

## Mouse 胚의 Glass 化 保存

權五龍 · 河野友宏 · 中原達夫

東京農業大學總合研究所

### Cryopreservation of Mouse Embryos by Vitrification

Kwon., O.Y., T.Kono, and T.Nakahara

NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture

#### SUMMARY

Eight-cell mouse embryos equilibrated with vitrification solution(VS3), consisting of glycerol and polyethylene glycol, were plunged directly into liquid nitrogen. The embryos were cryopreserved by vitrification without intra- and extracellular ice formation.

After the vitrified embryos were warmed at 4°C, sucrose dilution procedures were examined and the survival embryos were transferred to recipients after 48 h incubation *in vitro*.

The results were obtained as follows.

1. Mouse embryos equilibrated with VS 3 were diluted with 1.5 M sucrose-HB 1 solution, 0.5 M sucrose-HB 1 solution for 5 min at room temperature, respectively. The proportion of vitrified-warmed embryos developed to blastocyst(85.7%) was as high as that of the embryos diluted with 1.04 M sucrose-HB 1 solution at 4°C(85.5%).
2. Normal live youngs were obtained in 53.9%(55/102) of the vitrified-warmed embryos after transfer to pseudopregnant recipients.

#### I. 緒 論

Whittingham(1972)과 Wilmut(1972)는 耐凍劑로 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 glycerol 을 사용하여 -196°C 및 -269°C 에서 생쥐胚를 凍結 保存하여 融解胚로부터 産仔를 얻는데에 成功하였다.

그들에 의해서 생쥐胚의 凍結 保存의 可能性이 시사된 이래, 融解胚의 生存性的 향상 및 그 操作技術의 간략화를 위해 많은 研究가 進行되어 短期間에 눈부신 進歩를 보였다.

Rall 과 Fahy(1985)는 冷却速度를 현저히 빠르게 할 경우, 常壓下에서 glass 化 하는 溶液(vitrification solution 1, VS 1 液)을 개발하여 생쥐 初期胚의 glass 化 保存을 처음으로 성공하였다.

그 후 河野·角田(1987)는 VS 1 液을 사용하여 1 細胞期로부터 胚盤胞까지의 생쥐의 初期胚를 glass 化 保存하여 融解後 良好한 生存性を 얻음과 함께 移植實驗의 결과 全 發生段階의 glass 化 保存胚로부터 産仔를 얻었다고 報告하고 있다.

최근, Rall(1987)은 glycerol 과 polyethylene glycol(PEG)로 구성된 低毒性的 VS 3 液을 개발하여 VS 1 液과 마찬가지로 생쥐의 8 細胞期胚의 glass 化 保存에 유효하다고 報告하고 있다.

本 實驗은 VS 3 液을 사용하여 생쥐의 8 細胞期胚를 glass 化 保存하고 融解後의 稀釋法에 대한 檢討와 移植實驗에 의한 glass 化 保存胚의 産仔의 發生率을 調査하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 供試胚

8~10 주령, 체중 26~30 g의 CD-1系成熟한 암컷 생쥐에 5 IU의 PMSG(Peames, 三共臓器(株), 日本)와 hCG(同社)를 48時間 간격으로 腹腔內에 注射하여 多排卵을 誘起시킨 후 hCG 注射後, 즉시 同系統의 수컷 생쥐와 合房시켰다. hCG를 腹腔內에 注射한 後 64~66時間째에 頸椎脫臼法으로 생쥐를 도살한 다음 M2液(Fluton and Whittingham, 1978)을 사용하여 卵管에 灌流시켜 8細胞期胚를 採取하여 本 實驗에 供試하였다. Glass化 保存液(VS3) 및 HB1液은 Rall(1987)의 方法에 準하여 調整하였다(Table 1.).

### 2. Glass化 保存法

供試胚는 우선 室温下에서 25% VS3液으로 옮겨서 10분간 浸漬시킨 후, 4°C로 冷却되어 있는 培養用 dish(Falcon,  $\phi$  35 mm)中の 50% VS3液에 옮겨서 10분간 浸漬시켰다. 계속해서 4°C로 냉각된 0.25 ml Plastic straw 中の 40  $\mu$ l의 100% VS3液에 옮긴 후 10분간 保存한 뒤에 직접 液體窒素(LN<sub>2</sub>)中에 넣어 glass化 保存하였다.

Glass化 保存胚는 1~10日間 液體窒素中에 保存하였다(Fig. 1.A).

