

임상의학분야에서의 수의·축산기술 응용: 인간 난자은행의 설립

임 정 목

포천중문의과대학교 의학과 해부학교실

서울시 강남구 역삼1동 606-5 차병원 여성의학연구소 응용발생학연구실

초 록

수의축산분야에서 개발되어진 생식세포 체외조작기술은 의학 및 생물학을 포함한 생명과학 분야에 광범위하게 이용되고 있다. 특히 생식세포의 생존성을 체외에서 장기간 유지시키는 동결보존 기술은 현재 생식의학분야 첨단의료기술의 발전 및 효율성 향상에 필수적으로 인식되고 있으며, 이에 대한 다양한 연구결과가 소개되고 있다. 본 강의에서는 동결보존기술의 임상적 의미 및 주요 동결기법의 확립과정, 그리고 이를 이용한 최근의 임상연구결과를 간략히 소개하려 한다.

난자은행의 필요성

최근 수의축산분야에서는 생식세포의 체외조작기술을 이용한 가축의 번식성 향상이 활발히 도모되고 있다. 그 결과, 우수품종의 혈통보존 및 우량개체의 복제동물 생산이 이루어질 수 있게 되었으며, 관련학문의 유기적 발전이 계속적으로 진행되고 있다. 인간의 불임증에 관한 치료 및 연구를 수행하는 생식의학 분야도 생식세포 체외조작술을 이용한 다양한 기법들이 개발되어졌으며, 이러한 학문분야는 보조생식술(assisted reproductive technology)이라는 독립된 의료기술로 분류되기에 이르렀다. 보조생식술은 1)hormone 자극을 통한 난포의 발육유도 및 환자로 부터의 발생능력을 가지는 난자의 회수, 2)배양기술

을 이용한 난자의 성숙, 수정 및 작출된 수정란의 체외성장 유도, 3)난관 및 자궁으로의 수정란 이식 및 착상을 위한 자궁내막의 준비(endometrial preparation)의 3가지의 구성요소로 이루어져 있다. 이러한 기술들의 임상적용을 위하여 환자들로부터 회수된 신선난자가 주로 이용되고 있으며, 현재 각 의료기관마다 차이는 있으나 전체 보조생식기술 case 중 약 25~35%의 여성이 임신되어지고 있다. 그러나 다양한 증상을 가진 불임환자들의 신선란만을 이용한 시술은 한계가 있으며, 이를 극복하기 위한 방법으로 난자은행의 필요성이 대두되고 있다. 난자은행의 설립에 의하여 1차 시술과정에서 회수한 잉여난자를 보존한 후 시술이 실패하였을 때 다시 이용할 수 있으며, 난자공여 system의 확립을 통한 선천적 불임증 환자의 수태가능성을 제시할 수 있다. 또한 이러한 의료기술은 현대사회에서 여성의 사회활동을 보조할 수 있는 신개념의 가족계획법으로 이용될 수 있으며, 종양 등의 난치병 환자의 생식기능유지를 위한 방안으로 제시될 수도 있다. 이러한 임상적 중요성을 가진 난자은행의 확립을 위하여 난자의 효율적인 회수 및 체외배양기술, 그리고 회수란의 생존성을 연장할 수 있는 장기보존법등의 기술이 효율적으로 구축되어야 한다.

난자은행의 설립-효율적회수기법 및 체외배양기술

일반적으로 난자의 회수를 위하여서는 1)적출난소의 tissue slicing, 2)개복수술을 통한 난포로부터 난자 직접회수, 3)초음파를 이용한 난포 aspiration법(ultrasound-guided follicle aspiration method; US-aspiration) 등이 소개되어져 있으나, 이들 중 가장 임상적으로 유용한 방법은 US-aspiration 법이다. 지금까지의 보고를 종합하여 볼 때 환자 1인당 5~30개의 난자가 US-aspiration 법에 의하여 회수되고 있으며 본원의 경우 평균 13.6개 정도의 난자가 회수되고 있다. 회수된 난자는 직접 장기보존에 공여되어지거나, 일정 단계까지 발생시킨 후 보존하는 방법이 소개되어져 있으며 이를 위한 체외성숙배양법등의 보조기술들이 개발되고 있다. 일반적으로 난자배양을 위하여 기초 배양액에 hormone 및 혈청등을 첨가한 배지가 이용되고 있으며 본 원의 경우 tissue culture medium-199에 PMSG, hCG, 항생물질 및 serum을 첨가하고 있다.

