

여러 종류의 동해방지제를 이용한 소 체외수정란의 동결 및 일단계 용해후의 체외배양 생존율 및 수태율

T. Suzuki, M. Takagi, M. Yamamoto, A. Boediono,
S. Saha, H. Sakakibara and M. Oe

United Graduate School of Veterinary Science
Yamaguchi University, Japan

요 약

치밀 난구세포로 둘러싸인 소 난자를 38°C, 5% CO₂ 배양기에서 5% superovulated cow serum(SCS)이 첨가된 m-TCM 199 medium으로 20~22시간 배양하였으며, 수정능이 획득된 정자와 체외수정하였다. 7일~8일령의 수정란을 1.3M methyl cellosolve(MC), 1.1M diethylene glycol(DEG), 1.8M ethylene glycol(EG), 1.6M propylene glycol(PG) 및 1.1M 1,3-butylene glycol(BG) 용액에서 10분간 평형시킨 후 0.25ml 스트로내에 장전하였다. 스트로를 0°C의 alcohol bath freezer에 넣고 -6°C까지 -1°C/분 속도로 냉각, 식빙 후 10분간 정체시켰으며, -0.3°C/분 또는 -0.5°C/분으로 -30°C까지 냉각 후 스트로를 액체질소에 침지하여 보관하였다. 수정란이 들어있는 스트로를 30°C 온수에서 용해하였으며, 수정란을 TCM 199 medium으로 옮긴 후 5% SCS가 첨가된 TCM 199 medium에서 48시간 배양하였다. 수정란이 양호한 형태를 유지하며 나중의 발육단계로 진행된 것을 생존한 것으로 간주하였다. 각 종류의 동해방지제에서 동결된 수정란의 일부는 용해 후 동해방지제를 제거하지 않고 직접 비외과적으로 이식하였다. 동결-용해 후 동해방지제의 종류에 따른 탈출배반포 발달율은 EG 50.0%, MC 53.6%, DEG 56.9%, PG 58.0% 그리고 BG 11.5%였다. -0.3°C/분 또는 -0.5°C/분 으로 냉각한 수정란의 생존율은 두 그룹간에 유의적인 차이가 없었으나(P<0.05), 탈출배반포 발달율은 -0.5°C/분(22.6%, 12/53)보다 -0.3°C/분(64.6%, 31/48) 냉각시에 유의적으로 높았다(P<0.01). 동해방지제의 종류에 따른 수정란의 수태율은 MC 48%(10/21), DEG 30%(3/10), EG 74%(20/27) 및 PG 40%(4/10) 였다. 이러한 결과로 보아 MC, DEG, EG 그리고 PG는 소의 체외수정란의 동결을 위한 동해방지제로서 이용될 수 있음을 보여주었다.

서 론

소 수정란을 용해 후 수란우에 직접이식이 가능한 동결방법은 수정란이식의 상업화에 유용하며, 용해 후 동해방지제의 다단계 제거가 요구되는 conventional freezing procedure에 비해서 장점을 나타낸다. 수정란의 판매를 위한 직접이식법에 대한 관심이 동결 및 용해 후 수정란의 수분 재흡수의 문제에 대한 부가적인 연구를 유발하였다. 과거의 직접 이식법에 의해

