

생쥐난자의 초급속동결

박영식 · 서태광* · 이택후** · 전상식**

경북대학교 농과대학

Ultrarapid Freezing of Mouse Ova

Y. S. Park, T. K. Suh*, T. H. Lee** and S. S. Jeoun**

College of Agriculture, Kyungbuk National University

SUMMARY

This study was carried out to efficiently use the ultrarapid freezing method in the cryopreservation of mouse ova. For this, the effects of dehydration method, oval vigour and 0°C controlling method on post-thawing viability were investigated.

Fresh mouse ova were dehydrated in mPBS with 3.5M DMSO and /or 0.25M sucrose, and directly immersed in LN₂ for ultrarapidly freezing. The frozen ova were thawed at 37°C, rehydrated in mPBS with 0.25M sucrose, and then repeatedly washed in HAM's F10 before evaluating the morphological normality of frozen-thawed ova.

The results obtained showed that there was difference between treatments in a experiment. 1) The post-thawing viability of ova dehydrated in multi-step (48.4±13.8%) was higher than that of ova in two-step (40.9±14.0%). 2) The post-thawing viability of fertilized ova (87±14.0%) was significantly(p<0.01) higher than that of unfertilized ova (5.4±5.4%). 3) The post-thawing viability of ova dehydrated and rehydrated using a cooling machine (95.8±4.2%) was significantly(p<0.05) higher than that on ice(84.1±9.9).

In conclusion, in order to efficiently cryopreserve ova *in vitro* with ultrarapidly freezing method, highly viable embryos should be selected, heavy osmotic shock to the dehydrating ova should be avoided, and embryos in high osmotic condition were dehydrated and rehydrated in a constantly low temperature.

(Key wards: ultrarapid freezing, ova, embryo, mouse)

서론

난할전 1세포기 수정란은 용적이 적은 세포에 비해서 동결후 생존율과 발생율이 낮은 것으로 알려져 있으나, 유사한 동결조건을 가지고 있는 미수정

란(oocyte)의 동결처리방법을 개발하거나 불임시술후 버리게 되는 여분의 초기수정란을 효율적으로 동결보존하기 위하여, 최근 난할전 수정란의 동결보존에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

수정란의 동결방법은 동결시 세포유해온도역을 통과하는 속도에 따라 완만, 급속 또는 초급속동결

* 이기영산부인과(ART center, Lee Kyeeyoung OB/GY)

** 경북대학교 의과대학(College of Medicine, Kyungbuk National University)

본 연구는 1994년 경북대학교병원 의학연구소 연구비 지원으로 수행되었음.

법으로 구분할 수 있다. 대체로 완만동결의 경우 융해후 수정란의 생존율과 발생율이 높지만(Van den Abbeel 등, 1994; Tesarik 등, 1989; Siebzehnruebl 등, 1989), 일정한 속도로 냉각시킬 수 있는 특별한 장비가 요구되고 동결처리시간이 오래 걸린다는 실용상의 단점을 내재하고 있다. 이러한 완만동결의 단점을 보완하면서 융해후 수정란의 생존율을 높이기 위한 방법으로 초급속동결방법이 Trounson 등(1987)에 의해 처음 소개된 이래, 초급속동결한 난자에서 높은 생존율과 발생율이 보고되었다(Shaw 등, 1991; Wilson과 Quinn, 1989). 초급속동결법은 회수한 난자를 고농도의 동해방지제가 첨가된 용액에서 충분히 탈수한 다음, 직접 액체질소에 침적하여 동결하는 방법으로 시술이 간편하고 시간이 적게 소요되는 잇점을 가지고 있다. 그러나 이 방법은 고농도 동해방지제와 급격한 온도의 변화에 난자가 노출됨으로써 동결후 난자의 생존성이 저하되는 문제를 내재하고 있다. 따라서 본 실험에서는 시술이 간편한 초급속동결법을 난자의 동결보존에 효율적으로 이용하기 위하여, 이의 효율성에 영향을 주는 여러 인자 중에서 동결처리시 난자의 탈수방법, 난자의 수정 여부, 탈수 및 복수시 저온 조절방법이 생쥐난자의 동결융해 후 생존성에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 배양액

난자를 회수, 세척하거나 동결용액을 제조하기 위하여 4mg/ml의 BSA가 함유된 mPBS를 준비하였다. mPBS는 136.9mM NaCl, 2.68mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.76mM KH₂PO₄, 0.9mM CaCl₂ 및 0.49mM MgSO₄ · 7H₂O를 함유하고 있다.

