韓國受精卵移植學會誌(2001) 第 16 卷 第 3 號
Korean J. Emb. Trans. (2001) Vol. 16, No. 3, pp. 245~250

난자동결보존의 임상적 응용
I. 유리화 난자동결 보존에 의한 임신과 분만

정형민* · 박이석** · 차광렬
포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소, **산부인과

Clinical Application of Oocyte Cryopreservation
I. Pregnancy and Delivery of Vitrified Human Oocytes in ART Program

Hyung Min Chung, Ph.D.*, Lee Suk Park, M.D. and Kwang Yul Cha, M.D.**

Infertility Medical Center of CHA General Hospital, Pochon CHA University
Department of Obstetrics and Gynecology, CHA General Hospital, Pochon CHA University

SUMMARY

This study was performed to evaluate whether vitrification method using ethyle glycol and eletron microscopic (EM) grid could be used for the cryopreservation of human oocytes in ART program. Surplus oocytes were obtained from consented IVF patients. These surplus human oocytes were frozen with our vitrification method, Oocytes were exposed to 1.5M ethylene glycol (EG) in DPBS for 2,5 minutes, followed by 5.5M EG plus 1.0M Sucrose in DPBS for 20 seconds. Then oocytes were transferred onto the EM grid and the grid was plunged into LN2 for storage. For thawing, oocytes containing EM grid were sequentially transferred in 1.0M, 0.5M, 0.25M, 0.125M and 0 M sucrose in DPBS solution at the intervals of 2.5 minutes. Thawed and survived oocytes were provided for ICSI. Embryos from vitrified oocytes were transferred to uterus of the patient on 4 to 5 days after ovulation in natural cycles of on 15 to 17 day of hormone replacement cycles. A total of 370 oocytes from 26 patients were thawed and 159 (43.0%) of them survived. One hundred thirty four oocytes (84.3%) were fertilized normally and 126 pre-embryos were transferred to 26 patients, resulting in 5 clinical pregnancies. The pregnancy rate per transfer was 19.2% and implantation rate was 4.0%. Among the five pregnant, 4 patients delivered 4 healthy babies and the one patient was 32-week ongoing pregnancy. From this results, vitrification using ethylene glycol as cryoprotectant and EM grid is a rapid and simple method that can be effectively applied for the cryopreservation of human oocytes in ART program.

(Key words : oocyte cryopreservation, vitrification, EM grid)

서 론

수정란 동결보존은 난자채취당 임신성공율을 획기적으로 향상시킬 수 있는 기술로서 정착되었

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-1999-00082) 지원으로 수행되었음.
† Correspondence : Tel : 02) 3468-3391, Fax : 02) 3468-3399, E-mail : hmchung@chacares.com

다고 할 수 있다. 그럼에도 불구하고 수정란 동결보존은 생명체가 될 수 있는 인간 수정란을 동결과 융해과정에서 불가피하게 손상된다는 점에서 윤리적, 법적 문제점을 내재하고 있고 일부 유럽국가에서는 이를 금지하기도 한다. 이러한 수정란 동결보존의 대안으로 제시된 것이 난자 동결보존이다. 1986년 Chen을 비롯한 몇 건의 난자동결 성공사례가 있기는 하지만 이러한 연구결과는 재현성이 적고 성공률 역시 수정란 동결보존에 비해 매우 저조한 것으로 알려져 있다. 그러나 난자는 체세포, 정자 및 수정란과는 달리 세포의 크기가 매우 크고 매우 불안정한 구조적 특성등으로 인하여 세포의 동결보존과정에서 세포사멸 및 염색체 이상 등과 같은 문제로 인하여 실제 임상에 응용하는 것이 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 저자등은 기존의 완만동결법을 대신하는 유리화 난자동결보존법을 개발하여 보고한 바가 있고 또한 배반포 배아에 대해서도 임상적 적용을 시도하여 성공한 예가 있다 (Hong 등, 1999, Chung 등, 2000, Choi 등, 2001). 이에 본 연구에서는 저자들에 의해 보고된 유리화 난자동결보존법을 시험관아기 시술을 실시한 불임환자를 대상으로 임상적용을 실시하여 임신과 분만에 성공하였기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 임상시험윤리위원회 승인

인간난자의 유리화동결보존 및 이식과 관련된 모든 연구는 사전에 포천중문의과대학교 차병원 임상시험윤리위원회의 사전승인하에 이루어졌다.