### 3. 融解 및 稀釋法

Glass化 保存胚의 融解는 液體窒素로부터 꺼낸 straw를 즉시 4°C의 얼음물 中에 20~30초간 넣어 실시하였다.

Glass化 保存液의 稀釋은 다음의 세 가지 方法으로 실시하여 比較 檢討하였다.

A法: 融解胚는 즉시 4°C의 1.04 M sucrose-HB1液으로 옮겨 5분간 浸漬하였다. 계속해서 室温下의 1.04 M sucrose-HB1液에 옮겨 5분간 浸漬한 후 HB1液으로 수회 洗淨하였다.

B法: 室温下의 1.04 M sucrose-HB1液에 5분간 浸漬시킨 후, 0.5 M sucrose-HB1液에 5분간 浸漬하여 HB1液으로 數回 洗淨하였다.

C法: 室温下에서 1.5 M sucrose-HB1液에 5분간 浸漬후, 0.5 M sucrose-HB1液으로 옮겨 數回 洗淨하였다(Fig 1.B).

### 4. 培養

Glass化 保存·融解한 생쥐 8細胞期胚는 M16(Whittingham, 1971)과 paraffin oil(BDH)이 들어있는  $\phi$  35 mm의 培養用 dish에 옮겨, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 및 90% N<sub>2</sub>의 炭酸가스 培養器內에서 48시간 培養하여 胚盤胞 또는 膨大胚盤胞의 發生率을 調査하였다.

### 5. 移植

精管結紮 수컷 생쥐(CD-1系)와 교배시커 Plug가 확인된 同계통의 암컷 생쥐를 사용하여 胚盤胞로 發生한 胚를 偽妊娠 3일째의 암컷 생쥐의 子宮外 科의 方法으로 移植하여 産仔率을 調査하였다.

### 6. 統計處理

融解後, 胚의 正常率 및 發生率은 X<sup>2</sup>檢定法에 의해 有意差의 檢定을 실시하였다.(Table 1.)

Table 1. Composition of Hepes-Buffered Saline in VS3 and HB1 solutions.

Component	Final concentration(mM)	
	VS3	HB1 <sup>a)</sup>
NaCl	136.9	136.9
KCl	2.68	2.68
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.88	1.0
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.25	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.07	0.9
Glucose	5.56	5.56
Hepes	20.0	20.0
Na pruvate	—	0.33
BSA	0.75 mg/ml	3.0 mg/ml
Phenol red	0.01%	0.01%
Penicillin G	—	100 IU/ml
Glycerol	6.5 M	—
Polyethylene glycol (8000 MW)	6.0 M	—

<sup>a</sup> pH=7.2.