동결전 난자의 세포질내 수분을 제거하기 위하여 pH 7.0의 mPBS에 0.0625M(0.0625S) 또는 0.125M(0.125S) sucrose를 첨가하거나, 3.5M DMSO(3.5D) 또는 0.25M sucrose와 3.5M DMSO(0.25S3.5D)를 첨가하여 탈수용액들을 준비하였다.

동결융해후 난자의 복수를 위하여 pH 8.0의 mPBS에 0.25M sucrose(0.25S)를 첨가하여 복수용액을 준비하였다. 한편 0.25S로부터 회수한 난자

를 반복 세척하기 위하여 HAM's F10을 준비하였다.

2. 실험방법

생쥐 난자를 회수하기 위하여 5주 이상 성숙한 ICR 암컷의 복강에 PMSG 7IU를 주사하고 48시간 후에 HCG 5IU를 주사한 다음 수컷과 합사하여 교미를 유도하였다. HCG 주사후 24±4 시간에 난관팽대부·협부접속부 또는 난관협부 상단에서 난자를 회수하였다. 회수한 난자는 hyarulonidase로 난구세포를 제거한 다음 mPBS로 반복세척하여 실험에 이용하였다. 한 실험에 이용되는 난자의 수는 짧은 동결처리시간 때문에 3±1개로 제한하였다.

난자는 상온에서 sucrose용액에 1차 탈수한 다음 0℃에서 sucrose와 DMSO가 첨가된 용액에서 2차 탈수하였다.

탈수한 난자는 동결직전 스트로에 충전하는데, 스트로의 면실봉부위로부터 50μl의 0.25S3.5D, 동일 용적의 공기층, 난자가 함유된 50μl의 0.25S3.5D 및 동일 용적의 공기층의 순서로 스트로를 배열하고 나머지 부분을 0.25S3.5D로 채운 다음 스트로과 우더로 밀봉하였다.

밀봉한 스트로를 -196℃의 액체질소에 직접 침적하여 난자를 초급속동결하였다. 동결난자를 융해하기 위하여 스트로를 액체질소로부터 끄집어내어 공기중에서 5초간 정치한 다음 37℃의 항온수조에서 6~7초간 가온하여 스트로의 내용물을 완전히 융해하였다.

융해후 난자가 함유된 스트로분질의 내용물 50μl를 동량의 0.25S에 천천히 이동시켜 30초간 정치한 다음, 신선한 0℃의 0.25S용액으로 옮겨 30초간 정치하여 2회에 걸쳐 2차 및 3차 복수를 유도하였다. 난자의 완전회복을 위하여 실온의 HAM's F10에 이동하여 반복 세척(×6)한 다음 난자의 생존성을 판정하였다.

3. 실험설계

1) 실험 1: 난자의 탈수단계의 효과

난자는 탈수시 고삼투압환경에 노출되는데, 삼투충격을 상대적으로 심하게 받을 것으로 예상되는 2

단계방법과 다소 삼투충격을 완화할 것으로 예상되는 다단계방법을 비교하여 삼투충격이 초급속동결 후 난자의 생존성에 미치는 효과를 조사하고자 하였다.

2단계(Two-step)방법에서는 세척한 난자를 실온의 0.125S에서 1분 30초간 1차 탈수를 유도한 다음 얼음위(0℃) 0.25S3.5D에서 2분 30초간 정치하여 2차 탈수를 유도하였다. 한편 다단계(multi-step)방법에서는 난자를 0.0625S와 0.125S에 각각 30초와 1분간 1차 탈수한 다음 얼음위(0℃) 3.5D와 0.25S3.5D에서 각각 1분과 1분 30초간 정치하여 2차 탈수를 유도하였다.

2) 실험 2: 난자 수정의 효과

공시되는 난자의 활력이 초급속동결후 내동성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 HCG 주사 24시간 후에 회수한 수정란과 미수정란을 비교실험하였다. 회수시 상대적으로 생존 활력이 높을 것으로 예상되는 수정란은 1개 또는 2개의 극체와 2개의 전핵이 뚜렷하게 있으며, 수정을 확인할 수 있는 개체에서 회수된 난자로 한정하였다.

