

동결 전 단계적 노출처리방법이 유리화동결 및 초급속동결-융해 후 생쥐 성숙난자의 생존력에 미치는 영향에 관한 연구

부산대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 부산대학교병원 불임클리닉²

김상우¹ · 이재익² · 김미경² · 이영아¹ · 이규섭^{1,2} · 윤만수¹

Effects of the Stepwise Exposure Treatments Before Freezing on the Survival Capacity of the Frozen-Thawed Mouse Mature Oocytes by Vitrification or Ultra-Rapid Freezing

Sang Woo Kim¹, Jae Ik Lee², Mi Kyung Kim², Young Ah Lee¹,
Kyu Sup Lee^{1,2}, Man Soo Yoon¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Pusan National University,

²Infertility Clinic, Pusan National University Hospital, Pusan, Korea

Objective: This study was carried out to compare the effects of the stepwise exposure treatments on the morphological normality, fertilization and blastocyst formation rate of the frozen-thawed mouse mature oocytes by vitrification or ultra-rapid freezing and to use as a fundamental data for the cryopreservation of human oocytes.

Materials and Methods: The morphological normality and fertilization rates of the vitrified and ultra-rapid frozen mouse mature oocytes after three-stepwise exposure treatments (1step, 3step and 5step) were observed. After choosing the 3step exposure treatment groups, we observed the morphological normality and fertilization, blastocyst formation rate of the vitrified and ultra-rapid frozen mouse mature oocytes.

Results: The morphological normality and fertilization rates of the vitrified mouse mature oocytes after three-stepwise exposure treatments (1step, 3step and 5step) were 75%, 85%, 88% and 58%, 61%, 54% respectively. There were no significant differences among treatments ($p>0.05$). The morphological normality and fertilization rate of the control was 92% and 65%. There were no significant differences in fertilization rate among control and treatments ($p>0.05$). The morphological normality and fertilization rates of the ultra-rapid frozen mouse mature oocytes after three-stepwise exposure treatments (1step, 3step and 5step) were 83%, 83%, 84% and 75%, 63%, 56% respectively. There were no significant differences among treatments ($p>0.05$). The morphological normality and fertilization rate of the control was 95% and 67%. There were no significant differences among control and treatments ($p>0.05$). The morphological normality and fertilization rate of the vitrified or ultra-rapid frozen mouse mature oocytes after 3step exposure treatment were 69% and 75%, respectively. The blastocyst formation rate was 60% and 57%. The results did not differ significantly between vitrification and ultra-rapid freezing ($p>0.05$).

Conclusion: As known in the above results, there were no significant differences in the fertilization and blastocyst formation rate of the frozen-thawed mouse mature oocytes by vitrification or ultra-rapid freezing among the control and treatments. It is suggested that vitrification and ultra-

rapid freezing method were effective for the cryopreservation of mouse mature oocytes.

Key Words: Vitrification, Ultra-rapid freezing, Cryopresvstion

동물연구에서 배아 (embryo)와 난자 (oocyte)의 동결보존은 주로 멸종 위기 종의 보존, 우량가축의 형질보존, 수송 및 생산을 위한 방법으로 완만동결법 (slow freezing)에 이어 급속동결 (rapid freezing)과 유리화동결 (vitrification) 방법이 개발되어 높은 생존율이 보고되고 있다.¹

또한 사람의 시험관아기 기술에서 과배란유도법 (controlled ovarian hyperstimulation)의 발달로 많은 수의 성숙난자를 얻을 수 있게 됨에 따라 이식하고 남은 잉여난자의 처리문제가 대두되었다. 인간배아의 동결보존은 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 보조생식술에서 중요한 위치를 차지하게 되었으며, 동물연구에서 축적된 동결기술을 인간배아의 동결보존 (cryopreservation)에 응용하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 인간배아의 동결보존은 윤리적인 면과 법률적인 측면에서 많은 논란의 여지가 있어 최근에는 수정되지 않은 난자의 동결보존에 관심이 집중되고 있다.²

난자의 동결보존은 난소암으로 인한 난소기능의 상실과 항암치료와 같은 잠재적으로 생식력을 잃을 수 있는 여성들에게 생식력을 연장시켜 줄 수 있고 또한 시험관아기 기술에서 이식하고 남은 잉여난자를 동결보존함으로써 기술주기마다 과배란유도와 난자채취를 위한 기술이 필요하지 않으므로 불임여성에게 시간적, 경제적 부담을 줄일 수 있기 때문에 난자의 동결보존이 더욱 필요하다. 이러한 필요성에도 불구하고 1986년 Chen³에 의해 배아의 동결과 같은 완만동결법으로 보존된 난자에 의한 첫 임신이 보고된 이후 Al-Hasani 등⁴과 Van Uem 등⁵에 의해서도 성공적인 임신이 보고되었지만, 이의 임신율은 극히 저조한 실정이다.^{6,7} 1985년 Rall과 Fahy⁸는 동결보호제가 고농도로 농축된 동결액을 초급속 냉각하면 동결액이 병정이 형성되지 않는 유리화상태로 되는 유리화동결법을 보고하였으며 Takeda 등⁹은 생쥐의 수정란을 상온에서 액체질소에 곧바로 침지하는 초급속동결법을 개발하였다. 난자는 배아보다 온도변화와 삼투압에 아주 민감하여 저온에서 장시간 냉각처리해야 하는 완만동결법은 낮은 생존율을 극복할 수 없어 최근에는 유리화동결을 이용한