## III. 結果

8細胞期胚를 VS3液內에 浸漬하면 1~2分內에

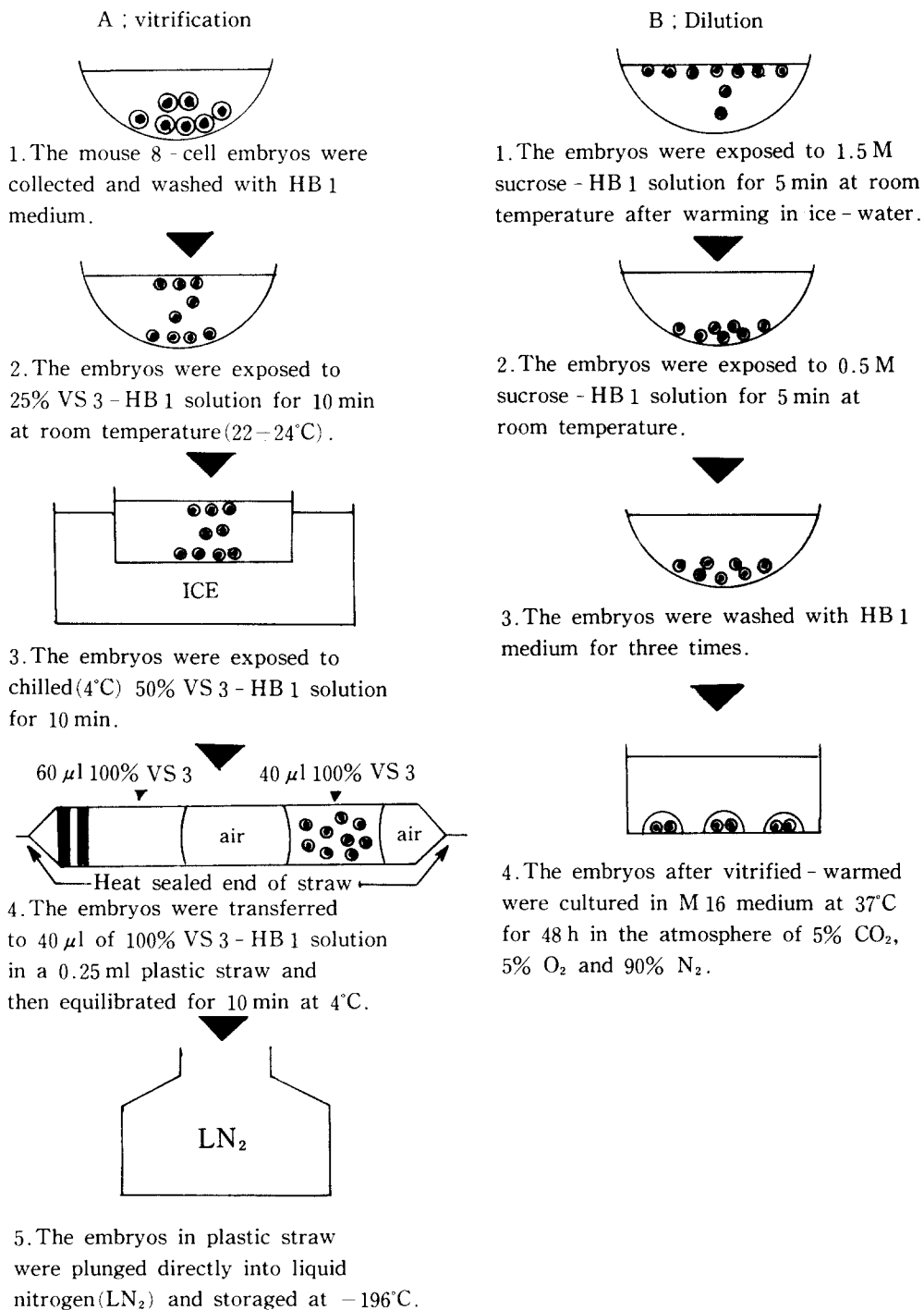


Fig. 1. Vitrification and dilution procedure of mouse embryos.

