Cryopreservation of Oocytes and Ovarian Tissues in IVF

포천중문 의과대학 해부학교실

정 형 민

I. 서 론

1978년 최초의 시험관 아기의 출생보고 이래 생식의학은 지난 20여년 동안 비약적인 발전을 거듭하여 왔다. 생식의학 기법이 오늘날의 발전이 있도록 한 이유로는 여러 가지를 말할 수 있겠으나 크게 난소자극을 용이하게 할 수 있는 다양한 호르몬제와 투여방법의 개발, 남성불임을 획기적으로 극복할 수 있었던 미세수정 및 미세조작 기술의 개발 그리고 잉여의 수정란을 냉동보관 하였다가 추후에 이용할 수 있도록 하는 동결보존기술의 개발이라고 말할 수 있다. 특히 수정란 동결보존기술은 한번 채취하는 난자의 이용효율을 극대화 시킬 수 있는 방법으로서 1983년 Trounson과 Mohr에 의해 임신성공이 보고되었으나 분만은 Zeilmaker 등 (1984)에 의해 보고되었다. 수정란 동결보존은 그 동안 대다수의 불임치료센터에서 효과적인 생식보조기법으로서 이용되고 있고 수정란의 발생단계나 상태에 따라 다양한 동결보존방법이 개발되어 있다. 그러나 수정란의 동결보존은 생식의학의 발전에 많은 공헌을 하고 있음에도 불구하고 개발초기부터 인간 생명세포의 시초인 수정란을 동결-융해함으로서 발생되는 세포의 사멸이나 손상이 곧 인간살상행위와 같다는 윤리적 법적 문제점을 내재하고 있어 실제 유럽의 몇몇 국가에서는 법률적으로 수정란의 동결보존을 금지하거나 제한적으로 허용하고 있는 실정이다. 이러한 수정란 동결보존의 윤리적 법적인 문제점을 해결할 수 있는 대안으로 난자의 동결보존이 제시되었다 (Friedler 등, 1988, Madelbaum 등, 1988, 1998). 난자는 정자와 마찬가지로 반수체의 생식세포인 관계로 수정란의 동결보존에 대한 여러 문제점을 상당부분 해결할 수 있다. 따라서 난자의 동결보존에 관한 연구도 일찍부터 연구되어 1986년 Chen이 DMSO (Dimetylsulfoxide)를 동결보호제로 사용하여 임신과 분만의 성공하였고 이어 Al-Hasani 등 (1986, 1987)과 Uem (1987)에 의해 임신 사례가 보고되었다. 그러나 인간난자의 동결보존에 관한 연구는 수정란의 동결보존과는 임상적인 응용기술로 개발되지 못하고 현재까지 몇몇 사례만이 보고되고 있을 뿐이다. 이러한 이유로는 난자의 동결보존이 수정란의 동결보존에 비해 기술적으로 매우 어렵고 동결-융해후 생존난자의 경우 염색체와 세포소기관의 이상 비율의 증가 등으로 임상적 응용이 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 최근 Tucker등 (1996)과 Porcu 등 (1997, 1999)은 인간난자의 동결보존에 의한 임신과 분만성공을 보고함으로서 이 분야에 관한 새로운 가능성을 제시하였다.

한편, 난소조직의 동결보존은 1994년 Gosden 등이 면양의 난소조직을 동결보존 하였다가 동일 개체에 다시 이식하여 산자의 출생을 보고한 이래 생식의학에 있어서 조기폐경이나 생식능력의 소실이 예상되는 여성의 생식능력의 복원이라는 점에서 각광받기 시작했다. 그동안 여러 연구자들에 의해 난소의 표층조직의 분리, 원시난포의 분리와 배양, 동결보존기술의 확

립, 동종이식 또는 이종이식에 따른 원시난포의 성장과 성선 혹은 생식호르몬의 분비 등과 같은 다양한 기초연구가 이루어져 오고 있다. 특히 최근에는 인간 난소조직을 동결-융해하여 이를 체외배양하거나 이식하여 난포의 성장과 호르몬의 생산 등과 같은 기초적인 연구가 이루어지고 있어 머지 않아 이 분야의 연구가 실제 환자들에게 적용할 수 있을 것으로 예상된다.

이에 저자는 지금까지의 난자와 난소조직의 동결보존에 관련된 연구내용과 기술적인 방법을 고찰하고 최근 저자 등이 새롭게 개발된 유리화 동결보존기술의 결과를 소개함으로서 인간 난자/난소은행의 설립 가능성을 살펴보기로 한다.