난자의 동결보존에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

이에 본 연구는 동결 전 단계적 노출처리방법이 유리화동결 및 초급속동결-융해 후 생쥐 성숙난자의 생존력에 미치는 영향을 규명하기 위하여 각각의 동결-융해 후 난자의 회수율, 정상형태율, 그리고 체외수정 후의 수정률 및 배아발달율을 비교하여 인간난자의 동결법 선택에 대한 기초자료로 활용하기 위하여 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 생쥐 제 1대 잡종 (CBA, ♂ x C 57BL6/J, ♀)의 생후 4~6 주령의 암컷 및 생식능력이 확인된 생후 10~12 주령의 수컷을 선택하여 12시간/12시간 light cycle을 유지하는 부산대학교병원 동물사육장에서 약 2주 동안 온도와 습도를 적절하게 조절하고 사료와 물은 자유롭게 섭취토록 한 후 실험에 이용하였다.

2. 과배란유도

사육환경에 적응된 암컷 생쥐 6~8 마리를 임의 추출하여 발정주기에 관계없이 과배란유도를 위해 pregnant mare's serum gonadotropin (G-4877, Sigma, USA) 7 IU를 복강내 주사하고 48시간 후 human chorionic gonadotropin (hCG; C-8554, Sigma, USA) 7 IU를 복강내 주사하였다. 주사용 호르몬은 생리식염수에 희석하여 0.5 ml씩 1회용 주사기에 분주한 후 냉동실 (-20℃)에서 보관하여 사용하였다.

3. 난자의 획득

hCG 주사 후 13~15 시간 사이에 암컷을 경추 탈구법으로 도살시켜 절취한 양측 난관 팽대부를 0.3% bovine serum albumin (BSA; A-9647, Sigma, USA)가 첨가된 2 ml의 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; 14040-026, Gibco, USA)이 담긴 직경 35 mm의 petri dish (3001, Falcon, USA)에서 3회 세척한 후 실체현미경 하에서 30 gauge 주사침으로 난관 팽대부를 조심스럽게 천자하여 성숙

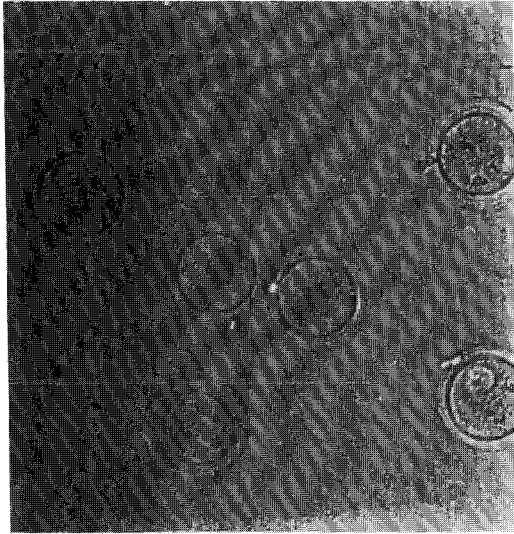


Figure 1. Appearance of the mouse mature oocyte. Cumulus cell free oocyte (first polar body visible) (Metaphase II, $\times 200$).

된 난자만을 채취하였다. 채취된 난자는 4 mg/ml의 BSA과 150 IU hyaluronidase (H-3884, Sigma, USA)가 첨가된 PBS에서 난자 주위의 난구세포 (cumulus cell)를 제거한 후 37°C, 5% CO₂로 조절된 배양기에서 1~2 시간 동안 배양하여 정상적인 형태의 성숙난자만을 실험에 이용하였다 (Figure 1).

4. 동결보존액의 제조

1) 유리화동결 보존액

유리화동결 보존액 (VS; vitrification solution)은 D-PBS를 기본용액으로 dimethyl sulfoxide (DMSO; D-5879, Sigma, USA)와 sucrose (Sigma, S-7903, USA)를 첨가하여 제조하였다. 제조방법은 D-PBS 기본용액에 1 M의 sucrose를 첨가하여 완전 용해시킨 후 6.0 M의 DMSO를 첨가하여 용해하고 10% fetal bovine serum (FBS)를 혼합하여 이 용액을 100% VS로 정하였다. 농도별 VS는 10% FBS가 첨가된 D-PBS로 다음과 같이 희석하여 10 ml씩 제조하였다.