2. 대상환자

포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소에 내원한 정상 난소기능을 나타내었던 불임환자 26명을 대상으로 하였으며 이들 환자의 평균연령은 33.4세, 불임기간은 4.7년이었다.

3. 과배란유도 및 난자 채취

연구에 참여한 26명의 환자들의 난소자극은 GnRH agonist (Buserilin acetate, Hoechst, Germany)와 gonadotropin (FSH와 hMG)을 이용한 long protocol을 통해 난소자극을 시행하였으며 매일 초음파 검사와 혈중 E_2 농도를 측정하면서 난포의 성장을 관찰하였다. 초음파상에 직경 17mm이상의 dominat follicle이 2개 이상 관찰되었을 때 gonadotropin 투여를 중단한 다음 10,000IU의 hCG를 주사한 다음 34~36시간째에 난자채취를 시행하였다.

난자채취는 질식초음파를 이용한 난자흡입 방법으로 난포를 흡입하였다. 흡입된 난포액은 즉시 연구실로 보내져서 난구세포-난자 복합체를 선별하여 신선 P-1 배양액 (Irvine Scienctific, USA)으로 3회 세척한 다음 난자의 성숙상태를 관찰하고 37℃ CO_2 배양기 (Heraeus, Germany)에 넣어 배양하였다. 채취된 난자중 성숙난자의 수가 8개 이상인 경우 환자의 동의하에 잉여의 난자는 유리화 난자동결보존을 실시하였다.

4. 유리화 난자동결 및 해동

난자동결 보존을 위해서 유리화 난자동결법을 이용하였다. 먼저 0.1% hylauronidase용액에 난자를 침지하고 pipetting을 실시하여 난자에 부착된 난구세포 3~5층 정도만을 남기도 나머지 난구세포를 제거하였다. 3~5층의 난구세포에 둘러싸인 난자-난구세포 복합체 (oocyte-cumulus cell complex)는 신선 P-1배양액으로 세척한 다음 유리화 난자동결에 이용하였다. 먼저 난자-난구세포 복합체는 1.5M ethylene glycol (이하 EG; Sigma, USA)이 함유된 DPBS용액 (Gibco/BRL, USA)에 37℃에서 2.5분간 침지한 다음 이어 5.5M EG가 함유된 DPBS용액으로 옮겨 20초간 침지하므로서 항동해제 처리를 실시하였다. 이어 난자-난구복합체는 즉시 pipet을 이용하여 멸균 거어즈상에 있는 400 mesh의 electron microscope grid (이하 EM grid; Gilder, USA)에 옮긴 다음 핀셀으로 난자-난구복합체와 함께 있는 동결용액을 제거하고 즉시 액체질소에 침지함으로써 유리화 동결을 실시하였다. 유리화 동결보존된 난자는 냉동보관용 용기 (cryovial, 1,8ml; Nunc, Denmark)에 넣어 해동시 까지 보관하였다.

난자의 해동은 환자가 신선주기에서 임신에 실패한 경우 실시하였다. 자연주기 혹은 hormone

replacement therapy (HRT)로서 자궁내막 주기를 맞춘 환자에게 배란일에 난자를 해동하였다. 난자의 해동은 냉동보관중인 EM grid를 1.0M, 0.5M, 0.25M 및 0.125M sucrose (Sigma, USA)가 함유된 DPBS용액에 각각 2.5분 간격으로 순차적으로 침지한 다음 마지막으로 0M sucrose가 함유된 DPBS용액에 침지하고 pipetting방법을 통해 EM grid상에 부착되어 있는 난자-난구세포 복합체를 분리하였다. 분리된 난자 난구세포 복합체는 37℃ CO_2 배양기에 넣어 30분~1시간동안 배양한 다음 현미경하에서 난자의 상태를 확인하였고 0.1% hyaluronidase 용액에 침지하여 난구세포를 제거한 다음 난세포질 상태를 관찰하여 난자의 생존여부를 확인하였다.

