DMSO: dimethyl sulphoxide, AA: acetamide, PG: propylene glycol, Gly: glycerol, EG: ethylene glycol, PEG: polyethylene glycol, Suc: sucrose.

* Unpublished data.

Table 3. Equilibration method of embryos in vitrification solution

Method	Step 1			Step 2			Step 3		
	Solution	Temp.	Time	Solution	Temp.	Time	Solution	Temp.	Time
Rall and Fahy(1985)	20%VS	~20℃	15min	50%VS	4℃	10min	VS	4℃	10min
Scheffen et al.(1987)	10%Gly +20%PG	Room temp.	10min	GP25	Room temp.	<30sec	-	-	-
中瀨(1989)	DAP213	Room temp.	5~10sec	-	-	-	-	-	-
Kasai et al.(1990)	EFS	20℃	2~5min	-	-	-	-	-	-
Kang et al.*	GFS	10℃	30sec~ 2min	-	-	-	-	-	-

PG: prophylyene glycol, Gly: glycerol.

* Unpublished data.

제에 의한 浸透壓 膨脹에 의한 세포가 傷害를 받을 가능성이 있다. 그것을 막는 방법으로 서서히 물게 하는 段階法과 胚의 수축을 촉진하는 sucrose 法 (0.3~1.0M) 등이 있다는 것은 종래의 동결법과 같으나 특히 유리化 法에서는 低温에서의 처리 혹은 급속

한 稀釋 등 용액의 毒性 영향을 적게하는 것을 考慮할 필요가 있다.

各種 유리化 法

4種의 유리化 法의 特徵을 아래에 記述하고자 한

Table 4. Viability of vitrified mouse embryos

Vitrification solution	Embryo stage	Viability(%)		Report
		<i>In vitro</i> *	<i>In vivo</i> **	
VS1	2-cell	46	22	河野, 角田(1987)
	8-cell	22~90	2~44	河野, 角田(1987)
	Morula	77~95	31~38	Rall et al.(1990) 河野, 角田(1987) 松本 等(1987)
90% VS1	8-cell	80~87	30	Rall et al.(1990)
VS2	8-cell	95	-	Rall(1987)
VS3	8-cell	89~97	30~60	河野 等(1990)
GP25	8-cell	77	-	Valdez et al.(1990)
	Morula	80~91	39	Scheffen et al.(1987)
DAP213	2-cell	54	60	中瀨(1989)
	Morula	78	-	中瀨(1989)
EFS	2-cell	82***	-	三宅 等
	8-cell	95***	-	三宅 等
	Morula	98	34	Kasai et al.(1990)
GFS	Morula	95***	-	Kang et al.

* No. of blastocysts/No. of embryos recovered after preservation × 100.

** No. of young/No. of embryos transferred × 100.

*** Unpublished data.

다. 또 여러 가지 유리화 용액을 써서 保存한 마우스의 2細胞期 胚, 8細胞期 胚 및 桑實胚의 生存性을 Table 4에 나타냈다.

1. Pall과 Fahy(1985)의 유리화 法

Rall과 Fahy는 最初로 마우스 胚의 유리화 보존의 성공을 報告했다. 그들의 사용한 용액(VS1)의 내동제는 DMSO를 기초로 하고 있는데 독성을 완화시키기 위해서 acetamide, 또 용액의 유리화를 촉진하기 위한 목적으로 propylene glycol(PG)과 polyethylene glycol(PEG)이 添加되고 있다. 平衡시에는 처음 稀薄한 저독성의 용액(25% VS1)에 실온에서 胚를 浮遊시켜 세포내에 내동제를 浸透시킨 다음 이어서 내동제의 독성과 투과성이 낮은 低温(4℃)에서 順次的으로 고농도의 용액(50% VS1, 100% VS1)에 옮겨 세포의 脫水를 촉진한다. 그러나 서로 다른 온도에서 3種의 용액에 순차적으로 胚를 이동해야 하기 때문에 동결전과 용해후에 각각 35~40분을 요하므로써 操作이 간편한 方法이라고 할 수 없다.