제조 후 모든 용액은 0.2 μ m filter (Coming, USA)로 여과하고 냉장보관하여 사용하였다.

VS (100%)	: D-PBS + 1 M sucrose + 6 M DMSO + 10% FBS
80% VS	: 8.0 ml VS + 2.0 ml D-PBS with 10% FBS (Solution I)
65% VS	: 6.5 ml VS + 3.5 ml D-PBS with 10% FBS (Solution II)
40% VS	: 4.0 ml VS + 6.0 ml D-PBS with 10% FBS (Solution III)
25% VS	: 2.5 ml VS + 7.5 ml D-PBS with 10% FBS (Solution IV)

2) 초급속동결 보존액

초급속동결 보존액 (UFS; Ultrarapid freezing solution)은 D-PBS를 기본용액으로 DMSO와 sucrose를 첨가하여 제조하였다. 제조방법은 D-PBS 기본용액에 0.5 M의 sucrose를 첨가하여 완전 용해시킨 후 3.5 M의 DMSO를 첨가하여 용해하고 20% FBS를 첨가하여 잘 혼합하여 사용하였다. 이 용액을 100% UFS로 정하였으며 농도별 UFS는 20% FBS가 첨가된 D-PBS로 다음과 같이 희석하여 10 ml씩 제조하였다.

제조 후 모든 용액은 0.2 μ m filter (Coming, USA)로 여과하고 냉장보관하여 사용하였다.

100% UFS	: D-PBS + 0.5 M sucrose + 3.5 M DMSO + 20% FBS
2.5 M DMSO	: 7.1 ml UFS + 2.9 ml D-PBS with 20% FBS (Solution I)
2.0 M DMSO	: 5.7 ml UFS + 4.3 ml D-PBS with 20% FBS (Solution II)
1.5 M DMSO	: 4.2 ml UFS + 5.8 ml D-PBS with 20% FBS (Solution III)
0.5 M DMSO	: 1.4 ml UFS + 8.6 ml D-PBS with 20% FBS (Solution IV)

5. 동결방법

1) 유리화동결법

유리화동결은 100% VS으로 제조한 용액 (Sol. I - Sol. IV)에서 노출용액의 농도와, 시간을 다르게 하여 세 처리군으로 나누어 동결하였으며, 동결방법은 다음과 같다.

Control	: exposure to VS for 5 min -> dilution -> culture
1 Step exposure	: exposure to VS for 5 min -> freezing
3 Step exposure	: 20% VS (3 min) -> 65% VS (1 min) -> VS (1 min) -> freezing
5 Step exposure	: 20% VS (1 min) -> 40% VS (1 min) -> 65% VS (1 min) -> 80% VS (1 min) -> VS (1 min) -> freezing

2) 초급속동결법

초급속동결법은 100% UFS으로 제조한 용액 (Sol. I - Sol. IV)에서 노출용액의 농도와 시간을 다르게 하여 세 처리군으로 나누어 동결하였다. 동결방법은 다음과 같다.

Control	: exposure to UFS for 3 min -> dilution -> culture
1 Step exposure	: exposure to 3.5 M DMSO for 3 min -> freezing
3 Step exposure	: 0.5 M DMSO (1 min) -> 1.5 M DMSO (1 min) -> 3.5 M DMSO (1 min) -> freezing
5 Step exposure	: 0.5 M DMSO (30 sec) -> 1.5 M DMSO (30 sec) -> 2.0 M DMSO (30 sec) -> 2.5 M DMSO (30 sec) -> 3.5 M DMSO (30 sec) -> freezing

유리화동결과 초급속동결은 모두 상온 (25~27℃)에서 실행되었으며, straw에 loading할 난자의 분실을 막기 위하여 mouth pipette으로 난자를 pipetting하여 직접 straw 안으로 loading 하였고 straw powder로 봉입 (sealing)한 후 액체질소 (LN₂)

Straw powder	1 M sucrose	Air	6 M DMSO	Air	6 M DMSO containing oocytes	Air	6 M DMSO	Air	1 M sucrose	Cotton plug
--------------	-------------	-----	----------	-----	-----------------------------	-----	----------	-----	-------------	-------------

2-1. Vitrification straw

Straw powder	0.5 M sucrose	Air	3.5 M DMSO	Air	3.5 M DMSO containing oocytes	Air	3.5 M DMSO	Air	0.5 M sucrose	Cotton plug
--------------	---------------	-----	------------	-----	-------------------------------	-----	------------	-----	---------------	-------------

2-2. Ultra-rapid straw

Figure 2. Diagram of 0.25 ml straw loaded with freezing and dilution solution just before cryopreservation.

vapour에서 5분 동안 정치한 후 액체질소에 침적하였다 (Figure 2, 3).