난자은행의 설립-난자의 생존성연장

난자의 생존성을 유지시키기 위하여 수의축산분야에서 활발히 사용되어지는 동결융해 방법이 이용되고 있다. 성공적인 동결과정을 이행하는데 고려하여야 할 점은 상기과정 중 일어나는 온도 및 세포외 삼투압의 변화, 그리고 동결보호제가 가지고 있는 독성이 난자의 다양한 변화를 야기한다는 점이다. 즉, 동결과정 중 세포내 피질파열, 세포골격, 염색체배열, 난자투명대 및 난자의 형태적인 변화가 야기되어지며(Carroll 등, 1990; Pickering 등, 1990; Park 등, 1997) 이는 즉각적인 난자의 생존성 저하를 초래한다. 지금까지의 연구결과 신선난자와 비교하여 인간 동결난자에서 성숙, 수정 및 발생능의 현저한 감소가 관찰되고 있다(Son 등, 1996). 이러한 동결과정의 부작용을 방지하며 동결보존 후 난자의 생존성을 향상시키기 위하여 여러 가지의 동결방법이 개발되었는데, 우선 $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$ 까지 상대적으로 천천히 ($-0.3\sim-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 난자를 냉각시킨 후 초저온에 정치하는 완만동결법과 영상($4\sim25^{\circ}\text{C}$)에서 직접 초저온에 정치하는 급속동결법으로 대별된다. 후자의 경우 동결과정 중 생성되는 세포내 얼음결정(intracellular ice crystal)을 형성하지 않도록 특수한 동결보호제로 난자를 처리한 후 동결과정을 수행하는 초자화동결법(vitrification)이 최근 주목을 받고 있다. 동결에 공여되는 난자는 회수 직후의 미성숙난자를 이용하거나 체외성숙 과정을 거친 후 작출된 성숙난자를 이용하는 방법이 사용된다.

완만동결법을 이용한 난자의 동결보존

인간 난자의 동결보존을 위하여 완만동결법을 이용한 다양한 방법들이 검토되어졌다. 1986년 Chen 박사의 연구진은 dimethylsulfoxide(DMSO)를 동결보호제로 이용하여 완만동결법에 의하여 성숙난자를 장기간 보존한 후 융해한 난자로부터 임신 및 출산 2중례를 보고하였다. '90년대 이후 완만동결법을 위하여 주로 1,2-propanediol(PROH)이 사용되고 있으며, 가축에서 많이 사용되는 glycerol 및 세포 및 조직의 동결에 사용되는 DMSO는 각각의 동결보호제가 가지고 있는 독성작용으로 인간난자의 동결보존에는 거의 이용되고 있지 않다. Chen박사에 의한 동결란 유래의 임신 및 출산이 성공된 이후 완만동결

법을 이용한 임상응용이 시도되어 지금까지 30례에 가까운 임신 및 출산이 보고되었다. 이는 주로 성숙난자를 이용한 임상결과로서, 미성숙난자 유래의 임신/출산 증례는 1998년 Tucker 등에 의하여 최초로 보고되었다. 소 난자를 공시란으로 선정한 본 연구진의 연구(Lim et al., 1992) 에서 미성숙난자는 성숙란에 비하여 낮은 동결능을 갖고 있다는 사실이 알려졌으며 인간의 미성숙난자를 대상으로 한 실험에서(Son et al., 1996; Park et al., 1997) 미성숙 동결난자는 신선난자에 비하여 낮은 형태적정상성 및 염색체정상성을 갖는다는 사실이 밝혀졌다. 따라서 동물난자의 동결보존과는 달리 인간의 경우 완만동결법의 임상적용은 한계성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

