

인간 포배란의 유리화동결 용해 후 임신 및 분만에 관한 연구

포천중문의과대학 산부인과학교실¹, 차병원 여성의학연구소²

최동희^{1,2} · 정형민² · 정미경² · 이숙환^{1,2} · 남윤성^{1,2} · 박 찬^{1,2} · 곽인평^{1,2} · 윤태기^{1,2}

Clinical Study on the Successful Pregnancy and Delivery after Transfer of Human Blastocysts Cryopreserved by Vitrification

Dong Hee Choi^{1,2}, Hyung Min Chung², Mi Kyung Chung², Sook Hwan Lee^{1,2},
Yoon Seung Nam^{1,2}, Chan Park^{1,2}, In Pyung Kwak^{1,2}, Tae Ki Yoon^{1,2}

Department of Obstetrics and Gynecology, Pochon Cha University, Pochon, Korea¹,
Infertility Medical Center of Cha General Hospital, Seoul, Korea²

Objective: This study was performed to evaluate whether vitrification method could be used for the cryopreservation of human blastocysts derived from IVF program.

Methods: Surplus embryos were obtained from consented IVF patients. Controlled ovarian hyperstimulation was done with midluteal GnRH agonist, gonadotropin and hCG. After oocyte retrieval and insemination, fresh embryo transfer was done at 4~8 cell stage. The surplus embryos after ET were cultured in blastocyst medium up to 6 days after oocyte retrieval. Obtained blastocysts were cryopreserved with our vitrification method. Blastocysts were exposed to 1.5 M ethylene glycol (EG) in phosphate buffered saline (PBS) for 2.5 minutes, followed by 5.5 M EG plus 1 M sucrose for 20 seconds. Then 1 to 3 blastocysts were mounted on electron microscope (EM) grid and the grid was plunged into liquid nitrogen for storage. For thawing, blastocyst-containing EM grids were sequentially transferred in 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M and 0 M sucrose solution at the intervals of 2.5 minutes. And blastocysts were cultured for about 6 hours and only re-expanded blastocysts were transferred to uterus of the patients on 4 to 5 days after ovulation in natural cycle or on 18 to 19 day of artificial cycle.

Results: From Oct. 1998 to Jul. 1999, 34 patients were agreed to participate in this study. The mean age and duration of infertility of the patients were 31.6 years and 4.1 years, respectively. Among 34 cycles, replacements could be done in 20 cycles (58.8%). A total 93 blastocysts were thawed and 48 (51.6%) of them survived. Thirty-eight blastocysts, mean 1.9 embryos per patient, were transferred, resulting in 5 clinical pregnancies which consisted of 1 triplet, 2 sets of twins and 2 singleton pregnancies. The pregnancy rate per transfer was 25% and implantation rate was 23.6%. Five patients delivered 7 healthy babies including 2 sets of twins at term.

Conclusion: Successful pregnancies and deliveries were established after transfer of vitrified human blastocysts. Vitrification using ethylene glycol as cryoprotectant and electron microscope grid is a rapid and simple method that can be effectively applied for the cryopreservation of human blastocysts.

Key Words: Human blastocyst, Vitrification, Pregnancy and delivery

연구대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1998년 10월부터 1999년 7월까지 본원의 IVF-ET 프로그램에 참여한 환자 중 배아이식 후 남은 수정란을 체외배양하여 포배란을 얻어 적어도 1개의 포배란을 유리화동결법으로 보관할 수 있었던 34명의 환자를 대상으로 하였다. 불임의 원인은 난관성 불임 16예, 남성불임 9예, 자궁내막 중 1예, 난자공여 1예, 원인불명 3예, 그리고 복합적 원인이 4예이었다.

2. 과배란 유도 및 체외수정-배아이식

시술 전 주기의 중기 황체기 (midluteal phase)부터 매일 GnRH agonist (Suprefact[®]; Hoechst, Germany) 0.3~0.4 ml을 피하 주사하였고 월경주기 3일째부터 GnRH agonist의 일일용량은 반으로 감량하면서 FSH (Metrodin-HP[®]; Serono, Switzerland)와 hMG (Humegon[®]; Organon, Netherlands)를 병용 투여하여 과배란 유도하였으며 평균 직경이 18 mm 이상인 난포가 2개 이상 초음파로 확인되면 hCG (Profasi[®]; Serono) 10000 IU를 근주하였고 36시간 후 질초음파를 이용하여 난자를 회수하였다.

