초자화 냉동법으로 냉동·해동한 neonatal 생쥐 난소의 생체내 동소이식 후 난포 발달에 관한 연구

포천중문 의과대학교[1], 차병원 여성의학연구소[2]
이경아[1,2], 이숙현[2], 윤세진[2], 고정재[1,2], 차광열[1,2]

Ovarian development of vitrified neonatal ovaries after orthotopic transplantation into adult recipients

K.A. Lee[1,2], S.H. Lee[2], S.J. Yoon[2], J.J. Ko[1,2], K.Y. Cha[1,2]
College of Medicine, Pochon CHA University[1]
Infertility Medical Center, CHA General Hospital[2]
Seoul, 135-081, Korea

1) 본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (HMP-98-M-5-0054)의 지원으로 수행되었음

Abstract

Ovarian development of the vitrified neonatal ovaries after orthotopical transplantation into the ovariectomized adult recipient mouse were observed. Ovaries were collected from the neonatal females on day of birth and grouped for fresh, vitrification for 1-minute, and 3-minute. Vitrified and thawed neonatal ovaries were orthotopically transplanted into ovarian bursa of the adult mice from which endogenous ovaries have removed just prior to the transplantation (1 minute: n=25; 3 minutes n=23). Fresh ovarian tissue transplanted (n=25) mice were included as control groups. Returning of the estrus cycles and the survival and development of the transplanted ovaries were evaluated. Intact ovaries from neonatal, and four weeks old mice were used for comparison of the ovarian development as in vivo-developed control. From 2 weeks after transplantation, 64%, 36%, and 75% of the transplanted mice showed return of the estrus cycles in fresh, 1-minute, and 3-minute groups, respectively. Four weeks after transplantation, all mice were sacrificed and ovarian tissues were recovered for histological analysis. 57.1%, 33.3%, and 64.7% mice in fresh, 1-minute, and 3-minute groups, respectively, had survived ovaries with follicles at various stages of growth from primordial to preovulatory follicles. Corpus lutea were also observed. Results of the present study suggest that 1) normal folliculogenesis has initiated in vivo after vitrification, and 2) the vitrification may be used as a preservation method for ovarian tissues for establishment of ovarian tissue bank.

Key Words: vitrification, mouse, neonatal ovary, orthotopic transplantation

서 론

여성의 생식세포나 난소조직을 몸밖에서 보관할 수 있는 냉동보존방법이 개발된다면, 임신시기를 조절하고자 하는 경우나, 방사선치료나 화학치료를 받아야 할 경우 난소를 체외에서도 안전하게 보존할 수 있게 될 것이다. 결혼적령기 또는 더 어린 나이에 암 등의 질병에 걸린 여성의 경우, 현대의술의 발달로 병의 완치를 기대해 볼 수 있고, 그러므로 냉동보존법은 이들이 완치 후 정상적인 가정을 꾸밀 수 있도록 도울 수 있는데 더 없이 유용한 방법이 될 것이다. 따라서 여성의 생식세포 및 난소조직을 보관할 수 있는 방법의 개발이 꼭 필요하다고 할 수 있겠다.

현재까지 성숙 또는 미성숙한 난자나 초기 배의 냉동보존에 관한 연구는 비교적 많은 연구가 되어 있으며, 이를 통한 아기의 출산도 이미 이루어져 있다. 그러나 난자나 초기 배의 냉동보존은 그 대상환자가 기혼 여성이어야 하며, 한번에 냉동할 수 있는 숫자도 적은 등 제한성이 있다. 또한 난자의 크기는 다른 세포에 비해 매우 크기 때문에 냉동보존 후의 생존율이 낮고 세포질 내에서 여러 가지 비정상적인 현상이 나타남으로서 성공률이 낮은 편이다. 이러한 점을 보완할 수 있는 방법으로 최근 들어서 난자보다 크기도 작고 물질대사도 적게 일어나며 또 난소피질 내에 존재하는 수도 월등히 많은 primordial follicles (원시난포)의 냉동보존에 많은 관심이 기울여지고 있다. 실제로 생쥐의 난소조직을 냉동 보존하였다가 해동한 후, 다른 개체에 이식하여 산자를 얻은 첫 보고는 1960년 Parrot에 의해서였다 (Parrott, 1960). 그후 1993년 Carrol과 Gosden은 생쥐의 원시난포를 분리하여 dimethylsulphoxide (DMSO)를 이용한 slow freezing-rapid thawing 방법으로 냉동 보존하였다가 다른 개체에 이식하여 산자를 얻는데 성공하였다 (Carroll and Gosden, 1993).