3) 실험 3: 난자의 탈수 및 복수시 저온유지 방법의 효과

탈수나 복수시 삼투충격을 최소화하기 위하여 저온에서 난자를 동결처리한다. 일반적으로 저온을 유지하기 위하여 얼음을 이용하는데, 얼음은 동결처리시간이 길어지면 주변온도에 의해 녹게 되어 일정한 온도를 유지하기 어렵다. 한편 냉각장치를 이용할 경우 일정한 저온을 유지할 수 있다. 높은 삼투압용액에서의 온도변화가 난자의 내동성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 탈수와 복수시 저온유지방법으로 얼음과 냉각장치를 비교 실험하였다.

4. 난자의 평가와 분석

복수후 반복 세척한 난자를 200배율의 도립현미경에서 주로 난막의 정상 유무와 세포질의 균등성에 기준하여 평가하였는데, 특히 동결전의 형태를 유지하는지에 초점을 맞추어 생존성을 평가하였다. 얻어진 실험의 결과는 분산분석(ANOVA)에 의해 통계처리하여 처리간 유의성을 검정하였다.

결 과

초급속동결난자의 생존성은 동결전 탈수방법에 의해 영향을 받게 되는데 결과는 Table 1과 같다. Two-step(2단계) 탈수방법으로 처리한 52개의 난자 중에서 20개가 초급속동결 후 정상적인 형태를 유지하였으며, 처리의 평균은 40.9%였고 표준오차는 $\pm 14.0\%$ 였다. 한편, Multi-step(다단계) 탈수방법에 의해 처리한 51개의 난자 중에서 25개가 용해후 정상형태를 유지하였으며, 처리의 평균은 48.4%였고 표준오차는 $\pm 13.8\%$ 였다.

탈수방법을 비교하였을 때, 다단계로 탈수한 난자에서 다소 높은 생존율을 얻었으나 처리간에 유의한 차이는 없었다. 한편 표준오차에서 제시된 바와 같이 반복처리간의 변이가 크게 나타났다.

난자의 질이 초급속동결후 생존성에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 초급속동결한 미수정란 63개중에서 4개만이 용해후 생존하였으며, 처리평균은 5.4% 였다. 한편 수정란의 경우 61개중 53개가 용해후 형태적으로 정상이었으며, 처리평균은 87%였고, 표준오차는 $\pm 14.0\%$ 였다. 초급속동결된 수정란

Table 1. Effect of the dehydration method on viability of ultra-rapidly frozen ova

Method* of dehydration	No. of ova used	No. of ova survived after frozen(%)	Mean \pm S.E. (%)
Two-step	52	20 (38.5)	40.9 \pm 14.0
Multi-step	51	25 (49.2)	48.4 \pm 13.8

* not significantly different

Table 2. Effect of ovum quality on viability of ultra-rapidly frozen ova

Ovum quality*	No. of ova used	No. of ova survived after frozen(%)	Mean \pm S.E. (%)
Unfert.	63	4 (6.3)	5.4 \pm 5.4
Fert.	61	53 (86.9)	87.0 \pm 14.0

* significantly different at $p < 0.01$

Unfert. : unfertilized ova 24 after HCG injection

Fert. : fertilized ova 24 after HCG injection

Table 3. Effect of 0°C control method for the embryo dehydration and rehydration on viability of ultra-rapidly frozen embryos

0°C control method*	No. of ova used	No. of ova survived after frozen (%)	Mean ± S.E. (%)
On ice	21	18 (85.7)	84.1 ± 9.9
With cooling machine	24	23 (98.3)	95.8 ± 4.2

* significantly different at $p < 0.05$

은 미수정란에 비해 유의하게 높은 생존성을 보였으나 ($p < 0.01$), 반복처리간의 변이가 크게 나타났다.

초급속동결후 난자의 생존성에 대한 탈수 및 복수 시 0°C 조절방법을 달리하였을 때 얻어진 결과는 Table 3과 같다. 환경온도의 영향으로 온도가 다소 불안정한 얼음위에서 탈수와 복수 처리한 난자 21개중 18개가 융해후 생존하였으며, 처리평균은 84.1% 였고 표준오차는 $\pm 9.9\%$ 였다. 한편 일정한 온도를 유지하도록 고안된 냉각장치를 이용하여 처리한 난자 24개중에서 23개가 융해후 정상형태를 유지하였으며, 처리평균은 95.8% 였고 표준오차는 $\pm 4.2\%$ 였다. 냉각장치를 이용하여 처리한 난자의 경우 얼음위에서 처리한 난자에 비하여 초급속동결후 높은 생존성을 보였으며, 또한 반복처리간 변이가 적었다.