5. 난자의 체외성숙, 수정, 배아이식 및 임신확인

해동이 완료된 난자는 현미경하에서 생존 여부를 확인함과 동시에 난자의 성숙정도를 관찰하여 성숙난자의 경우 2~4시간내에 정자세포질내 직접주입법 (intracytoplasmic sperm injection; 이하 ICSI)을 통해 수정을 유도하였으며 성숙과정인 난자의 경우 8~12시간 그리고 난핵포기 난자의 경우 24~48시간 동안 추가배양을 통해 체외성숙을 유도한 다음 제1극체의 방출이 일어난 성숙난자만을 골라 ICSI를 시행하였다. ICSI 시행후 12~18시간째에 난자를 관찰하여 수정여부를 판정하였으며 수정된 난자는 P-1배양액 하에서 3일간 배양하여 난할을 유도하였다. 정상적인 난할이 이루어진 2~8세포기 배아는 acid Tyrode 용액을 이용한 보조부화술 (assisted hatching)을 시행한 다음 환자의 자궁에 이식함으로써 임신을 유도하였다. 임신의 확인은 배아이식후 12~14일경에 혈중 HCG 농도로 결정하였으며 임신 4~6주경에 초음파상으로 태낭과 심장박동으로 재차 확인하였다.

결 과

신선주기에서 성숙난자의 채취가 8개 이상인 환자로서 잉여난자에 대해 유리화 난자동결보존을 실시한 환자중 임신에 실패한 총 26명의 불임환자로 부터 370개의 난자에 대해 유리화 난자동결 및 해동과 배아이식을 시행하였다. 총 370개의 유리화 냉동 난자를 해동한 결과 159개의 난자가 해동후 형태학적으로 정상을 나타내어 생존율은 43.0%

Table 1. Overall results of oocyte vitrification in ART cycles

No. of patient (cycles)	No. of oocyte vitrified	No. of oocytes survived after thawing (%)	No. of oocytes fertilized normally (%)	No. of embryos transferred/ implanted (%)	No. of pregnant/ ET(%)	No. of patient delivered*
26	370	159 (43.0)	134 (84.3)	5/126 (4.0)	5/26 (19.2)	4

* One patient was 32-week ongoing pregnant.

Table 2. Detailed pregnancy outcome from vitrified oocytes in ART program

Patient No.	No. of oocytes				Delivered
	Vitrified	Survived (%)	Fertilized (%)	Transferred	
A	13	7 (53.8)	6 (85.7)	6	Delivered*
B	11	11 (100)	9 (81.8)	4	Delivered*
C	18	8 (44.4)	5 (62.5)	5	Delivered*
D	15	9 (60.0)	8 (88.9)	7	Delivered*
E	12	8 (66.7)	6 (75.0)	5	32-week ongoing

* Normal karyotype was confirmed by amniocentesis.

의 생존율을 나타내었다. 이들 난자에 대해 ICSI 방법을 이용하여 수정을 유도한 결과 134개 (84.3%)의 난자가 정상적인 수정을 나타내었으며 이중 배아의 형태가 극히 않좋거나 발생이 정지된 8개의 배아를 제외한 126개의 배아를 26명의 환자에 이식할 수 있었다. 배아이식후 혈중 HCG 및 초음파 검사등을 통해 임시을 확인한 결과 5명 (19.2%)에서 임신이 확인되었으며 착상율은 4.0% (5/126)로 나타났다. 2002년 1월 현재 임신된 5명의 환자중 4명은 정상적으로 건강한 아기를 출생하였으며 1명은 현재 임신 32주로서 특별한 이상징후 없이 건강한 상태로 임신중에 있다.