당초 그들의 사용한 VS1에서는 胚가 생존은 했으나 독성이 높기 때문에 그 후 약간 묽은 90%의 VS1을 써서 많은 産仔를 얻었다(Rall et al., 1987).

Rall(1987)은 더우기 glycerol + PEG(VS3), propylene glycol + PEG(VS2)을 써서 보다 높은 생존율을 얻었다고 報告하고 있다.

2. Scheffen 등(1987)의 유리화 法

그들의 유리화 溶液(여기서는 GP25라 함)에서는 glycerol에 propylene glycol을 혼합하므로써 兩者의 독성을 低下시키고 동시에 유리화를 促進시키려 하고 있으나 PEG와 같은 非透過性 高分子는 쓰지 않고 있다. 저농도의 용액에 平衡 후 고농도의 용액에 옮겨 유리화하는 것은 Rall과 Fahy(1985)와 같은 생각이지만 고농도 용액에서의 處理 시간을 短縮하려고 하여 모두 室温에서 處理하고 있다.

3. 中瀉(1989)의 유리화 法

유리화 溶液(DAP 213)은 DMSO, acetamide, propylene glycol을 2 : 1 : 3으로 첨가한 것으로 Rall과 Fahy(1985)의 VS1과 類似하지만 PEG에 대해서는 반드시 첨가하고 있지는 않다. 그의 戰略은 아주 短時間에 처리하므로써 毒性을 回避 할려고 하는

것인데 실온에서 30秒의 유리화 용액중에 직접 胚를 넣어 불과 10초 이내에 액체질소에 沈積한다. 그러나 그 이상 時間이 걸리면 生存率이 低下하는 것으로 미루어 용액의 독성이 상당히 높을 것으로 생각. 冷却後의 회식을 빠르게 실시하게끔 샘플 튜브(0.5 ml)을 사용하고 있다. 그는 1細胞期 受精卵 桑實胚의 보존에 더하여 未受精卵(Nakagata, 1989)의 유리화 保存에도 成功하고 있다.

4. Kasai 등(1990)의 유리화 法

室温下에서 1단계 평형후 凍結 되게끔 독성이 낮은 유리화 용액(EFS)를 作出하고 있다. 내동제에는 細胞透過性的 ethylene glycol을 기초로 非透過性的 Ficoll과 sucrose를 첨가하고 있다. 胚는 20℃ EFS 액속에서 2~5분간 平衡에 達할 수 있기 때문에 스트로 등의 용기에 封入할 시간적 餘裕가 있고 더우기 그 이상의 平衡時間은 불필요하다.

또 胚의 생존율도 매우 높고(桑實胚에서는 98%) 여기에 제시한 유리화 溶液中에서는 가장 毒性이 낮을 것으로 생각된다. 이것은 ethylene glycol의 독성이 DMSO, glycerol, propylene glycol 등 보다도 낮고, 또 分子량이 작기 때문에 평형시의 浸透나 용해후의 除去가 容易하다는 것, Ficoll은 低毒性으로 溶解度가 높다는 것, 더우기 sucrose에 의한 脫水가 세포내의 ethylene glycol 농도를 調整함과 동시에 용해후의 내동제 제거를 容易하게 하는 등이 理由로 여겨진다.

유리화 방법으로 동결보존후 용해에서 얻어진 桑實胚와 胚盤胞는 각각 Fig. 1과 2 및 3과 4에서 보는 바와 같다.

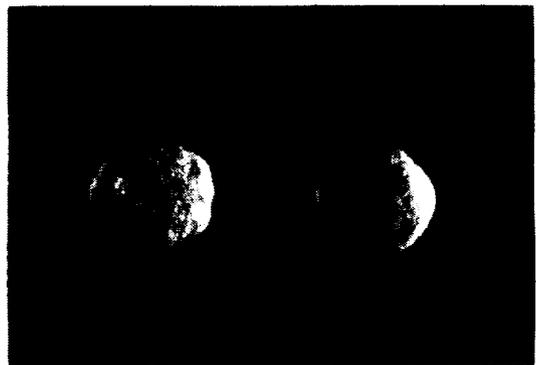


Fig. 1. Compacted morula after thawing.



Fig. 2. Expanded blastocyst from cultured morula.