6. 용해방법

1) 유리화동결의 용해

24시간 이상 액체질소에서 냉동 보존하였던 straw를 공기 중에서 10초간 holding 후, 20℃ 항온 수조에서 10초간 흔들면서 용해하였으며 air bubble를 제거한 후 organ dish에서 straw 내용물 속의 난자를 mouth pipette으로 pipetting하여 실온의 1 M sucrose 용액에서 3분간 회석한 후 10% FBS가 첨가된 D-PBS에서 3회 세척한 후 생사판정을 하였다.

2) 초급속동결의 용해

24시간 이상 액체질소에서 냉동 보존하였던

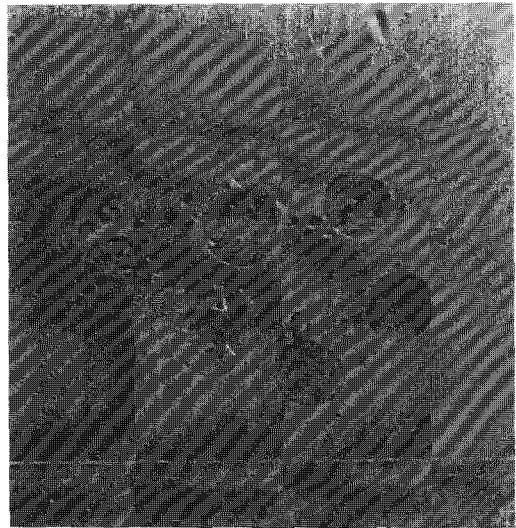


Figure 3. Appearance of the mouse mature oocyte exposed to VS for 1 min before cryopreservation.

straw를 37°C 항온수조에서 5초간 흔들면서 용해하였으며 air bubble를 제거한 후 organ dish에서 straw 내용물 속의 난자를 mouth pipette으로 pipetting하여 실온의 0.5 M sucrose 용액에서 5분간 희석한 후 10% FBS가 첨가된 PBS에서 3회 세척한 후 생사판정을 하였다.

7. 생존판정

동결-융해된 난자는 역반사 현미경 (Eclipse TE 300, Nikon, Japan)의 200 배율에서 형태적인 생존을 판정하였다. 세포질 (cytoplasm)에 응집된 현상이 나타나지 않고 깨끗하며 위란강 (perivitelline space)이 넓지 않고, 투명대가 손상되지 않은 것을 생존한 난자로 판정하였다.

8. 체외수정과 배양

체외수정을 위하여 3일 동안 교미한 경험이 없는 10~12 주령의 생쥐 수컷 2마리를 경추탈추법으로 도축하여 외과적 방법으로 정소상체를 채취하여 BSA가 첨가되지 않은 신선한 T6 배양액에서 3회 세척 후 1.6% BSA가 첨가된 T6 배양액 1 ml에 정소상체 미부를 절개하여 흘러나오는 정자괴를 채취하여 suspension한 후 수정능 (capacitation) 획득을 위하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 정치하였다. 체외수정을 위하여 대조군

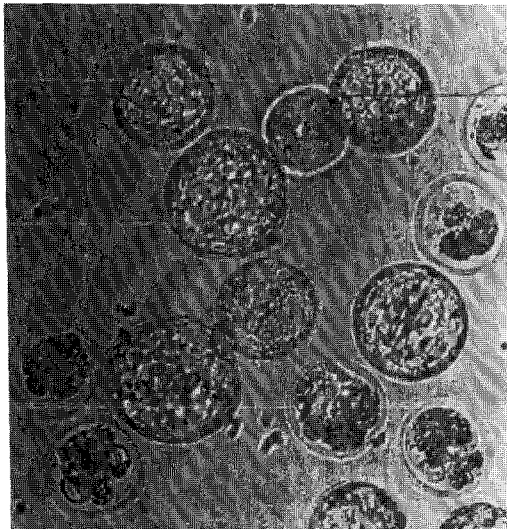


Figure 4. Development of blastocyst after in-vitro fertilization of the frozen-thawed mouse mature oocyte by vitrification or ultra-rapid freezing.

과 실험군의 난자를 0.9 ml의 1.6% BSA + T6 배양액이 들어있는 organ dish (Falcon, USA)에 각각 3~5개의 난자를 옮긴 후, 수정능 획득을 위하여 배양해 두었던 정자 부유액 0.1 ml을 첨가하여 수정 시켰으며, 5시간 후 0.4% BSA가 첨가된 T6 배양액으로 3회 세척 후 19시간 동안 추가 배양하여 수정 후 24시간째에 2-cell로 발달한 것을 수정된 것으로 간주하였으며, 4일간 추가 배양하며 포배기 형성률을 조사하였다 (Figure 4).