초자화동결법을 이용한 난자의 동결보존

완만동결법이 갖고있는 결점을 보완하기 위하여 초자화동결법이 최근 연구되기 시작하였다. 본 대학이 보유하고 있는 초자화동결기술은 동결보호제로 ethylene glycol을 사용하며 oocyte vehicle로 열 전도성이 우수한 electron microscopic grid가 이용된다. 용해과정은 sucrose 용액을 이용한 5단계 용해법이 사용되고 있다. 이러한 초자화동결법은 완만동결법에 비하여 간단하고 기자재가 필요없으며 난자에 유해한 세포내 얼음결정이 형성되지 않는다는 장점을 가지고 있다. 초자화동결법으로 보존된 미성숙 및 성숙난자의 발생능을 비교하였을 때 완만동결법 수행 후에 나타나는 미성숙난자와 성숙난자 간의 발생능 차를 발견할 수 없었으며 동결당시의 성숙단계에 관계없이 배반포까지의 발생이 가능하였다(Chung 등 1999). 상기방법의 안정성을 검토하기 위하여 동결란 유래 배반포의 염색체 정상성을 검사한 결과 조사란 모두에서 정상염색체 수가 관찰되었으며 이러한 결과로부터 초자화 동결법은 인간난자의 동결보존에 이용될 수 있는 유효한 기법이라는 사실을 확인하였다.

난자은행의 임상적 응용

본 대학의 연구진은 다낭성난포증후군(polycystic ovarian syndrome; PCOS) 환자의 치료효율성 향상을 위하여 미성숙난자의 초자화 동결보존기법을 이용하고 있다. PCOS환자는 내분비성 불임질환으로 hyperandrogenemia 및 비정

상적 FSH:LH ratio에 의하여 발생능력을 가지지 않는 미성숙난자가 다수 회수된다. 이런 환자의 치료를 위하여 총 14명의 PCOS환자로부터 잉여 미성숙난자를 채취하여 초자화동결법에 의하여 동결보존 후 체외성숙 및 수정을 행하였다. 그 결과 동결난의 83%가 용해 후 형태적정상성을 유지하였으며 상기 난자의 성숙 및 수정율은 각각 68%를 나타내었다. 체외수정 후 전핵을 형성한 수정란의 90%가 체외 발생배양 후 분할하였기 때문에 동결기법 및 보조생식술을 이용한 수정란 이식이 현재 준비중이다. 성숙란을 이용한 난자은행설립의 경우, 현재 총 7명의 환자에게 동결성숙란을 체외수정 및 배양 후 이식하여 이중 3명의 환자가 임신에 성공하였으며, 이중 1명의 환자가 최근 정상아를 자연분만 하였다. 이와는 별도로 난자은행을 위하여 확립된 초자화동결법을 배반포의 동결보존에 이용한 결과 20명의 이식환자 중 5명에서 임신이 확인되었으며, 최근 1명의 환자가 쌍태아를 분만하였다. 이러한 임상시술 성공으로부터 난자은행 유래의 난자를 체외수정 및 수정란 이식에 공여하는 program은 보다 효율적인 불임치료술 발전을 위하여 적극적으로 이용되어질 전망이다.

맺음 말

수의축산분야에서 개발되어진 동결보존은 현재 생식의학의 불임치료시술에 적극적으로 이용되어지고 있다. 이러한 기술을 토대로 구축된 “난자은행”은 기존 보조생식기술의 효율성증진 뿐만 아니라 선천적 불임증에 고통받고 있는 환자 및 현대사회의 여성의 활동력 증진을 위한 유용한 임상 system으로 빠르게 발전될 것이다

참고문헌

Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. J Reprod Fertil 1990;90:547-53.

Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet

1986;1:884-6.

Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, Han SY, Choi DH, Cha KY. In vitro blastocyst formation of human oocytes retrieved from unstimulated and stimulated cycles following vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* 1999 (in press).

Lim JM, Fukui Y, Ono H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 1992;37:351-361.

Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;54:102-8.

Park SE, Son WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil Steril* 1997;68:920-926.

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

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