제기 되었던 주된 문제는 동해방지제에 대한 소 수정란의 투과성의 결핍이었다. 소 수정란에 매우 투과성이 있는 효과적인 동해방지제를 확인하는 것은 직접이식 기술을 개발하는 또 하나의 방법이다. 이전에 소 수정란의 직접이식에 대한 여러 가지 방법이 기술되었으며, 그러한 기술중의 하나가 일단계법이었으며(Leibo, 1984 & 1986; Renard, 1982; Suzuki, 1984), 다른 하나의 방법은 동해방지제로서 0.25M sucrose가 첨가된 1.5M glycerol을 사용하였다(Massip, 1984). 이상의 실험에서 sucrose는 삼투성 평형을 유지시키기 위한 삼투성 완충제로서 사용되었다. 그러나 이러한 방법들은 과정의 복잡성 또는 지속적인으로 만족할만한 결과를 보여주지 못하였으므로 수정란이식 산업화에는 널리 이용되지 않았다. 최근에 우리는 1.6M propylene glycol이 소 수정란의 동해방지제로서 효과적으로 이용될 수 있음을 보고하였다(Suzuki, 1990). 그것은 동결-융해된 수정란이 보존배지에서 직접 희석될 수 있음을 가능케하였다. 수란우에 직접 이식 후 61%의 수태율이 얻어졌다. 이 후에 Voelkel과 Hu(1992)는 ethylene glycol을 이용하여 소 수정란을 동결-융해 후 직접이식한 결과 50%의 수태율을 보고하였다. ethylene glycol과 propylene glycol에 대한 면양과 소 수정란의 투과성이 glycerol에 비해 컸으며(Szell, 1989), 이것은 이러한 동해방지제들이 직접이식절차에 유용하게 이용될 수 있음을 제시하는 것이었다. 그러나 소 체외수정란에 이용되는 여러 종류의 동해방지제에 대한 연구의 보고는 드문 상태이다. 따라서 본 실험은 동결 소 체외수정란으로부터 동해방지제의 제거에 의해 야기되는 문제점을 경감시키거나 배제시키기 위하여 실시되었다.

본 연구의 목적은 1) $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 또는 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 적정 냉각속도를 결정, 2) 동결 소 체외수정란을 위한 EG, MC, DEG 그리고 PG 등의 동해방지제의 적정농도를 구명, 3) 여러 종류의 동해방지제로서 수정란을 동결-융해 후 보존배지에서 직접 희석에 의한 수정란의 손상정도의 구명, 4) 동결-융해한 소 수정란을 동해방지제의 제거 없이 비외과적 이식하여 수태율을 비교하는데 있다.

재료 및 방법

수정란

도축 난소를 이용하여 난포란을 채취하였으며, 치밀 난구세포로 둘러싸인 난자만을 선별하여 100ml당 glucose 55mg, Na-pyruvate 10mg, 7.5% NaOH 1.3ml 및 insulin 0.5mg이 첨가된 m-TCM 199을 이용 38.5°C , 5% CO_2 배양조건으로 20-22시간 배양하였다(10, 11). 배지에는 이전의 시험결과로 판정된 양질의 수정란을 생산한 과배란처리 공간우로부터 7일에 회수된 5% superovulated cow serum(SCS)이 역시 첨가되었다(Matsuoka, 1992; Suzuki, 1985 & 1985). 동결-융해한 정자는 5mM caffeine과 10mg/ml heparin이 첨가된 BO media(Brackett, 1975)에서 2회 원심세척 후 38.5°C , 5% CO_2 배양조건으로 5시간 배양시켰다(Parrish, 1985; Niwa, 1988). 수정된 난자들은 5% SCS와 insulin(0.5mg/ml)이 첨가된 TCM 199에서 8일간 배양되었다. 배양 후 8일에 40%의 배반포 수정란을 얻었으며 실험을 위하여 양질의 배반포 수정란만을 이용하였다.

수정란 동결

동해방지제 용액은 3mg/ml(V/W) bovine serum albumin(BSA; fraction V; sigma, St. Louis, Mo, USA)를 첨가한 modified-PBS(mPBS)를 이용하여 제조하였다. 수정란을 실온(25℃)에서 여러 종류의 동해방지제 용액에 노출시켰으며, 10-20분의 평형 후 수정란을 0.25ml plastic straw에 장전하였다. 스트로를 즉시 cooling chamber(NTB-211, Tokyo-rikakikai, Tokyo, Japan)에 넣고 2분간 정체 후 0℃에서 -6℃까지 -1℃/분으로 냉각하고, 식빙 및 10분간 정체한 후 -0.3℃/분 또는 -0.5℃/분으로 -30℃까지로 냉각하였다. 이 때 스트로를 액체질소에 침지 후 보관하였다.