9. 통계처리

통계 검증은 SPSS pc version 8.0을 이용한 Chi-square test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 대조군과 실험군간에 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 유리화동결-융해 후 생쥐 난자의 회수율, 정상형태율 및 수정률의 비교

과배란유도된 생쥐의 난관 팽대부를 관류하여 349개의 난자를 획득하여 대조군은 100% 유리화동결액에 노출 후 희석하여 배양하였다. 실험군은 100% 유리화동결액에 5분간 노출 후 동결한 1 step, 25%, 65%, 100% 유리화동결액에 각각 3분, 1분, 1분간 노출 후 동결한 3 step, 25%, 40%, 65%, 80%, 100% 유리화동결액에 각각 1분간 노출 후 동결한 5 step의 세 군으로 하여, 각각의 방법에 따른 동결-융해 후의 회수율, 정상형태율 및 수정률을 비교하였다.

대조군과 step 1, 3, 5의 세 실험군의 회수율은 각각, 100%, 97%, 96%, 94%로써 실험군 사이에는 통계학적으로 유의한 차이는 없으나 처리단계가 많아질수록 회수율이 약간 감소하는 경향이 있었다 ($p > 0.05$). 정상형태율은 대조군이 92%, step 1, 3, 5의 세 실험군이 각각 75%, 85%, 88%로써 대조군이 다소 높은 정상형태율을 나타내었으나 유의한 차이는 없었다 ($p > 0.05$). 체외수정 후 24시간째에 2-세포기로 발생한 배아를 수정된 것으로 정의한 체외수정률은 대조군이 65%, 실험군에서 각각 58% (1 step), 61% (3 step), 54% (5 step)를 나타내어 실험군과 대조군 그리고 각각의 실험군에서도 유의한 차이가 없어 동결방법이 융해 후의 수정률에 영향을 미치지 않았다 ($p > 0.05$) (Table 1).

Table 1. Effects of stepwise exposure on the frozen-thawed mouse mature oocytes by vitrification

Stepwise methods	No. of oocytes				No. of 2-cell embryos after IVF (%)
	exposed	frozen (%)	recovered (%)	normal (%)	
1 step	110	110	107 (97)	80 (75)	46 (58)
3 step	92	92	88 (96)	75 (85)	46 (61)
5 step	97	97	91 (94)	80 (88)	43 (54)
Control	50	50	46 (92)	46 (92)	30 (65)

Table 2. Effects of stepwise exposure on the frozen-thawed mouse mature oocytes by ultra-rapid freezing

Stepwise methods	No. of oocytes				No. of 2-cell embryos after IVF (%)
	exposed	frozen (%)	recovered (%)	normal (%)	
1 step	81	81	77 (95)	64 (83)	35 (55)
3 step	76	76	75 (99)	62 (83)	39 (63)
5 step	78	78	70 (90)	59 (84)	33 (56)
Control	40	40	40 (100)	38 (95)	25 (67)

Table 3. Comparison of the fertilization and blastocyst formation rate of the frozen-thawed mouse mature oocytes by vitrification or ultra-rapid (UR) freezing after 3 step exposure

Freezing methods	No. of frozen oocytes	No. of oocytes. morphologically normality (%)	No. of 2-cell embryos (%) after IVF	No. of blastocysts (%)
Control	72	72 (100)	57 (79)	43 (75)
Vitrification	148	102 (69)	60 (59)	36 (60)
Control	64	64 (100)	50 (78)	36 (72)
UR	138	104 (75)	56 (54)	32 (57)

2. 초급속동결-융해 후 생쥐 난자의 회수율, 정상형태율 및 수정률의 비교

난관 팽대부를 관류하여 275개의 난자를 획득하여 대조군은 초급속동결액에 3분간 노출 후 회석하였다. 실험군은 초급속동결액에 3분간 노출 후 동결한 1 step, 0.5 M, 1.5 M, 3.5 M DMSO에 각각 1분씩 노출 후 동결한 3 step, 그리고 0.5 M, 1.5 M, 2.0 M, 2.5 M, 3.5 M DMSO에 각각 30초씩 노출 후 동결한 5 step의 세 군으로 하여 각각의 방법에 따른 동결-융해 후의 회수율, 정상형태율 및 수정률을 조사하였다.

회수율은 대조군이 100%, 실험군의 step 1, 3, 5에서 각각 95%, 99%, 90%로써 모두 비슷한 회수

율을 나타내었다. 정상형태율은 대조군이 95%, step 1, 3, 5의 세 실험군이 각각 83%, 83%, 84%로써 대조군과 실험군간에 유의한 차이는 없었다 ($p>0.05$). 수정률은 대조군이 67%, 실험군에서 각각 75% (1 step), 63% (3 step), 56% (5 step)를 나타내어 대조군과 실험군 사이에는 유의차가 없었다 ($p>0.05$) (Table 2).