본 저자들은 vitrification (초자화 냉동보존법)을 사용하여 조직을 보존하는 방법을 개발하고자 한다. 초자화 냉동보존법은 slow freezing-rapid thawing 방법에 비하여 매우 간단하고 경제적인 장점이 있다. 그러나 아직 이 방법이 생식세포에 미치는 영향 즉, 안전성에 대해서는 많은 연구가 이루어져 있지 않다. 본 연구에서는 neonatal 생쥐의 난소를 초자화 냉동보존법으로 냉동, 융해한 후 다른 생쥐의 체내로 이식하여 난포의 성장을 관찰함으로써 초자화 냉동보존법이 난포성장에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

Neonatal 생쥐 난소의 초자화 냉동보존

ICR 생쥐가 태어난 날 난소를 회수하여 초자화 냉동을 하였다. 항동해제는 Martino 등 (Martino et al, 1996)이 사용한 바 있었던 EG 5.5를 기본으로 만들어 사용하였는데,

20mM HEPES가 첨가된 Waymouth 752/1 media (Gibco, USA)에 5.5M EG (Ethylene Glycol)과 1M Sucrose, 10% FBS를 첨가한 것으로, 0.22㎛ filter로 여과하여 사용하였다. 처리 온도는 실온으로 선택하였고, 항동해제를 1분과 3분 동안 처리한 후 전자현미경용 grid에 얹어서 곧바로 액체질소에 넣어 동결 시켰다.

해동과정

동결된 난소를 해동하기 위해 액체질소에서 꺼낸 grid를 0.5M sucrose용액에 30초간 녹인 후 난소만 다시 새로운 0.5M sucrose 용액으로 옮겨서 10분 동안 세척하였다. 그 후 0.25M, 0.125M sucrose용액으로 옮기며 각각 10분씩 처리해 주었고, 마지막에 Waymouth 752/1 배양액에 5분씩 두 번 세척한 후, 이식할 때까지 37℃ CO_2 배양기에 넣어두었다. 해동에 사용된 용액 제조 방법은 Martino 등 (Martino et al, 1996)에 의한 방법을 이용하였는데 각 sucrose용액은 10% FBS와 20mM HEPES가 첨가된 Waymouth 752/1 media(Gibco, USA)에 희석하여 제조하였고, 해동에 이용된 용액의 온도는 37℃를 유지 시켜 주었다.

난소 이식 수술

본 실험에서는 14시간/10시간 (light/dark)의 조명 조건에서 먹이와 물을 충분히 공급하면서 사육한 생쥐를 사용하였다. Neonatal ICR생쥐를 ovary donor로 사용하였고, recipient로는 4주령 된 ICR생쥐를 사용하였다. 실험군으로는 초자화 냉동보존법으로 동결 처리한 후 융해과정을 거친 neonatal 난소를 이식한 군 (Frozen group)으로 하였고, 대조군으로는 동결처리하지 않고 이식한 군 (Fresh control group), 마취와 수술과정의 영향을 알아보기 위해서 마취과정과 수술과정은 동일하게 시행하되 난소 이식은 하지 않은 대조군 (Sham control group), 그리고 ovariectomized group (negative control group)으로 나누었다. Frozen group은 항동해제에 1분 처리한 군과 3분 처리한 군으로 나누었다. 난소이식의 과정은 recipient 생쥐의 난소를 제거한 후 그 자리에 donor 난소를 이식해 주는 orthotopic transplantation (동소이식)의 방법으로 수행되었다. 난소이식에 사용한 recipient 생쥐를 kg당 85mg의 ketamine (Parke-Davis Co., USA)과 4mg의 xylazine (Byer Korea, Seoul, Korea)으로 마취한 후, 등 쪽을 절개한 후 난소 부위를 꺼냈다. 그리고, 난소를 둘러싸고 있는 bursa를 약간만 절개하여 recipient 난소를 완전히 떼어낸 후, 해부현미경 하에서 fresh 또는 frozen-thawed neonatal donor 난소를 bursa 안에 넣고 봉합하였다. 난소 및 난소를 둘러싸고 있는 지방조직을 다시 제자리에 넣어주고 근육조직을 봉합한 후 바깥 피부 쪽 절개부분도 봉합하였다.

Vaginal cytology의 관찰

난소이식 후 2주간의 회복기간을 둔 후에 생쥐의 estrus cycle의 회복을 관찰하기 위해 vaginal cytology를 조사하였다. Vaginal smear를 통해 얻어진 세포를 슬라이드 글라스 위에 도말하여 광학현미경으로 관찰하였다. Vaginal cytology는 주로 cornified epitherial

cell이 관찰되는 시기를 estrus로 구분하여 조사하였다.