II. 난자의 동결보존

1. 난자동결보존의 임상적 의의

난자의 동결보존이 성공적으로 행해질 수 있다면 다양한 임상적응용이 가능해진다. 첫째, ART program 시행 중에 난소과자극 증후군 (Ovarian hyperstimulation syndrome: OHSS)의 발생이 우려되거나 자궁내막 (endometrium)의 증식이 원활하지 못한 경우 난자의 동결보존은 추후에 임신의 시도방법으로서 이용될 수 있다. 또한 불가피한 사정으로 정자의 채취가 불가능하거나 채취되는 정자의 수가 너무 적어 수정에 이용될 수 있는 정자수가 제한 받을 경우에도 난자동결은 효과적으로 이용가능하게 되어 ART program의 적용상 유연성을 높일 수 있게 된다. 둘째, 정자은행 (sperm bank)과 마찬가지로 난자은행 (ovum bank)의 설치가 가능하게 되어 난자공여 프로그램 (ovum donation program)시 공여자와 수용자의 자궁내막의 동기화 (endometrium synchronization)가 필요 없게 되며 나아가 타인에게 보다 쉽게 공여가 가능해진다. 셋째, 백혈병 등과 같은 암으로 인해 화학요법치료 (chemotherapy)난 방사선치료 (radiotherapy) 등으로 인해 자신의 생식능력을 소실할 가능성이 높은 환자에게 치료전 난자나 난소조직의 동결보존은 완치 후에 자신의 생식세포를 이용한 임신이 가능해질 수 있게 된다. 또한 조기폐경의 위험이 있는 환자의 경우에도 이 방법은 효과적으로 이용가능하다. 넷째, 여성의 사회활동 등으로 인해 현재 임신을 추후로 연기한 여성에게 또는 현재 배우자가 없는 여성에게 난자의 동결보존은 노령으로 인한 수태율의 감소와 유전이상아의 출생을 방지할 수 있는 수단으로서 이용가능하게 되어 새로운 가족계획 방법으로 이용가능해 진다. 다섯째, 서두에서 언급한 바와 같이 수정란의 동결보존에 따른 윤리적, 법적인 문제점을 상당부분 해결할 수 있는 대안이 될 수 있다. 마지막으로 임상적인 면에서 뿐만 아니라 동물생명공학 분야에서도 희귀동물이나 멸종동물 또는 고부가가치를 갖는 동물의 종족보존수단으로 뿐만 아니라 유전자 보존이라는 점에 그 의의는 매우 크다고 하겠다 (Cha, 1997, Ludwig 등, 1999).

2. 인간난자 동결보존 연구동향

초기의 난자동결에 관한 연구는 기본적으로 인간 수정란을 포함하는 포유동물 수정란 동결보존 방법을 이용하였으며 난자는 기본적으로 ART program에서 채취되는 성숙단계의 난자가 주된 연구대상이었다. 초기의 일련의 연구에서 난자의 동결-융해시 수정란과는 달리 생존율이 매우 저조하고 세포유전학적으로 방추사 (meiotic spindle)의 이상, 염색체의 이수현상 (chromosomal aneuploidy)의 증가, 투명대의 경화 (zona hardening) 및 세포발생의 정지나 지연 (developmental retardation) 등이 매우 높은 것으로 보고되었다. 이러한 근본적인 이유는 난자는 인체를

구성하는 세포 중에서 가장 큰 세포 중 하나이고 구조적으로도 매우 불안정한 구조를 갖고 있어 동결-융해시 많은 손상을 입게 된다고 생각되었다. 일반적으로 동결과정에서 세포의 손상을 초래하는 주된 원인은 세포내 빙결정의 형성 (intracellular ice crystal formation)에 의한 세포파괴이다 (Mazur, 1990). 현재 수정란의 동결에 이용되고 있는 완만동결법 (slow freezing)을 이용하여 동결하게 되면 약 -7℃ 정도에서 과냉각 (supercooling) 현상과 빙결정의 형성이 일어나게 되는데 이때 결정화 에너지 (crystallization energy)가 만들어져서 과냉각된 세포의 온도가 다시 상승하는 현상이 초래되는데 이때 세포소기관의 손상이 발생한다. 이러한 현상을 최소화하기 위해 -7℃ 정도에서 세포외 빙결정 (extracellular ice formation)을 위해 식빙 (seeding)을 실시하게 되는데 식빙으로 인해 만들어지는 세포외 빙결정은 수분을 제거하게 되어 결과적으로 세포외 전해질의 농도를 상승하게 한다. 결과적으로 세포내의 수분은 삼투압작용에 의해 세포 밖으로 빠져나가게 되는 탈수과정 (dehydration)을 거치게 된다. 이러한 일련의 동결과정에서 만약 동결속도가 너무 빠르거나 혹은 그 반대의 경우가 발생하게 되면 탈수현상이 완벽히 이루어지지 못하게 되고 결국 세포에 치명적인 세포내 빙결정 형성이 이루어져 세포는 결국 사멸하게 된다. 따라서 난자의 동결보존을 연구하는 학자들은 이러한 기본원리에 입각하여 동결방법, 동결속도, 동결보호제의 선택 및 융해방법에 대한 다양한 연구를 시도하고 있으며 최근에는 빙핵형성이 일어나지 않는 초급속 동결법 등이 연구되어 지고 있다.