3. 3단계 노출방법을 이용한 유리화 및 초급속동결-융해 후의 생쥐 성숙난자의 정상형태율, 수정률 및 포배기 형성률의 비교

동결방법에 따른 융해 후의 수정률이 가장 좋은 3단계 노출법을 선택하여 앞의 실험과 같은 방법으로 하여 정상형태율, 수정률 및 포배기 형

성률을 비교하였다. 대조군은 동결액에 3단계 노출 후 동결하지 않고 회석하여 배양한 것으로 하였다. 유리화 및 초급속동결-융해 후의 정상형태율과 수정률은 각각 69%와 75%, 59%와 54%였으며, 포배기 형성률은 60%와 57%로써 두 방법간에 유의한 차이는 없었다 ($p>0.05$) (Table 3).

고 찰

포유류 배아의 동결은 1972년 Whittingham¹⁰과 Wilmut¹¹가 완만동결법으로 DMSO를 동결보존액으로 사용하여 8-세포기 생쥐 배아의 동결보존과 1977년 생쥐 상실배 (morula)를 동결융해한 후 이식하여 산자생산의 성공을 보고한 이후 동결융해 후의 생존율 향상과 다른 종에의 적용 등에 대한 많은 연구가 진행되어 Al-Hasani 등⁴은 토끼에서, Fuku 등¹²은 소에서 산자생산을 보고함으로써 동결분야에서 눈부신 발전이 이루어왔다.

1981년부터 동물에서의 원리를 인간배아의 동결보존에 적용하기 시작하여 1983년 Trounson과 Mohr¹⁴는 8-세포기 인간배아를, 1984년 Zeilmaker 등¹⁵은 4-세포기 인간배아를 완만동결법으로 동결보존 후 자궁내에 이식하여 성공적인 임신율 보고하였으며, 1985년에는 Cohen 등이 인간 포배기 배아를 동결보존하여 임신에 성공한 후에도 최근까지의 평균 임신율과 출산율은 15%와 12% 정도로 저조한 실정이다.¹⁶

완만동결보존 후 생존율이 낮은 이유는 낮은 농도의 침투성 내동제 (permeable cryoprotectant)에만 의존하여 세포내부의 자유수를 탈수시키기 때문에 동결과정에서 생성되는 세포내외부의 빙정형성 (ice crystallization)과 세포내부의 염분 농도 증가에 기인한다.¹⁷⁻¹⁹ 또한 완만동결은 고가의 장비가 필요하고 소요되는 시간이 많기 때문에 이를 개선하려는 연구가 진행되어 Wood 등²⁰과 Leibo 등²¹에 의해 동결보존액에 sucrose를 첨가하여 동결 전 세포내의 자유수를 탈수시킴과 동시에 세포외부를 보호함으로써 고가의 장비없이 단시간에 급속동결이 가능하게 되었다.^{22,23} 그러나, 많은 동물실험 결과 급속동결법 역시 충분한 탈수가 이루어지지 않아 세포내외부에 형성되는 빙정형성 때문에 융해 후의 생존율은 높으나 포배기 형성률이 낮은 문제점이 제기되었다.^{17,24}

1985년 Rall과 Fahy 등⁸은 20.5% DMSO, 15.5% acetamide, 10% propanediol의 침투성 내동제와 비

침투성 내동제인 6% polyethyleneglycol을 혼합하여 -196℃에서 빙정이 형성되지 않는 유리화동결법으로 생쥐 8-세포기의 동결보존에 성공하였다고 보고하였다. 유리화동결은 고농도의 동결보존액이 저온에서 강한 점성을 갖게 되어 부피의 변화와 빙정형성 없이 고체화되는 이론이다.²⁵ 초기의 유리화동결은 동결액의 높은 농도때문에 세포와 동결액의 삼투압 차가 커 세포에 해로운 영향을 줄 수 있어 4℃에서 조작해야 하는 단점이 지적되었다.⁸

그러나, 1990년 Kasai 등²⁶은 실온에서 40% ethyleneglycol, 30% ficoll, 20% sucrose를 혼합하여 생쥐 상실배를 동결융해 후 98%의 생존율을 보고한 이후 유리화동결법에 대한 많은 연구가 이루어져 이 분야의 급격한 발전이 이루어졌다.

최근에는 인간배아의 동결보존에 대한 법적, 윤리적 문제점이 대두됨에 따라 미수정 난자의 동결보존에 많은 관심이 집중되고 있다. 또한 인간 보조생식술 중 과배란유도의 발달로 많은 난자를 얻을 수 있게 되어 이식하고 남은 잉여난자의 보존이 필요하게 되었다. 잉여난자의 동결보존은 시술주기마다 과배란유도와 난자채취를 위한 시술이 필요하지 않으므로 불임여성에게 시간적, 경제적 부담을 줄일 수 있으며 또한 과배란유도 주기 뿐만 아니라 자연배란 주기에서 임신 기회를 제공함으로써 누적임신율을 높일 수 있으므로 시술기관 및 환자들에게 절실히 요구되는 분야가 되었다. 인간에서 최초의 난자의 동결보존 성공은 1986년 Chen³에 의해서 수정난의 동결과 같은 완만동결법으로 이루어졌으며, Al-Hasani 등⁴과 Van Uem 등⁵에 의해서도 임신성공이 보고되었다. 최근에는 Porcu 등²⁷과 Polak de Fried 등²⁸에 의해서도 임신성공이 보고되었지만 성공률은 극히 저조한 편이다.

