

배아의 동결보존 (Cryopreservation of Human Embryos in IVF)

산본 제일병원

김재명

1. 서론

최초의 시험관아기의 임신성공 (Steptoe & Edwards, 1978) 이래 불임분야는 괄목할 만한 발전을 거듭해왔으며, 다양한 과배란 유도방법이 개발되고 여러 크리닉에서 IVF program 성행함에 따라 배아이식 후 남은 잉여 수정란의 동결의 필요성이 대두됨에 따라서 여러 연구진에 의해 시도되어 1983년 Alan Trounson과 Mohr에 의해 최초 인간 냉동수정란으로 임신에 성공하였다. 또한 Zeilmaker 등 (1984)에 의해 첫 쌍 태아의 분만성공이, Cohen 등 (1985)은 배반포기 난자의 동결보존 후 이식해 분만성공이 보고된 이래 난자와 수정란의 동결보존 하는 방법이 많이 연구되고 발전되어 왔다. 동결보존의 필요성은 첫째 과배란 유도에 따른 잉여 난자와 수정란의 적절한 처리, 둘째 호르몬 투약의 결과 난소 과자극 증후군이 심할 경우, 자궁내막이 착상에 부적당한 경우 또는 난자채취 후 남편의 출장, 정자의 사멸, 체외배양 시스템의 이상에 의해 난자채취 후 체외수정이 불가능한 경우, 셋째 난자 공여자와 수여자간의 생리적 불일치에 의해 난자의 이식이 불가능한 경우, 넷째 유전자의 이상을 초래할 수 있는 치료를 받아야 할 경우, 착상 전 수정란의 유전질환 검색이 필요한 경우 등으로 인해 그 주기에 배아이식을 받지 못할 경우에 배아의 동결은 환자가 원하는 적절한 시기에 배아를 융해하여 이식함으로써 임신의 시도를 가능케 한다.

오늘날 체외수정 및 배아이식 프로그램의 획기적인 발전으로 양질의 난자와 수정란을 다수 얻을 수 있으며, 이식 후 잉여 수정란을 동결보존 하여 과배란시 유발될 수 있는 내분비학적 변화 (endocrine aberrations)와 자궁내막의 수정란 수용능력 (endometrial receptivity) 감소가 없는 자연배란 주기에서 배란 여부를 확인한 후 냉동보존된 수정란을 융해하여 자궁강내로 이식하여 누적 임신율을 향상시킬 수 있었다. 미국내 통계 (ASRM, 1996)에 의하면 체외수정 시술시 배아이식 주기당 임상적 임신율과 분만율은 신선 배아이식시 각각 29.1%, 23.4%, 동결보존 배아이식시 각각 19.3%, 15.6% 이었고, 주산기 사망율과 기형 발생율에 있어서 유의한 차이가 없는 것으로 보고된 바 동결보존된 배아의 이식은 임상적으로 안전한 시술로 인식되고 있다 (Wada et al., 1994).

배아의 동결법은 완만동결법 (slow freezing), 급속동결법 (rapid freezing) 및 초급속동결법 (ultrarapid freezing) 또는 유리화 동결법 (vitrification) 등이 개발되었으나 대부분의 크리닉에서는 완만동결법이 이용되고 있다.

2. 동결보존의 원리

동결보존된 배아의 생존성과 발달에 영향을 미치는 요인으로는 동결 및 융해과정에서 세포 내외의 빙정형성, 삼투압, 저온충격 및 동결보호제에 의한 유해효과로부터 난자가 보호될 때 야 가능하다. 동결보존시의 요인으로는 냉각속도, 난자의 발달단계에 따른 세포막의 전도성과 온도상수, 동해방지제의 종류와 농도, 동결속도 및 동결보존 방법에 의해 복합적으로 영향을 받게 된다.

수정란내에는 세포수 (cellular water)가 존재하기 때문에 아무런 처리 없이 동결하면 세포내의 수용액이 얼어 빙결정 (ice-crystallization)을 형성, 부피가 팽창하므로 세포질막과 내부소기관을 파괴함으로서 수정란은 그 고유한 형태를 유지하지 못하며 생존성을 잃게 된다.