1) 미성숙 난자의 동결보존

미성숙 난자의 동결보존은 성숙난자에 비해 비교적 세포 구조적으로 안정적이라는 가설 하에서 연구되어져 왔다. 즉, 미성숙 난자는 성숙난자에 비해 동결-융해과정에서 손상 받기 쉬운 방추사가 존재하지 않는 안전한 구조를 갖고 있으며 (Santhananthan 등, 1988, Pickering 등, 1990, Van der Elst 등, 1988) 또한 난핵포 (germinal vesicle; GV)내에 염색질이 응축되어 있는 관계로 염색체의 손상을 극소화할 수 있다 (Van der Elst 등, 1992, Gook 등, 1992, Van Blerkom과 Davis, 1994). 이러한 이론적 근거에도 불구하고 Park 등 (1997)은 수정란 동결보존에 이용되는 완만동결-급속융해 방법 (slow freezing and rapid thawing method; Lasselle 등, 1985)으로 동결-융해한 결과 융해후 생존율 (40%)이 매우 낮고 생존된 미성숙 난자의 경우 염색체 이상 (78%)과 방추사의 기형 (70%)율이 매우 높게 나타났다고 보고하였다. 또한 Son 등 (1996)은 동결-융해된 인간 미성숙 난자의 체외성숙율 (69%), 수정율 (43%) 및 난할율 (17%)이 신선 미성숙 난자의 결과에 비해 유의적으로 낮은 것으로 보고하여 미성숙 난자의 동결보존의 효율이 매우 낮은 것으로 보고하였다. 현재까지 인간 미성숙 난자의 동결보존에 관한 임상성공은 Tucker 등 (1998)이 난소자극 주기에서 채취된 미성숙 난자를 이용한 단 1례의 보고만 있을 뿐이다. 그들은 28세의 환자로부터 총 61개의 난자를 채취하여 이중 13개의 미성숙 난자와 16개의 성숙난자를 동결보존하였다가 융해한 결과 미성숙 난자 3개만 생존하여 이를 체외성숙하여 얻은 2개의 난자를 ICSI를 이용하여 수정하여 이식하여 아기의 분만에 성공하였다고 사례보고를 하였다. 결과에서 보듯이 동결난자의 생존율이 매우 낮아 (3/29; 10.3%) 이 방법을 임상적으로 적용하기에는 아직 어렵다고 사료된다.

2) 성숙난자의 동결보존

성숙난자를 이용한 동결보존 연구는 이미 언급한 바와 같이 1986년 Chen에 의해 분만성공이 있은 이래 비교적 많은 연구가 진행되어져 왔다. 성숙난자가 미성숙 난자의 동결에 비해 비교적 많은 연구가 이루어진 이유는 우선 일반적인 ART program에서 채취하기가 용이하며

또한 발표자에 따라 미성숙 난자에 비해 성숙난자는 동결-융해시 손상에 대해 저항성을 갖는 미세구조를 갖고 있으며 (Fuku 등, 1995, Gook 등, 1993, 1994), 동결능 (freezability)에 결정적인 영향을 미치는 동결보호제에 대한 세포막 투과성 (membrane permeability)이 미성숙 난자에 비해 양호하고 현재까지의 보고로는 비교적 생존율과 발생능이 높은 것으로 보고되고 있다 (Lim 등, 1992, Al-Hasani 등, 1988). 실제로 지금까지의 난자동결에 관한 임상보고는 Tucker 등 (1998)의 보고를 제외하곤 모두 성숙난자를 이용한 동결보존에 관한 사례이다. 난자동결의 초기연구에서는 동결보호물질로서 주로 DMSO를 이용하였으나 이 물질은 후에 세포독성 (cytotoxity)이 높은 것으로 판명되어 수정란 동결에서도 배제되었고 대신 세포막 침투성이 빠르고 세포독성이 비교적 적은 PROH가 이용되어 지고 있다. 난자동결은 1996년도 Tucker 등과 Porcu 등에 의해 재차 시도되어 임상결과가 보고되었고 Porcu 등 (1999a,b,c)은 ART program에 적극적으로 응용하고 있는 실정이다. 그러나 난자동결에 대한 임상결과는 임신성립 이후에 유산율이 매우 높은 것으로 알려져 있다. 실제 임신환자 중 분만까지 진행된 경우는 50% 미만인 실정이다. 이러한 이유에 대해서는 아직까지 정확한 원인규명이 이루어지지 않았으나 동결-융해된 난자로부터 수정되어 발생된 배반포의 경우 세포의 수가 현저히 감소되며 특히 내부세포괴 (inner cell mass; ICM)의 감소가 특징적으로 관찰된다는 보고가 있다 (Van der Elst 등, 1998, Edwards and Beard, 1997). 이러한 현상은 착상 후의 배아발생에 영향을 줄 수 있는 충분한 사유가 된다고 사료된다. 또 다른 연구로는 동결-융해 난자의 염색체의 이상의 증가이다. 연구자에 따라 염색체 이상의 비율이 증가되지 않는다는 보고 (Gook 등, 1994)도 있지만 염색체의 이수현상 (aneuploidy)이 증가된다는 연구결과는 상당히 신빙성이 있다. 일반적으로 동결-융해 난자의 경우 대부분의 경우 수정방법으로 ICSI가 이용되고 있는데 이는 동결-융해시 투명대의 생화학적 변화 또는 경화현상으로 인한 수정율의 감소를 예방하기 위한 것으로 사료되나 아직까지 이에 관한 구체적인 연구보고는 없는 실정이다.