이러한 낮은 성공률 때문에 소와 생쥐의 난자를 이용한 많은 연구에서 성숙난자는 낮은 온도 (chilling; 0~15℃)와 삼투압에 아주 민감하다는 결과가 보고된 이후 유리화동결법으로 난자를 동결보존하려는 많은 연구가 시도되었다.^{4,29,30,31}

1987년 Fahy, 1989년 Nakagata가 유리화동결-융해 후 생쥐 성숙난자를,^{25,32} Arav 등³³은 유리화동결-융해 후 돼지난자의 수정란을 이식하여 산자생산을 보고하였으며, Wood 등³⁴은 6 M DMSO에 5% FBS를 첨가하여 제조한 유리화동결액으로 소난자를 동결보존 했을 때 1.5 M DMSO 용액에서

완만동결-융해 후의 배발달율과 산자생산에 차이가 없음을 보고하여 유리화동결에 의한 난자보존 연구에 더욱 활기를 띠게 되었다.

O'neil 등³⁰은 6 M DMSO에 5% FBS를 첨가한 용액을 100% 유리화동결 보존액으로 하여 5% FBS가 첨가된 PBS로 25%와 65% 용액을 제조한 후 단계적 처리로 생쥐 성숙난자를 동결하여 유리화 용액에 노출 후 동결하지 않고 회석하여 배양한 것을 대조군으로 하여 유리화동결의 해를 조사하였다. 융해 후 정상형태율에서는 대조군과 실험군이 각각 90%와 60%로써 유의한 차이가 있었으나, 수정률과 포배기 형성률은 74%와 80%, 68%와 55%로 유의한 차이가 없어 유리화동결의 해가 없음을 보고하였다.

본 연구에서도 6 M DMSO에 10% FBS와 1 M sucrose를 첨가한 용액을 100% 유리화동결 보존액으로 하여 10% FBS가 첨가된 PBS로 25%, 40%, 65%, 80% 용액을 제조하여 세 가지 방법의 단계적 처리로 생쥐 성숙난자를 동결-융해한 후 유리화용액에 노출 후 동결하지 않고 회석하여 배양한 것을 대조군으로 하여 생존율을 비교하였다. 단계적 처리방법에서는 3단계 처리방법이 가장 높은 생존율을 나타내었으나 처리방법간에 유의성은 없었다 ($p>0.05$).

대조군과 실험군 (3단계 처리방법)의 비교에서도 정상형태율과 수정률이 각각 100%와 85%, 64%와 68%로써 유의한 차이 ($p>0.05$)를 보이지 않아 O'neil 등³⁰의 보고와 일치하여 유리화동결의 유해성이 없는 것으로 나타났다. 또한, Van der Elst 등³¹은 3.5 M DMSO에 0.5 M sucrose를 첨가한 동결보존액에서 3분간 노출 후 초급속동결한 생쥐 성숙난자의 동결보존 연구에서 노출 후 동결하지 않은 대조군과 실험군의 수정률은 각각 78%와 69%였으며, 포배기 형성률은 각각 81%와 82%로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다고 보고하였다.

본 실험에서도 3.5 M DMSO에 0.5 M sucrose와 20% FBS를 첨가하여 세 가지 단계적 처리방법으로 생쥐 성숙난자를 초급속동결-융해 후 생존율을 비교하였다. 단계적 처리방법간에는 통계적인 유의성은 없었으나 3단계 처리방법에서 수정률이 약간 높은 65%를 나타내었으며, 노출 후 동결하지 않은 대조군과 3단계 처리방법간에도 정상형태율과 수정률이 각각 67%와 83%, 73%와 65%로써 유의한 차이가 없는 것으로 나타나 초급속

동결법도 생쥐 성숙난자의 동결보존에 효과적임을 시사하였다.