회수된 난자는 10% synthetic serum substitute (Irvine Scientific Co., Santa Ana, CA)가 첨가된 Pre-implantation I 배양액 (Irvine Scientific Co.)에서 4~6 시간 배양한 후 $1\sim 2 \times 10^5$ /ml의 정자를 insemination 하거나 또는 업 등⁸의 방법에 의해 정자직접주입술을 시행하였다. 16~20 시간 후 전핵형성 유무로 수정을 확인한 후 2일간 더 배양하여 4~8 세포기에 자궁내로 이식하였다.

3. 포배란 배양

배아이식 후 남은 수정란은 Blastocyst 배양액 (Irvine Scientific Co.)으로 옮겨 24시간마다 배양액을 교환하면서 난자 채취 후 6일까지 배양하여 포배란 형성을 관찰하였다.

4. 포배란의 동결

포배란을 1.5 M ethylene glycol (EG, Sigma Chemical Co.)이 포함된 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, GIBCO BRL)이 들어 있는 organ culture dish에 2.5분간 넣은 후 5.5 M EG와 1 M sucrose가 들어 있는 D-PBS 용액에 20초간 노출시켰다. 그 후

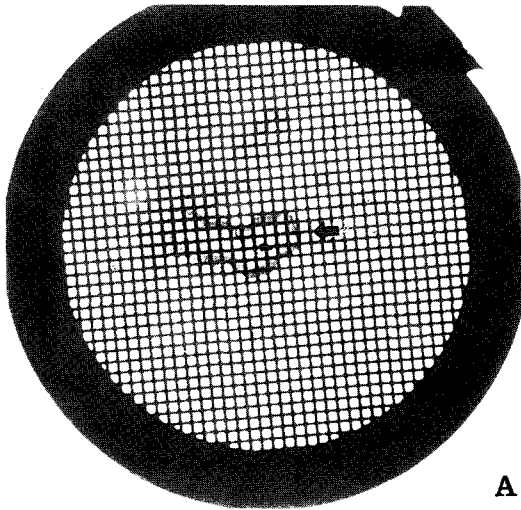
인간의 체외수정 프로그램에서 얻어지는 여분의 수정란을 동결 보존한 후 융해하여 이식하는 치료법은 많은 불임치료기관에서 널리 이용되고 있다. 수정란을 동결 보존함으로써 얻을 수 있는 잇점은 1회에 이식하는 배아의 수를 제한할 수 있어 다태 임신 발생을 감소시키는 것이 가능하며 잉여의 수정란을 다음 주기에 과배란 유도없이 이식할 수 있기 때문에 1회의 난자 채취 후 임신율을 증가시킬 수 있다. 또한 난소과자극 증후군의 위험성이 높을 때에는 그 주기에 배아이식 하지 않고 다음 주기에 융해된 수정란을 이식하는 것이 가능하다.¹ 1983년 Trounson 등은 냉동 보관된 인간의 4~8 세포기 수정란을 융해 후 자궁내 이식하여 최초로 임신에 성공하였다.² 그 후 Cohen 등에 의해 인간 포배란 (blastocyst)의 동결 보존 후 임신이 성공된 이래,³ 최근까지 glycerol을 동결보호제 (cryoprotectant)로 이용한 완만동결 (slow freezing)법이 포배란의 동결에 주로 이용되고 있다.

한편 초급속동결 (ultra-rapid freezing)법 중 유리화동결 (vitrification)은 동결 보존하려는 세포나 조직을 고농도의 동결보호제에 단시간 노출시켜 탈수를 유발하고, 냉각 (cooling) 과정 중 정상적으로 발생하는 점도 (viscosity)의 증가에 의해 세포 내외가 유리화된 고체 상태 (glass-like solidification)로 되어 세포에 손상을 주지 않고 분자운동이 정지되는 상태를 만드는 것이다.⁴

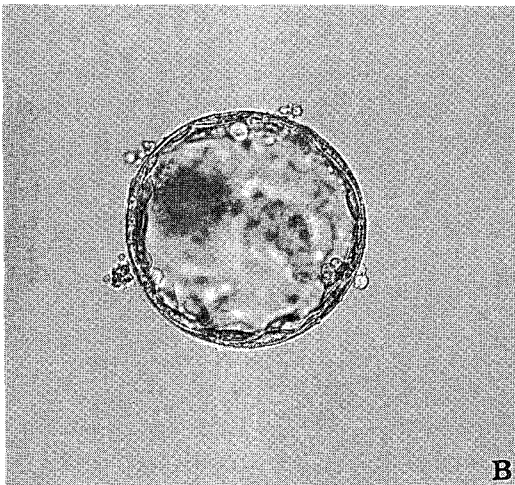
유리화동결법은 완만동결법에 비해 동결 과정이 간단하고 시간이 적게 걸리며 세포 내외에 결빙형성 (ice crystal formation)이 되지 않을 뿐 아니라 고가의 programmed freezer가 필요치 않아 경비가 절약되는 등 여러 가지 장점을 가지고 있다.