수정란의 그 고유한 형태를 유지하면서 동결할 수 있는 기본 원리는 수정란내의 수분을 삼투압의 원리를 이용하여 제거하고 수분 대신 동결보호제를 침투시켜 난자를 보호하고 동결하는 것으로 수정란이 삼투압의 충격 (osmotic shock)을 가능한 한 적게 받게 하기 위하여 동결보호제에 노출시 단계별로 낮은 농도부터 3~10분간 노출시켜 최소한으로 삼투압의 충격을 줄여야 한다. 일반적으로 난자의 동결에 이용되고 있는 침투성 동결보호제 (permeable cryoprotectants)로는 DMSO, 1,2-Propanediol, Glycerol 및 Ethylene glycol 등이 가장 많이 보편적으로 이용되며, 이들 물질의 특성은 분자량이 작기 때문에 세포막을 쉽게 통과할 수 있고 빙점이 낮아 저온에서도 빙결정이 발생하지 않는다. 동결보호제의 세포내의 침투속도는 배아의 종류 및 배아의 발달단계에 따라 다르나 보통 propanediol의 경우 5~7분, DMSO는 20~30분, Glycerol은 60분 이상으로 동결보존 하는 배아의 발달단계에 따라 동결보호제의 선택이 중요한데 일반적으로 전핵기의 난자와 2~4 세포기의 배아는 propanediol, 8세포기의 배아는 DMSO, 배반포기의 배아는 Glycerol이 이용되고 있다. 비투과성 동결보호제 (non-permeable cryoprotectants)는 sucrose와 lipoprotein, ficoll 등이 이용되고 있는데 이들 물질은 분자량이 크기 때문에 세포내로 통과될 수는 없으나 삼투압에 영향을 미쳐 세포의 탈수 및 재수화를 돕는다. 수정란에 동결보호제를 노출 시켰을 때 이들 수정란으로부터 수분이 탈수되는 동안 할구의 크기는 작아지다가 동결보호제에 노출하여 일정시간이 흐르면 원상태의 크기로 복귀된다.

동결보호제에 수정란이 노출되어 평형이 일어나면 수정란을 상온에서 -7℃까지 분당 -2~-3℃의 비율로 냉각시킨 후 이 온도영역에서 식빙 (seeding)을 실시한다. 식빙은 과냉각에 의한 빙결정과 또는 열발생에 의한 피해를 방지하기 위해서 실제 빙결정 온도 (about -14℃)보다 높은 온도 (-7℃)에서 빙정의 형성을 유도하여 난자의 손상을 최소화 하는데 목적을 두고 있다. 즉 수정란의 동결시 -5℃ 정도로 온도를 내리면 세포를 둘러싸고 있는 배양액은 동결보호제에 의해 과냉각 상태로 얼지 못하고 있다가 -5~-15℃ 사이에서 배양액내 얼음의 결정이 형성됨에 따라 세포 주변의 용질의 농도는 증가하고 세포는 삼투압으로 탈수되어 수축이 발생한다. 결빙기에 어는 속도가 충분히 느리면 세포질내의 수분이 빠져나가고 필요한 세포질내의 용질의 농도는 유지되며, 빙정의 형성을 방지할 수 있다. 그러나 동결속도가 빠르면 세포내의 수분이 세포 밖으로 빠져나갈 충분한 시간이 없으므로 세포질내의 빙정의 형성을 가져온다. -7℃에서 식빙된 수정란은 컴퓨터에 의해 조절되는 자동 세포동결기를 이용하여 분당 -0.3℃의 비율로 -30~-40℃까지 냉각한 후 액체질소에 옮겨 보존하게 된다. LN₂ tank내 -196℃에서

일정기간 보존된 수정란은 필요에 따라서 융해하여 사용하게 되는데 동결수정란의 융해과정은 동결에 비하여 매우 간단하지만 동결보존의 성패를 좌우할 수 있는 만큼 중요한 과정이므로 수정란의 동결시 냉각속도에 따라서 융해속도를 결정하여야 하며 이를 무시하게 되면 빙결정의 재형성 (recrystallization)이 이루어져 수정란은 치명적인 손상을 받을 수 있다. 융해된 수정란은 여러 농도의 sucrose 용액에 고농도로부터 저농도로 배아를 처리함으로써 급격한 삼투압의 변화에 따른 세포막의 손상을 최소화하면서 배아 세포질내의 동결보호제를 제거하는 재수화 (rehydration)과정을 통해 동결보호제를 제거한 후 일정시간 배양하여 소기의 목적을 위해 사용할 수 있다.