체외 생존성 판정

액체질소에 2-3주 보관한 뒤, 스트로를 액체질소통에서 꺼내어 5초동안 공기중에 노출 후 30초간 30℃ 항온수조에서 융해하고 스트로 내용물을 5% SCS가 첨가된 TCM 199에 넣어서 수회 세척하였다. 수정란을 파라핀 오일이 덮여진 5% SCS, 5µg/ml insulin 및 난구세포가 첨가된 TCM 199에 옮겼다. 모든 배양은 5% CO₂ 38℃의 배양기(Sanyo, Tokyo, Japan)에서 실시하였다. 배양 24시간과 48시간 후에 생존하는 배반포 및 탈출 배반포의 수를 기록하였다. 수정란이 양호한 형태를 보이며 나중의 발육단계로 발육시 생존한 것으로 간주하였다.

실험 1

배반포를 3mg/ml(V/W) BSA, 10% SCS 및 항생제가 첨가된 1.8M ethylene glycol(EG) PBS에 직접 침지하고 식빙 후 -0.3℃/분 또는 -0.5℃/분으로 냉각하여 적정 냉각속도를 결정하였다.

실험 2

동해방지제 methyl cellosolve(MC), diethylene glycol(DEG) 그리고 ethylene glycol(EG)의 적정농도를 결정하기 위하여, 배반포를 3mg/ml BSA, 10% SCS 및 항생제가 첨가된 PBS의 1.0M, 1.3M, 1.5M MC, 0.8M, 1.1M, 1.2M DEG 그리고 1.5M, 1.8M, 2.1M EG의 3가지 농도의 용액에 직접 침지하였다.

실험 3

동결-융해 후 보존배지에서 직접 희석에 의하여 수정란에 가해진 손상 정도를 측정하기 위해서 배반포를 3mg/ml BSA, 10% SCS 및 항생제가 첨가된 PBS의 1.3M MC, 1.1M DEG, 1.8M EG, 1.6M PG 또는 1.1M 1,3-butylene glycol(BG) 용액에 각각 직접 침지하였다.

실험 4

10-20개의 체외수정란을 각각 10% SCS와 항생제가 첨가된 PBS의 1.3M MC, 1.1M DEG, 1.8M EG 또는 1.6M PG 용액에 직접 부유시켰다. 10분간 평형 후, 각 수정란을 0.25ml plastic straw에 장전하여 동결하였다. 액체질소에 15-30일 보관 후 스트로를 공기중에 5초동안 노출시킨 뒤 30°C의 온수에서 용해하였다. 발정이 동기화된 수란우에 동해방지제의 제거없이 비외과적으로 이식하였으며 이 실험에서 모든 동결 및 용해절차는 3명의 기술자에 의해 실시되었다. 수정란이식 후 30일과 60일에 초음파진단장치에 의해 임신여부를 확인하였다.

통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 chi-square test를 이용하였다.

결 과

실험 1

배반포를 1.8M EG에 부유 후 -0.3°C/분 및 -0.5°C/분으로 냉각하여 동결 및 용해 후의 체외 생존 결과는 Table 1에서와 같다. -0.3°C/분과 -0.5°C/분의 냉각속도에 따른 생존율은 유의적인 차이가 인정되지 않았으나($P < 0.05$), 탈출배반포 발달율은 -0.3°C/분(64.4%, 31/48)으로 냉각시가 -0.5°C/분(22.6%, 12/53)으로 냉각시에 비해 유의적으로 높았다($P < 0.01$).

Table 1. Comparison of developmental rates of frozen-thawed IVF embryos cooled at -0.3°C or -0.5°C/minute in ethylene glycol

Cooling Rate	No. Cultured	No. Surviving(%)	Developmental Stage(%)		
			Hatched blastocyst	Expanding blastocyst	Blstocyst
0.3°C/minute	48	46(95.8)	31(64.6) ^a	6(12.5) ^a	9(18.8) ^a
0.5°C/minute	53	48(90.6)	2(22.6) ^b	13(24.5) ^b	23(43.4) ^b

^{a, b} Means with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.01$).