최근 수정란 체외배양액 및 배양기술의 발달로 체외수정 프로그램에서 인간 포배란의 획득률이 증가되고 있는 추세를 보이고 있어,⁵ 좀 더 효율적이고 간편한 포배란 냉동 보존 방법의 개발이 요구되고 있다.

본원에서는 체외수정 프로그램에서 회수된 인간 난자를 유리화동결법으로 보존 후 융해하여 체외배양 후 수정시키고 정상적인 포배란으로의 발생을 성공적으로 수행하고 있다.^{6,7} 본 연구는 난자의 동결 보존을 위해 본원에서 개발된 유리화동결법이 인간 포배란의 동결에도 이용될 수 있는지 알아보기 위해 시행되었다.



A



B

Figure 1-A. Photograph of the electron microscope (EM) grid used to cryopreserve human blastocysts and blastocysts on the EM grid before being cooled in liquid nitrogen (X250).

Figure 1-B. Photograph of human blastocyst vitrified and then warmed (X250).

1~3개의 포배란을 electron microscope copper grid (EM grid; Gilder Co., West Chester, PA)에 유리 pipette를 이용하여 올려놓았고 (Figure 1-A) 여분의 동결 보호제는 EM grid 밑에 미리 멸균된 filter paper를 깔아서 제거하였다. 포배란이 놓인 EM grid를 -196°C 액체 질소에 침지하여 보관하였다. 액체 질소에 침지하기 전까지의 모든 과정은 37°C 에서 시행하였고, 5.5 M EG에 노출시켰을 때부터 30초 이내에 EM grid를 액체 질소에 침지하였다.

5. 포배란의 용해 및 이식

유리화 동결 보관된 포배란의 용해를 위해서는 10% fetal bovine serum이 포함된 D-PBS 용액에 1 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M sucrose를 첨가하여 각 용액에 포배란이 놓여 있는 EM grid를 2.5분씩 순차적으로 노출시킨 후 sucrose가 들어 있지 않은 배양액에서 포배란을 EM grid로부터 분리하여 포배란의 형태를 관찰하여 lysis 여부를 확인 후 Blastocyst 배양액에서 6시간 정도 배양하여 다시 팽창된 포배란을 정상 생존한 것으로 간주하였다 (Figure 1-B).

용해 후 형태학적으로 정상인 포배란만을 분비기의 자궁내에 이식하였다. 자연배란 주기를 가지는 환자에서는 소변 LH kit와 질초음파를 이용하여 배란을 확인하여 배란 4~5일 후에 이식하였고 무배란 환자에서는 난자공여 프로그램에서와 같이 estrogen (Progynova®, Schering AG)과 progesterone (Progesterone-in-oil)을 투여하여 artificial cycle 18~19 일째의 분비기 자궁내막에 이식하였다. 포배란 이식 10~11일 후 혈중 hCG를 측정하였고, 4~5주 후 질초음파를 시행하여 자궁내 착상 여부와 태낭 및 배아의 수를 관찰하였다. 임상적 임신의 판정은 초음파 검사상 태낭이 관찰된 경우로 하였다.

결 과

34명 환자들의 평균 연령은 31.6 ± 4.3 세, 평균 불임기간은 4.1 ± 2.7 년 이었다. 34명의 환자 중 20명 (58.8%)에서 용해 후 포배란 이식을 받을 수 있었다. 총 93개의 포배란을 용해시켰으며 용해 후 48개가 생존하여 51.6% 생존율을 보였고 38개의 포배란을 20명의 환자에게 자궁내 이식하였다. 5명의 환자가 임신되어 임신율은 용해 당 14.7%, 배아이식 당 25.0%이었으며, 착상율은 23.6%였다 (Table 1).

환자들의 임신 결과는 Table 2에 요약되어 있다. 임신 된 5명의 환자 중 1명은 3태임신, 2명은 쌍태임신, 2명은 단태임신이었으며 삼태임신 된 환자는 임신 7주에 선택적 태아감소술을 시행받았고, patient E는 임신 10주에 한 태아가 자연 유산되어 (vanishing twin) 단태임신으로 진행하여 분만하였다. Patient A,B는 임신 중기 산모 혈액으로 시행한 태아기형 선별검사인 triple test가 음성이었으며 양수검사 상 양수세포가 정상 핵형을 나타냈다. 양수검사 받기를 거부한 Patient C, D 및 E는 triple test만 시행받았으며 그 결과는 3명의 환자에서 모두 음

성을 나타냈다. 현재 5명의 환자에서 2쌍의 쌍태아를 포함하여 7명의 아기가 만삭분만되었다. 첫분만은 1999년 8월에 있었고 patient E는 2000년 3월에 분만하였다. 출생시 평균 재태기간은 39주였으며 7명의 아기 중 6명이 남아, 1명이 여아였고 평균 체중은 3,013 gm이며 소아과적 진찰 상 모두 정상 신생아의 소견을 보였다.