3. 새로운 난자동결보존법 – 유리화 난자동결보존법

난자의 구조는 정자에 비해서는 부피가 약 50,000배 이상 크고 구조적으로도 감수분열중인 세포이기 때문에 매우 불안정한 세포이다. 따라서 이러한 난자를 효과적으로 동결보존하기 위해서는 그동안 수정란의 동결보존에 이용되어지고 있는 완만동결-급속융해 방법으로는 한계가 있는 것이 사실이다. 따라서 난자를 효과적으로 동결보존하기 위해서는 새로운 개념의 동결보존기술이 필요하다고 하겠다. 이러한 관점에서 개발되어진 방법이 초급속 동결보존법의 일종인 유리화 동결법 (vitrification)이다. 유리화 동결법이란 세포를 빙점 이하 즉, -196℃의 액체질소 (liquid nitrogen; LN_2)에 노출하여도 세포내에 빙결정이 형성되지 않고 gel과 같은 상태를 유지하도록 하는 동결기술이다. 이 방법은 기존의 완만동결법과 비교할 때 매우 단순하고 동결에 소요되는 시간이 매우 적으며 동결과정에서 빙핵형성 (ice crystal formation)이 이루어지지 않아 세포의 손상이 적고 고가의 동결기를 사용하지 않기 때문에 비용을 절감할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 동결의 특성상 고농도의 동결보호제가 처리되기 때문에 삼투압현상으로 세포의 손상을 초래할 수 있다는 단점도 있다. 유리화 동결보존법은 Rall과 Fahy (1985)에 의해 생쥐 수정란을 동결보존하는데 성공한 방법으로서 개발초기에는 고농도의 동결보호제가 갖는 세포독성 등으로 일부의 연구자들에 국한되어 진행되다가 90년대 초부터 가축의 수정란 동결에 이용되어 현재는 동물산업에서는 상당부분 이 방법을 이용하고 있다. 그러나 유리화

동결보존은 고농도의 동결보호제가 함유되어 있는 용액을 사용 (삼투압이 5,000 mOsmol/kg)함으로 매우 짧은 시간 동안에 세포를 동결용액에 노출하고 바로 액체질소에 침지 해야하기 때문에 기술적인 숙달을 요구한다. 또한 동결 자체가 수정란 또는 난자를 보관하는 용기의 열전도율 (thermal conductivity)에 따라 동결효율이 달라지기 때문에 연구자에 따라 plastic straw나 glass vial 등을 이용한다. 이밖에도 수정란 또는 난자를 포함하는 동결용액의 양에 따라서도 동결효율이 달라지는데 가급적 동결용액의 양을 적게 하는 것이 좋은 것으로 알려져 있다. 1996년 Martino 등은 소 미성숙 난자에 대해 electron microscopic grid (EM grid)를 사용한 유리화 동결법을 실시하여 70% 이상의 생존율을 얻었다는 보고를 하였다. 이 방법은 그동안 난자의 동결시 사용되는 동결보존 용기가 갖는 낮은 열전도율과 많은 동결용액으로 인한 동결시간의 지연을 해결하는 방법으로서 유리화 동결보존법과 같은 초급속 동결법에서는 매우 효과적인 방법으로 생각된다. 이밖에도 Vajta 등 (1998)은 plastic straw의 내경을 가늘게 하여 유리화 동결하는 open pulled straw 방법을 보고하였는데 이러한 일련의 시도들은 순간적인 동결을 위해 열전도율을 극대화시킬 수 있는 방법으로서 고안되어졌다.

1) 인간난자의 유리화 동결보존

차병원 여성의학연구소에서는 인간난자의 유리화 동결법의 유용성을 검증하고 새로운 유리화 난자동결기법의 개발을 위해 인간 미성숙 및 성숙난자를 이용하여 유리화 동결 후 생존율, 세포학적 정상 여부 및 체외발생능을 조사하여 임상적 응용가능성을 검토하였다.