Table 2. Comparison of developmental rates of frozen-thawed IVF embryos in the various cryoprotectants

Concentration of cryoprotectants	No. Cultured	No. Surviving(%)	No. of hatched blastocysts(%)
1.0M methyl cellosolve	15	13(87)	4(27) ^b
1.3M methyl cellosolve	23	22(96)	12(55) ^a
1.5M methyl cellosolve	10	10(100)	4(40) ^a
0.8M diethylene glycol	14	9(64)	4(29) ^b
1.1M diethylene glycol	18	15(83)	9(60) ^a
1.2M diethylene glycol	16	13(81)	5(31) ^b
1.5M ethylene glycol	14	10(70)	6(43) ^a
1.8M ethylene glycol	16	14(88)	9(56) ^a
2.1M ethylene glycol	14	9(64)	5(36) ^b

^{a, b} Means with different superscripts are significantly different($P < 0.05$).

실험 2

동해방지제의 농도별 탈출배반포 발달율에 있어서는 1.8M EG(56.0%), 1.3M MC(55.0%) 또는 1.1M DEG(60.0%)에서 좋은 성적을 보여주었다(Table 2).

실험 3

Table 3에서 보는 바와 같이, 동해방지제로서 MC, DEG, PG 또는 EG을 이용하여 수정란을 동결 후 융해하여 보존배지에서 직접 희석 후의 생존율은 유의적인 차이가 인정되지 않았다(92.8%, 64/69; 92.2%, 47/51 ; 86%, 43/50; 89.8%, 79/88). 이상의 동해방지제들은 BG(65.4%)를 이용하여 동결시킨 것에 비해서는 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다($P < 0.05$). 탈출배반포 발달율에 있어서도 MC, DEG, PG 또는 EG(53.6%, 37/69; 56.9%, 29/51; 58.0%, 29/50; 50.0%, 44/88)간에 역시 유의적인 차이가 없었으며, BG(11.5%)에서 가장 낮은 결과를 나타내었다($P < 0.05$).

Table 3. Comparison of survival rates of frozen-thawed

Cryoprotectants	No. Cultured	No. Surviving(%)	No. of hatched Blastocysts(%)
1.3M methyl cellosolve	69	64(92.8) ^a	7(53) ^c
1.1M diethylene glycol	51	47(92.2) ^a	29(56.9) ^c
1.8M ethylene glycol	88	79(89.8) ^a	44(50.0) ^c
1.6M propylene glycol	50	43(86.0) ^a	29(58.0) ^c
1.1M butylene glycol	52	34(65.4) ^b	6(11.5) ^d

a, b, c, d Values within columns with different superscripts are significantly different (P<0.05); (P<0.01).

실험 4

여러 종류의 동해방지제로서 동결시킨 수정란을 이식한 결과 수태율(Table 4)은 MC 48%(10/21), DEG 30%(3/10), EG 74%(20/27) 및 PG 40%(4/10)를 나타내었다.

Table 4. Pregnancy rates after nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos that were suspended in 4 different cryoprotectants

Cryoprotectants	No. of recipients transferred	No. of pregnancies(%)
1.3M methyl cellosolve	21	10(48) ^a
1.1M diethylene glycol	10	3(30) ^a
1.8M ethylene glycol	27	20(74) ^b
1.6M propylene glycol	10	4(40) ^a

a, b Values within columns with different superscripts are significantly different(P<0.05).

