

인간 포배기 배아의 냉동보존과 그 생존율 및 임상결과에 관한 연구

마리아 산부인과

조현진, 윤산현, 윤혜균, 윤혜진,
허용수, 이석원,
마충철, 박세필, 이원돈, 임진호

본 연구는 체외수정과 체외배양으로 획득된 인간의 포배기 배아를 냉동보존하였다가 정상주기의 자궁에 이식하므로써 생존율, 착상률 및 임신률을 조사하기 위하여 실시하였다.

과배란주기로부터 채취된 난자를 YS배양액 (glucose free)에 20% hFF(v/v)를 첨가하고 정자와 함께 배양하면서 체외수정을 유도하였다. 포배기 배아의 발생을 유도하기 위하여 수정된 난자를 20% hFF가 첨가된 YS배양액에서 cumulus cell layer와 48시간동안 공동배양하였으며 8-16 세포기 부터는 배아를 20% hFF와 1mM glutamine이 첨가된 YS 배양액에서 cumulus cell layer와 48-72 시간동안 공동배양하였다. 난자채취 5일째에 최상의 quality를 지닌 포배기 배아를 최대 3개까지 이식하고, 잉여 포배기 배아(≥ early expanding blastocysts; non-expanding blastocysts는 24시간 동안 추가배양한 후)는 20% hFF와 0.55M glycerol 이 첨가된 D-PBS용액에 10분간 침지시켰다가 20% hFF, 1M glycerol 및 0.2M sucrose가 첨가된 D-PBS 용액에 10분간 침지시킨 후 자동세포 동결기(Planner, Cryo-10 series III)에 의한 완전냉각방법(-7℃까지 -2℃/min, -38℃까지 -0.3℃/min, -196℃ LN₂)으로 동결하였다. 포배기 배아의 용해는 20% hFF가 첨가된 D-PBS용액에 glycerol과 sucrose를 각각 0.55M과 0.4M, 0.44M과 0.2M, 0.33M과 0.2M, 0.22M과 0.2M, 0.11M과 0.2M, 0.00M과 0.2M로 첨가하고 차례로 각각 5분, 6분, 7분, 7분, 6분, 2분씩 노출시켜 rehydration 과정을 거치면서 실시하였다(Menezo 등, 1992). 포배기 배아의 생존여부는 20% hFF와 1mM glutamine이 첨가된 YS배양액에서 약 18시간동안 배양한 후 blastocoel이 건강하게 형성되는 것으로 판정하였

고 있다.

본 연구는 생쥐를 이용하여 전핵이 처음 형성되어 2세포기로 분열하기 직전까지 상태가 다른 전핵시기를 동결 및 해빙하여 그 생존율과 발생율을 비교함으로써 동결에 가장 적합한 전핵배아의 시기를 알아보려고 시행하였다.

생쥐 제 1대잡종 (C57BL ♀ × CBA ♂)으로 과배란 유도된 생후 6-8주 암컷과 생후 12주된 생식력이 확인된 숫컷을 이용하여 체외수정과정을 통해 전핵배아를 획득하였다. 수정 6시간 후 전핵이 확인된 배아를 골라 이들을 계속 배양하면서 수정 후 전핵이 처음 보이기 시작하는 6시간, 두개의 전핵이 뚜렷하면서 세포질의 양끝에 멀리 떨어져 있는 9시간, 두개의 전핵이 뚜렷하면서 근접한 12시간, 두개의 전핵이 융합하는 15시간에 각각 동결을 시행하였다. 배아의 동결은 PROH와 sucrose를 이용한 완만동결법으로 시행하였으며 용해는 급속해빙으로써 3단계의 용해액을 이용하여 시행하였다.

본 연구의 결과는 다음과 같다.

1. 수정 후 6시간, 9시간, 12시간, 15시간에 동결을 시행하여 용해하였을 때 회수율은 모두 100%를 나타냈고 생존율은 각각 95.36%, 88.73%, 75.17%, 62.42%로 나타났다.
 2. 생존된 배아를 24시간동안 배양하였을 때 2세포기까지의 발생율은 대조군이 100%, 6시간은 93.75%, 9시간은 97.62%, 12시간은 88.07%이고 15시간은 98.98%로 나타났다.
 3. 생존된 배아를 48시간동안 배양하였을 때 4세포기까지의 발생율은 대조군이 99.30%, 6시간은 61.11%, 9시간은 76.98%, 12시간은 66.97%이고 15시간은 79.59%이었다.
 4. 생존된 배아 중 배양 96시간에 포배기로 발생한 비율은 대조군이 95.77%, 6시간은 43.75%, 9시간은 73.01%, 12시간은 70.04%이고 15시간은 90.82%였으며 48시간 더 배양했을 때 완전히 탈각한 배아율은 각각 61.27%, 25.69%, 43.05%, 42.20%, 60.20%로 나타났다.
- 이상의 결과 생쥐전핵배아의 동결보존시기는 생존율과 발생율을 비교하여 볼때 전핵이 처음형성되어 보이기 시작하는시기 (수정 후 6시간)와 전핵이 소실되어 2세포기로 분열하기 직전의 시기 (수정 후 15시간)보다는 뚜렷한 두개의 전핵이 보이면서 이동하는 시기 (수정 후 9시간, 12시간)가 유용할 것으로 사료된다.