3. 동결보존 방법

수정란을 동결보존 할 때 가능한 한 빠른 시간내에 동결보존 (Trounson & Mohr, 1983) 하거나 배반포까지 배양 후 동결을 실시한다 (Fehilly et al., 1985). 배아의 동결법에 있어서 일반적으로 완전동결법이 이용되고 있으나 최근에는 급속동결법 및 유리화 동결법이 개발되어 시도되고 있으나 이들 방법의 임상적 적용에는 아직 한계가 있다.

1) 전핵기 난자의 동결과 융해

전핵기는 수정과정에 중에 있으며 배우자 융합 (syngamy)이 이루어지지 않은 상태로서 microtubule의 변화가 특징인 단계로서 microtubule은 특히 저온에 민감하게 영향을 받는 단계로서 수정 후 20~22시간 정도가 지난 후 동결을 실시하는 것이 배아의 생존성 및 발달율에 양호한 결과를 가져올 수 있다 (Wright 등, 1990). 그러나 신선 배아이식시 배아의 선별이 불가능하고 임신율이 다소 감소하는 경향이 있어 다수의 전핵기 난자를 얻었을 경우에 시행하는 것이 좋다. 이 시기에는 주로 propanediol과 sucrose을 동결보호제로 이용하여 완전동결 및 급속 융해법으로 배아의 동결 및 융해를 실시한 Teatart 등 (1986)과 Shaw 등 (1993)의 방법이 이용되고 있다 (Table 1).

2) 난할중인 배아의 동결과 융해

2~8 세포기의 배아를 선별하여 동결보존 하는 것으로 동결-융해후의 생존성, 배 발달율이 높아 양호한 결과를 기대할 수 있는 단계이다. 배아이식 전에 형태학적으로 양호한 배아를 선별하여 시간에 제약을 받지 않고 동결할 수 있기 때문에 보편적으로 많이 이용되고 있다.

그러나 배아이식시 선별이 이루어지기 때문에 전체 시험관아기 기술 중 약 20% 정도의 환자에게만 적용될 수밖에 없는 단점을 지닌 반면 동결보존시 동결보존하는 배아의 형태를 확인할 수 있고, 형태학적으로 정상적인 동결배아의 개수를 조절함으로써 다태아 임신을 사전에 피할 수 있다. 동결보존법은 전핵기 배아의 경우와 같이 완전-급속융해법이 널리 이용되고 있으며, 2~4 세포기의 배아는 propanediol이 6~8 세포기의 배아는 DMSO가 동결보호제로 널리 이용되고 있다 (Table 2).

3) 배반포배의 동결융해

배양법의 발달에 따라 수정 후 5~6일간 배양하여 얻어지는 배반포배를 동결보존하는 방법

Table 1. Freezing and thawing procedures for pronuclear and early stage embryos

Dehydration	Concentration of cryoprotectant	Exposure time in dilution
	0.5 M Propanediol	5 min
	1.0 M Propanediol	5 min
	1.5 M Propanediol	5 min
	1.5 M Propanediol + 0.1 (or 0.2) M sucrose (FS)	5 min Loading straw

FS	FS + Embryos	FS
2 cm	2~3 cm seeding point	1 cm

Freezing	Temperature	Freezing velocity
	Room temp. - -7°C	-2°C/min
	-7°C	Holding for 5 min Manual seeding
	-7°C~-30°C	-0.3°C/min
	-196°C	Directly plunged into LN ₂

Thawing	Remove straw and air thaw for 30 sec. Place in a 37°C water bath for 30 sec. During this time handle the straws carefully