고 찰

수정란을 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 또는 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 으로 냉각시킨 결과 생존율에서는 유의적인 차이가 없었으나 탈출배반포 발달율은 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 으로 냉각시가 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 에 비해 높았다. 이러한 결과는 식빙온도, 냉각속도 및 최종 냉각온도와 같은 동결방법의 조정이 동해방지제로서 1.8M ethylene glycol을 이용하여 최적의 조건을 조성할 수 있음을 제시한다. 1.3M methyl cellosolve, 1.1M ethylene glycol, 1.6M propylene glycol 및 1.8M ethylene glycol을 이용하여 동결시킨 수정란이 보존배지에서의 직접 희석과정을 견딜 수 있었으며, 이러한 동해방지제 사이에 생존율에는 유의적인 차이가 없었다. 이것은 소 수정란이 이러한 동해방지제에 대한 고도의 투과성에 일부 기인될 수 있는 것으로 보인다. Szell 등(1989)은 소 수정란은 glycerol에 비해 ethylene glycol에 보다 투과성이 크다는 것을 보여주었다. Renard 등(1981)은 소 수정란의 동결보존을 위하여 sucrose가 첨가된 2.0M propylene glycol을 효과적으로 이용하였으며, 또한 Hernabdez-Iedezma(1981)도 마우스 수정란의 동결을 위해서 이용하였다. 그러나 murine embryos의 생존성은 propylene glycol보다 ethylene glycol을 이용하여 동결시가 높았다(Miyamoto, 1988). 다른 연구자들의 경우 소 수정란의 동결 및 직접 희석을 위해 propylene glycol을 성공적으로 사용할 수 없었는지에 대한 원인에 대해서는 명확하지 않다(Suzuki, 1990). Voelkel과 Hu(1992)의 연구에서는 propylene glycol이 1.5M의 농도로 사용되었으며 -7°C 에서 식빙 후, $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 으로 -35°C 까지 냉각하였다고 하였다. 이러한 동결방법의 차이로 인해 실험결과에서 차이가 나타난 것으로 보인다. 포유동물의 수정란을 위한 동해방지제로서 methyl cellosolve와 diethylene glycol을 이용한 성적은 아직 접해보지 못하였다. 0.25ml 스트로의 중간 부분에 동해방지제와 함께 수정란을 넣고 스트로의 양 끝부분에 보존배지를 넣어 동결시켰으며, 융해 후 수란우에 직접이식한 결과 1.8M ethylene glycol(74%, 20/27)로 동결시킨 수정란의 수태율이 1.3M methyl cellosolve(48%, 10/21), 1.1M diethylene glycol(30%, 3/10) 및 1.6M propylene glycol(40%, 4/10)을 이용하여 동결시킨 수정란에 비해 유의적으로 높았다($P < 0.05$). 따라서 소 수정란의 직접이식을 위한 동해방지제로서 1.8M ethylene glycol이 가장 효과적이었다. 이러한 결과는 1.8M ethylene glycol이 수정란의 동결보존중 독성효과를 감소시킬 수 있음을 보여준다. ethylene glycol은 수란우의 생식기관에서 수분의 재흡수가 일어나는 직접이식기술에 매우 효과적으로 이용될 수 있다. 이전의 직접이식기술을 개발하는 노력은 글리세롤에 대한 소 수정란의 비교적 낮은 투과성을 피하는데 초점이 맞추어졌다. 본 연구에서 나타난 결과로 보아 소 수정란에 매우 투과성이 높은 동해방지제를 밝혀내는 것이 직접이식법 개발을 위한 또 하나의 가치있는 전략임이 명백하다. 이점에 관해서는 ethylene cellosolve와 diethylene glycol이 역시 매우 유력한 것으로 보인다. 그러나 낮은 농도의 sucrose와 propylene glycol을 이용하여 동결-융해 소 수정란으로부터 이식가능 수정란이 생산되었다(Suzuki, 1992). 이러한 사실은 비록 매우 투과성이 높은 동해방지제가 이용되더라도 낮은 농도의 sucrose 또는 trehalose가 동결수정란의 보호를 위하여 필요하다는 것을 제시한다. 그러므로 이러한 기술의 보완 및 연구가 확실한 직접이식체계를 구축하는데 필요할 것이다.