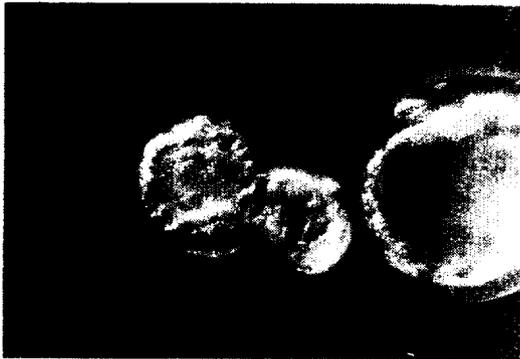


Fig. 3. Blastocyst showing hatching.



Fig. 4. Expanded blastocyst after hatching.

結 論

유리화 法은 植水이나 緩慢 冷却이 불필요하며 실온 \sim 0 $^{\circ}$ C로 부터 직접 液體窒素에 투입하여 동결 할 수 있기 때문에 조작이 매우 쉽고 더구나 세포의

의 氷晶에 의한 物理的 傷害가 없기 때문에 보다 높은 生存性이 기대된다. 실제 EFS液을 쓴 Kasai 등(1990)의 實驗과 GFS液을 쓴 Kang 등(1991)의 實驗에서는 傷害를 입는 胚의 비율은 불과 2~5%였다.

그러나 이상 몇개의 方法을 列擧한 것처럼 유리화 法은 改良途上에 있고 아직 통일된 技法은 확립되어 있지 않다. 現在 世界主要研究施設에서의 마우스 胚의 보존은 종래의 동결법으로 실시되고 있으나 유리화 法의 이점을 고려하면 가까운 장래에 유리화 法이 널리 보급될 것으로 보인다.

마우스 이외에 牛(Massip et al., 1986), rat(Kono et al., 1988), 家兎(Smorag et al., 1989)에서 유리화 보존 胚로 부터도 産仔가 얻어지고 있다.

더욱이 최근 哺乳動物胚 보다 매우 큰 초과리(Steponkus et al., 1990)의 胚에서도 유리화 보존의 成功이 보고되고 있어서 장차 器官의 保存에도 有望한 手法으로 활용이 기대되고 있다.

參 考 文 獻

- Whittinghaam DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196° C and -269° C. *Science*, 178:411-414.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196° C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA and Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21:407-426.
- Mazur P. 1990. *Cell Biophysics*, 17:53-92.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24:387-402.
- Scheffen B, Van Der Zwalm P and Massip A. 1987. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters*, 7:260-269.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrifi-

- cation solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.*, 89:91-97.
- Whittingham DG. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233:125-126.
- Rall WP, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG. 1990. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fertil.*, 89:499-504.
- Valdez CA, Mazni OA, Takahaasi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1990. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 33:627-636.
- Nakagata N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitirification. *J. Reprod. Fertil.*, 87:479-483.
- Massiip A, Van Der Zwalmen P, Scheffen B and Etors F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters*, 7:270-273.
- Kono T, Suzuki O and Tsunoda Y. 1988. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology*, 25:170-173.
- Smorag Z, Gajda B, Wieczorek B and Jura J. 1989. *Theriogenology*, 31:1227-1231.
- Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leib SP, Rall WP, Pitt RE, Lin TT and MacIntyre RJ. 1990. Cryopreservation of *drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, 345:170 - 172.
- 松本徹郎, 石渡 學, 山井淳子, 山川宏人, 近藤ゆり, 川手秀一, 尾川紹三. 1987. Vitrification法で凍結融解されたマウス胚の生存性に対する sucrose 稀釋の効果. *家畜繁殖誌*, 33:200-205.
- 中舘直己. 1989. 体外受精由来マウス前核期受精卵の超急速凍結保存について. *哺乳卵研誌*, 5:23-26.
- 河野友宏, 角田幸生. 1987. ガラス化超急速凍結法によるマウス初期胚の生存性および移植試験. *家畜繁殖誌*, 33:77-81.
- 河野友宏, 権五龍, 一戸健司, 中原達夫. 1990. ガラス化保存されたマウス胚における稀釋液の検討. *家畜繁殖誌*, 35:211-221.