고 찰

지난 20여년동안 생식의학 (reproductive medicine)의 발전은 이제 거의 모든 종류의 불임증을 치료할 수 있는 수준으로 발전되었다. 오늘날 생식의학의 발전에 있어서 배아의 동결보존은 채취된 난자의 임신가능성을 극대화 할 수 있을 뿐만 아니라 환자에게 신체적, 경제적 부담을 극소화 할 수 있다는 점에서 매우 의미있는 기술이라 하겠다. 그러나 오늘날 대부분의 배아동결보존은 그 임상적 의의가 매우 큼에도 불구하고 인간의 생명체가 될 수 있는 세포를 동결-해동하는 과정에서 불가피하게 일부 또는 상당수가 사멸된다는 점에서 윤리적으로 문제점을 안고 있다. 이러한 측면에서 일부의 국가에서는 배아동결보존을 법으로 금지시키거나 매우 제한적 허용을 하고 있다. 따라서 이러한 배아동결 보존을 대체할 수 있는 새로운 기술체계가 요구되었는데 이것이 난자동결 보존이다. 난자동결 보존은 배아동결과는 달리 정자와 함께 여성의 생식세포인 난자를 동결한다는 점에서 윤리적 문제를 상당부분 극복할 수 있다는 장점이 있다. 뿐만 아니라 발전적으로는 왕성한 사회활동 등으로 인해 임신을 늦추고자 하는 여성에게 젊었을 때 자신의 난자를 보관하였다가 후에 해동하여 임신을 시도할 수 있는 새로운 가족계획 수단으로 활용될 수도 있으며 암 등으로 인해 항암치료나 방사선 치료로 인해 생식세포의 파괴가 예상되는 환자에게 미리 자신의 생식세포를 보관하였다가 질병이 완치된 후에 자신의 생식세포를 이용하여 임신을 유도할 수도 있다. 또한 동물생명공학 분야에서는 희귀동물 또는 멸종위기의 동물의 생식세포를 보관함으로써 귀중한 유전자원의 보존수단으로서 활용한 다는 점에서 그 의미가 크다고 하겠다. 그러나 난자는 정자나 배아와는 달리 세포의 크기가 매우 크고 감수분열 중기에 있어 세포구조학적으로 매우 불안정하다. 실제 인간 생식의학분야에서 난자동결보존과 관련된 연구는 극히 미비한 실정이다. 1986년 Chen과 1987년 Uem등은 DMSO를 이용한 난자동결에 의한 임신성공 보고가 있었으나 이후 이들의 연구가 추시되지 못하였으며 1998년 Tucker등은 23개의 난자를 동결하여 1개만이 생존한 보고를 하는 등 이 분야의 연구는 진전되지 못하였다. 1997년과 1999년에 Porcu등은 세포투과성이 우수한 propylene glycol을 이용한 완만동결법을 이용하여 임신에 성공을 거두었다는 보고 정도가 인간 난자동결의 대부분일 정도라 하겠다. 이러한 난자동결 실패의 원인에 대해 많은 연구자들의 보고가 있었는데 대체로 난자의 냉동-해동과정에서 상당수의 난자의 방추사 (meiotic spindle)의 손상과 이에 따른 염색체의 이상 (chromosomal aneuploidy)의 증가 (Gook 등, 1993, 1994, Son 등, 1996, Park 등, 1997), 표층과립의 조기방출 (cortical premature exocytosis)에 의한 투명대 경화 (zona hardening)현상의 증가 (Schalkoff 등, 1989, Carroll 등, 1990, Gook 등, 1995)등이 그 주된 원인으로 지적되었다. 최근 세포동결보존의 새로운 방법으로 유리화 동결보존법 (vitrification)이 제시되었는데 이 방법은 기존의 완만동결법에 비해 세포 동결과정에서 세포내 빙결정이 형성 (intracellular ice crystal formation)이 형성되지 않고 고가의 냉동기를 사용하지 않으며 매우 신속하게 동결할 수 있는 방법이다. 이에 저자등은 이미 시험관 시술과정에서 잉여로 얻어진 난자에 대해 유리화 난자동결을 시도하여 비교적 높은 생존율과 배반포로의 발생을 관찰하였으며 (Chung등, 2000) 또한 동결보호제 처리시간 및 온도 그리고 세포의 성숙단계에 따른 차이를 비교하여 인간 난자동결의 최적 조건을 보고한 바 있다 (Hong 등, 1999). 이러한 방법은 난자뿐만 아니라 배반포 배