고 찰

포유류의 수정란을 냉동 보존하는 기술은 지난 20년간 많은 발전을 이루어 인간의 체외수정 프로그램에서도 1회의 난자 채취 후 임신율을 높일 수 있는 필수적인 기술로 자리잡고 있다.⁹ 1990년대에 들어서 수정란의 발달 단계에 따른 생리적 필요성분의 차이를 고려한 순차적 배양액 (sequential culture media)의 발달로 공배양 (coculture) 없이도 체외에서 비교적 높은 율의 인간 포배란 형성이 가능해

졌고,^{5,10} 따라서 포배란 이식과 냉동 보관이 임상에서 자주 시행되고 있다.

1985년 Cohen 등³의 성공 이래 인간 포배란의 동결 보존에는 glycerol을 동결보호제로 이용한 완만동결법이 주로 이용되어 왔다. 유리화동결법 (vitrification)은 완만동결에 대응되는 초급속동결법으로 Rall과 Fahy (1985)에 의해 생쥐 수정란에서 처음 성공하였고,⁴ 그 후 Kasai 등도 vitrification법에 의해 생쥐와 토끼의 상실배에서 높은 생존율을 보고하였다.^{11,12} 한편 인간수정란을 유리화 동결 보존한 초기의 시도들은 성공적이지 못했는데 Quinn 등은 그 이유를 dimethyl sulphoxide (DMSO), propanediol 및 acetamide 등으로 이루어진 동결 용액의 독성때문으로 생각하였다.¹³ 그 후 Vanderzwalmen 등¹⁴과 Mukida 등¹은 동결보호제로 EFS (ethylene glycol, ficoll, sucrose) 용액을 사용하고 수정란을 plastic straw에 loading 하여 인간수정란의 유리화 동결 후 임신성공예를 보고하였으나 현재까지 인간 포배란의 유리화 동결 후 임신성공은 많은 예에서 보고되어 있지 않다.

성공적인 유리화 동결을 위해서는 매우 빠른 냉각 속도와 고농도의 동결보호제가 동시에 필요하다고 알려져 있다.¹⁵ 본 연구에서 포배란을 loading 하는데 사용된 EM grid는, 원래 냉해 (chilling injury)에 극히 예민한 Drosophila 수정란의 유리화 동결에서 수정란에 손상을 주는 온도대 (dangerous temperature zone)를 극히 빠른 속도로 통과하여 냉해를 최소화하기 위해 고안되었다.^{16,17} 그 후 Martino 등¹⁸은 소난자의 유리화 동결에서 EM grid가 straw에 비해 용해 후 우수한 난자생존율을 보임을 밝혔다. 본 연구에서 사용된 EM grid는 직경이 3.05 mm, 두께 0.037 mm로 그 용적이 straw에 비해 매우 작아 straw에 비해 적어도 3배 이상의 냉각 속

Table 1. Result of transfer of vitrified-thawed human blastocysts

No. of thawed cycles	34
Transfer cycles (%)	20 (58.8)
Thawed blastocysts	93
Survived blastocysts (%)	48 (51.6)
Transferred blastocysts	38
ET/cycle (mean \pm SD)	1.9 \pm 0.9
Clinical pregnancy rate	
Per thawing (%)	5 / 34 (14.7)
Per transfer (%)	5 / 20 (25.0)
Implantation rate (%)	9 / 38 (23.6)

Table 2. Outcome of pregnancy

Patient	No. of ET	No. of implantation	Result of Triple test	Result of amniocentesis	Outcome of pregnancy	
A	3	3*	Negative	46XY, 46XY	Term delivery	Twin
B	3	2	Negative	46XY, 46XY	Term delivery	Twin
C	3	1	Negative	Not done	Term delivery	Single
D	2	1	Negative	Not done	Term delivery	Single
E	3	2†	Negative	Not done	Term delivery	Single

*Selective abortion of one embryo at IUP 7 wks, †one fetus: vanishing twin at IUP 10 wks

도를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁷

또한 이 연구에서 동결보호제로 사용된 ethylene glycol (EG)은 세포내 투과 속도가 빠르며 세포 독성이 비교적 적은 것으로 알려져 있다.¹⁹ 유리화 동결 상태를 얻기 위해 요구되는 고농도의 ethylene glycol에 의한 세포 독성을 완화시키기 위해 본 연구에서는 동결 과정 중 포배란을 낮은 농도인 1.5 M EG에 미리 노출시켜 세포를 탈수시키고 세포내 동결보호제의 농도를 높인 후 고농도의 EG가 포함된 용액에 포배란을 처리하였다.