O'neil 등³⁰의 유리화동결 연구와 Van der Elst 등³¹의 초급속동결 연구에서 두 동결방법간에 동결보존액의 농도와 sucrose 첨가 유무, 노출 시간 등의 처리방법이 달라 통계적으로 비교할 수는 없으나 수정률에서는 유리화동결법이 80%로 초급속동결법의 69% 보다 높았으며, 포배기 형성률에서는 초급속동결법이 82%로 유리화동결법의 55% 보다 높은 발달율을 나타내었다. 이는 동결과 융해시 생성되는 빙정형성은 보다 높은 농도에 의한 삼투압의 유해한 영향으로 세포골격과 세포기관에 더 큰 영향을 미치는 것으로 사료되어 이 점을 확인하기 위하여 3단계 처리법으로 초급속동결과 유리화동결 후의 생쥐 성숙난자의 수정률과 포배기 형성률을 조사하였다. 유리화동결과 초급속동결융해 후의 수정률은 각각 59%와 54%, 포배기 형성률은 각각 60%와 57%로써 두 방법간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으나, 이에 대한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 실험은 D-PBS를 기본용액으로 6 M DMSO와 1 M sucrose 10% FBS를 첨가하여 실험한 단계적 유리화동결과 3.5 M DMSO와 0.5 M sucrose, 20% FBS를 첨가하여 실험한 초급속동결 후 생쥐 성숙난자의 정상형태율, 수정률, 포배기 형성률을 비교하였다. 두 방법 모두 단계적 실험군간에 유의한 차이가 없었으며, 동결보존액에 노출 후 동결하지 않은 대조군과 실험군간의 비교실험에서도 유의한 차이가 없었다. 또한, 초급속동결법과 유리화동결법의 비교실험에서도 수정률과 배발달율의 유의한 차이를 보이지 않아 유리화동결법과 초급속동결법이 생쥐난자의 동결보존에 효율적인 방법으로 제안되고 있으나, 인간난자의 동결보존 후의 생존율의 향상을 위한 기초자료로 활용되기 위해서는 많은 추가연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Koninckx PR, Schotsmans P. Frozen embryos:

- Too cold to touch? Spare embryos: symbols of respect for humanity and freezing in the pronuclear stage. *Hum Reprod* 1996; 11: 1841-942.
3. Chen C. Pregnancy after human oocytes cryopreservation. *Lancet* 1986; 1: 884-6.
 4. Al-Hasani S, Kirsch J, Diedrich K, Blanke S, Van der Ven H, Krebs D. Successful embryo transfer of cryopreserved and in vitro fertilized rabbit oocytes. *Hum Reprod* 1989; 4: 77-9.
 5. Van Uem JF, Siebzehrubl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987; i: 752-3.
 6. Fugger EF. Clinical status of human embryo cryopreservation in the USA. *Fertil Steril* 1989; 52: 986-90.
 7. Alikani M, Cohen J. Human oocytes and embryo cryopreservation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1990; 2: 714-7.
 8. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
 9. Takeda T, Elsdon RP, Seidel GE Jr. Effect of cryoprotectant concentration on mouse embryos by development following rapid freezing. *Theriogenology* 1989; 31: 266.
 10. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science* 1972; 178: 411-4.
 11. Wilmut I. The effects of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on the survival of during freezing and thawing. *Life Sci II* 1972; 11: 1071-9.
 12. Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ, Downey BR. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology* 1992; 29: 485-92.
 13. Trounson A, Leeton JF, Wood C, Webb J. Pregnancies in human by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science* 1981; 212: 681-2.
 14. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-9.
 15. Zeilmaker GH, Alberda AT, Van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984; 42: 293-6.
 16. Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985; 2: 59-64.
 17. Szell A, Shelton JN. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J Reprod Fertil* 1986; 76: 401-8.
 18. Szell A, Shelton JN. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1986; 78: 699-703.
 19. Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Effects of equilibration time, precooling and development stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1989; 33(3): 627-36.
 20. Wood MJ, Farrant J. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology* 1980; 17: 178-80.
 21. Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984; 21: 767-90.
 22. Mazur P. Freezing of living cells: Mechanism and implications. *Am J Physiol Cell* 1984; 16: 125-42.
 23. Kono T, Suzuki O, Tsunoda Y. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 1988; 25: 170-3.
 24. Szell A, Shelton JN. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on day-3 mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1987; 80: 309-16.
 25. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407-26.
 26. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 91-7.
 27. Porcu E, Fabbri R, Seacchiolii R. Intra-cytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. In 10th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction. Monduzzi

- Eds, Bologna, Italy. 1997; 1153-7.
28. Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M, Marrazzi A, Gomez-Gonzalez M. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil Steril* 1998; 69: 555-7.
 29. Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L, Brady T. The effect of cooling human oocytes. *Hum Reprod* 1988; 8: 968-77.
 30. O'Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ. Vitrification of mature mouse oocytes: Improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology* 1997; 34: 295-301.
 31. Van der Elst J, Amerijckx Y, Van Steirteghem A. Ultra-rapid freezing of mouse oocytes lowers the cell number in the inner cell mass of 5 day old in vitro cultured blastocysts. *Hum Reprod* 1998; 13: 1595-99.
 32. Nakagata N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 479-83.
 33. Arav A, Bacci ML, Rubinsk B. Vitrification of immature pig oocytes. In preceding of the 11th International Pig Veterinary Society Congress, Lausanne, 1990; P479 (Abstract).
 34. Wood MJ, Barros L, Candy CJ, Carroll J, Melendez J, Whiltingham DG. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethyl sulphoxide. *Biol Reprod* 1993; 49(3): 489-95.
-