(1) 인간 미성숙 난자의 유리화 동결보존

인간 미성숙 난자의 채취는 자연주기의 미성숙 난자 채취시 또는 제왕절개 분만시 환자의 동의 하에 채취되었으며 이들 난자의 유리화 동결보존은 Martino 등 (1996)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 미성숙 난자를 5.5 M ethylene glycol (EG)과 1.0 M sucrose가 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 용액에 20초간 침지한다. 이어 난자를 electron microscopic copper grid (EM grid, 300 mesh)상에 올려놓고 fine pincet을 EM grid 하단에 놓여준 멸균 여과지 쪽으로 눌러 잉여의 동결용액을 제거한다. 이후 즉시 LN_2에 침지하므로서 유리화 동결을 완료하였다. 이때 유리화 동결용액의 처리부터 LN_2로 침지까지 30초를 넘지 않도록 주의하였다. 유리화 동결된 난자가 부착된 EM grid는 cryovial에 넣어 최소 1주일 이상 보관하였으며 융해는 EM grid를 LN_2로부터 꺼내 0.5 M, 0.25 M. 0.125 M sucrose가 함유된 PBS 용액에 연속적으로 각 1분간 침지하여 융해와 난세포질내의 항동해제를 제거하였다. 마지막으로 신선 PBS 용액에 침지한 다음 pasteur pipette을 사용하여 EM grid상에 부착된 난자를 분리하고 신선 배양액으로 3~4회 세척한 다음 체외성숙에 이용하였다. 자연주기 또는 난소자극주기에서 채취된 미성숙 난자를 무작위로 자연주기의 경우 채취 즉시의 미성숙 상태와 48시간 동안 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin; 10 IU/ml)와 hCG (human chorionic gonadotropin; 10 IU/ml)이 함유된 TCM 199 체외성숙용 배양액에서 성숙이 유도된 난자로 분류하였고, 난소자극주기의 경우 미성숙 단계, 8~15시간 배양한 성숙중인 난자 (GVBD or metaphase-I oocyte) 및 성숙난자로 분류하여 상기 서술한 방법에 의해 유리화 동결을 실시하였다. 그 결과 자연주기의 경우 유리화 동결-융해후 형태학적으로 정상모양을 나타낸 난자의 비율은 미성숙 난자의 경우 63%, 체외성숙 난자의 경우는 56%로서 차이가 인정되지 않았다. 미성숙 난자의 경우 체외성숙을 유도한 결과 40%의 체외성숙이 이루어졌으며 이를 ICSI한 결과 미성숙의 경우 37% 그리고 성숙난자의 경우 31%로서 차이가 없었다. 한편, 난소자극주기에서 채취한 미성숙 난자의 경우 융해후 생존

율은 미성숙단계에서 동결한 경우 65%, 중간성숙단계에서 동결한 경우 64% 그리고 성숙단계에 동결한 경우 100%로서 체외성숙한 난자의 동결-융해후 생존율이 유의적으로 높게 나타났다. 이들 난자를 수정시킨 결과 정상수정인 2-PN 난자의 비율은 각각 55, 56 및 83%로서 통계학적 의의는 인정되지 않았으나 체외성숙된 난자의 경우 비교적 높은 수정율을 나타남을 알 수 있었다. 한편, 유리화 동결-융해후 수정이 이루어진 난자를 체외배양하여 배반포까지의 발생율을 조사한 결과 수정이 이루어진 난자 중 난소자극주기에서 미성숙단계에서 동결-융해한 경우 (83%)를 제외한 모든 실험구에서 공히 100%의 난자가 최소 2-세포기 이상 발생하였다. 배반포로의 발생율은 자연주기에서 채취한 미성숙 난자의 경우 40~43%가 난소자극주기의 경우 33~40%의 수정란이 배반포까지 발생하였다. 이러한 결과는 그동안 완만동결 및 급속융해한 성숙난자의 결과에 비해 월등히 양호한 결과로서 본 연구에서 이용한 유리화 동결보존법이 매우 안정적이고 효율이 높은 방법임을 나타내주는 것이라 하겠다. 또한 배반포까지 발생이 일어났던 12개의 배반포를 염색체 분석을 실시한 결과 분석가능한 배반포는 7개였으며 이들 모두 정상 염색체 상을 나타내었다. 이러한 결과는 유리화 난자동결법이 융해후 생존성과 발생율이 높을 뿐만 아니라 염색체 이상이 거의 나타나지 않는 매우 안전한 방법임을 시사해 주는 것이라 하겠다.