유리화 동결 보존 포배란의 해동 후 생존율은 본 연구에서는 51.6%였다. 완만동결의 경우 51.3~83%의 다양한 생존율이 보고되어 있으며,^{20,21} 같은 기간 동안의 본원의 완만동결에 의한 포배란의 해동 후 생존율은 67%였다 (unpublished data). 주기 당 평균 1.9개의 포배란이 이식되었고 20주기 중 5예에서 임신되어 이식 당 임신율은 본 연구에서 25%였다. Vanderzwalmen 등¹⁴은 체외에서 5일간 배양된 수정란의 유리화 동결 보존 및 해동 후 18%의 임신율을 보고하였으며 완만동결법에 의한 논문에서는 14~21.7%의 임신율이 보고되었다.^{20,21} 착상율은 본 연구에서 23.6%로서 포배란 유리화 동결 후 착상율은 거의 보고된 바가 없으며 완만동결의 경우 9~13.4%의 착상율이 보고되어 있다.^{20,21} 본 연구에서 임신한 환자 5명은 1예의 vanishing twin을 제외하고 임상적으로 유산된 환자는 없었는데 완만동결 포배란 이식 후 20~35%의 유산율이 알려져 있다.^{20,21} 그리고 5명의 산모는 2쌍의 쌍태아를 포함하여 모두 7명의 아기를 만삭분만하였고 현재까지 아기들은 정상적으로 성장하고 있다.

이상의 결과로 볼 때 동결보호제로 ethylene glycol을 사용하고 수정란을 electron microscope grid에 loading 하여 유리화 동결시킨 후 해동하여 이식한 인간 포배란은 이식 후 정상적으로 발생하여 건강한 산자 (offspring)를 분만하게 할 수 있으며 본 연구에서는 해동 후 포배란 생존율이 약간 낮은 경향을 보여으나 일단 생존한 포배란의 임신율 및 착상율은 이미 보고되어 있는 완만동결법에 비해 낮지 않음을 알 수 있었다. 앞으로 좀 더 대규모 환자에 대한 연구 및 동결 방법의 개선이 이루어진다면 체외수정 프로그램에서 인간 포배란을 동결 보존 하는데에 완만동결법에 비해 간편하고 경제적이며 시간이 적게 걸리는 유리화동결법의 이용이 증가되리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1998; 13: 2874-9.
2. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-9.
3. Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1985; 2: 59-64.
4. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
5. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84-8.
6. Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, et al. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999; 72: 142-6.
7. 임기봉, 오종훈, 손지은, 정형민, 고정재, 한세열 등. 시험관아기 시술시 정자직접주입법을 이용한 2146예의 임상결과. 대한산부인과학회지 1998; 41: 181-90.
8. Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, et al. In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* 2000; 73: 545-51.
9. Van den Abbell E, Camus M, van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem AC. A randomized comparison of the cryopreservation of the one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen. *Hum Reprod* 1997; 12: 1554-60.
10. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 169-77.

11. Kasai M, Nishimori M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. *Bio Reprod* 1992; 47: 1134-9.
12. Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T, Machida T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol Reprod* 1992; 46: 1042-6.
13. Quinn P, Kerin J. Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1986; 3: 40-5.
14. Vanderzwalmen P, Delval A, Chatziparasidou A, Bertin G, Ectors F, Lejeune B, et al. Pregnancies after vitrification of human day 5 embryos. *Hum Reprod* 1997; 12: Abstract book O-198.
15. Hotamisligil S, Toner M, Powers RD. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol Reprod* 1996; 55: 161-8.
16. Mazur P, Cole KW, Hall JW, Schreuders PD, Mahowald AP. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Science* 1992; 258: 1932-5.
17. Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature* 1990; 345: 170-2.
18. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059-69.
19. Miyamoto H, Ishibashi T. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J Reprod Fertil* 1997; 50: 373-5.
20. Hartshorne GM, Elder K, Crow J, Dyson H, Edwards RG. The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum Reprod* 1991; 6: 136-41.
21. Kaufmann RA, Nicollet B, Menezo Y, DuMont M, Hazout A, Servy E. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1995; 64: 1125-9.