다. 1995년 8월부터 1996년 7월까지 과배란 당주기에서 실시한 포배기 배아이식과 냉동보존 후 생존한 포배기 배아이식의 결과를 비교·조사하였던바 그 결과는 다음과 같다.

Table. Outcomes of blastocyst transfer(conventional ET, cryo-preservation, thawing ET)

	Conventional ET	Cryo preservation	Thawing ET
No. of cycles	977	426	63
No. of 2 PN	9379	-	-
No. of blastocysts	5439	1587	292
No. of transfer cycles	977		60
No.(%) of survived embryos	-		201 (68.8)
No. of transferred embryos	2295		164
Implantation rates			
no.(%) of G-sac	684 (29.8)		28 (17.1)
no.(%) of FHB(+)	554 (24.1)		21 (12.8)
No.(%) of clinical preg./ET	483 (49.4)		24 (40.0)
No.(%) of OG preg./ET	403 (41.2)		18 (30.0)
no.(%) of single	275 (68.2)		15 (83.3)
no.(%) of twin	105 (26.1)		3 (16.7)
no.(%) of triple	23 (5.7)		0 (0.0)

이상의 결과로 미루어 보아 포배기 배아의 냉동보존법은 과배란 당주기에서 실시한 포배기 배아이식의 임상결과에는 다소 미치지 못하지만 누적임신률(cumulative ongoing pregnancy; 약 4-5%의 증진)에 양호한 영향을 줄 수 있으므로 임상적용과 냉동-융해 연구에 큰 의의가 있다고 사료된다.

- 11 -

일반적인 체외수정 방법과 세포질내 정자주입술로 얻어진 배아의 동결-융해 후 이식의 결과

삼성제일병원 불임연구소, 산부인과 불임클리닉¹

김정옥, 한미현, 전진현, 변혜경, 임천규, 백은찬¹, 궁미경¹, 손일표¹, 이호준, 강인수¹

최근 세포질내 정자주입술을 이용하여 기존의 체외수정 방법으로는 수정이 어려웠던 환자들에게서도 만족할 만한 수정률을 얻을 수 있게 되었고, 이에 따라 많은 수의 수정란을 얻을 수 있게 되었다. 따라서 이러한 잉여 수정란의 동결보존이 많이 행해졌으며, 동결-융해 후의 결과도 많이 보고되었다. 본 연구는 1994년 5월부터 1996년 3월까지 일반적인 체외수정 방법과 ICSI 방법을 시행한 후, 잉여의 수정란을 동결보존한 환자들 중 1995년 1월부터 1996년 4월까지 동결수정란 이식을 시행한 155 주기를 대상으로 배아융해 후 이식의 결과를 알아보기 위해 수행하였다.

1. ICSI 방법으로 얻어진 전핵 시기, 2-8 세포기 그리고 전핵 시기와 2-8 세포기 배아의 융해 후 생존율은 각각 63.5%, 65.1%, 47.6% 였으며, 일반적인 체외수정 방법으로 얻어진 배아의 융해 후 생존율은 전핵 시기의 배아가 57.0%, 2-8 세포기 배아가 54.0%, 전핵 시기와 2-8 세포기 배아를 함께 한 경우가 29.5%였다.

2. ICSI 방법으로 얻어진 배아를 동결-융해한 후 이식한 63 주기 중 15 주기에서 임신에 성공하여 23.8%의 임신율을 얻었고, 체외수정 방법으로 얻어진 배아의 동결-융해 후 이식의 결과는 84 주기중 20 주기에서 임신에 성공하여 21.3%의 임신율을 얻었다.

3. 일반적인 체외수정 방법과 ICSI 방법으로 얻어진 전핵 시기의 배아만을 동결-융해 후 생존율은 각각 57.0%와 63.5%로 ICSI 방법으로 얻어진 배아의 생존율이 다소 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 융해 후 생존한 배아가 2 세포기 이상으로 발생한 경우는 ICSI 방법의 경우가 60.3%로 일반적인 체외수정의 52.0%보다 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 높았다. 또한 이들 배아의 발생양상을 보면, 양질의 배아로 발생된 배아의 비율도 ICSI의 경우 63.6%로 일반적인 체외수정의 52.6%보다 유의하게 ($p < 0.05$) 높아 ICSI 방법으로 얻어진 전핵 시기의 배아가 융해 후에 보다 좋은 발생양상을 보임을 알 수 있었다.

결론적으로 ICSI 방법으로 얻어진 배아도 발생 시기에 관계없이 성공적으로 동결보존할 수 있으며 기존의 체외수정 방법으로 얻어진 배아의 생존율과 임신율에서 큰 차이가 없다는 것을 알 수 있었다. 특히 전핵 시기 배아의 경우 ICSI 방법으로 얻어진 배아의 융해 후 발생률이 일반적인 체외수정 방법으로 얻어진 배아의 경우 보다 높은 것은