난소이식 후 조직학적 분석

이식 된 난소의 상태와 발달 정도를 보기 위해 난소를 이식한 생쥐들을 4주 후에 경추 도살하여 조직학적 준비를 하였다. 이식한 부위의 조직 전체를 10% Neutral buffered formalin solution에 고정한 후 알코올 처리과정을 거쳐 탈수시키고 xylene에 투명화 시킨 후 paraffin block을 만들어 5μm 두께로 절편을 만들었다. 조직이 시작되는 부분부터 10개의 절편마다 1개씩 슬라이드 글라스 위에 올려서 조직이 끝나는 부분까지 serial section하여 이식된 난소가 관찰될 수 있도록 하였다.

통계분석

결과의 통계분석은 χ^2-test를 사용하여 검정하였으며, p값이 0.05이하인 경우를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결과

1. Estrus cycle의 회복

난소이식 후 2주 동안 회복기를 준 후, 다음 2주 동안 vaginal cytology를 조사하여 이식된 난소의 기능을 조사하였다. Vaginal cytology 관찰 시에 epitherial cell이 주로 관찰되는 시기를 proestrus, cornified epitherial cell이 관찰되는 시기를 estrus, 소수의 cornified epitherial cell과 leucocytes가 함께 관찰되는 시기를 metestrus, 그리고 leucocytes만 관찰되는 시기를 diestrus로 구분하였다. 동결처리하지 않은 neonatal 난소를 바로 이식해준 Fresh group에서는 전체 25마리중 16마리 (64.0%)에서 estrus cycle이 회복되었고, 1분간의 동결 처리하여 해동과정을 거친 Frozen 1분 group에서는 전체 25마리 중 9마리 (36.0%), Frozen 3분 group의 경우는 24마리 중 18마리 (75.0%)에서 cycle이 회복되었다 (표 1).

2. 동소이식된 난소의 발달

4주령 된 생쥐를 마취시키고 등 쪽에서 원래의 난소를 제거한 다음, fresh 또는 frozen-thawed neonatal 생쥐의 난소를 그 자리에 대신 넣어주는 동소이식을 수행하였다. 이식된 생쥐에서 estrus cycle 회복으로 난소의 존재를 간접확인 한 후에도 실제로 이식한 부분에 난소가 존재하는지, 어느 정도 발달하였는가 여부를 확인하고자 이식한 부위의 조직을 serial section하여 조직 전체를 관찰하였다 (표 1). 이식 4주 후에 생쥐를 희생하여 난소조직을 회수하여 조직검사를 하였을 경우 fresh group에서는 21마리 중 12마리 (57.1%), 1분 frozen group에서는 24마리 중 8마리(33.3%), 그리고 3분 frozen

group에서는 17마리 중 11마리 (64.7%)에서 난소조직이 존재함을 확인할 수 있었다.
그림 2의 각 사진들은 이식 전의 neonatal 난소의 모습 (a)과 이식 4주 후의 난소의 모습 (b)을 나타내고 있다. Fresh (그림 1A)나 frozen 3분(그림 1B) 모두 정상적인 발달을 한 것을 볼 수 있었으며, primordial, primary, secondary, preovulatory follicle, 그리고 황체까지 난포의 각 발달 단계를 모두 관찰할 수 있었다.

고찰 및 결론

본 연구에서는 neonatal 생쥐의 fresh한 난소를 동소이식 하였을 때와 초자화 냉동 후의 난소를 동소이식 하였을 때 난소가 기능을 회복하고 난포의 발달이 일어났음을 확인할 수 있었다.