(2) 새로운 유리화 난자동결보존법의 개발

저자 등은 미성숙 난자의 동결보존에 이용하였던 유리화 동결보존법의 효율을 높이기 위한 방법으로서 몇 가지 방법상의 수정을 가한 새로운 유리화 난자동결법을 개발하였다. 이 방법은 기존의 유리화 동결법을 실시할 때 고농도의 유리화 동결용액에 난자가 노출될 때 발생할 수 있는 세포의 손상을 줄이기 위해 유리화 동결용액 처리 전에 저농도의 동결용액에 전처리하여 삼투압의 변화로 인한 세포의 손상을 극소화시키고 또한 융해시 세포질내의 동결보호물질의 제거를 위해 충분한 노출시간을 제공하기 위해 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M 및 0.125 M sucrose 용액에 2.5분 혹은 5분간 처리하도록 조정하였다. 또한 EM grid에 직접적으로 난자가 부착되는 것을 예방하기 위해 난자에 부착된 난구세포를 3~5층 정도 남게 하여 유리화 동결하도록 하였다. 이렇게 새롭게 발전시킨 방법의 안정성을 알아보기 위해 우선 유리화 동결-융해된 난자의 염색체 이상을 조사하였는데 대조구와 비교하여 염색체 이상의 증가는 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 근거로 개발된 유리화 동결보존법을 ART program에서 채취되어진 미성숙, 성숙과정 및 성숙난자에 대해 유리화 동결보존을 실시하고 이를 융해시 융해간격을 2.5분간과 5분간으로 나누어 융해후 생존율 및 체외발생능을 비교하였다. 그 결과, 융해간격을 2.5분으로 한 경우 (short protocol), 난자의 성숙에 따라 84~100%의 생존율을 나타내었으며 이를 체외성숙시켰을 때 성숙율은 75~86% 이었으며 수정율은 52~71%로서 비교적 양호한 성적을 나타내었다. 한편, 융해간격을 5분으로 한 경우 (long protocol)는 융해후 생존율은 94~100%, 체외성숙율 88~100% 그리고 수정율은 38~63%로서 두 융해방법에 따른 통계학적 유의성은 인정되지 않았다. 그러나 수정율에 있어서는 5분 간격으로 융해한 경우 다소 감소되는 경향이 관찰되었다. 또한 융해방법에 관계없이 난자의 성숙이 진행될수록 융해후 발생이 좋은 경향을 나타내었다. 한편, 이들 체외수정이 이루어진 2 PN 난자를 체외배양하면서 배반포까지의 발생율을 조사한 결과 2.5분 간격으로 융해한 경우 2-세포기 (71~100%), 4-세포기 (71~93%), 8-세포기 (46~71%) 그리고 배반포기로의 발생율은 23~36%로 관찰되었다. 5분 간격으로 융해한 경우 2-세포기 (50~67%)와 4-세포기 (0~50%)로 발생이 관찰되었으나 8-세포 이상으로 발생

된 수정란은 관찰할 수 없었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 유리화 동결보존된 인간난자의 경우 융해시 2.5분 간격으로 융해하는 방법이 효과적임을 확인할 수 있었으며 대체로 통계적인 유의성이 나타나지 않았으나 난자의 성숙이 진행될수록 동결-융해후의 생존율과 발생율이 증가됨을 확인하였다. 또한 일반적으로 동결-융해 난자에게서 관찰되는 수정율의 저하 역시 일반적인 체외수정방법으로서도 높은 수정율을 얻어 동결과정에서의 표층과립의 조기방출 (precocious cortical granule exocytosis)에 의한 투명대 경화현상은 크게 나타나지 않음을 확인하였다.

2) 유리화 난자동결법의 임상적 응용

저자 등은 상기 서술한 다양한 연구결과를 기초로 하여 새로 개발된 유리화 난자동결법의 안전성과 효율을 검토하였고 이 방법을 이용한 임상연구를 실시하였다. 대상환자는 ART program을 진행하고 있는 불임환자로서 채취되는 난자의 개수가 성숙난자 10개 이상인 경우로 제한하였으며 환자로부터 유리화 난자동결법의 설명과 동의를 구하였다. 채취된 난자는 약 1/2는 신선주기에 체외수정을 실시하여 임신을 유도하였으며 나머지 1/2 난자는 유리화 난자동결을 실시하여 동결보존 하였다. 신선주기에서 임신에 실패한 환자의 경우 동결보존된 유리화 동결난자의 융해이식을 실시하였다. 1998년 10월부터 1999년 8월까지 총 7명의 불임환자에게 동결보존된 유리화 동결난자의 이식을 실시하였다. 이들 7명의 환자의 평균연령은 31.9세였으며 평균 불임기간은 4.7년이었으며 평균 12.9개의 난자를 동결보존하였다. 이들 난자의 보존기간은 2개월~13개월이었다. 7명의 환자로부터 총 90개의 유리화 동결난자를 융해 한 결과 63%인 57개의 생존난자가 수정 가능한 제 1극체를 갖는 성숙난자였으며 이를 남편의 정액을 이용하여 ICSI를 실시한 결과 45개의 난자가 정상적으로 수정되었다. 이를 3일간 배양한 다음 수정란 이식 직전 acid Tyrode 용액을 이용한 보조부화술 (zona drilling)을 시행하였다. 7명의 환자 중 수정란 이식을 실시하지 못한 환자는 없었으며 7명에게 1~7개의 수정란을 이식하였다. 이식한 7명의 환자의 자궁내막의 준비는 6명은 자연주기에서 실시하였으며 1명의 환자는 estradiol valerate와 progesterone을 이용한 호르몬요법으로 실시하였다. 이식결과 7명의 환자 중 3명이 임신에 성공하여 임신율은 43%였으며 이식한 32개의 수정란 중 3개의 수정란이 착상되어 착상율은 9.4%이었다. 임신에 성공한 환자들은 임신 16~18주경에 dual test와 양수검사 (amniocentesis)를 통하여 태아의 정상을 확인하였고 임신한 환자 중 2명은 각각 2.9 Kg과 2.5 Kg의 건장한 남아를 분만하였다. 이러한 결과는 저자들이 개발한 유리화 난자동결보존법이 실험적으로 뿐만 아니라 임상적으로 충분히 적용할 수 있는 결과라는 것을 확인 것으로서 문헌상으로 유리화 난자동결법에 의한 최초의 임신과 분만사례라고 하겠다.