고 찰

융해후 난자의 생존성을 높이기 위해서는 초급속 동결을 하기 전에 세포내 수분을 충분히 제거하여야 한다. 세포내 수분이 남아 있을 경우 급속한 동결속도 때문에 세포내에 빙정이 형성되어 융해후 세포의 생존에 심각한 손상을 주게 된다. 본 실험에서는 세포내 수분을 제거하기 위하여 고농도의 동해방지제 0.25M sucrose와 3.5M DMSO를 첨가한 용액에서 난자를 탈수시켰다. 이와 같이 높은 삼투용액에 난자가 노출되면 탈수는 용이하게 일어나지만 난자의 생존성이 저하될 수 있다. 특히 갑작스런 삼투환경의 변화는 난자에게 악영향을 끼칠 것으로 사료되어 실험 1에서 탈수시 난자를 동결용액에 노출시키는 방법 - 2단계 또는 다단계 처리 - 을 비교하였던

바, 여러 단계에 걸쳐 순차적으로 높은 삼투환경에 노출시키는 것이 융해후 난자의 생존성을 높일 수 있으며, 따라서 초급속동결시 삼투충격이 난자의 생존성을 저해할 수 있다는 결론을 얻었다. 한편 실험 1에서 융해후 낮은 생존율과 동일 처리내 반복간 차이가 크게 얻어진 것은 HCG주사 24시간 후에 회수된 난자를 무작위로 이용하였기 때문인 것으로 사료된다.

동결후 난자의 생존성(Fahning과 Garcia, 1992; Mandelbaum 등, 1988; Van den Abbeel 등, 1988), 발생능(Van den Abbeel, 1994)과 임신율(Schalkoff 등, 1993)은 동결전 난자의 질과 밀접한 관련이 있다. 실험 2에서 미수정란과 수정란의 내동성을 비교하였던 바, 융해후 수정란에서 유의하게 높은 생존율을 얻을 수 있었다. 이는 동결전 형태가 정상인 난자라고 하더라도 수정되지 않고 퇴행중인 난자는 초급속동결처리에서 심각한 손상을 입는 것으로 사료된다. 한편 초급속동결후 수정란의 생존율은 높게 얻어졌으나 반복처리간 차이가 크게 나타났다.

초급속동결에서 고농도의 삼투환경에 노출되는 난자의 경우 상대적으로 낮은 삼투압을 띄게 되고 따라서 외부로부터 동해방지제의 침투와 외부로의 수분의 배출이 일어나게 되는데, 난막의 투과성은 주변환경온도에 의해 영향을 받는다. Wilson과 Quinn(1989)은 난자를 상온에서 탈수하고 초급속 동결하여 71%의 생존율을 얻었으나, 난자의 탈수 온도를 비교한 Shaw 등(1991)은 1세포기 수정란을 0°C에서 탈수하여 실온에서보다 융해후 높은 발생율을 얻었다고 보고하였다. 고농도의 동해방지제를 이용하는 초급속동결의 경우 융해후 난자의 생존율을 높이기 위하여 낮은 온도에서 난자를 처리하게 되는데, 낮은 온도를 유지하기 위하여 주로 얼음을 이용하고 있다. 얼음을 이용하는 경우 동결처리과정에서 주변의 높은 온도에 의하여 얼음이 녹게 되며, 이때 난자는 주변온도의 변화에 노출되고 따라서 고삼투환경에서 쉽게 손상을 받을 수 있다. 실험 1과 2 및 실험 3에서 얼음위에서 난자를 탈수하고 복수하였을 때 융해후 난자의 생존율은 반복처리간에 차이가 크게 나타났다. 한편 일정하게 0°C를 유지할 수 있는 냉각장치를 이용하여 탈수와 복수처

리를 하였던 바 융해후 난자의 생존율이 높았을 뿐만 아니라, 반복처리간 생존율의 차이도 적게 나타났다. 이러한 결과로 미루어 저온환경을 유지하기 위하여 얼음을 이용하는 경우 난자 주변의 온도 변화가 예상되며, 이러한 온도의 변화가 고농도 동해 방지제를 이용하는 초급속동결에서 난자의 생존성에 악영향을 미친다고 사료된다.