난소조직의 냉동보존에 관한 연구로는 1960년 Parrott이 생쥐난소를 냉동한 후 이식하여 산자를 얻음으로서 냉동 후 난소의 기능이 회복됨을 최초로 보고하였다 (Parrott, 1960). 그 후 난소 조직의 냉동보존에 큰 관심을 기울이지 않다가 1990년대에 이르러 많은 연구들이 진행되고 있다. 1994년 Harp등과 1996년 Cox등은 1.4M DMSO를 항동해제로 사용하여 생쥐난소를 slow freezing 방법으로 냉동한 후 이식하여 난소기능의 회복을 관찰하였다 (Harp et al., 1994; Cox et al., 1996). 그리고 1997년 Gunasena등은 생쥐난소를 냉동 한 후 같은 종의 생쥐에 이식하거나, 다른 종인 immunodeficient 생쥐에 이식하여 모두 산자를 얻었다고 보고하였다 (Gunasena et al., 1997a; 1997b). 이들이 생쥐난소를 냉동할 때 사용한 방법은 이미 Harp등이 사용하였던 1.4M DMSO를 항동해제로 사용하는 slow freezing 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 위에서 언급한 지금까지의 생쥐난소를 이용한 냉동·융해후의 이식을 통한 기능회복을 조사해 본 실험들은 slow freezing 방법을 이용한 것이 대부분이다. 본 연구에서는 초자화 냉동법 (vitrification)으로 생쥐난소를 냉동하였는데, 이 방법은 slow freezing에 비하여 그 과정이 매우 간편하고 경제적이어서 이 방법을 임상에 사용하였을 때 많은 이점이 있다고 할 수 있겠다. 그러므로, 본 실험은 초자화 냉동법으로 생쥐의 난소를 냉동한 후 동소이식을 하여 난소기능의 회복을 확인함으로서 초자화 냉동법의 안정성을 입증했다고 할 수 있다.

생쥐의 neonatal 난소는 원시난포로만 이루어져 있기 때문에 이식 후 조직을 확인했을 때 primary follicle 이상의 여러 발달단계의 난포가 나타난다면 그 발달한 난포는 neonatal 난소가 이식 후 체내에서 자리를 잡고 난포의 성장과 발달이 이루어진 것이라고 확인 할 수 있다. 본 저자들은 이미 수행된 전 실험에서 사람의 난소 피질조직을 이용하여 초자화 냉동법에 적합한 조건을 조사하여 보았는데, 37℃나 4℃보다는 RT (Room Temperature)에서 항동해제를 처리하였을 때 초자화 냉동 후 난소조직내의 난포 생존율이 가장 좋은 것을 확인하였다 (Lee et al., in press). 따라서 neonatal 생쥐난소의 초자화 냉동 시에도 항동해제인 EG5.5를 RT에서 처리하였다. 또한 neonatal 생쥐의 난소는 크기가 작고 사람의 난소 피질조직에 비하여 fibrous tissue가 없기 때문에 초자화 냉동 시의 최적 시간을 찾기 위해 EG5.5에 1분과 3분으로 난소를 처리하여 보았다.

난소를 이식한 결과 난소기능이 회복된 것은 이식된 생쥐들은 2주 후부터 vaginal cytology로 estrus cycle이 다시 돌아감을 관찰 할 수 있었다. Fresh group에서는 64%의

생쥐가 난소기능의 회복을 보였고 항동해제인 EG5.5에 1분 처리한 군은 36%, 3분 처리한 군은 75%의 회복을 보여서 3분 처리한 군이 1분 처리한 군 보다 더 높은 비율의 난소기능 회복을 나타내었다. 이것은 RT에서 1분간 처리한 군은 3분에 비하여 EG5.5가 조직 내에 충분하게 침투하지 못했기 때문으로 사료된다.

이식된 생쥐에서 estrus cycle의 회복 뿐 아니라 실제로 이식한 부분에 난소가 존재하는지의 여부를 확인하고자 이식한 부위의 조직을 serial section하여 조직 전체를 관찰하였을 때 fresh group에서는 57.1%, EG5.5에 1분 처리한 군은 33.3%, 3분 처리한 군에서는 64.7%에서 난소가 관찰되었다. 역시 estrus cycle의 회복성적과 마찬가지로 3분 처리군이 1분 처리 군에 비하여 좋은 성적을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 이식 후의 난소의 모습을 관찰한 결과 primordial follicle 뿐만 아니라, primary, secondary, preovulatory follicle 및 황체까지 여러 가지 발달단계가 모두 존재하였으므로 이식된 난소에서 정상적인 난포의 발달이 일어난 것을 확인 할 수 있었다.

결론적으로 본 실험을 통해 neonatal 생쥐의 난소를 동소이식 하였을 때 이식된 난소에서 난포의 발달을 볼 수 있었으므로 난소이식이 잘 수행되었음이 먼저 확인되었고, 초자화 냉동법을 이용하여 난소를 냉동한 후 이식하였을 때에도 난소의 기능회복은 물론이고 난포의 발달이 정상적으로 이루어짐을 확인할 수 있었다. 그러므로, 본 실험 결과에 의해 초자화 냉동법에 의한 난소냉동법의 안정성이 입증되었다고 할 수 있다. 그리고, neonatal 생쥐 난소의 초자화 냉동 시에는 항동해제인 EG5.5를 RT에서 3분간 처리해 주는 것이 1분간 처리 해 주는 것보다 더 좋은 조건임을 확인 할 수 있었다. 그러나 본 실험에서는 초자화 냉동 후에 이식된 난소에서 배란되는 난자의 발달능력이 정상적인지의 여부에 대해서는 확실히 언급 할 수 없다. 그러므로, 난소가 이식된 생쥐에서 나오는 난자가 정상적인 지를 확인하기 위해서는 앞으로 산자를 얻는 실험이 계속 진행되어야 할 것이라고 사료된다.