III. 난소조직의 동결보존

난소조직의 동결은 현재까지 생식보조술에서 난소조직의 동결보존은 일시에 난소표면에 존재하는 다수의 원시난포를 동결할 수 있다는 점에서 난자동결보존에 비해서 잇점이 있다. 뿐만 아니라 난소조직 자체를 동결하기 때문에 나중에 이를 이식하였을 경우 생식세포의 발생뿐만 아니라 이와 관련된 다양한 여성 호르몬의 분비가 이루어져 자연적인 임신의 가능과 더불어 폐경의 치료수단으로서도 이용가능하다. 동결-융해된 난소조직을 이식하는 연구는 1960년 Parrot에 의해서 생쥐에서 최초로 성공하였으나 이후 연구의 진전은 거의 전무하다가 1993년 Carrol과 Gosden에 의해 생쥐의 원시난포를 분리하여 DMSO를 이용하여 동결한 다음 다른 개

체에 융해된 원시난포를 이식하여 산자의 생산에 성공하므로서 이 분야의 연구가 활발히 연구되기 시작했다. Gosden 등 (1994)은 면양에 대해 난소조직을 냉동보존하였다가 이를 융해한 다음 다른 개체에 이식하여 산자의 출산을 보고하여 실험동물이 아닌 그리고 인간의 난소와 매우 유사한 동물에서 최초의 성공을 보고하므로서 이 분야의 연구가 인간으로의 적용가능성을 제시하였다. 인간의 경우 난소조직의 동결보존에 관한 연구는 조직의 채취가 매우 어렵고 채취되는 난소조직내에 존재하는 원시난포의 수와 분포가 불규칙하게 나타나 많은 연구는 이루어지지 않고 있다. Newton 등 (1996)은 채취된 인간 난소조직을 다양한 동결보호제를 사용하여 동결보존한 다음 이를 융해하여 severe combined immunodeficiency (SCID) 생쥐에 그 조직을 이식하여 생존율 및 난포의 발달 등을 관찰한 결과 glycerol을 제외한 다른 항동해제는 비슷한 결과를 나타낸다고 보고하였다. Hovatta 등 (1996)도 DMSO와 PROH를 이용하여 유사한 실험을 시행한 결과 융해후 난소조직의 형태, 난포의 수 등에서 차이가 없다고 하였다. 한편, 이 등 (1999)은 유리화 동결보존법을 이용하여 neonatal 생쥐의 난소조직을 동결한 다음 이를 다른 생쥐에 동소이식하여 난포의 성장을 관찰한 결과 이식된 난소에서 난포의 발달이 관찰되었고 발정의 재기가 이루어짐을 확인하여 새로운 난소조직의 동결보존법을 보고하였다. 이어 이 등 (1999)은 성인 여성의 난소피질 조직을 분리하여 이를 유리화 동결보존법으로 냉동보존함에 있어 다양한 동결보호제의 처리시간 및 처리온도 등을 검토하고 또한 융해후의 생존율을 조사하므로서 인간 난소조직을 동결보존하는 최적의 조건을 결정하였다고 보고하였다. Oktay 등 (1999)은 28세의 여성으로부터 난소조직을 채취하여 동결한 다음 29세 때 일부의 난소조직을 융해하여 자가이식하고 3주 후에 이식된 난소조직에 혈관형성을 확인하였고 이 환자에게 HMG로 유도한 결과 이식된 난소조직에서 난포의 성장을 확인하였다. 또한 일부의 조직을 체외배양 하였을 때 상당량의 스테로이드 호르몬의 생산이 이루어짐을 확인하여 이러한 난소조직의 동결보존이 의학적으로 난소기능의 소실이 예상되는 환자의 새로운 치료수단으로서 가능함을 입증하였다. 그러나 난소조직의 동결보존에 관한 연구는 언급한 바와 같이 연구보고의 사례가 매우 적고 특히 인간의 난소조직을 이용한 연구는 거의 없다. 난소조직의 동결보존은 배아나 난자와 같이 극히 제한적인 수의 세포를 동결하는 점을 극복할 수 있는 대안이기는 하지만 아직까지 난소조직으로부터 원시난포를 분리하여 이를 수정가능한 단계까지 발생할 수 있는 적절한 체외배양조건의 확립이 이루어지지 않았고 또한 동결-융해된 난소조직으로부터 얻어지는 난자의 염색체 이상, 세포질의 변화 등과 같은 세포조직학적 안정성 등의 평가도 이루어져야 한다. 그러나 이러한 몇 가지 어려운 점이 있기는 하지만 난소조직의 동결보존에 관한 연구는 새로운 생식의학 연구의 개발과 인간 생식조직의 보존이라는 점에서 그 의미는 매우 크고 이 연구를 바탕으로 나아가 인간의 여러 장기의 보관 연구에도 많은 기술적, 학문적 기초가 될 수 있을 것으로 예상된다.