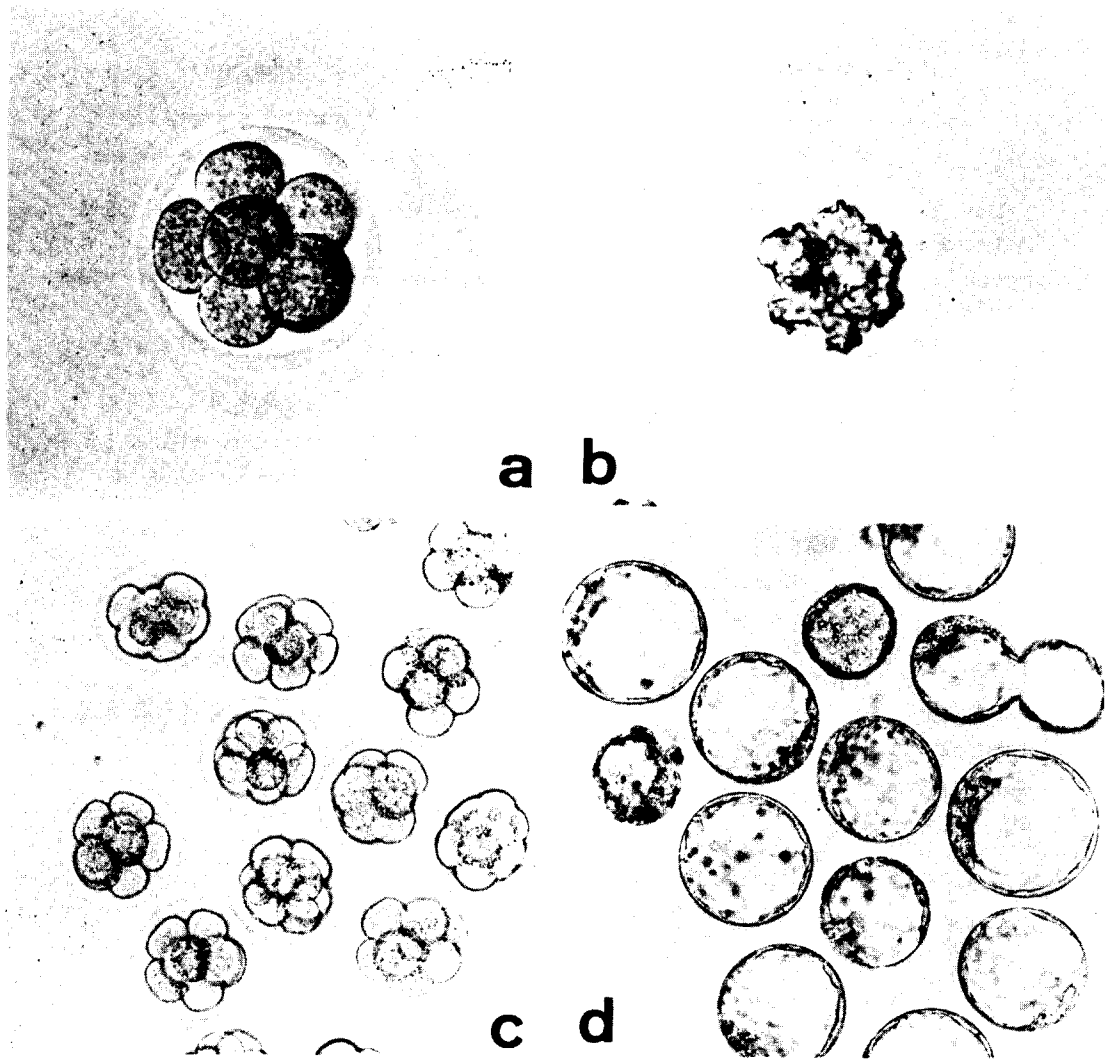


Fig. 2. a ; Freshly obtained mouse 8-cell embryo.  
 b ; Fully shrunken mouse 8-cell embryo in 100% VS 3 solution.  
 c ; Vitrified-warmed mouse 8-cell embryos after dilution.  
 d ; Expanded blastocysts developed from vitrified-warmed mouse 8-cell embryos  
 48 h after incubation *in vitro*.

細胞質이 收縮되는 것을 볼 수 있으나(Fig 2. b) 약 10 분 후에는 25% 및 50% VS 3 兩液 모두 正常卵과 비교하여 각각 80% 및 70%로 細胞質이 다시 膨大하여 glass化 保護物質이 充分히 細胞質內로 浸透되고 있음이 確認되었다.

Glass化 保存된 생쥐 8細胞期胚의 融解後에 正常率 및 培養成績은 Table 2 에 표시하였다.

Rall(1987)의 方法에 準한 A 法으로 sucrose 稀釋

을 실시한 경우 融解後 回收胚의 87.1%(54/62)가 正常的인 形態를 나타내었고, 또한 體外培養에 의해 85.5%(53/62)가 胚盤胞로 發生하였다.

B 法 및 C 法에서는 融解後의 回收胚의 正常率은 각각 64.4%(38/59)와 85.7%(54/63)이었다. 이러한 値는 A 法과 비교하여 有意差는 인정되지 않았다. (P=0.3~0.2)

한편, 移植成績은 Table 3 과 같다.

Table 2. Effect of sucrose dilution on development of vitrified-warmed mouse 8-cell embryos.

Dilution procedure	No. of embryos tested	No. of morphologically normal embryos (%)	No. of embryos developed to exp. blastocyst after culture (%)
A : 1.04 M → 1.04 M	62	54 (87.1)	53 (85.5)
B : 1.04 M → 0.5 M	59	38 (64.4)	38 (64.4)
C : 1.50 M → 0.5 M	63	55 (87.3)	54 (85.7)

Table 3. *In vivo* development of vitrified-warmed mouse 8-cell embryos.

Dilution procedure	No. of embryos tested	No. of embryos transferred	No. of pregnant/recipients	No. of live young (%)
A : 1.04 M → 1.04 M	62	40	4/4	19 (47.5)
B : 1.04 M → 0.5 M	59	29	3/3	17 (58.6)
C : 1.50 M → 0.5 M	63	33	3/3	19 (57.6)

\* The vitrified-warmed embryos developed to blastocysts were transferred to Day 3 pseudopregnant recipients.