인용문헌

Carroll J, Gosden RG: Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Human Reprod* 1993, 8, 1163-1167.

Cox S-L, Shaw J, Jenkin G: Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *J Reprod Fertil* 1996, 107, 315-322.

Gunasena KT, Villines PM, Critse ES, Critse JK: Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Human Reprod* 1997a, 12, 101-106.

Gunasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Critser ES, Critser JK: Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol Reprod* 1997b, 57, 226-231.

Harp R, Leibach J, Black J, Keldahl C, Karow A: Cryopreservation of murine ovarian tissue. *Cryobiology* 1994, 31, 336-343.

Lee KA, Lee SH, Ha SD, Yoon SJ, Ko JJ, Lee WS, Yoon TK, Cha KY: Cryopreservation of the human adult ovarian cortical tissues by vitrification. *Korean J Fertil Steril* 1999, (in press).

Martino A, Songsasen N, Leibo SP: Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996, 54, 1059-1069.

Parrott DMV: The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil* 1960, 1, 230-241.

Figure legends

Figure 1. Microphotographs of orthotopically grafted mouse ovarian tissues. Tissues of A (fresh) and B (frozen 3-minute) are showing the ovaries before transplantation (a) and 4 weeks after transplantation (b) in each condition. Scale bar represents 200μm.

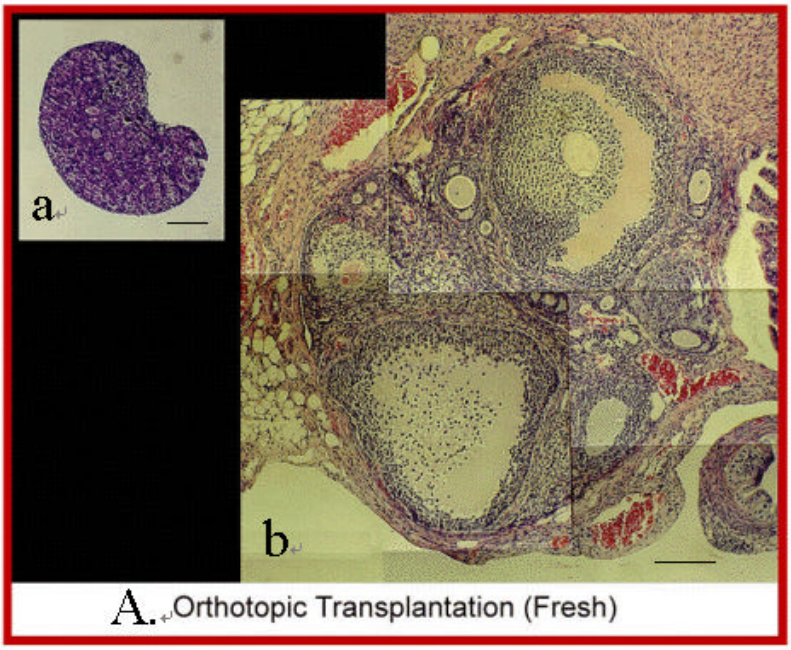

Table 1. Success rate at 4 weeks after ovarian transplantation.

Group	No. of Mouse (%)		
	Transplanted	With estrus cycles[1]	With survived ovaries[2]
Fresh	25	16 (64.0)[a]	12/21 (57.1)[3,a]
Frozen, 1 min	25	9 (36.0)[b]	8/24 (33.3)[4,b]
Frozen, 3 min	24	18 (75.0)[a]	11/17 (64.7)[5,a]

[1] No. of mouse showed estrus cycles during 2~4 weeks after transplantation.
[2] No. of mouse with survived ovaries at 4 weeks after transplantation.
[3] 2 animals sacrificed at 2 weeks; 2 animals dead before 4 weeks
[4] 1 animal sacrificed at 2 weeks
[5] 1 animal sacrificed at 2 weeks; 1 animal dead before 4 weeks;
5 animals showed only one estrus cycle
[a,b] Different letters (a, b) indicate significant differences ($p<0.05$) in the column.

Figure 1 A&B

원본은 함께 보내는 floppy disket에 MS WORD file로 들어있습니다.