결론적으로 초급속동결방법을 이용하여 난자를 체외에서 효율적으로 보존하기 위해서는 생존활력이 높은 난자를 선별하여 이용하며 동결처리과정에서 삼투충격을 적게 받도록 하여야 한다. 또한 고농도의 삼투환경에 난자가 노출되었을 때, 일정하게 낮은 온도를 유지하도록 하여야 한다.

적 요

본 연구는 난자의 동결보존에 초급속동결법을 효율적으로 이용하기 위하여, 이의 효율성에 영향을 주는 여러 요인 중에서 난자의 탈수방법, 난자의 생존활력, 및 저온조절방법이 동결융해후 난자의 생존성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 실시하였다.

생쥐난자를 3.5M DMSO와 0.25M sucrose가 함유된 mPBS에서 탈수한 다음 액체질소에 직접 침적하여 초급속동결하였다. 이어 동결된 난자를 37℃에서 융해하여 0.25M의 sucrose가 함유되어 있는 mPBS에서 복수시킨 다음, HAM's F10에 반복 세척하여 형태의 정상성을 조사하였다.

초급속동결난자의 생존성은 동결전 탈수방법, 난자의 질, 및 탈수와 복수시 0℃ 조절방법에 따라서 차이가 있었다.

- 1) 다단계로 탈수한 난자의 융해후 생존율은 $48.4 \pm 13.8\%$ 로서 2단계 탈수한 난자의 생존율 $40.9 \pm 14.0\%$ 보다 높았다.
- 2) 수정란의 융해후 생존율은 $87.0 \pm 14.0\%$ 로서 미수정란의 융해후 생존율 $5.4 \pm 5.4\%$ 보다 유의하게 높았다($p < 0.01$).
- 3) 냉각장치를 이용하여 탈수와 복수처리한 난자의 융해후 생존율은 $95.8 \pm 4.2\%$ 로서 얼음위에서 처리한 난자의 $84.1 \pm 9.9\%$ 보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

결론적으로 초급속동결방법을 이용하여 난자를 체외에서 효율적으로 보존하기 위해서는 생존활력이 높은 난자를 선별하고 탈수하는 동안 삼투충격을 적게 받도록 하며, 고삼투환경에 있을 때 온도를 일정하게 유지하여야 한다.

참고문헌

- Fahning ML and Garcia MA. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*, 29:1-18.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Tibi T, Cohen J, Debache C and Tesquier L. 1988. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Human Reprod.*, 3:117-119.
- Schalkoff ME, Oskowitz SP and Powers RD. 1993. A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo cryopreservation program. *Fertil. Steril.*, 59:1070-1074.
- Shaw JM, Diotallevi L and Trounson AO. 1991. A simple rapid 4.5M dimethyl-sulfoxide freezing technique for the cryopreservation of one-cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 3:621-626.
- Siebzehnuebl ER, Todorow S, Van Uem J, Kock R, Wildt L and Lang N. 1989. Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol. *Human Reprod.*, 4:312-317.
- Tesarik J, Hanzelka Z and Travník P. 1989. Developmental capacity of human embryos after cryopreservation in the unicellular zygote stage. *Cesk. Gynekol.*, 54:740-747.
- Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48:843-850.

- Trounson AO and Wood C. 1993. IVF and related technology. The present and the future. *Med. J. Aust.*, 158:853-857.
- Van den Abbeel E, Van den Elst J and Van Steirteghem AC. 1994. The effect of temperature at which slow cooling is terminated and of thawing rate on the survival of one cell mouse embryos frozen in dimethyl sulfoxide or 1,2-propanediol solutions. *Cryobiology*, 31:423-33.
- Van den Abbeel E, Van der Elst J, Van Waesbergh L, Camus M, Devroey P, Khan P, Smitz J, Staessen C, Wisanto A and Van Steirteghem A. 1988. Hyperstimulation: the need for cryopreservation of embryos. *Human Repod. Suppl.*, 2:53-57.
- Wilson L and Quinn P. 1989. Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. *Human Reprod.*, 4:86-90.