아에도 적용 가능하여 임상적 적용을 통한 임신성공을 보고한 바 있다 (Choi 등, 2001). 따라서 본 연구에서는 저자들에 의해 개발된 인간 난자동결법의 임상적 응용가능성을 확인하기 위해 시험관 아기 시술과정에서 성숙난자의 수가 8개 이상인 경우 잉여의 난자를 환자의 동의하에 유리화 냉동보존을 실시하고 신선주기에서 임신에 실패하였을 경우 이들 냉동보관된 난자를 해동하여 임신에 시도하는 연구를 실시하였다. 총 26명의 환자에 대해 370개의 잉여난자를 채취하여 유리화 냉동보존을 실하였는데 이를 해동한 결과 생존율은 43.0%였다. 이전의 Hong등 (1999)의 결과와 비교할 때 다소 저조한 생존율이긴 하지만 잉여난자의 질과 상관없이 모두 냉동보존한 점을 고려한다면 그리 저조한 결과는 아니라고 판단된다. 생존한 냉동배아를 남편의 정액을 채취하여 ICSI 방법으로 수정을 유도한 결과 생존한 난자의 84.3%인 134개의 난자가 정상수정이 일어났다. 수정을 위해 ICSI 방법을 선택한 것은 일부의 연구보고에서 지적한 바와 같이 난자의 냉동과 해동과정에서 나타날 수 있는 과립막세포의 조기방출에 의한 투명대 경화현상에 따른 수정율 저하를 방지하기 위해 실시하였다. 수정이 이루어진 배아를 2~3일간 추가배양하여 배발생을 위도한 결과 8개의 배아를 제외한 126개의 배아가 적어도 2-세포기 이상 난할이 이루어져 배아이식이 가능하였다. 배아이식 직전에 이식한 배아의 착상을 위해 acid Tyrode 용액을 이용한 보조부화술을 시행한 다음 실시하였고 총 26명의 이식환자중 5명에서 혈중 HCG와 초음파상의 태낭과 심박동이 관찰되어 19.2%의 임신성공율을 나타내었다. 이때 착상율은 임신 5명 모두에서 단태임신이 관찰되어 착상율은 4.0%였다. 2002년 1월 현재 임신된 5명중 4명은 정상분만을 통해 건강한 아기가 출생하였으며 1명은 현재 임상적으로 아무런 이상없이 임신 32주를 진행하고 있다. 따라서 본 연구진에 의해 개발된 인간 유리화 동결법은 배아동결보존의 대안으로 적절히 이용될 수 있다고 사료된다. 다소 저조한 생존율을 극복할 수 있는 세포골격기관 안정제의 처리나 배발생 증진방안 등이 보완될 수 있다면 인간 및 동물 생식의학에 있어 매우 경제적이고 편리한 동결보존술이 될 것으로 예측된다.

참고문헌

Carroll J, Depypere H, Mattews CD. 1990. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. J. Reprod. Fertill., 90:547-553.

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

Choi DH, Chung HM, Chung MK, Lee SH, Nam YS, Park C, Kwak IP and Yoon TK. 2000. Clinical study on the successful pregnancy and delivery after transfer of human blastocysts cryopreserved by vitrification. Korean J. Fertili, & Steril., 27(4):367-372.

Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ and Cha KY. 2000. *In vitro* blastocyst formation of human oocytes retrieved from unstimulated and stimulated cycles following vitrification at various maturational stages. Fertil. Steril., 73:545-551.

Gook DA, Osborn SM and Johnston WI. 1993. Cryopreservation of mouse and human oocyte using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. Hum. Reprod., 8:1101-9.

Gook DA, Osborn SM, Bourne H. 1994. Fertilization of human oocytes following cryopreservation: normal karyotype and absence of stray chromosomes. Hum. Reprod., 9:684-91.

Gook DA, Schiewe MC and Osborn SM., 1995. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. Hum. Reprod., 10:2637-41.

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

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

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

Porcu E. 1999. Freezing of oocytes. Curr. Opin. Obstet. Gynecol., 11:297-300.

Schalkoff ME, Oskowitz SP and Powers RD. 1989. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. Biol. Reprod., 40:379-393.

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

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

Van Uem JFHM, Siebzehnrubl ER, Schuh B, Koch R, Trotnov S and Lang N. 1987. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. Lancet. i:752-53.

(접수일: 2001. 10. 21/ 채택일: 2001. 12. 9)