A 法으로 sucrose 稀釋을 실시하여 培養後 胚盤胞 또는 膨大胚盤胞로 發生한 것 중에서 40 胚를 4 마리의 recipient 에 移植한 결과, 4 마리가 妊娠하여 19 마리(47.5%)의 産仔를 얻었다.

또한 B 法 및 C 法에서는 29 胚 및 33 胚를 각각 3 마리의 recipient 에 移植하여 전부 妊娠하였고, B 法에서는 17 마리(58.6%) 및 C 法에서는 19 마리(57.6%)의 産仔를 얻을 수 있었다.

#### IV. 考 察

Rall(1985)에 의해서 개발된 VS 1 液은 常壓의 條件下에서 쉽게 glass 化 狀態로 固體化되어 세포內外의 氷晶形成을 막고 胚가 받는 障害를 回避할 수 있는 점으로부터 생쥐 初期胚의 glass 化 保存을 가능하게 하였다.

河野·角田(1987)은 VS 1 液을 사용하여 1 細胞期부터 胚盤胞까지의 생쥐 初期胚를 glass 化 保存하여

줄 發生段階로부터 産仔를 얻을 수 있었으나, 8 細胞期胚에서 가장 높은 發生率을 나타내었다고 報告하고 있다. 또한 Kono 等(1988)은 흰쥐의 胚盤胞期胚를 VS 1 液으로 glass 化 保存하여 融解後 79%의 正常率을 얻었고 稀釋에 의해서 41%의 産仔를 얻는데에 成功하여 glass 化 保存이 생쥐와 흰쥐 初期 發生胚에 있어서 有效하다고 報告하고 있다.

그러나 VS 1 液은 胚에 대한 毒性이 비교적 강하여 생쥐 8 細胞期를 100% VS 1 液에 30 分간 浸漬시키면 胚는 전부 死滅한다(Rall and Fahy, 1985).

최근 Rall(1987)은 glycerol 과 PEG 로부터 만들어진 毒性이 약한 glass 化液(VS 3)을 개발하여 양호한 성적을 얻었다. VS 3 液의 경우 생쥐의 8 細胞期胚를 100% VS 3 液에 1 시간 浸漬하여도 80%는 胚盤胞로 발생하였다고 報告하고 있다(Rall, 1987). 또한, 25% VS 3 液에 1 시간 浸漬하여도 90%는 胚盤胞로 발생한다(未發表).

그러나 VS 1 液과 같이 胚에 대한 毒性을 약화시키기 위하여 平衡 및 稀釋時에는 冷却操作을 必要로

하고 있다. 그러므로 本實驗에서는 融解後의 稀釋을 室温下에서 실시하기 위하여 sucrose 에 의한 稀釋法에 關하여 檢討하였다.

그 결과 C法(1.5 M sucrose - HB 1 液  $\Rightarrow$  0.5 M sucrose - HB 1 液  $\Rightarrow$  HB 1 液)으로 稀釋하였을 경우 가장 좋은 성적을 얻을 수 있었고 87.3%의 胚가 正常인 形態를 유지하였고 85.7%의 胚가 胚盤胞까지 發生하였다. 한편 그것들을 移植한 결과 57.6%의 産仔를 얻을 수 있었다.

B法(1.04 M sucrose - HB 1 液  $\Rightarrow$  0.5 M sucrose - HB 1 液  $\Rightarrow$  HB 1 液)에서도 64.4%의 正常率을 얻을 수 있었고 形態가 양호한 것은 모두 胚盤胞로 發生하였으며, 移植後에는 58.6%의 産仔를 얻을 수 있었다.

이러한 결과로부터 室温下에서의 glass化 物質의 稀釋이 가능하게 되었고 生存性이 유지되면서 그 操作이 簡便화 되었다. 또한, VS 3 液은 VS 1 液과 같이 생쥐 初期胚의 glass化 保存에 有効한 사실이 밝혀졌다.

한편 glass化 保存·融解後 培養에 의해서 發育한 147 胚 中에서 102 胚를 10 마리의 recipient 에 이식하여 10 마리 全部가 妊娠하였고, 73 마리(53.9%)의 正常的인 産仔를 얻을 수 있었으며, 이러한 성적은 本實驗에 있어서 glass化 保存·融解胚는 産仔로 的 發生能力을 충분히 갖고 있음이 확인되었다.

또, glass化 保存 생쥐胚의 産仔로 的 發生能力은 Whittingham(1972)이 DMSO 를 사용하여 凍結保存한 생쥐 8 細胞期胚에서 54%의 産仔를 얻은 성적과 거의 같아 만족할 수 있는 値였다.