IV. 결 론

난자/난소조직의 동결보존은 최종적으로 난자은행 (ovum bank)의 설립에 그 목적을 두고 있다. 불임치료를 받는 환자나 또는 질병 등으로 생식기능의 상실이 우려되는 환자 그리고 임신을 뒤로 미루고 있는 여성들에게 자신의 생식세포인 난자 또는 난소조직을 보관하였다가 원하는 시기에 임신을 시도할 수 있게 되며 나아가 타인에게 기증할 수 있는 수단으로서도 이용

가능해진다. 난자는 정자나 수정란에 비해 부피가 매우 크거나 구조적으로 매우 불안정한 구조를 갖는 세포인 관계로 이를 동결보존하는데 있어서 많은 어려움이 있다. 1990년대 중반부터 활발히 연구되어져 오고 있는 난자 동결보존기술은 현재로서는 신선주기의 난자나 또는 동결 수정란의 이용효율에 비해서 낮기는 하지만 임상적 응용가능성이 매우 높고 향후에는 반드시 수정란의 동결을 대체할 수 있는 유일한 수단이기 때문에 보다 많은 연구가 절실히 필요하다고 사료된다. 저자들이 개발한 유리화 난자동결법은 이러한 가능성을 제시해 주는 하나의 방법이라고 생각되며 좀더 개선된 방법의 개발이 요구되어 진다. 또한 난소조직의 동결보존은 수정란이나 난자의 동결보존이 제한된 수와 융해후 생존성과 세포학적 이상 등이 나타남을 감안할 때 이를 대안할 수 있는 방법이라고 사료된다. 일부의 연구자들에 의해서 이미 임상적 적용이 극히 제한적으로 시도되고 있으나 현재로서는 좀더 기초적이고 구체적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 참 고 문 헌

Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. Hum Reprod 1987; 2: 695-700.

Cha KY. Oocyte freezing/Egg banking. 38th Annual Postgraduate Program, Course IV. 21st century ART: Embracing change. American Society for Reproductive Medicne 1997; pp. 17-33.

Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet 1986; 1: 884-6.

Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, Cha KY. In vitro blastocyst formation of human oocytes retrieved from unstimulated and stimulated cycles following vitrification at various maturational stages. Fertil Steril 1999; accepted.

Fabbri R, PorcuE et al. Oocyte Cryopreservation. Hum Reprod 1998; 13 Suppl 4: 98-108.

Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, Cha KY. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. Fertil Steril 1999; 72: 142-6.

Lim JM, Fukui Y, Ono H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. Theriogenology 1992; 37: 351-61.

Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, Alnot MO, Slat-Baroux J. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. Hum Reprd 1998; Suppl 13: 161-74.

Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. Cell Biophysics 1990; 17: 53-92.

Oktay K, Karlikaya G, Gosden R et al. Ovarian function after autologous transplantation of frozen-banked human ovarian tissue. Abstract for 1999 ASRM/CFAS at Toronto, Canada, O-054.

Park SE, Lee KA, Son WY, Ko JJ, Lee SH, Cha KY. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. Fertil Steril 1997; 68: 920-6.

Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. Fertil Steril 1997; 68: 724-6.

Rall WF and Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196℃ by vitrification. Nature 1985; 313: 573-5.

Son WY, Park SE, Lee KA, Lee WS, Ko JJ, Yoon TK. Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the in vitro developmental capacity of human immature oocytes. Fertil Steril 1996; 66: 995-9.

Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following Cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 1983; 305: 707-9.

Tucker MJ, Wright G, Mortin PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. Fertil Steril 1998; 70: 578-9.

Yoon TK, Chung HM, Lim JM et al. Birth of normal baby developed from vitrified oocytes. Fertil Steril 2000, in press.

Zeilmaker GH, Alberda AT, Van Gent L, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril 1984; 42: 293-6.

이경아, 이숙현, 하상덕, 윤세진, 고정재, 이우식, 윤태기, 차광렬. 여성의 난소 피질조직의 초자화 냉동보존. 대한 불임학회지 1999; 26(2): 251-6.

이경아, 이숙현, 윤세진, 고정재, 차광렬. 초자화 냉동법으로 냉동. 해동한 Neonatal 생쥐 난소의 생체내 동소이식 후 난포발달에 관한 연구. 대한불임학회지 1999; 26(2): 219-23.