Rehydration	Concentration of cryoprotectant	Exposure time
	1.0 M Propanediol + 0.2 M sucrose	5 min
	0.5 M Propanediol + 0.2 M sucrose	5 min
	0.2 M sucrose	5 min
	0.0 M sucrose	5 min

으로 부화배 (hatching)가 되기 직전에 동결하는 것이 양호한 성적을 얻을 수 있다. 신선 배아를 배반포까지 배양 후 이식시 임신율이 높고 다태아 임신을 예방할 수 있기 때문에 최근에 여러 연구진에 의해 시도되고 있으며 배반포 배아의 동결보존-융해후 생존성 및 임신율이 양호하다는 결과가 많이 보고되고 있다. 그러나 배반포 단계까지 배양할 수 있는 배양체계의 확립이 필수적이고 배반포 배아를 동결보존 할 수 있는 환자가 제한 받을 수 있다는 단점이 있다. 대부분 배반포 배아의 동결보호제로는 glycerol이 많이 이용되고 있다 (Table 3).

4) 미세조작된 수정란의 동결융해

체외수정 프로그램에 있어서 남성요인과 저수정을 환자를 위해 개발된 세포질내 정자주입술 (ICSI)은 대부분의 크리닉에서 널리 이용되고 있고 생식 보조술에서 차지하는 비율도 점차

Table 2. Freezing and thawing procedures for cleaved embryo

Dehydration	Concentration of cryoprotectant	Exposure time
	0.25 M DMSO	10 min
	0.5 M DMSO	10 min
	1.00 M DMSO	10 min
	1.50 M DMSO	10 min, Loading into straw
Freezing	Temperature	Freezing velocity
	Room temp. - -7℃	-2℃/min
	-7℃	Seeding. Holding for 10 min
	-30℃	-0.3℃/min
	-150℃	-50℃/min
	-196℃	Plunged into -196℃
Rehydration	Concentration of cryoprotectant	Exposure time
	1.0 M DMSO	10 min
	0.75 M DMSO	10 min
	0.50 M DMSO	10 min
	0.25 M DMSO	10 min
	0.00 M DMSO	10 min

높아지고 있다. Van Steirteghem 등 (1994)에 의해 미세조작 배아의 동결보존이 최초로 보고된 이후 여러 연구자에 의하면 체외수정된 배아와 미세조작된 배아의 동결보존 후 이식하였을 때 임신율에 있어서 큰 차이는 나타나지 않았다고 보고하였다 (Van Steirteghem et al., 1994; Al-hasani et al., 1996; Hoover et al., Kim 등, 1997).

4. 논 의

체외수정 및 배아이식 프로그램의 발달에 따라 잉여 난자와 수정란을 동결보존하는 방법이 널리 이용되어 왔다. 수정란의 동결보존은 많은 수의 난자가 수정되었을 경우, 잉여 수정란의 동결보존은 다 태아의 임신방지 및 누적 임신율의 향상을 가져올 수 있으며 심한 과배란 증후군을 보이는 환자에서 당주기에 이식을 피하고 동결보존 하여 다른 자연주기에 이식해 난소 과자극 증후군의 발생을 최소화시킬 수 있는 방법으로도 이용되고 있다. 동결보존시 이용되는 동결보호제는 배아의 발달단계에 따라 여러 가지 방법이 이용되어 왔는데, 전핵 시기 및 초기배아의 경우는 1,2-propanediol, 8세포기 배아의 경우 DMSO가 배반포기의 배아인 경우 glycerol 등이 이용되는 완만동결 및 급속융해법이 여러 크리닉에서 이용되고 있다. 동결보존 배아의 해동후 생존율에 영향을 미치는 여러 조건들이 많이 존재하나 특히 동결전 배아의 상태가 중요하며, 이외에 동결보호제, 동결 및 융해의 기술적 측면 등이 영향을 줄 수 있다. 최근