Kasai 等(1980)은 DMSO 를 사용하여 凍結保存한 생쥐胚를 融解後 凍結保護物質의 除去에 sucrose 가 有効하다고 報告한 이래, sucrose 를 사용한 稀釋法이 넓게 사용되고 있다(Merry 等, 1983; Suzuki 等, 1986; Széll 等, 1986).

한편 Massip 等(1986)는 소의 桑實期胚와 胚盤胞를 10% glycerol 과 20% 1,2 propandiol 으로 구성된 glass化 保存液을 사용하여 glass化 保存後 sucrose 로 稀釋을 실시하여 각각 42.8% 와 53.8%의 生存胚를 얻었다.

또한 Schffen 等(1986)도 같은 방법으로 생쥐 桑實期胚와 胚盤胞를 glass化 保存後 각각 80% 와 40%의 生存胚를 얻었다고 報告하고 있다.

한편 2 M glycerol - 0.5 M sucrose 의 稀釋으로

VS 1 液으로 glass化 保存된 胚盤胞의 生存性이 현저하게 向上하는 것이 알려져 있다(河野·角田, 1987).

본 실험에서도 VS 3 液으로 glass化 保存한 생쥐 初期胚의 경우에서도 sucrose 에 의한 稀釋이 有効하다는 사실이 밝혀졌다.

今後 더욱 簡便한 glass化 保存法 및 融解法의 開發을 위해 研究가 進展할 것으로 생각된다.

## V. 摘要

생쥐 8 細胞期胚를 glycerol 과 polyethylene glycol 로 구성된 glass化 保存液으로 平衡시킨 후 직접 LN<sub>2</sub>에 投入하여 保存하였다.

胚의 保存에 있어서 glass化 保護物質의 사용으로 細胞質內外의 氷晶形成을 막을 수 있었다.

Glass化 保存한 胚는 4°C의 氷水中에서 融解後 sucrose 를 사용하여 稀釋하였고 48 시간 體外培養에 의해 胚盤胞로 發生한 胚는 僞妊娠 암컷 생쥐의 子宮에 移植하였다.

結果는 다음과 같다.

1. VS 3 液으로 平衡시킨 생쥐胚를 融解後 室温下에서 1.5 M sucrose - HB 1 液, 0.5 M sucrose - HB 1 液에 각각 5 분간 稀釋하였을 때 胚盤胞로 85.7%의 發生率을 보였고, 이 稀釋法은 4°C에서 1.04 M sucrose - HB 1 液으로 稀釋한 경우의 胚盤胞로 的 發生率(85.5%)보다 약간 높은 성적을 얻을 수 있었다.
2. Glass化 保存·融解한 胚는 稀釋後 胚盤胞로 發生한 胚를 僞妊娠 암컷 생쥐에 移植한 결과, 53.9%(55/102)의 正常的인 産仔를 얻었다.

## VI. 引用文獻

1. Kasai, M., Niwa, K., and Iritani, A. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert. 59: 51-56.
2. Kono, T., Suzuki, O. and Tsunoda, Y. 1988. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. Cryobiology. 25: 170-173.
3. Massip, A., Van der Zwalm, P., Scheffen, B. and Ectors, F. 1986. Pregnancies follow

- transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo - Letters*. 7 : 270-273.
4. Merry, D.A., Allen, R.L., Krag, K. and Wright, R.W. 1983. Sucrose dilution of frozen mouse embryos : Interaction of glycerol and sucrose concentrations. *Theriogenology*. 20 : 325-332.
  5. Quinn, P., Barros, C. and Whittingham, D. G. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Report. Fertil.* 66 : 161-168.
  6. Rall, W.F. and Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature*. 313 : 573-575.
  7. Rall, W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*. 24 : 387-402.
  8. Scheffen, B., Van der Zwahlen, P. and Massip, A. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo - Letters*. 7 : 260-269.
  9. Suzuki, T. and Shimohira, I. 1986. Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose : A preliminary report. *Theriogenology*. 26 : 333-339.
  10. Széll, A. and Shelton, N. 1986. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.* 76 : 401-408.
  11. Whittingham, D.G. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 14 : 7-21.
  12. Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science*. 178 : 411-414.
  13. Wilmut, I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sciences*. 11 : 1071-1079.
  14. 河野 友宏, 角田 辛生. 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実験. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33 : 77-81.