Table 3. Freezing and thawing procedure for blastocyst embryo

Dehydration	Concentration of cryoprotectant	Time spent
	1% Glycerol	10 min
	2% Glycerol	10 min
	4% Glycerol	10 min
	6% Glycerol	10 min
	8% Glycerol	10 min
Freezing	Temperature	Freezing velocity
	Room temp. - -6℃	-1℃/min
	-6℃	Seeding, Holding for 5 min
	-6℃ ~ -30 (9)℃	-0.3℃/min
	-196℃	Plunged into LN ₂
Thawing	Remove straw and air thaw for 30 sec. Place in a 37℃ water bath for 30 sec. During this time handle the straws carefully	
Rehydration	Concentration of cryoprotectant	Time spent
	8% Glycerol	5 min
	6% Glycerol	10 min
	5% Glycerol	12 min
	4% Glycerol	12 min
	3% Glycerol	14 min
	2% Glycerol	14 min
	1% Glycerol	16 min

초급속동결법 및 유리화 동결법이 실험동물 및 가축에서는 널리 적용되어 양호한 성적을 거두고 있으며 몇몇 크리닉에서도 시도되어 성공을 거두고 있으나 저조한 생존율과 임신율을 보이는 바 체계적인 동결기술의 확립, 동결수정란의 적절한 배양조건을 개발이 향후의 과제로서 개선되어야 할 문제점이다.

참 고 문 헌

1. Baker A. Use of the one-step method to freeze and thaw human pronuclear stage and 2~8 cell embryos. Proceeding for 13th annual postgraduate program for ASRM. 1997, p. 31-44.
2. Brinsden PR. Embryo Cryopreservation. A textbook in vitro fertilization and Assisted reproduction. 1999, p. 211-7.
3. Check JH, Hoover L, Nazari A, Summers D. The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. Fertil Steril 1996; 65: 254-7.

4. Cohen J, DeVane GW, Elsner CW, Fehily CB, Kort HI, Massey JB, Tuner TG. Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 1988; 49: 283-9.
5. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988; 49: 743-64.
6. Kaufmann RA, Menezo Y, Hazout A, Nicollet B, et al. Co-cultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1996; 64: 1125-9.
7. Leibo SP. Principles of cryopreservation for ART laboratory. Proceeding for 13th annual postgraduate program for ASRM. 1997, p. 1-14.
8. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, et al. Cryopreservation of embryos and oocytes. *Hum Reprod* 1988; 3: 117-9.
9. Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, et al. *Hum Reprod* 1988; Suppl 13: 161-74.
10. Menezo Y, Nicollet B, Harbaut N, et al. Freezing co-cultured human blastocyst. *Fertil Steril* 1992; 58: 977-80.
11. Menezo Y, Guyader-Joly C. Cryopreservation of blastocyst: The in-vitro vs. in-vivo situation in bovine and human. Proceeding for 13th annual postgraduate program for ASRM. 1997, p. 47-55.
12. Society for Assisted Reproductive Technology. Assisted reproductive technology in the united states: 1996 results generated from the American Society for reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil Steril* 1999; 71: 789-807.
13. Testart J, LaSalle B, Beleisch-Allard J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986; 46: 268-72.
14. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-9.
15. Trounson A, Sjoblom P. Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. *Fertil Steril* 1988; 50: 373-6.
16. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, et al. Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62: 775-80.
17. Veeck LL, Amundson CH, Brothman LF, DeScisciolo C, Maloney MK, Muasher SF, Jone HW. Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993; 59: 1202-7.
18. Veeck LL. Embryo management when and how to choose for transfer and when and how to freeze. Proceeding for 11th annual meeting for In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. A Comprehensive update 1998, p. 209-26.
19. Wright G, Wiker S, Elsner C, Kort H, Massy J, Mitchell D, Toledo A, Cohen J. Observations on the morphology of human zygotes, pronuclei and nucleoli and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 1990; 5: 109-15.
20. 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.

21. 대한산부인과학회 인공수태 의료기관 심사소위원회. 한국 보조생식술의 현황: 1996년. 대한산부인과학회지 1999; 42(2): 231-53.
 22. 김석현, 지병철, 정병준, 김희선, 류범룡 등. 난자 세포질내 정자주입술 후 동결보존후 배아이식: 고식적 체외수정시술과의 비교 연구. 대한불임학회지 1997; 24: 281-90.
-